

カビ毒分析法

イムノクロマト

昭和電工株式会社

<http://www.autoprep.jp>



キット内容: (24テスト/箱)

- テストストリップ
- 抗体金コンプレックスコートウェル
- マイクロウェルホルダー
- 希釈液

検出限界:

- 4 ppb用
- 10 ppb用
- 20 ppb用

適用:

コーン、米、ピーナッツ、DDGS、大豆カス

(DDGS: トウモロコシ発酵後の残さ)

イムノクロマト AgraStrip Aflaキット

➡ 測定原理 操作手順 基礎データ

境界値付近での測定精度
測定者によるばらつき
ロット再現性
保存安定性
本キットの測定精度
イムノクロマトの利点と制限

ワンステップラテラルフロー法によるイムノクロマト法であり、簡易な定性分析が行うことができる。

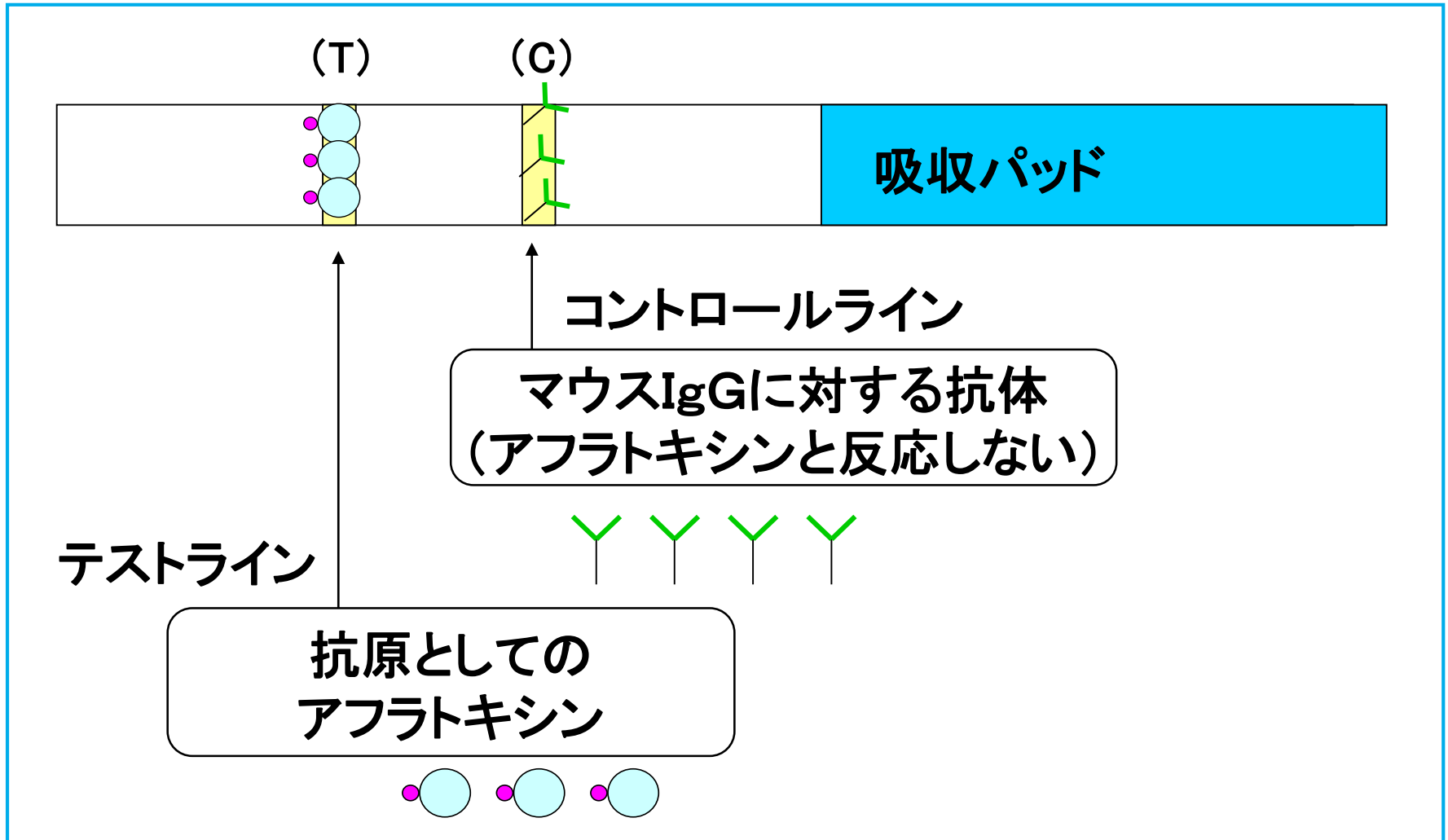
測定結果は、アフラトキシンB₁ およびその類縁体の総和 (総アフラトキシン量)として得られる。

交差反応

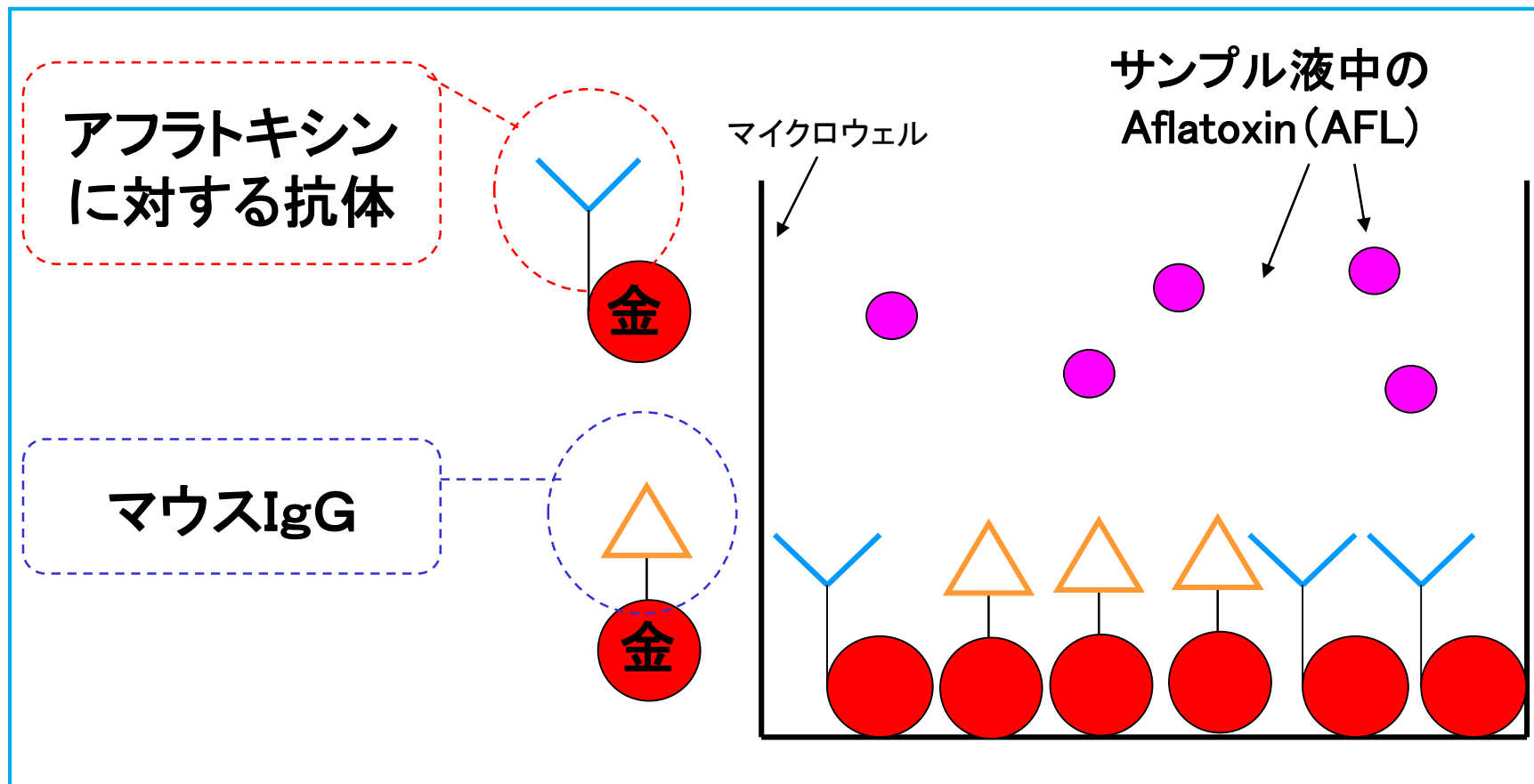
B ₁	100%
B ₂	76%
G ₁	70%
G ₂	42%



測定原理： 試験紙の仕組み



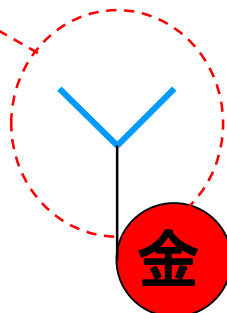
測定原理： サンプル液の調整



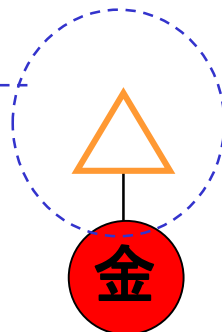
試料抽出液と抗体-金コンプレックスを混合する

測定原理： サンプル液の調整

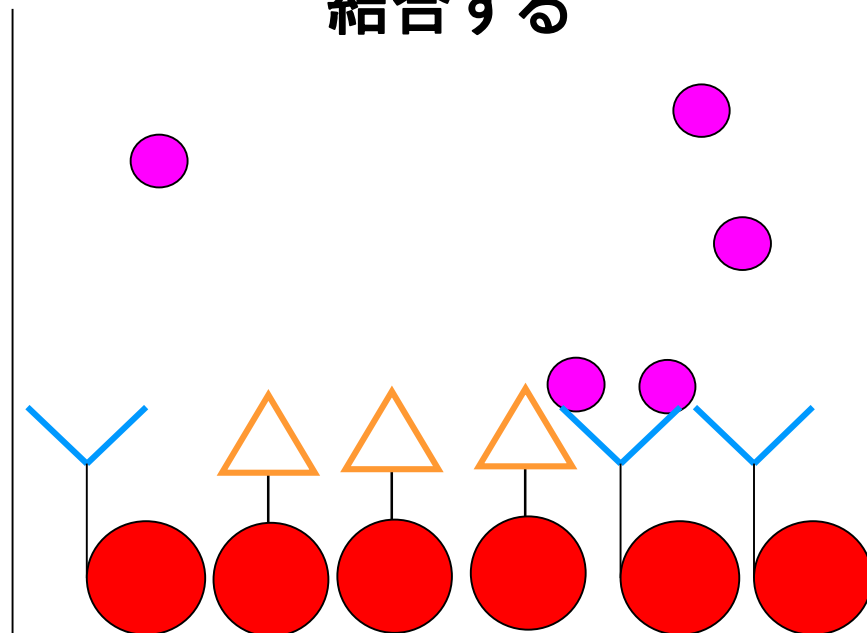
アフラトキシン
に対する抗体



マウスIgG

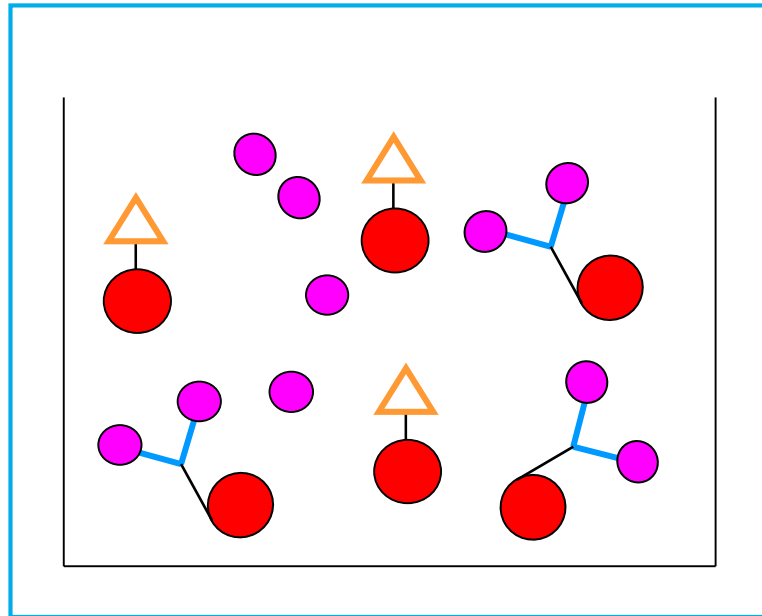


試料中のアフラトキシンは、
抗体-金コンプレックスと
結合する

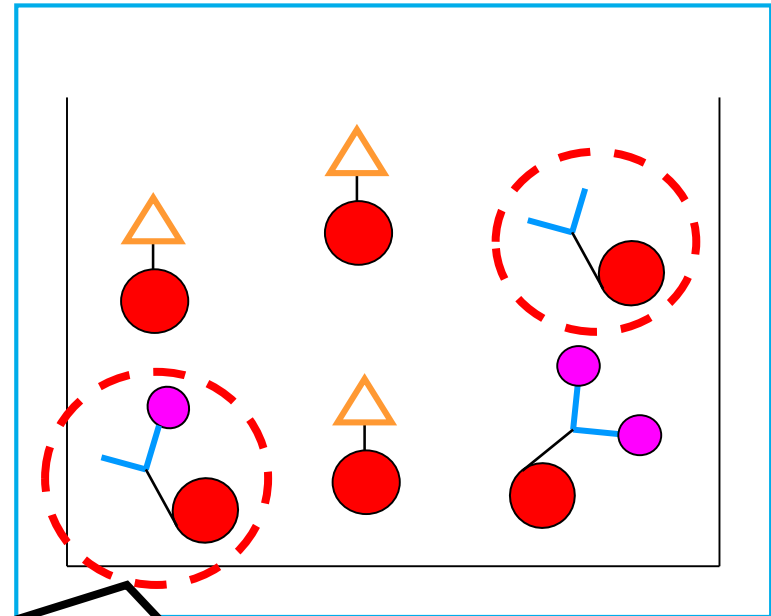


測定原理： サンプル液の状態

AFL汚染が高いとき



AFL汚染が低いとき

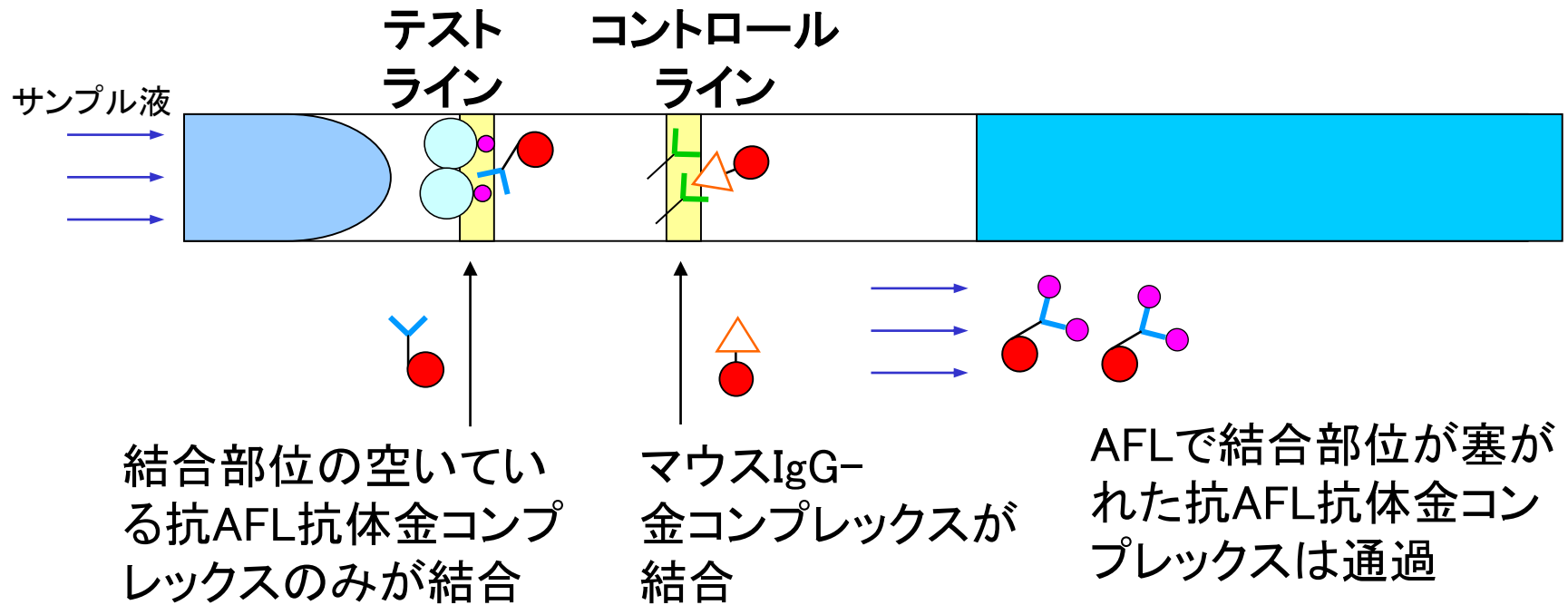


汚染の低い場合

アフラトキシンの結合していない
抗体-金コンプレックスが残る

試料中のAFLが、抗AFL抗体-金コンプレックスのAFL結合部位を塞ぐ

測定原理： 試験紙での反応



混合液を試験紙に吸収させる

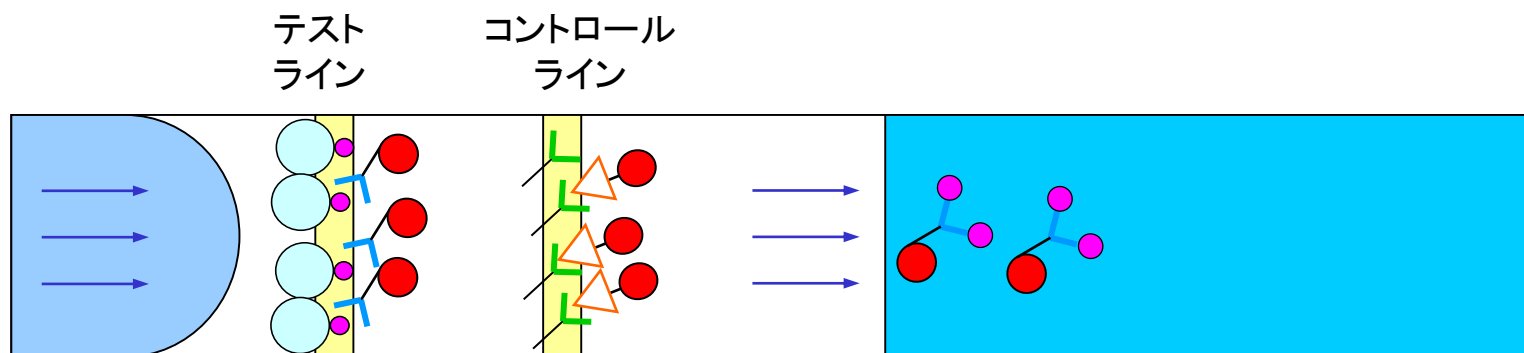
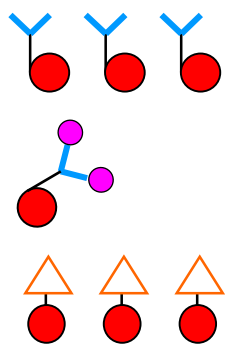
境界値より低濃度の場合

アフラトキシン濃度が境界値より低い場合

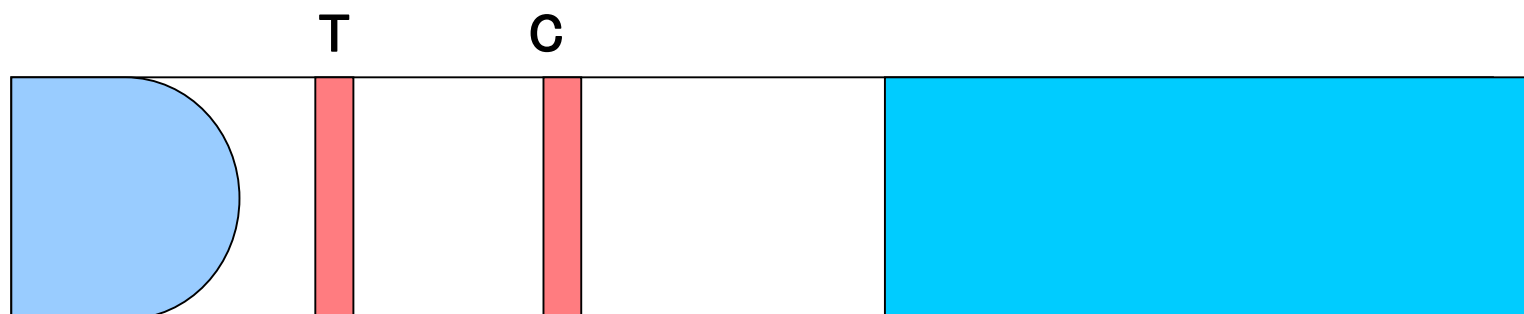
→2本の赤いラインが観察される

(テストライン、コントロールライン)

サンプル液



結果



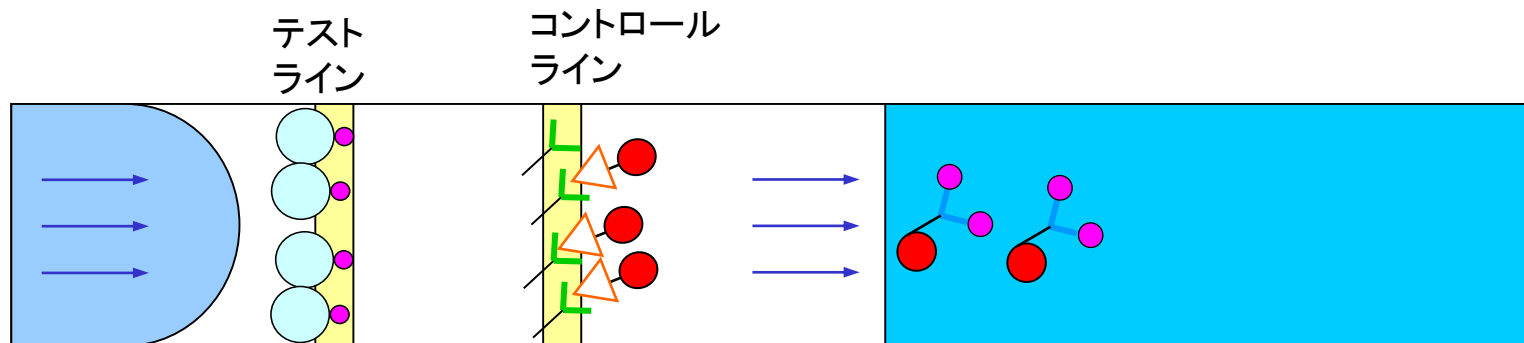
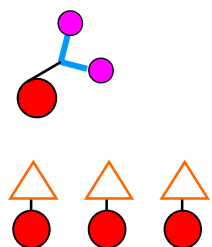
境界値より高濃度の場合

アフラトキシン濃度が境界値より高い場合

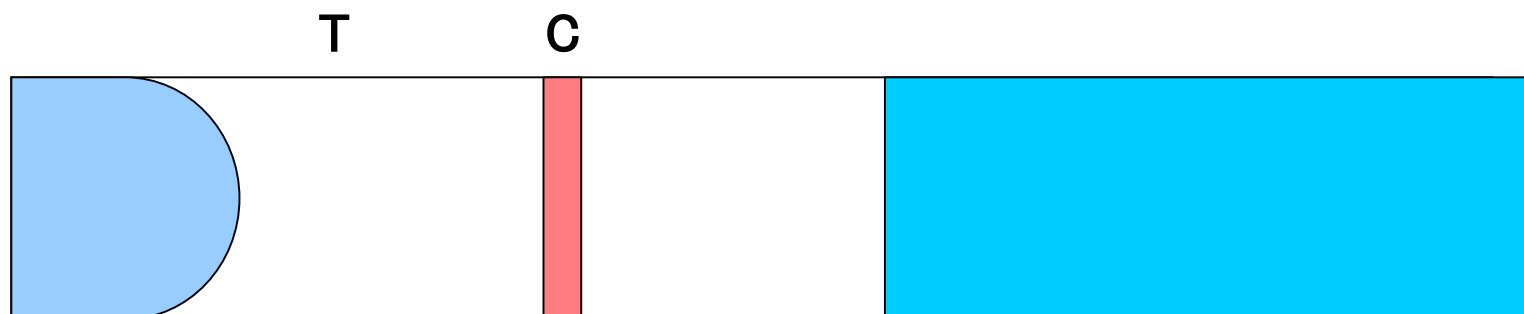
→1本の赤いラインが観察される

(コントロールラインのみ)

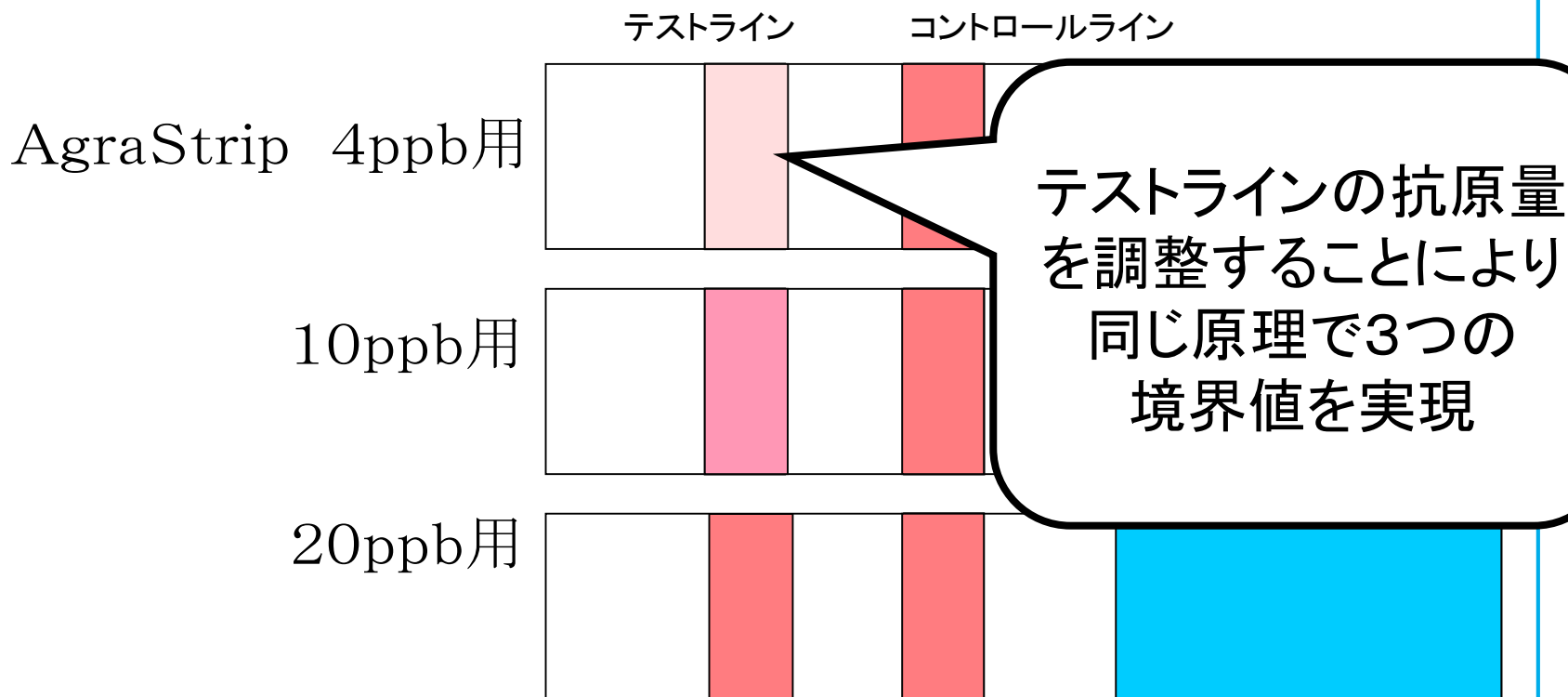
サンプル液



結果



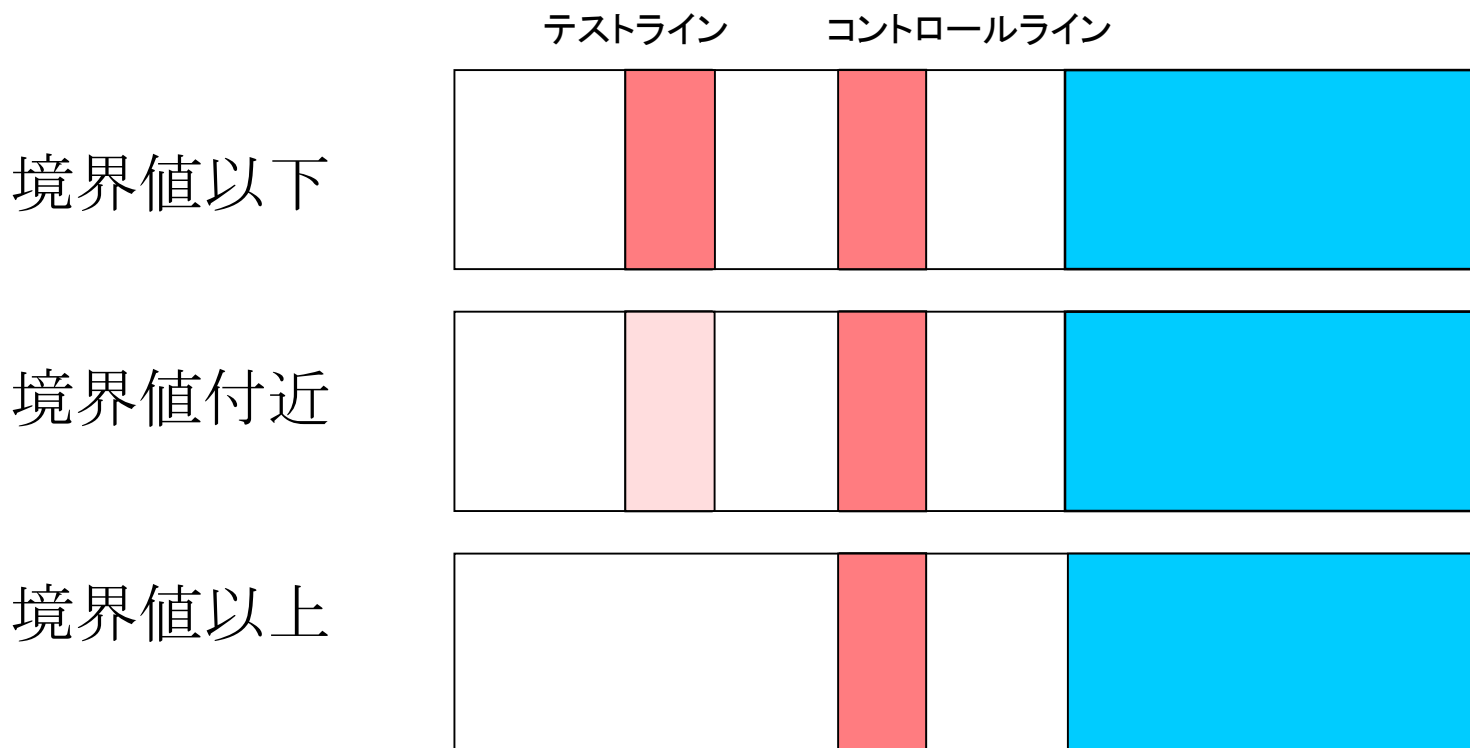
各ストリップでの陰性サンプル測定結果



汚染度に応じた濃さのラインが形成される

測定原理： 結果判定

試料中のアフラトキシン濃度



汚染度に応じた濃さのラインが形成される

イムノクロマト AgraStrip Aflaキット

測定原理

➔ 操作手順

基礎データ

境界値付近での測定精度
測定者によるばらつき
ロット再現性
保存安定性
本キットの測定精度
イムノクロマトの利点と制限

操作手順-1

Autoprep®



キット内容: (24テスト/箱)

- テストストリップ
- 抗体金コンプレックスコートウェル
- マイクロウェルホルダー
- 希釈液

保存: 2~25 °C

有効期限: 製造より18ヶ月

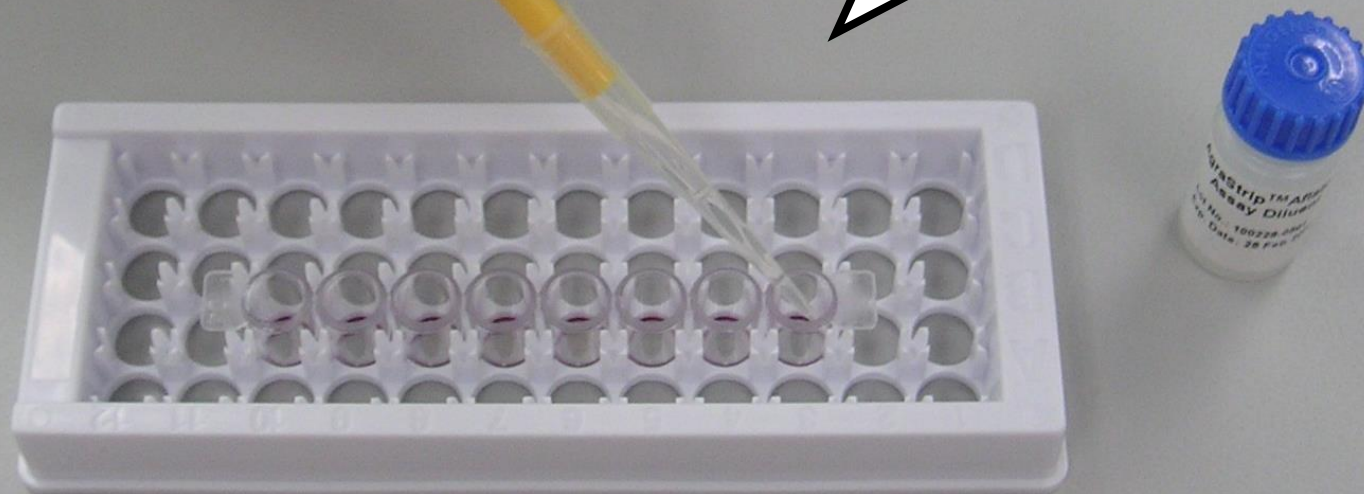
キット内容物を室温に戻す

操作手順-2

Autoprep®

希釈液 50 μ L を各マイクロウェルに注入し
5回のピペッティング操作(出し入れ)により混ぜる

ポイント
ウェル壁面から
金コンプレックスを
しっかり剥がす



操作手順-3

Autoprep®

サンプル抽出液50 μ L を各マイクロウェルに加え
3回のピペッティング操作(出し入れ)により混合する



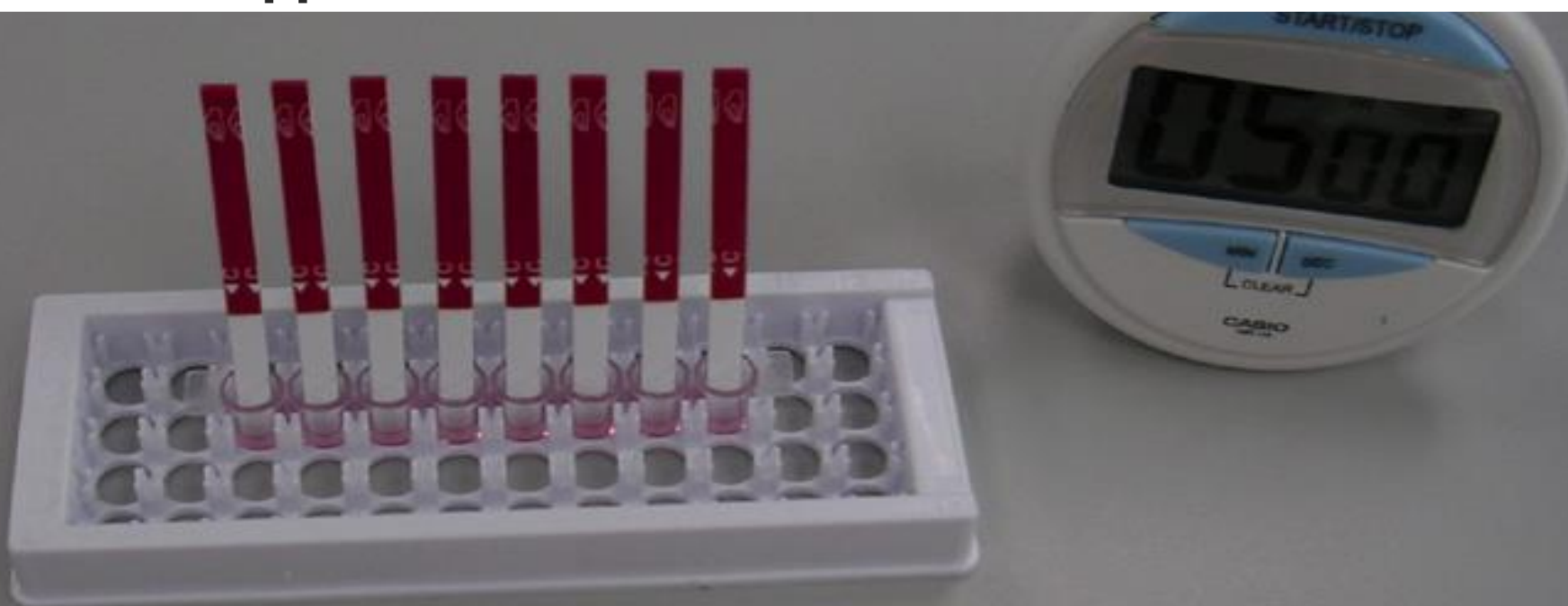
- サンプル抽出: 20 g 粉砕サンプル に 40 ml 70v/v% メタノールを加えて 1分攪拌後ろ過する

操作手順-4

Autoprep®

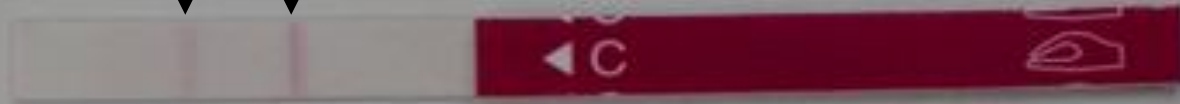
テストストリップを各マイクロウェルに挿入し
5分間 静置

ただし、20 ppb用キットでは、陰性サンプルは1分以内に反応が完了する



結果判定

テストライン コントロールライン



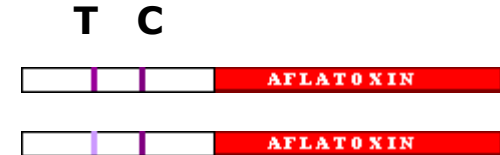
ポイント

ストリップ表面を保護すれば、
結果を保存することが可能

結果判定方法

陰性:

アフラトキシンが
検出限界レベル以下の場合
(テストライン と コントロールラインの2ライン)



陽性:

アフラトキシンが
検出限界レベル以上の場合
(コントロールライン のみに 1ライン)



無効結果:

コントロールラインがない場合



イムノクロマト AgraStrip Aflaキット

測定原理

操作手順

➔ **基礎データ**

境界値付近での測定精度

測定者によるばらつき

ロット再現性

保存安定性

本キットの測定精度

イムノクロマトの利点と制限

境界値付近での検出精度

AgraStrip 10 ppbキットによるコーンへのスパイク試験では、
8~9 ppbの時に50%陽性を示し、10 ppb以上では100%陽性を示した。

試験方法: 使用キット数; 1(1ロット)

測定試料; 非汚染コーン試料 1種×5濃度 にスパイクして使用 (スパイク液 B1:B2:G1:G2=10:1:1:1)

スパイク濃度 (ppb) ; 8, 9, 10, 11, 12

測定者; 1名

1. 試料を5濃度にスパイクし、スパイク試料から抽出液を作成した。
2. 各濃度の試料を それぞれ4枚の試験紙で測定した。

cut-off値10ppbの試験結果

コーンにスパイクしたトータルアフラトキシン	B1換算スパイク濃度	測定結果				判定
8 ppb	7.3 ppb	2 lines (100%)	2 lines (100%)	1 lines (100%)	1 lines (100%)	50% negative, 50% positive
9	8.2	2 lines (100%)	2 lines (100%)	1 lines (100%)	1 lines (100%)	50% negative, 50% positive
10	9.1	1 lines (100%)	1 lines (100%)	1 lines (100%)	1 lines (100%)	100% positive
11	10.1	1 lines (100%)	1 lines (100%)	1 lines (100%)	1 lines (100%)	100% positive
12	11.0	1 lines (100%)	1 lines (100%)	1 lines (100%)	1 lines (100%)	100% positive

AgraStripテストキットは、厳しめに設計されているため
擬陰性判定がない

測定者によるばらつき(スパイク試料)

本キットによるコーン試料検出は測定者による違いがない。

操作がシンプルなため、操作の違いによる結果の相違が出にくい方法。

試験方法: 使用キット数; 3 (cut-off値3種×1ロット)

測定試料; 非汚染コーン試料 1種×3セット×9濃度 にスパイクして使用 (スパイク液 B1:B2:G1:G2=10:1:1:1)

スパイク濃度(ppb); 0, 2, 5, 6, 10, 15, 20

B1換算スパイク濃度(ppb); 0, 1.8, 4.6, 5.5, 9.1, 13.7, 18.8

測定者; 3名(各1セット測定)

1. 試料を9濃度にスパイクし、スパイク試料から抽出液を作成した。
2. 各cut-off値に適した濃度の抽出液を組み合わせ、検出した(組み合わせは表中に記載)。

表1. cut-off値4ppbの試験結果

Spiked Total Aflatoxin in corn (ppb)	Analyst 1	Analyst 2	Analyst 3	Scores*	Results	Comments
0	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
2	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
6	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good
10	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good

測定者によるばらつき(スパイク試料)

試験結果(続き)

表2. cut-off値10ppbの試験結果

Spiked Total Aflatoxin in corn (ppb)	Analyst 1	Analyst 2	Analyst 3	Scores*	Results	Comments
0	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
5	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
15	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good
20	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good

表3. cut-off値20ppbの試験結果

Spiked Total Aflatoxin in corn (ppb)	Analyst 1	Analyst 2	Analyst 3	Scores*	Results	Comments
0	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
15	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
25	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good
30	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good

AgraStripは操作がシンプルなため、試験者による違いが出にくいキットである
(コーンへのスパイク試料による試験)

測定者によるばらつき(自然汚染試料)

本キットによるコーン試料検出は測定者による違いがない。

操作がシンプルなため、操作の違いによる結果の相違が出にくい方法。

試験方法: 使用キット数; 3 (cut-off値3種×1ロット)

測定試料; 非汚染コーン試料 1種×3セット

自然汚染コーン試料 1種(12.2ppb)×3セット

(cut-off値4ppbの試験には12.2ppbの試料を2倍希釈して使用した)

測定者; 3名(各1セット測定)

1. 各試料から抽出液を作成した。
2. 各cut-off値に適した濃度の抽出液を検出した。

表1. cut-off値4ppbの試験結果

Spiked Total Aflatoxin in corn (ppb)	Analyst 1	Analyst 2	Analyst 3	Scores*	Results	Comments
0	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
6.1	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good

表2. cut-off値10ppbの試験結果

Spiked Total Aflatoxin in corn (ppb)	Analyst 1	Analyst 2	Analyst 3	Scores*	Results	Comments
0	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
12.2	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good

測定者によるばらつき(自然汚染試料続き)

試験結果(続き)

表3. cut-off値20ppbの試験結果

Spiked Total Aflatoxin in corn (ppb)	Analyst 1	Analyst 2	Analyst 3	Scores*	Results	Comments
0	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	2 Lines (100%)	100%	Negative	Good
24.6	1 Line (100%)	1 Line (100%)	1 Line (100%)	100%	Positive	Good

AgraStripは操作がシンプルなため、試験者による違いが出にくいキットである
(自然汚染コーンによる試験)

ロット再現性

本キットによるコーン試料検出について、定性的にはロット間の違いはない。

操作がシンプルなため、操作の違いによる結果の相違が出にくい方法。

試験方法: 使用キット数; 3 (cut-off値 × 1ロット)

測定試料; 各20 gずつ

境界値4 ppbの場合 境界値10 ppbの場合

非汚染コーン試料 (<2 ppb) 1種 (<2 ppb) 1種















自然汚染コーン試料 (6.3 ppb) 1種* (12.6 ppb) 1種

* 自然汚染コーン12.6 ppb (HPLCによるB1濃度: 12.0 ppb)の抽出液を2倍希釈したものを使用。

測定者; 1名

測定方法: 1キット当たり3連で測定した

AgraStripテストキットは
ロット間の再現性に優れている

AgraStrip 境界値	Lot No.	非汚染コーン <2 ppb 2本ラインがあれば合格	自然汚染コーン Tライン(1本)があれば合格
Cut-off値4 ppbの試験結果	ロットA		(自然汚染濃度 6.3 ppb) 
	ロットB		
	ロットC		
Cut-off値10 ppbの試験結果	ロット1		(自然汚染濃度 12.6 ppb) 
	ロット2		
	ロット3		
	ロット4		

保存安定性 (AgraStrip 4 ppb)

キットは常温保管が可能。

保存温度と期間で得られた結果より、イムノクロマトキットは4~37 °Cのいずれの保管条件でも安定した測定結果が得られることがわかりましたので、2~25 °Cで、保存することをお奨めする。

試験方法: (GIPSA認証試験) 使用キット数; 3 (cut-off値3種×1ロット)

測定試料: 非汚染 1種およびアフラトキシン添加コーン試料 3種 各20 g

測定者: 1名

各濃度の試料から抽出液を用事調整し、1キット当たりそれぞれ3枚の試験紙で測定した。

USDA/GIPSA提出 温度安定性データ
AgraStrip 4 ppbは
37 °C×1ヶ月保管後も、性能OK

1. 各製品4箱を、4, 21, 37 °Cにそれぞれ保存した。毎週各製品各温度から1箱を取り、同じ試料の検査を行った。

Cut-off値 4 ppbの試験結果

保管温度 (°C)	保管期間 (日)	4 °C保管 相当期間	アフラトキシン0 ppbスパイクコーン B1換算濃度 0 ppb				アフラトキシン6 ppbスパイクコーン B1換算濃度 5.5 ppb			
			セット1	セット2	セット3	判定	セット1	セット2	セット3	判定
4	7	7	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	14	14	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	21	21	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	28	28	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
21	7	35	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	14	70	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	21	105	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	28	140	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
37	7	105	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	14	210	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	21	315	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	28	420	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive

本キットは常温保管が可能

保存安定性 (AgraStrip 10 ppb)

キットは常温保管が可能。

保存温度と期間で得られた結果より、イムノクロマトキットは4~37℃のいずれの保管条件でも安定した測定結果が得られることがわかりましたので、2~25℃で、保存することをお奨めする。

試験方法: (GIPSA認証試験) 使用キット数: 3 (cut-off値3種×1ロット)

測定試料: 非汚染 1種およびアフラトキシン添加コーン試料 3種 各20g

測定者: 1名

各濃度の試料から抽出液を用事調整し、1キット当たりそれぞれ3枚の試験紙で測定した。

USDA/GIPSA提出 温度安定性データ
AgraStrip 10 ppbは
37℃×1ヶ月保管後も、性能OK

1. 各製品4箱を、4, 21, 37℃にそれぞれ保存した。毎週各製品各温度から1箱を取り、同じ試料の検査を行った。

Cut-off値 10ppbの試験結果

保管温度 (°C)	保管期間 (日)	4℃保管 相当期間	アフラトキシン6 ppbスパイクコーン				アフラトキシン15 ppbスパイクコーン			
			B1換算濃度 5.5 ppb				B1換算濃度 13.7 ppb			
			ヤット1	ヤット2	ヤット3	判定	ヤット1	ヤット2	ヤット3	判定
4	7	7	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	14	14	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	21	21	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	28	28	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
21	7	35	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	14	70	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	21	105	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	28	140	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
37	7	105	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	14	210	2 lines	2 lines	N.A	Negative	1 lines	1 lines	N.A	Positive
				(not enough strip)				(not enough strip)		
	21	315	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive
	28	420	2 lines	2 lines	2 lines	Negative	1 lines	1 lines	1 lines	Positive

本キットは常温保管が可能

- 境界値付近での測定精度
擬陰性がでないよう 厳しめに設計されている
- 測定者によるばらつき
操作がシンプルなため
試験者による違いが出にくいキット
- ロット再現性
ロット再現性に優れている
- 保存安定性
4～37 °Cでの過酷試験に耐えるキットなので
常温保存が可能

利点:

- 迅速分析
- シンプルな操作手順
- 検査結果(試験紙)を保存可能
- 常温保存が可能(2~25 °C)
- 複数サンプル同時テスト
- 現場で使用可能
- 分析用機器必要なし

制限:

- 検出限界(ボーダーライン)付近レベルの判定が困難

カビ毒用検査キット(ラテラルフロー試験紙)

品名	境界値	本数/箱	測定時間 (抽出を除く)	希望小売価格*
AgraStrip™ Afla4	4 ppb	24	7分	38,000
AgraStrip™ Afla10	10 ppb	24		38,000
AgraStrip™ Afla20	20 ppb	24		38,000

*別途、消費税を申し受けます。