

日本語マニュアル

「CTX-ELISA™1B」操作説明書

CSI 品番 : 8100

Wako 品番 : 382-14341

本キットには 2 x 96 検体の検査に十分な以下の試薬類が含まれます。

品番	試薬/材料 (表記名称)	数量
8111	x 20 プレート洗浄液, W-1 (Plate Wash Buffer x20 Conc., W-1)	1 x 50 mL
8112	試料希釈液, D-1 (STD/Sample Diluent, D-1)	1 x 50 mL
8113	標識抗体希釈液, D-2 (Anti-CTX1B-ALP Diluent, D-2)	1 x 50 mL
8114	比色測定用 ALP 基質溶液, R-1 (ALP Substrate Solution, R-1 (pNPP))	1 x 50 mL
8115	抗体固相化マイクロプレート (ELISA Assay Plate, CTX1B)	2 枚
8116	アルカリフォスファターゼ標識抗体 (Anti-CTX1B-ALP)	1 x 250 μ L
8117	CTX1B 標準抗原 ^{注1} 5 ng/mL (CTX-1B STD 5 ng/mL, 100 μ L)	1 x 100 μ L
--	粘着マイクロプレートシール	6 枚
--	簡易説明書 (英文)	1 冊

保存条件 : 製品受け取り後できるだけ速やかに 2~8°C に保存

有効期限 : 箱側に記載

^{注1} CTX1B 標準抗原には東北大学名誉教授 平間正博博士から提供された合成シガトキシン 1B を使用しています。この標準抗原の濃度は、東北大学名誉教授 安元健博士より提供された天然型シガテラ毒 CTX1B をスタンダードとして、本 ELISA キットで測定した標準曲線を用いて検定しております。

合成及び天然型 CTX1B の検量線の比較試験は本マニュアルの最後に記載しました。

* ご使用前にこの操作マニュアルを良く読み、付属の試薬類が上記付属品リストと一致していることをご確認ください。

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

目 次

1. はじめに	16
2. 測定方法の概要	16
3. 使用上の注意	17
4. キット付属品と保存条件	17
5. その他必要な試薬・機材	18
6. 試薬類の調製方法	18
7. 検査試料の調製	19
8. 測定手順	20
9. 測定結果から含有量の算出	21
10. 技術的ヒント	22
11. 参考文献	23
12. 合成及び天然型 CTX1B の検量線比較	24
13. 比色法と蛍光測定法の代表的な検量線	24
14. 品質規格	25

* 本説明書で使用する省略語

アルカリフォスファターゼ：ALP、シガテラ毒：CTX、酵素結合免疫測定法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)：ELISA

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

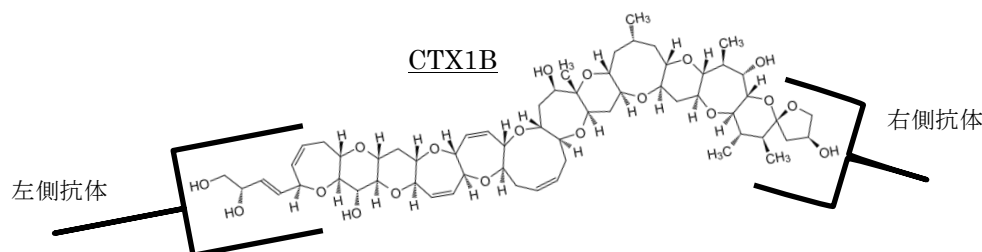
1. はじめに

亜熱帯や熱帯の珊瑚礁に囲まれた地域では、一年間に5万人以上の人々が「シガテラ」と呼ばれる、毒化した魚介類による食中毒に苦しんでいます。この中毒は16~17世紀の大航海時代から報告されていましたが、その原因物質は最近まで特定されていませんでした。

しかし、1976年にその原因となる毒素を生産するのは、渦鞭毛藻(Dinoflagellate) *Gambierdiscus toxicus* であり、食物連鎖により藻食魚から肉食魚へと蓄積されることが東北大学の安元健博士により明らかにされました。更に、1989年に安元健博士らは、4トンの毒ウツボから0.35 mgのシガトキシン (CTX1B) を単離し、化学構造を決定しました。その後、安元博士やLewis博士ら多くの研究者によって、20種以上のシガトキシン同族体 (CTXs) の構造が決定されています。

近年、東北大学の平間正博博士のグループが、主に太平洋に分布する4種類のCTX類 (CTX3C, CTX1B, 51-hydroxyCTX3C, 54-deoxyCTX1B) の化学合成に挑戦し、その人工合成に成功しました。そして彼の共同研究者である大阪府立大学教授 円谷健博士は合成したCTX類の部分構造を抗原として数種類の単クローン抗体 (mAb) の製造に成功しました。

これらの研究に基づいて、0.2~0.0005ppbの広い濃度範囲でCTX1Bと54-deoxyCTX1Bを検出できる新しいELISAキット「CTX-ELISA™1B」を開発し、世界で初めて製品化致しました。本キットの検出感度はFDAが定めた指導基準である“0.01ppb”よりはるかに優れているため、シガテラ食中毒の予防だけでなく、疫学および生理学的研究にも有用です。



2. 測定方法の概要

この検査キットはCTX1Bの左側と右側に結合するモノクローナル抗体2種類を用いた定量的酵素結合免疫測定法 (ELISA) を利用しています。測定操作概要は以下のとおりです。

- ① マイクロプレート表面に結合させた左側の抗体で目的の抗原を捕獲します。
- ② 捕獲した抗原にALPを標識した右側抗体を結合させます。
- ③ ALPの発色基質または蛍光基質を加え、抗原の量に比例して結合したALP標識右側抗体で基質を発色物質または蛍光物質に変換します。
- ④ 発色または蛍光の強度をマイクロプレートリーダーで計測し、数値化します。
- ⑤ 標準抗原で検量線を作成し、測定試料の吸光度または蛍光強度値を元に試料中のCTX1Bの含有量を計算します。

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

操作手順

1. 洗浄液、検査試料を指示通りに準備する
2. CTX1B 標準液、検査試料、ブランク用の D-1 を抗体固相化マイクロプレートに 100 μ L ずつ分注
 ↓
 37°C または室温で 30 分インキュベート
3. プレートの液を捨て、各ウエルを 200 μ L のプレート洗浄液で 3 回洗浄
 ↓
4. ALP 標識抗体溶液を指示通りに希釈し、各ウエルに 100 μ L ずつ加える
 ↓
 37°C または室温で 30 分インキュベート
5. プレートの液を捨て、各ウエルを 200 μ L のプレート洗浄液で 3 回洗浄
 ↓
6. R-1 を各ウエルに 200 μ L ずつ加える
 (高感度蛍光検出の場合は各基質キットの説明書に従って下さい)
 ↓
 37°C で 30~45 分インキュベート
7. 測定波長 405nm、対照波長 490nm にセットしマイクロプレートリーダーで吸光度を測定
 (蛍光測定法の場合は使用する基質に合わせて蛍光波長と励起波長をセットして下さい)

3. 使用上の注意

- * 本品は研究用試薬です、食品の検査及び臨床検査には使用できません。
- * 本キットを受け取り後はできるだけ速やかに冷蔵庫に入れて下さい、なお凍結は厳禁です。
- * 検査キットの箱側面に表示した使用期限までにご使用下さい。
- * このキットは CTX1B 及びその同族体の検査専用であり、その他の CTX 類は検出できません。
- * 本キットに含まれる試薬類を保存する時は強い光を避けて各試薬類の指定保存条件をお守り下さい。
- * 本キットの試薬 W-1, D-1, D-2 には界面活性剤が含まれています。強く攪拌すると持続性の泡が発生し測定誤差が大きくなる原因になります、攪拌は緩やかに行って下さい。
- * それぞれの試薬類には抗菌剤や殺菌剤が含まれています、使用する場合は手袋、マスク、保護衣などを着用して試験試料や試薬類に直接触れない様に注意して下さい。
- * 試薬類の廃棄は各国や地域、自治体で定められた方法に従って下さい。

4. キット付属品の保存条件

- * 使用前のキットは箱に入れたまま 2~8°C で冷蔵保管して下さい、冷凍保存はできません。
 開封後は下表の保存条件に従って下さい。

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

試薬/材料（表記名称）	保存条件
x 20 プレート洗浄液, W-1 (Plate Wash Buffer x20 conc. W-1)	冷蔵/室温 希釈後は室温保存
試料希釈液, D-1 (STD/Sample Diluent, D-1)	冷蔵/室温
標識抗体希釈液, D-2 (Anti-CTX1B-ALP Diluent, D-2)	冷蔵/室温
比色測定用 ALP 基質溶液, R-1 (ALP Substrate Solution, R-1 (pNPP))	冷蔵/凍結厳禁
抗体固相化マイクロプレート (ELISA Assay Plate, CTX1B)	冷蔵/凍結厳禁
アルカリフォスファターゼ標識抗体, (Anti-CTX1B-ALP)	冷蔵/凍結厳禁
CTX1B 標準抗原 * * 5 ng/mL, (CTX-1B STD 5 ng/mL, 100 µL)	冷蔵/凍結可
粘着マイクロプレートシール	
簡易説明書（英文）	

5. その他必要な試薬・機材

1. マイクロプレートリーダー：波長 405nm 及び 490nm の 2 波長が設定できる機種、波長 490nm が設定できない場合は 405nm だけで吸光度を測ります。
2. 100~200 µL を分注できる使い捨てチップを使用する 6 または 12 チャンネルのマルチチャンネル分注器、及び 10~1,000 µL を分注する使い捨てチップを使用するマイクロピペット
3. CTX1B 標準液の作成及び検査試料調製用のガラス製試験管またはバイアル
4. 洗浄液作成用のガラス製またはプラスチック製の 1 L 瓶
5. 洗浄液、ALP 標識抗体溶液、R-1 を分注するための使い捨てリザーバー
6. 超純水・精製水
7. 化学グレードのアセトン及びジメチルスルフォキシド (DMSO)
8. 超音波破碎機、ホモジェナイザー等の魚肉粉碎用機材
9. 高速遠心分離機
10. 自動マイクロプレート洗浄装置（無くても良い）
11. マイクロプレートミキサー
12. 対数または標準グラフ用紙または ELISA 用ソフトウェアの付いたコンピューター
13. 高感度蛍光測定の場合、以下の ALP 蛍光基質キット及び蛍光マイクロプレートリーダーが必要です。
 - ① AttoPhos[®] AP Fluorescence Substrate System; Cat. #S1000, Promega, WI USA
 - ② QuantiFluo[™] Alkaline Phosphatase Assay Kit; Cat. #QFAP-100, Bioassay Systems, CA USA

6. 試薬類の調製方法

* 全ての試薬類は使用前に室温に戻して下さい。

* 標準抗原の作成や検査試料の希釈系列を作成する場合、ガラス製の試験管またはバイアルの使用を推奨します。プラスチック容器は CTX の濃度を低下させる可能性があります。希釈した試料や標準抗

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

原をマイクロプレートに注入するための使い捨てプラスチックチップは、短時間に限り使用出来ます。

- ① プレート洗浄液： W-1 全量 (50 mL) を 1 L の蓋付き容器に入れ、精製水 950 mL に加えて全量 1 L として静かに混合し、容器の蓋をして室温保存して下さい。

* 保存中に目視できる濁りが発生した場合は使用しないで下さい。

- ② ALP 標識抗体溶液：

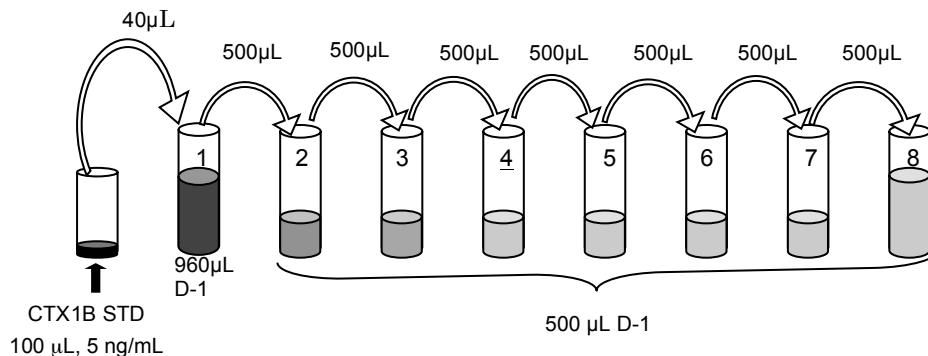
* 15 mL のプラスチック試験管を使い、抗体固相化マイクロプレート 1 枚当たり 11 mL を目安として、必要とする最小量を製造して下さい。過剰に作製しないこと。

使用直前に、ALP 標識抗体を D-2 で下記の濃度に希釈して下さい。なお希釈した標識抗体は保存できません、速やかにご使用下さい。残った ALP 標識抗体は冷蔵庫に保存して下さい。

比色法の場合 1/100, 蛍光測定法の場合 1/200~400

- ③ CTX1B 標準液の調製： 使用直前に行うこと。

洗浄したガラス製試験管またはガラスバイアル瓶を 8 本準備します。D-1 を分注して、960 μ L を 1 本、500 μ L を 7 本作成します (図参照)。CTX1B 標準抗原 5 ng/mL をロングタイプのピペットチップを付けたマイクロピペットで正確に 40 μ L をはかり取り、960 μ L の D-1 と混合して 200 pg/mL の CTX1B 標準液を作成します。500 μ L の D-1 を分注したガラス試験管またはバイアル瓶で 1/2 段階希釈を行い、200~1.56 pg/mL の検量線用 CTX1B 標準溶液を作成します。未使用の CTX1B 標準抗原 (CTX1B STD 5 ng/mL) は蓋をして冷蔵保管して下さい。



Vial No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Conc. pg/mL	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56

7. 検査試料の調製

7-1. 魚肉抽出液の作成

* 記載した方法は暫定的な方法です、最適な抽出方法をご検討下さい

- ① 検査する魚肉を切り取り、1 g を秤量して超音波破碎機やホモジェナイザーなどの破碎機で使用するガラス製容器に入れ、5 mL のアセトンを加え良く挽き潰します。

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

- ② 全量を遠心分離用チューブに入れ 4℃、20,000 x g、10 分間遠心分離して上清液全量を新しいガラス容器に移します。最上部に多量の油成分が有る場合は油成分を避けて下の溶液部分を回収します。
- ③ 減圧濃縮装置または空気吹き込みによってアセトンを除き乾燥します。
- ④ 容器内に残った残渣に 1 mL の DMSO を加え、強く攪拌して残渣を溶解します。
- ⑤ DMSO 溶液をガラス製遠心管に移し 4℃で 20,000 x g、10 分間遠心分離し、上清液を新しいガラス容器に移し検査試料とします。検査試料は測定するまで冷凍保存して下さい。

7-2. 血液試料の作成

- * 保護手袋、マスク、保護眼鏡等を使用し血液に直接触れない様に注意して下さい。
 - * 多量の脂質成分の混入は検査を妨害します。出来るだけ除去して下さい。
- ① 抗凝固剤を使わず血液を 2~5 mL 採取、ガラス製の遠心管に入れ、冷蔵庫に一夜静置します。
 - ② 4℃、1,500 x g、10 分間遠心分離して上清液を新しいガラス容器に移し、検査試料とします。

8. 測定手順

- * 全ての試薬材料は使用前に室温に戻して下さい。
- * 検体、標準液、ネガティブコントロールは各濃度 3 ウェルで試験することを推奨します。
- * 粘着シールをはがすときやウェル内の液を棄てる時、マイクロプレートの固定枠からストリップウェルが外れないように注意して下さい。

8-1. 比色法による測定手順

- ① 洗浄液、CTX1B 標準液、検査試料を作成します。
- ② 抗体固相化マイクロプレートをアルミ袋から取り出し、使用しないストリップウェルをプレート枠から外しアルミ袋に入れて冷蔵保管します。
- ③ 事前に作成した CTX1B 標準液、検査試料、ネガティブコントロール用の D-1 をマイクロプレートの各ウェルに 100 μ L ずつ分注します。標準液、検査試料は各濃度に 3 ウェルを推奨します、下図参考。
- ④ プレートを攪拌機で攪拌後、付属の粘着シールで蓋をして 37℃または室温で 30 分インキュベートします。
- ⑤ ストリップウェルが枠から外れないように注意して粘着シールを剥がし、全てのウェルから吸引または直接廃棄して除きます。
- ⑥ プレートウェルの洗浄操作
 - a. マルチチャンネル分注器を使い、全てのウェルに 200 μ L のプレート洗浄液を注入する。
 - b. マイクロプレート攪拌機で攪拌する。
 - c. 洗浄液を吸引除去または直接廃棄する。
 - d. プレートを吸水紙の上に逆に乗せ手のひらに軽く叩き付け、余分な洗浄液を除きます、この際マ

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN

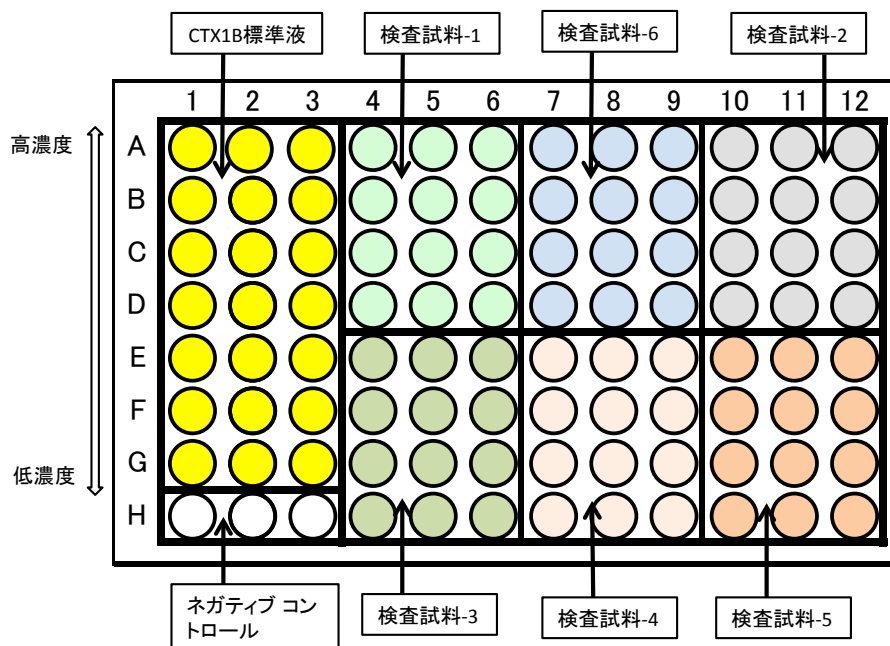


www.cellscience.co.jp

マイクロプレートのストリップウエルが枠から外れないように注意して下さい。

このステップを3回繰り返します。

- ⑦ ALP 標識抗体を D-2 で 1/100 濃度に希釈し、各ウエルに 100 μ L ずつ加え、攪拌して粘着シールで蓋をして、37°Cまたは室温で 30 分インキュベートします。
- ⑧ ⑥プレートウエルの洗浄操作を行う。
- ⑨ マルチチャンネル分注器を用いて R-1 を各ウエルに 200 μ L ずつ加え攪拌し、37°Cで 30~45 分インキュベートします。この際、ウエル内に泡が残っている場合はドライヤーで風を吹き付ける、またはプレート遠心分離機で遠心して泡を消して下さい。
- ⑩ マイクロプレートリーダーの測定波長を 405nm、対照波長を 490nm 以上に設定して、30 分または 45 分後に吸光度を測定します。



8-2. 蛍光測定法による高感度分析

- ① 比色法による測定手順に従い⑥まで実行します。
- ② ALP 標識抗体を D-2 で 1/200~400 濃度に希釈し、各ウエルに 100 μ L ずつ加え、攪拌して粘着シートを付け、37°Cまたは室温で 30 分インキュベートします。
- ③ 比色法による測定手順⑥「プレートウエルの洗浄操作」を実施しプレートを洗浄します。
- ④ 市販の ALP 蛍光基質キットを準備し、その使用説明書に従って操作して下さい。

9. 測定結果から含有量の算出

各濃度の CTX1B 標準液と希釈した検査試料を測定して得られた 3 ウエルの吸光度（蛍光強度）の平均値を計算し、その計算値からネガティブコントロールの平均吸光度（蛍光強度）を差し引き、正味の吸

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

光度（蛍光強度）を算出します。

吸光度（蛍光強度）を Y 軸に、CTX1B 濃度を X 軸として、CTX1B 標準液の濃度別吸光度（蛍光強度）をグラフ用紙上にプロットして各ポイントに最適な標準曲線を作成します。検査試料中の含有量は、検査試料の吸光度（蛍光強度）から標準曲線を使用して CTX1B 濃度（X 軸）に補間して決定します。

最適な標準曲線は、コンピューターと ELISA 用ソフトウェアを使用して統計分析によって決定することが可能です。また、検査試料中の濃度を自動的に計算することも可能になります。

希釈した検査試料を測定した場合、得られた値を希釈律で補正して検査試料中に含有される CTX1B の含有量を計算します。

検査試料の吸光度値（蛍光強度）が CTX1B 標準液の最大測定値を上回った場合は、検査試料を D-1 でさらに希釈して再度測定する必要があります。

10. 技術的ヒント

- ・ CTX1B 標準液及び検査試料の作成にはプラスチック製試験管やバイアルは使用せず、ガラス製の容器を使って下さい。使い捨てピペットチップは短時間に限り使用可能です。
- ・ ALP 標識抗体の希釈はプラスチック試験管を使って下さい。
- ・ R-1 の取り出しにはピペットを使用せず、目盛り付き試験管または計量容器に直接注いで下さい。取り出した溶液が濃い黄色を呈した場合は使用できません。
- ・ CTX1B 標準液や検査試料をマイクロプレートに添加する際、濃度の低い試料から順番に添加して下さい。
- ・ マイクロプレート内での交差汚染を防ぐために CTX1B 標準液の添加、検査試料の添加、各試薬の添加に使うピペットチップや試薬を入れるリザーバー容器は注意深く交換して下さい。
- ・ 希釈した CTX1B 標準液、検査試料、希釈した ALP 標識抗体溶液は調製後 30 分以内に使用して下さい。
- ・ 各ウエル内の測定液の蒸発ロス防止のためにインキュベート中は粘着シール等で蓋をしてください。
- ・ 5%以上のメタノールやエタノール、アセトン、DMSO などの水溶性有機溶剤は抗原抗体反応を妨害します。検査試料に含まれる有機溶剤の濃度が 5%未満になる様に溶剤を除去するか D-1 で希釈して下さい。
- ・ 魚肉や血清試料中に含まれる脂質は反応を妨害する可能性があります。検査試料が濁っている場合は混入する脂質を高速遠心分離機で除去して下さい。
- ・ R-1 を分注後プレートウエルの中に泡がある場合、空気の吹き付けまたは遠心分離機を使用して泡を消して下さい。
- ・ 付属の R-1 の代わりに市販の ALP 蛍光検出試薬を用いるとさらに高感度の検出が可能になります。蛍光検出試薬の使用方法は各メーカーのマニュアルに従って下さい。

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

11. 参考文献

- Ciguatera and its off-shoots—Chance encounters en route to a molecular structure. Scheuer, P. J. *Tetrahedron*, **50**, 3 (1994).
- Structures and configurations of ciguatoxin from moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. Murata, M., Legrand, A. M., Ishibashi, Y., Fukui, M., Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4380 (1990).
- Marine toxins. Yasumoto, T., Murata, M. *Chem. Rev.* **93**, 1897 (1993).
- Structural elucidation of ciguatoxin congeners by fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. Yasumoto, T., Igarashi, T., Legrand, A.-M., Cruchet, P., Chinain, M., Fujita, T., Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4988 (2000).
- The chemistry and biological function of natural marine toxins. Yasumoto, T. *Chem. Rec.* **1**, 228 (2001).
- Total synthesis of ciguatoxin CTX3C. Hirama, M., Oishi, T., Uehara, H., Inoue, M., Maruyama, M., Oguri, H., Satake, M. *Science*, **294**, 1904 (2001).
- Synthesis-based approach toward direct sandwich immunoassay for ciguatoxin CTX3C. Oguri, H., Hirama, M., Tsumuraya, T., Fujii, I., Maruyama, M., Uehara, H., Nagumo, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7608 (2003).
- Total synthesis of ciguatoxin and 51-hydroxyCTX3C. Inoue, M., Miyazaki, K., Ishihara, Y., Tatami, A., Ohnuma, Y., Kawada, Y., Komano, K., Yamashita, S., Lee, N., Hirama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9352 (2006).
- Production of monoclonal antibodies for sandwich immunoassay detection of Pacific ciguatoxins. Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M. *Toxicon*, **56**, 797 (2010).
- Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. Oshiro, N., Yogi, K., Asato, S., Sasaki, T., Tamanaha, K., Hirama, M., Yasumoto, T., Inafuku, Y. *Toxicon*, **56**, 656 (2010).
- First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). Otero, P., Perez, S., Alfonso, A., Vale, C., Rodriguez, P., Gouveia, N. N., Gouveia, N., Delgado, J., Vale, P., Hirama, M., Ishihara, Y., Molgo, J., Botana, L. M. *Anal. Chem.* **82**, 6032 (2010).
- Detailed LC-MS/MS analysis of ciguatoxins revealing distinct regional and species characteristics in fish and causative alga from the Pacific. Yogi, K., Oshiro, N., Inafuku, Y., Hirama, M., Yasumoto, T. *Anal. Chem.* **83**, 8886 (2011).
- Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1B: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA. Tsumuraya, T., Takeuchi, K., Yamashita, S., Fujii, I., Hirama, M. *Toxicon*, **60**, 348 (2012).
- Preparation of anti-ciguatoxin monoclonal antibodies using synthetic haptens: Sandwich ELISA detection of ciguatoxins. Tsumuraya, T., Fujii, I., Hirama, M. *J. ACAC*. **97**, 373 (2014).

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN

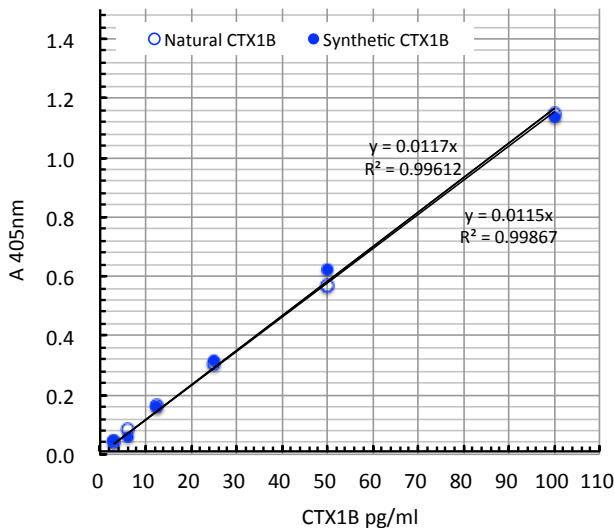


www.cellscience.co.jp

Practical route to the left wing of CTX1B and total syntheses of CTX1B and 54-deoxyCTX1B. Yamashita, S., Takeuchi, K., Koyama, T., Inoue, M., Hayashi, Y., Hiram, M. *Chem. Eur. J.* **21**, 2621 (2015).

Highly Sensitive and Practical Fluorescent Sandwich ELISA for Ciguatoxins. Tsumuraya, T., Sato, T., Hiram, M., Fujii, I., *Anal. Chem.* **90**, 7318 (2018).

12. 合成及び天然型 CTX1B の検量線比較

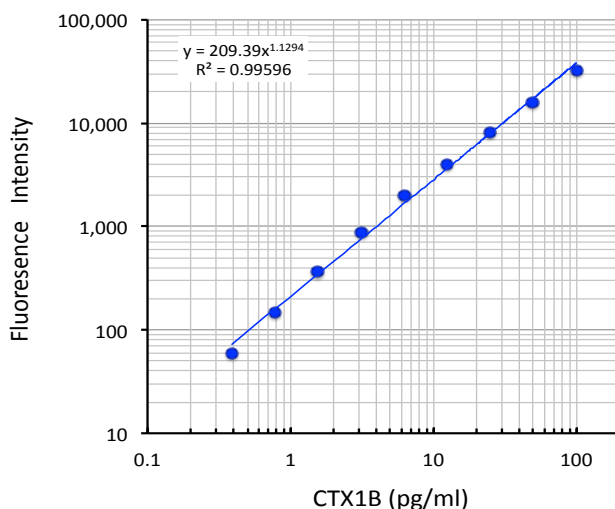


結果： 100~0.3pg/mL の濃度の合成及び天然 CTX1B を CTX-ELISA 1B キットで測定し、検量線を作成しました。この 2 種類の CTX1B の ELISA キットでの反応性に差は見られなかった。

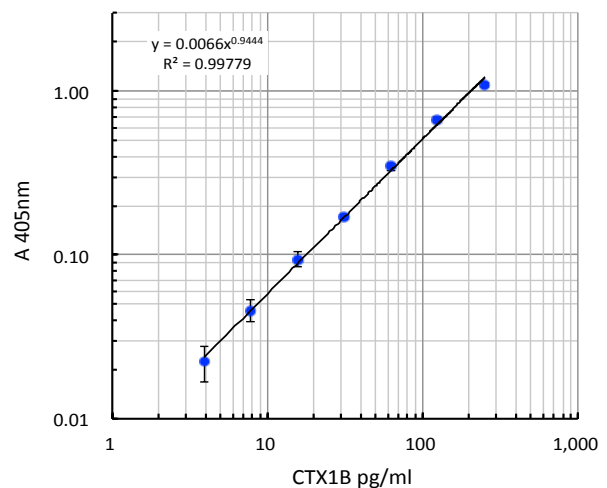
注意：このデータは検量線としては使用できません。
検量線は試験ごとに作成して下さい。

13. 比色法と蛍光測定法の代表的な検量線

AttoPhos[®] AP 蛍光基質による蛍光測定法



ALP 基質溶液 R-1 (pNPP) を用いた比色法



検出限界濃度は比色法が約 5 pg/mL、蛍光測定法が約 0.5 pg/mL で、蛍光測定法は比色法の 10 倍の検出感度であった。この結果は FDA の定めるシガテラ毒の管理基準値 “0.01 ppb” を十分に上回る検出性能を有していることを示します。

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp

14. 品質規格

- 1, 測定限界値： 3 pg/ml
検出限界値はネガティブコントロール（0 pg）及び標準液の反復測定によって決定されました。
- 2, 測定可能範囲： 比色法 5~200pg /mL、 蛍光測定法 0.5~100pg/mL
- 3, 特異性： この ELISA キットはシガトキシン 1B とその類似毒素を検出できます、他のシガトキシン類とは反応しません。
- 4, 再現性： 社内規格 CV 値<15%
3 種類の濃度の標準抗原を繰り返し測定したときの測定値の変動係数（CV%）
- 5, CTX1B 標準抗原の濃度検定： 本キットに添付した CTX1B 標準抗原の濃度は、東北大学名誉教授 安元健博士から提供された定量済み天然型シガテラ毒 CTX1B 標品を比較対照品として本 ELISA キットで決定しました。

“AttoPhos® AP” は米国プロメガ社の登録商標です。

“QuantiFluo™” は米国バイオアッセイシステム社の商標です。

“CTX-ELISA™” は日本国株式会社セルサイエンスの登録商標です、無許可での使用を禁止します。

RESEARCH USE ONLY, NOT FOR FOOD INSPECTION AND CLINICAL DIAGNOSTIC USE.

Manufacture: Cell Science Inc. (CSI); 82-16 Imozawa-Gongenmoriyama, Aoba-ku, sendai, 989-3212, JAPAN

Supplier: FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.; 1-2 Doshomachi 3-Chome, Chuo-ku, Osaka 540-6605, JAPAN



www.cellscience.co.jp