

「ルシフェール AT100」取扱い説明書

商品コード:60259



注意！

1. キット中の試薬を飲んだり、素手で触れたり、目に入れたりしないで下さい。
2. 取扱い説明書の使用上の注意および取扱い上の注意に従って取扱って下さい。

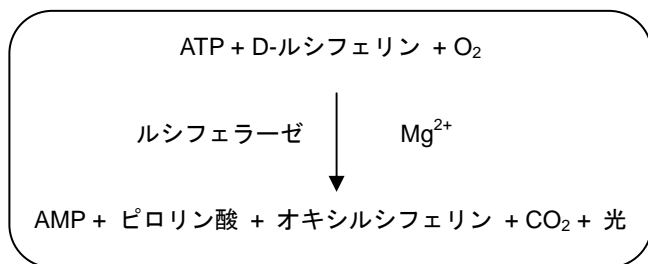
「ルシフェール AT100」は、キッコーマンのバイオ技術によって開発された、ホタルルシフェラーゼを用いた ATP(アデノシン三リン酸)法による生菌数測定キットです。

〔用途〕

本キットは飲料製品において、無菌であることを確認する作業に使用することができます。製品自体で培養を行い、一定濃度以上の菌濃度になったものに関して、迅速に菌混入の有無を確認することができます。また、生乳の一般生菌数測定に関しても 10^4 CFU/mL以上の菌濃度から推定することができます。

〔測定原理〕

ホタルルシフェラーゼは、以下の反応により光を発します。



反応の結果生じる光の量は ATP (アデノシン三リン酸) 量に比例するので、発光量を測定することにより ATP を定量できます。ATPは微生物を始めとする生細胞にエネルギー物質として含まれています。また、生細胞中だけでなく、食品および食品残渣などにも遊離の ATP が多量に含まれています。

従来、無菌製品において無菌性を確認する手段として、製品を恒温状態に保持し、混入している微生物を増殖させた後、寒天培地を用いたプレート法により増殖菌の有無を確認してきました。しかし、混入する微生物は多種多様であり、培地の種類、培養温度、酸素の有無など培養条件が適していない場合、製品で増殖した微生物をプレート法において完全に判定しているとはいえませんでした。また、プレート法ではコロニー形成をするまで数日間の培養期間を要し、検査に多くの日数を要していました。

本キットは、上記の問題を解決するためにキッコーマンが開発した ATP 消去試薬と試料処理方法を組み合わせたキットです。従来は遠心分離やフィルター濾過などの煩雑な操作が必要とされていましたが、このキットは試料を希釈し、試薬を混合することで、試料中の微生物以外の ATP を消去し、微生物由来の ATP を正確に測定することができます。また、発光試薬に関してはバイオの技術を使い、従来の発光試薬に比べ非常に多くの光を出すように改良を加えました。これらの技術により、従来に比べ少ない菌数でも高感度に検出できるようになりました。

〔キットの構成〕

本製品は以下の試薬より構成されています。

試薬名	主成分	数量
発光試薬 HS	ルシフェリン ルシフェラーゼ 酢酸マグネシウム	凍結乾燥品 2本
発光試薬溶解液	Tricine 緩衝液	5.5 mL 2本
ATP 消去試薬	ATP 分解酵素	凍結乾燥品 2本
ATP 消去試薬溶解液	MES 緩衝液	5.5 mL 2本
希釈液	MES 緩衝液 糖類	25 mL 4本
処理液	界面活性剤 キレート剤	5.5 mL 2本
ATP 抽出試薬	界面活性剤	5.5 mL 2本

〔使用上の注意〕

本製品の性能を十分に活用していただくため、以下の点にご注意下さい。

- ①品質保持期限が切れた製品は使用しないで下さい。測定が正確に行えないおそれがあります(品質保持期限は外箱に記載してあります)。
- ②必ず、推奨機器を用い発光量を測定して下さい。推奨機器以外の測定機を使用しますと、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ③本製品は室温(20~30℃)に戻してからご使用下さい。冷えたまま使用しますと、測定値が低くなる場合があります。
- ④発光試薬 HS は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。ゴム栓を強い力で開けますと、急激に空気が入り込み、内容物が飛散するおそれがありますので、試薬の調製法に従って開栓して下さい。
- ⑤ルミチューブやルミテスターが静電気を帯びますと、異常値を示す場合があります。そのような場合は、ルミチューブやルミテスターを湿った布で拭くなどして、静電気を取り除いてください。
- ⑥使用時は検査用手袋などを着用して下さい。また、手袋は抗静电性のもの(例えばニトリルゴム製)を使用し、手袋をはめた手でルミチューブをこすらないように気を付けてください。素手で使用しますと ATP や微生物の混入によりブランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑦異なるロット(試薬瓶ラベルに記載)の試薬を混合して使用しないでください。測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑧ルミテスターを使用時に、周辺に電気ノイズ(電子レンジ、ミキサーなどが原因となります)が発生しますと、異常値を示す場合があります。周辺に電気ノイズを発生する機器類等が無いことをご確認のうえ、ご使用ください。
- ⑨マイクロピペットチップは滅菌済み、または検査用手袋などを着用した上でラックに並べオートクレーブしたものをご使用下さい。ATP や微生物が混入するとブランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑩本製品の使用に際しては、容器本体の口やキャップの先端に触らないように注意して下さい。ATP や微生物が混入すると

ランク値が上昇し、測定が正確に行えないおそれがあります。

- ⑪発光試薬添加後は、ミキサーなどで良く攪拌した上で直ちに発光量の測定を開始して下さい。測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑫ATP の抽出に必要な時間は、微生物の種類によって異なります(通常は 20 秒で充分です)。正確な測定を行うには、最適時間を求めて一定時間に固定して下さい。
- ⑬本キットは一般生菌数を迅速に推定する簡易キットです。正確な生菌数を測定することが出来ない場合があります。正確な生菌数を測定するためには、食品衛生検査指針記載の手法に基づき、菌数を測定して下さい。
- ⑭キット付属の試薬が ATP または微生物に汚染されていないことを必ず確認した後、試料を測定して下さい。汚染された試薬類を用いると、正確な測定が出来ない場合があります。
* 汚染の確認は、[測定方法]・「1. 試薬汚染の確認方法」を参照の上行って下さい。
- ⑮微生物測定を行う際に使用する検量線は、微生物の種類や用いる培地の組成など使用条件により異なります。必ず使用する条件下で作成した検量線をご使用下さい。

〔測定に使用する推奨機器〕

ルミテスター C-110、C-100N、C-100
(販売元:キッコマンバイオケミファ(株))

〔試薬の調製法〕

1. 発光試薬

発光試薬 HS は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。内容物が飛散しないようにゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れるようにして開栓して下さい。開栓した発光試薬 1 瓶に 1 瓶分の発光試薬溶解液を全量移し入れ、室温で 5 分程度放置後、泡立たない程度に攪拌して溶解して下さい。溶解した発光試薬は、一度で使い切ることをお勧めします。

やむを得ず保存する場合は、冷蔵(2~8℃)または凍結(-10℃以下)して下さい。ただし、保存後の発光試薬は発光量が低下していますので、別売りの ATP 標準試薬セット(商品コード:60260)を使って ATP の検量線を新たに作成した上でご使用下さい。保存期間は、冷蔵(2~8℃)で 1 週間、凍結(-10℃以下)で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度として下さい。

2. ATP 消去試薬

発光試薬と同様に溶解して下さい。

3. ATP 抽出試薬

開栓してそのままご使用下さい。一度で使い切ることをお勧めしますが、やむを得ず保存する場合は冷蔵(2~8℃)で保存して下さい。ATP や微生物の汚染がない限り、1 ヶ月間保存できます。

4. 希釈液

開栓してそのままご使用下さい。一度で使い切ることをお勧めしますが、やむを得ず保存する場合は凍結(-10℃以下)して保存して下さい。ATP や微生物の汚染がない限り、6 ヶ月間保存できます。

5. 処理液

開栓してそのままご使用下さい。一度で使い切ることをお勧めしますが、やむを得ず保存する場合は凍結(-10℃以下)して保存して下さい。ATP や微生物の汚染がない限り、6 ヶ月間保存できます。

〔測定方法〕

本製品の他に準備する器具

ルミノメーター(ルミテスター C シリーズ)、ルミノメーター用測

定チューブ、マイクロピペット(100 μL/700 μL/800 μL の設定ができるもの)、滅菌済みマイクロピペットチップ

1. 試薬汚染の確認方法

試薬開封時に以下の操作を行い、試薬ブランクの確認を行って下さい。

測定チューブに処理液 0.1 mL を採取します。そこに 0.8 mL の希釈溶液と 0.1 mL の ATP 消去試薬を加え、ミキサーなどで数秒攪拌し、新たな測定チューブに 0.1 mL を移して下さい。さらに 0.1 mL の ATP 抽出試薬を添加し、20 秒後に 0.1 mL の発光試薬を添加します。ミキサーなどで数秒攪拌した上で、速やかにルミノメーターにて発光量の測定を開始します。

試薬開封時でブランク値は通常 50 RLU 以下の値を示します。開封済みの試薬を使用する場合も同様にブランク値を測定して下さい。ブランク値が 50 RLU 以上の値を示す場合は、以下の様に試薬を変えてブランク値を測定し、汚染された試薬を調査して下さい。

- ①処理液を新しいものに替える。
- ②希釈液を新しいものに替える。
- ③ATP 抽出試薬を新しいものに替える。
- ④発光試薬 HS を新しいものに替える。

新たな試薬に変更して発光量が減少したものが汚染された試薬です。汚染された試薬は後記[廃棄の方法]に従い、廃棄して下さい。また、開封した試薬は後述の[保存方法]に従い、保存して下さい。

2. 微生物測定

1) 試料の調製

①固形試料の場合(クリーム、マーガリンなど)
一定の重量(1 g 程度)を秤量し、滅菌水等を 1~10 mL 程度加えた後、ストマッカー、ホモジナイザーなどで試料を処理し、懸濁液を測定に供します。

②液状試料の場合(液体飲料など)
通常試験にそのまま供します。しかし、製品由来の ATP が非常に高い場合や測定反応を阻害する物質が多く混在している場合(塩が多量に入っているなど)は、緩衝液又は蒸留水で適宜希釈して測定に供します。

2) 測定操作

処理液使用と不使用の 2 つの方法があります。実際の試料(無菌製品)を用いて、2 つの方法をお試しいただき、発光量が低くなる方法をご使用下さい。

方法①(処理液不使用)	方法②(処理液使用)
ATP 消去 0.1 mL 試料 0.1 mL ATP 消去試薬 0.8 mL 希釈溶液 ↓攪拌 ↓別のチューブに 0.1mL 移す ↓室温にて 30 分間放置 (消去済み試料)	ATP 消去 0.1 mL 試料 0.1 mL 処理液 ↓攪拌 0.7 mL 希釈溶液 0.1 mL ATP 消去試薬 ↓攪拌 ↓別のチューブに 0.1mL 移す ↓室温にて 30 分間放置 (消去済み試料)
発光量測定 0.1 mL 上記消去済み試料 0.1 mL ATP 抽出試薬 ↓攪拌(3 秒程度)後、10 秒程度放置 0.1 mL ATP 発光試薬 ↓1~2 秒程攪拌 ↓ルミテスターにて速やかに発光量を測定	

3) データの取扱い

ルミテスターは、相対発光量(Relative Light Unit : RLU)という単位で結果を表示します。ATP 法により得られる測定値(RLU)と従来のプレートによる培養法による一般生菌数の 2 つのデータを基準にして判定を行います。製品の種類、菌の種類により測定値は変わりますので製品ごとにデータを取ることが必要になります。データの処理の方法として、横軸(X 軸)に一般生菌数、縦軸 (Y 軸)に発光量 (RLU)をとり、各菌数における発光量をプロットしていくことにより測定限界の菌数と発光量の関係がわかります(図 1~3)。データを蓄積することによりブランク値を求めることができます。無菌製品において無菌状態の確認としては、通常のブランク値より高い値が出た場合、微生物混入の可能性があると迅速に判断できます。

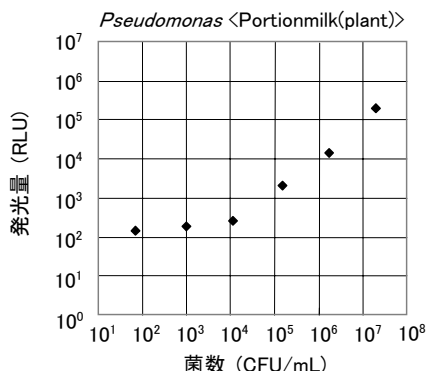


図 1 ポーションミルク(植物性脂肪)
 接種菌種: *Pseudomonas.sp*
 測定限界菌数: 2×10^4 CFU/mL
 ブランク値: 150~200 RLU

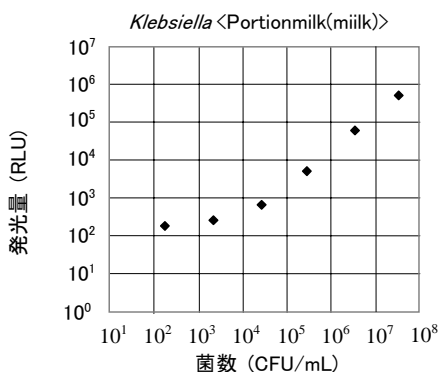


図 2 ポーションミルク(乳性脂肪)
 接種菌種: *Klebsiella.sp*
 測定限界菌数: 4×10^4 CFU/mL
 ブランク値: 170~250 RLU

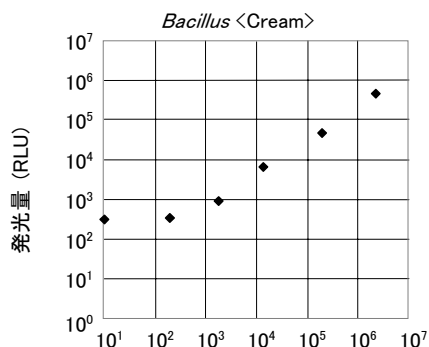


図 3 ホイップクリーム菌数 (CFU/mL)
 接種菌種: *Bacillus.sp*
 測定限界菌数: 8×10^3 CFU/mL
 ブランク値: 300~330 RLU

データ提供: 守山乳業 株式会社
 技術部 品質管理課微生物チーム

【廃棄の方法】

発光試薬および発光試薬溶解液の容器はガラス、ゴム、アルミの材質からなっています。ATP 抽出試薬および希釈液の容器は、本体、キャップともにポリプロピレン製です。廃棄の際は、各々を分別して、都道府県・市町村が定める廃棄物の適正処理に従って廃棄処理して下さい。

【取扱い上の注意】

本製品を安全にご使用いただくため、以下の点にご注意下さい。

- ①本製品を微生物測定の目的以外には使用しないで下さい。本製品は、微生物を特定する検査などにはご使用できません。
- ②本キットは一般生菌数を迅速に推定する簡易キットです。正確な生菌数を測定することが出来ない場合があります。正確な生菌数を測定するためには、食品衛生検査指針記載の手法に基づき、菌数を測定して下さい。
- ③本製品の試薬類を使用前後に口に入れたり、素手で触れたり、目に入れたりしないで下さい。口に入れた場合は口を良くすすいだ後、皮膚についた場合は大量の水で洗浄した後、また目に入れた場合は大量の水で洗浄した後、直ちに医師に連絡を取り、指示を受けて下さい。
- ④本製品の容器および試薬が食品などへ混入しないよう、保管、廃棄に十分ご注意下さい。
- ⑤製品の ATP 抽出試薬にはアルカリ性(pH 12.0)の試薬を用いています。取扱いにはくれぐれもご注意下さい。
- ⑥製品は幼児の手の届かないところに保管して下さい。

【保存方法】

- 1) キットの保存: 冷暗所(2~8℃)にて保存。
- 2) 試薬開栓後の保存: 発光試薬および ATP 抽出試薬ともに開栓後は一度で使いきることをお勧めします。止むを得ず保存する場合、発光試薬は冷蔵(2~8℃)または凍結(-10℃以下)して下さい。ただし、保存後の発光試薬は発光量が低下していますので、別売りの ATP 標準試薬セット(商品コード: 60260)を使って ATP の検量線を新たに作成した上でご使用下さい。保存期間は、冷蔵(2~8℃)で 1 週間、凍結(-10℃以下)で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度として下さい。ATP 抽出試薬は、冷蔵(2~8℃)で 1 ヶ月間の保存を限度として下さい。
- 3) 品質保持期限: 本製品の外箱に記載。

【保証】

製造元では、本製品が所期の品質を有することおよび、本製品に不具合があった場合代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な若しくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任は負いません。

製造元:

キッコーマンバイオケミファ株式会社
 〒105-0003 東京都港区西新橋 2-1-1
 Tel: 03-5521-5490 Fax: 03-5521-5498
 E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp
 URL: <http://www.kikkoman.co.jp/bio/>