

牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット

平成 18 年 3 月 22 日（告示 350 号） 一部改正

プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体でプレート进行处理し、酵素抗体法により牛海綿状脳症の異常プリオン蛋白を検出するためのキットである。

1 小分製品の試験

1.1 特異性試験

1.1.1 試験材料

試験品及び非感染牛延髄（付記 1）を用いる。

1.1.2 試験方法

1.1.2.1 陰性検体の作成

それぞれのキットについて 1.1.2.1.1 又は 1.1.2.1.2 により陰性検体を作成する。

1.1.2.1.1 ホモジネート 500 μ L 使用キットの陰性検体

非感染牛延髄 350 \pm 40mg をグライディングチューブに入れホモジナイズする。ホモジネート 500 μ L とプロティナーゼ K 溶液 500 μ L を混和し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させる。クラリファイソリューション 500 μ L を加え、混和し、20,000G で 5 分間、又は 15,000G で 7 分間遠心する。上清を除去し、溶解液を 50 μ L 加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた後混和する。希釈液 250 μ L を加え、陰性検体とする。

1.1.2.1.2 ホモジネート 250 μ L 使用キットの陰性検体

非感染牛延髄 350 \pm 40mg をグライディングチューブに入れホモジナイズする。ホモジネート 250 μ L とプロティナーゼ K 溶液 250 μ L を混和し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させる。クラリファイソリューション 250 μ L を加え、混和し、20,000 G で 5 分間、又は 15,000 G で 7 分間遠心する。上清を除去し、溶解液を 25 μ L 加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた後混和する。希釈液 125 μ L を加え、陰性検体とする。

1.1.2.2 酵素抗体反応

抗体固相マイクロプレートの 4 穴に陰性コントロールを、3 穴に陽性コントロール液（付記 2）を、5 穴に陰性検体をそれぞれ 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 75 分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、酵素標識抗体液を 100 μ L ずつ加え、2 ~ 8 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質発色液を 100 μ L ずつ加える。プレートを遮光して 18 ~ 22 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、反応停止液を 100 μ L ずつ加え、30 分以内に各穴の吸光度を主波長 450nm、副波長 620nm で測定する。

1.1.2.3 判定

検体の吸光度値がカットオフ値（付記 3）未満の場合を陰性、カットオフ値以上の場合を陽性と判定する。

陰性検体は、いずれも陰性でなければならない。

1.2 吸光度試験及び力価試験

それぞれのキットについて 1.2.1 又は 1.2.2 の試験を行う。

1.2.1 ホモジネート 500 μ L 使用キットの試験

1.2.1.1 試験材料

試験品を用いる。

1.2.1.2 試験方法

抗体固相マイクロプレートの 4 穴に陰性コントロールを、3 穴に陽性コントロール液をそれぞれ 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、75 分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、酵素標識抗体液

を 100 μ L ずつ加え、2 ~ 8 、60 分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質発色液を 100 μ L ずつ加える。プレートを遮光して 18 ~ 22 で 30 分間反応させた後、反応停止液を 100 μ L ずつ加え、30 分以内に各穴の吸光度を主波長 450nm、副波長 620nm で測定する。

1.2.1.3 判定

陰性コントロールの吸光度値はすべて 0.150 未満でなければならず、陽性コントロール液の吸光度値はすべて 1.000 以上でなければならない。

1.2.2 ホモジネート 250 μ L 使用キットの試験

1.2.2.1 試験材料

試験品を用いる。

1.2.2.2 試験方法

抗体固相マイクロプレートの 4 穴に陰性コントロールを、3 穴に陽性コントロール液を、及び 3 穴に参照陽性抗原（付記 4）をそれぞれ 100 μ L ずつ加え、37 、75 分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、酵素標識抗体液を 100 μ L ずつ加え、2 ~ 8 、60 分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質発色液を 100 μ L ずつ加える。プレートを遮光して 18 ~ 22 で 30 分間反応させた後、反応停止液を 100 μ L ずつ加え、30 分以内に各穴の吸光度を主波長 450nm、副波長 620nm で測定する。

1.2.2.3 判定

陰性コントロールの吸光度値はすべて 0.150 未満でなければならず、陽性コントロール液の吸光度値はすべて 1.600 以上でなければならない。参照陽性抗原の吸光度値はすべて 0.600 以上、3.000 未満でなければならない。

付記 1 非感染牛延髄

牛海綿状脳症に感染していない牛の延髄

付記 2 陽性コントロール液

陽性コントロールを、ホモジネート 500 μ L 使用キットは 2 mL の、また、ホモジネート 250 μ L 使用キットは 4 mL の希釈液で溶解したもの

付記 3 カットオフ値

カットオフ値は、次の計算式により算出する。

カットオフ値 = 陰性コントロールの吸光度値の平均値 + 0.21

付記 4 参照陽性抗原

陽性コントロールと同様の組成を持つ試薬を、含まれる合成ペプチドの濃度が 0.125 μ g/mL になるように希釈液で溶解したもの