

# 牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット(ワンステップ測定法)

平成 16 年 4 月 23 日 ( 告示 978 ) 新規追加

平成 18 年 12 月 20 日 ( 告示 1778 ) 一部改正

平成 20 年 10 月 28 日 ( 告示 1564 ) 一部改正

プリオン蛋白に対するモノクローナル抗体を固相化したプレートに、処理された検体と標識抗体を同時に添加し、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 吸光度試験

#### 1.1.1 試験材料

試験品を用いる。

#### 1.1.2 試験方法

抗体固相マイクロプレートの 1 穴に陽性コントロールを、2 穴に陰性コントロールをそれぞれ 100  $\mu$  L ずつ加える。直ちに酵素標識抗体液を 50  $\mu$  L ずつ各穴に加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、各穴に基質液を 100  $\mu$  L ずつ加える。プレートを遮光し、20 ~ 30  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、反応停止液を 100  $\mu$  L ずつ加える。各穴の吸光度を、主波長 450nm、副波長 630nm で測定する。

#### 1.1.3 判定

陽性コントロールの吸光度値が 1.0 以上、陰性コントロールの吸光度値の平均が 0.1 以下でなければならない。

### 1.2 特異性試験及び力価試験

#### 1.2.1 試験材料

試験品、非感染牛延髄 ( 付記 1 ) 及び参照陽性検体 ( 付記 2 ) を用いる。

#### 1.2.2 試験方法

##### 1.2.2.1 陰性検体の作製

非感染牛延髄 0.2g に、800  $\mu$  L のホモジネート用調製試薬 1 ( 付記 3 ) を加えてホモジナイズし、20%脳乳剤とする。20%脳乳剤 250  $\mu$  L に、調製試薬 2 ( 付記 4 ) を 300  $\mu$  L 加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。反応終了後、調製試薬 3 ( 付記 5 ) を 150  $\mu$  L 加え 15,000G、25  $^{\circ}$ C で 10 分間遠心する。上清を除去し、可溶化液を 50  $\mu$  L 加え、100  $^{\circ}$ C で 5 分間加熱して沈殿を懸濁する。検体希釈液を 100  $\mu$  L 加え陰性検体とする。

##### 1.2.2.2 酵素抗体反応

抗体固相マイクロプレートの 3 穴に陰性検体を、3 穴に参照陽性検体を、1 穴に陽性コントロールを、2 穴に陰性コントロールをそれぞれ 100  $\mu$  L ずつ加える。直ちに酵素標識抗体液を 50  $\mu$  L ずつ各穴に加え、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、各穴に基質液を 100  $\mu$  L ずつ加える。プレートを遮光し、20 ~ 30  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、各穴にそれぞれ 100  $\mu$  L の反応停止液を加える。各穴の吸光度を、主波長 450nm、副波長 630nm で測定する。

#### 1.2.3 判定

陽性コントロールの吸光度値が 1.0 以上、陰性コントロールの吸光度値の平均が 0.1 以下のとき、試験が成立するものとする。検体の吸光度がカットオフ値 ( 付記 6 ) 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。

陰性検体は陰性、参照陽性検体は陽性でなければならない。また、参照陽性検体の吸光度値は、0.2 以上 1.0 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 参照陽性検体

組換え牛正常プリオン蛋白が  $0.0025 \mu\text{g/mL}$  になるように陰性コントロールで溶解したもの

付記 3 ホモジネート用調製試薬 1

ホモジネート液 1 mL に対し DNase 溶液を  $8 \mu\text{L}$ 、コラゲナーゼ溶液を  $50 \mu\text{L}$  を加えたもの

付記 4 調製試薬 2

界面活性剤液 1.7mL に対しプロテイナーゼ K 溶液を  $100 \mu\text{L}$  を加えたもの

付記 5 調製試薬 3

濃縮液 3 mL に対しプロテイナーゼ K 反応停止液を  $100 \mu\text{L}$  を加えたもの

付記 6 カットオフ値

陰性コントロール 2 穴の平均値に 0.15 を加えた値