

# 牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット（アビジン-ビオチンカップリング法）

平成20年1月7日付 農林水産省告示第9号

ストレプトアビジンを固相化したプレートに、プリオン蛋白に対するビオチン標識モノクローナル抗体と検体を添加し、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 特異性試験

#### 1.1.1 試験材料

試験品及び非感染牛延髄検体（付記1）を用いる。

#### 1.1.2 試験方法

##### 1.1.2.1 陰性検体の作製

非感染牛延髄180±60mgを、調製済みホモジナイズ用溶液（付記2）を0.9mL加えたチューブに入れ、ホモジナイズする。1,000 Gで2分間遠心し、得られた上清150 µLを消化用プレートへ移す。14分間振とう後、42 °Cで30分間振とうする。調製済み消化停止用薬（付記3）100 µLを各ウェルに分注し、20分間振とうしたものを、陰性検体とする。

##### 1.1.2.2 酵素抗体反応

検出用プレートの8穴に陽性コントロール（付記4）を、32穴に陰性コントロール（付記5）を、24穴に陰性検体をそれぞれ40 µLずつ加え、これらの調製液を加えた全穴に検出用溶液（付記6）を各200 µL加える。60分間振とう後、洗浄液で洗浄する。基質液200 µLを加え、10分間振とう後、基質停止液50 µLを加え、10分以内に主波長450 nm、副波長620 nmで各穴の吸光度を測定する。

##### 1.1.2.3 判定

測定結果が以下に述べる条件を満たした時、試験が成立したものとする。

- ・ 陽性コントロールの吸光度は、8穴の中央値（付記7）が2.00から4.00の間にあり、変動係数値（付記8）が15%以下であり、吸光度の中央値から20%以上の値を示す穴の数が2つを超えない。
- ・ 陰性コントロールの最初の8穴の吸光度は、それらの中央値が0.2以下で、変動係数値が35%以下であり、0.2を超える穴の数が2つを超えない。
- ・ 陰性コントロールの残りの24穴の吸光度の中央値でカットオフ値（付記9）を除いた値は1.5 から23の間であり、変動係数値は35%以下であり、各穴の吸光度はカットオフ値を超えない。
- ・ 陰性検体24穴の吸光度の中央値でカットオフ値を除いた値が1.5から23の間で、変動係数値は35%以下である。

検体の吸光度値がカットオフ値未満の場合を陰性、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

### 1.2.1 試験材料

試験品及び参照陽性抗原（付記10）を用いる。

### 1.2.2 試験方法

調製済みコントロールとコントロール溶液を、それぞれ60 µLと940 µL、40 µLと960 µL、及び20 µLと980 µL混和し、ホモジナイズ後1,000 Gで2分間遠心する。得られた上清を14分間振とう後、42 °Cで30分間振とうしたものの150 µLに調製済み消化停止用薬100 µLを加え、20分間振とうしたものを、それぞれ陽性サンプル1、2及び3とする。

参照陽性抗原とコントロール溶液を、それぞれ60 µLと940 µL、40 µLと960 µL、及び20 µLと980 µL混和し、ホモジナイズ後1,000 Gで2分間遠心する。得られた上清を14分間振とう後、42 °Cで30分間振とうしたものの150 µLに調製済み消化停止用薬100 µLを加え、20分間振とうしたものを、それぞれ参照陽性抗原1、2及び3とする。

検出用プレートの8穴に陰性コントロールを、8穴に陽性コントロールを、各3穴に陽性サンプル1、2及び3を、各3穴に参照陽性抗原1、2及び3をそれぞれ40 µLずつ加え、これらの調製液を加えた全穴に検出用溶液を各200 µL加える。60分間振とう後、洗浄液で洗浄する。基質液200 µL

を加え、10分間振とう後、基質停止液50  $\mu$ Lを加え、10分以内に主波長450 nm、副波長620 nmで各穴の吸光度を測定する。

#### 1.2.3 判定

陽性コントロールの吸光度値は、8穴の中央値が2.00から4.00の間にあり、変動係数値が15%以下であり、吸光度の中央値から20%以上の値を示すものが2穴を超えてはならない。

陰性コントロールの吸光度は、8穴の中央値が0.2以下で、変動係数値が35%以下であり、0.2より大きな値を示すものが2穴を超えてはならない。

陽性サンプル1、2及び3の各3穴の吸光度の中央値は、それぞれ、1.0から3.2の間、0.6から2.2の間、及びカットオフ値から1.2の間でなければならない。

参照陽性抗原1、2及び3の各3穴の吸光度の中央値は、それぞれ、1.0から3.2の間、0.6から2.2の間、及びカットオフ値から1.2の間でなければならない。

#### 付記1 非感染牛延髄検体

牛海綿状脳症に感染していない牛の延髄

#### 付記2 調製済みホモジナイズ用溶液

消化用試薬を精製水10mLに溶解し混和したものを3 mLを、ホモジナイズ用緩衝液100mL当たり精製水200 mLを加えて混和したものを97mLに加え均等に混和したものを

#### 付記3 調製済み消化停止用薬

消化停止用薬に消化停止用薬溶解液12mLを加えて溶解し、透明無色になるまでよく混和したものを

#### 付記4 陽性コントロール

コントロール溶液900  $\mu$ L当たり調製済みコントロール100  $\mu$ Lを加えてホモジナイズ処理したものを、1,000 Gで2分間遠心する。得られた上清150  $\mu$ Lを、室温で14分間、42  $^{\circ}$ Cで30分間振とうし、調製済み消化停止用薬100  $\mu$ Lを加えて室温で20分間振とうしたものを

#### 付記5 陰性コントロール

調製済みホモジナイズ用溶液900  $\mu$ L当たり、調製済みコントロール100  $\mu$ Lを加えてホモジナイズ処理したものを1,000 Gで2分間遠心する。得られた上清150  $\mu$ Lを、室温で14分間、42  $^{\circ}$ Cで30分間振とうし、調製済み消化停止用薬100  $\mu$ Lを加えて室温で20分間振とうしたものを

#### 付記6 検出用溶液

ペルオキシダーゼ標識抗PrP抗体に水1 mLを加えて溶解したものを0.3mLと、ビオチン標識抗PrP抗体に精製水1 mLを加えて溶解したものを0.3mLを、インキュベーション用緩衝液25 mLに加え混和したものを

#### 付記7 中央値

測定値を小さい順に並べたとき、中央に位置する値。サンプル数が偶数の場合は、中央に位置する2つの値の算術平均の値

#### 付記8 変動係数値

標準偏差を平均値で割ったものに100を乗じた値

#### 付記9 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 8 穴の測定値の中央値  $\times 0.5 + 0.25$

付記10 参照陽性抗原

コントロールと同様の組成及び分量の試薬を、コントロール溶解液 6 mLにより溶解したもの