

診断液の部の牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット（ワンポット前処理法）の項を次のように改める。

牛海綿状脳症診断用酵素抗体反応キット（ワンポット前処理法）

プリオン蛋白のコア領域に対するモノクローナル抗体を固相化したプレートに、ワンポット前処理法で調製した検体を添加し、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 小分け製品の試験

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 陰性検体の作製

非感染牛延髄110±20mgをバイオマッシャーに入れ、これを回収用チューブ内にセットし15,000Gで30秒間の遠心操作を行う。バイオマッシャーを廃棄し、回収用チューブに酵素混合液（付記2）を1mL加え、全体が均一になるまで攪拌する。56℃で10分間反応後、直ちに100℃で10分間加熱する。これを37℃以下まで冷却したものを陰性検体とする。

1.1.2.2 酵素抗体反応

抗体プレートの3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3）を、4穴に陰性検体をそれぞれ100μLずつ加え、37℃で1時間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、希釈標識抗体液（付記4）を100μLずつ加え、4～8℃で30分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質液を100μLずつ加える。プレートを遮光して常温で30分間反応させた後、反応停止液を100μLずつ加え、30分以内に各穴の吸光度を波長450nmで測定する。

1.1.2.3 判定

陰性コントロール液3穴の吸光度平均値が0.2以下、および陽性コントロールの吸光度から陰性コントロールの平均値を差し引いた値がいずれも1.2以上であるとき、試験が成立したものとする。

検体の吸光度から陰性コントロールの平均値を差し引いた値がカットオフ値（付記5）以上の場合を陽性、カットオフ値未満の場合を陰性と判定する。

陰性検体はすべて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、参照陽性抗原（付記6）及び標準試料溶液L、M及びH（付記7）を用いる。

1.2.2 試験方法

参照陽性抗原の2倍階段希釈系列を希釈用緩衝液(付記8)を用いて64倍まで作製し、各希釈の参照陽性抗原を抗体プレートの2穴ずつに、標準試料溶液L、M及びHを抗体プレートの8穴ずつに、陰性コントロールを3穴に加え、37°Cで1時間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、希釈標識抗体液を100 μ Lずつ加え、4~8°Cで30分間反応させる。洗浄液でプレートを洗浄し、基質液を100 μ Lずつ加える。プレートを遮光して常温で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波長450nmで測定する。参照陽性抗原希釈系列の測定結果を用いて作成した検量線により、標準試料溶液L、M及びHの吸光度からこれらの濃度を算出する。

1.2.3 判定

参照陽性抗原の吸光度値から、陰性コントロールの平均値を差し引いた値は1.2以上でなければならない。また、標準試料溶液L、M及びHの算出濃度と、あらかじめ調整された濃度との誤差は25.0%以内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 酵素混合液

試薬A(破砕用緩衝液)、試薬B(プロテイナーゼK)及び試薬C(マイクロバイアルセリンプロテイナーゼ)を、100:1:1の割合に混合したもの

付記3 陽性コントロール液

陽性コントロールを、水2mLで溶解したもの

付記4 希釈標識抗体液

標識抗体溶液を標識抗体用希釈液で30倍希釈したもの

付記5 カットオフ値

陰性コントロール3穴の吸光度の平均値に0.30を加えた値

付記6 参照陽性抗原

組換え牛プリオン蛋白質が、0.002 μ g/mLになるように、アルブミン含有リン酸緩衝液(付記9)に溶解したもの

付記7 標準試料溶液L、M及びH

組換え牛プリオン蛋白質をアルブミン含有リン酸緩衝液に溶解し、希釈用緩衝液で次の濃度に調整したもの

L:0.00007 \pm 0.00003 μ g/mL

M:0.0002 \pm 0.0001 μ g/mL

H:0.0008±0.0002 μg/mL

付記8 希釈用緩衝液
陰性コントロールと同様の組成を持つもの

付記9 アルブミン含有リン酸緩衝液

1000mL中

アルブミン（乾燥脱糖卵白） 10g

塩化カリウム 0.2g

塩化ナトリウム 8.0g

リン酸二水素カリウム 0.2g

リン酸水素二ナトリウム・12水 2.9g

アジ化ナトリウム 0.5g

水 残量

pHを7.2に調整する