

鳥インフルエンザウイルスH5亜型遺伝子検出用酵素抗体反応キット

鳥インフルエンザウイルスH5亜型の赤血球凝集素（HA）遺伝子を増幅し、増幅した核酸をプレートを用いた酵素抗体法により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。指示陽性対照（付記1）及び指示陰性対照（付記2）を試料とする。

1.1.2 試験方法

0.5mL 又は 1.5mL チューブに試料 5 μ L を入れ、増幅試薬（付記3）10 μ L を混合し、65 $^{\circ}$ C で 5 分間、41 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させる。酵素試薬（付記4）5 μ L を加えて混合し、41 $^{\circ}$ C で 5 分間反応させ、遠心後、41 $^{\circ}$ C で 90 分間反応させる。

0.5mL 又は 1.5mL チューブに反応液 5 μ L を移し、プローブ混合液（付記5）2 μ L 及びハイブリダイゼーション緩衝液（付記6）43 μ L を混合後、ストレプトアビジン固相化エライザプレート（付記7）の1穴に各々全量を移す。41 $^{\circ}$ C で 60 分間反応後、1穴当たり 250 μ L の洗浄液（付記8）で3回洗浄する。標識抗体（付記9）を 100 μ L ずつ分注し、30 分間反応する。洗浄液で更に3回洗浄後、基質緩衝液（付記10）を 100 μ L ずつ分注する。基質緩衝液 100 μ L のみを加えた1穴をブランクとする。5 分間反応させた後、反応停止液（付記11）を 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405nm で吸光度を測定する。試料の吸光度値からブランクの吸光度値を差し引いた値を E 値として算出する。

1.1.3 判定

指示陽性対照の E 値は 1.000 以上、指示陰性対照の E 値は 0.200 以下でなければならない。

1.2 特異性試験

1.2.1 試験材料

試験品を用いる。参照陽性鳥インフルエンザ（H5N2）ウイルス核酸抽出液（付記12）、参照陰性鳥インフルエンザ（H3N8）ウイルス核酸抽出液（付記13）、参照陰性鶏伝染性気管支炎ウイルス核酸抽出液（付記14）、参照陰性ニューカッスル病ウイルス核酸抽出液（付記15）、指示陽性対照及び指示陰性対照を試料とする。

1.2.2 試験方法

1.1.2 の方法を準用して試験する。

1.2.3 判定

参照陽性鳥インフルエンザ（H5N2）ウイルス核酸抽出液及び指示陽性対照の E 値は 1.000 以上、参照陰性鳥インフルエンザ（H3N8）ウイルス核酸抽出液、参照陰性鶏伝染性気管支炎ウイルス核酸抽出液、参照陰性ニューカッスル病ウイルス核酸抽出液及び指示陰性対照の E 値は 0.200 以下でなければならない。

1.3 力価試験

1.3.1 試験材料

試験品を用いる。参照陽性鳥インフルエンザ（H5N2）ウイルス核酸抽出液をジエチルピロカーボネート処理水（付記16。以下「DEPC 処理水」という。）で 10 倍階段希釈した各段階の希釈液、指示陽性対照及び指示陰性対照を試料とする。

1.3.2 試験方法

1.1.2 の方法を準用して試験する。

1.3.3 判定

指示陽性対照の E 値が 1.000 以上、指示陰性対照の E 値が 0.200 以下を示すとき、参照陽性鳥インフルエンザ (H5N2) ウイルス核酸抽出液の E 値が 0.450 以上を示す最高希釈倍数は 10^5 倍以上でなければならない。

付記 1 指示陽性対照

鳥インフルエンザウイルス H5 亜型の HA 遺伝子を挿入したベクタープラスミドを保持した大腸菌 DH5AIV H5-HA 株を適当と認められた方法で培養集菌してプラスミドを回収し、制限酵素 *EcoRV* で切断し直鎖化したものを鋳型 DNA とする。鋳型 DNA を用いて RNA を増幅後、DNA 分解酵素 で鋳型 DNA を除去したものをを用いる。

付記 2 指示陰性対照

DEPC 処理水を用いる。

付記 3 増幅試薬

A 液 120 μ L 中に、以下の濃度の成分を含有しているもの

dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP 混合)	0.002 mol/L
NTP (ATP、UTP、CTP、GTP 混合)	0.004 mol/L
ジチオトレイトール	0.010 mol/L
塩化マグネシウム	0.024 mol/L

A 液 1,000 mL 中

増幅試薬溶解用液 (付記 17)	666.7 mL
DEPC 処理水	116.7 mL
塩化カリウム溶液 (付記 18)	133.3 mL
H5 プライマー混合液 (付記 19)	83.3 mL

付記 4 酵素試薬

酵素試薬溶解用液 (付記 20) 55 μ L 中に、以下の濃度の成分を含有しているもの

鶏骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素 (AMV-RT)	1.30 単位/ μ L
リボヌクレアーゼ H	0.02 単位/ μ L
T7 RNA ポリメラーゼ	6.40 単位/ μ L
牛血清アルブミン	0.42 μ g/ μ L

付記 5 プローブ混合液

DEPC 処理水中に、ビオチン標識プローブ及びディゴキシン標識プローブを、それぞれ 26 μ mol/L の濃度となるように含有しているもの

付記 6 ハイブリダイゼーション緩衝液

1,000 mL 中

トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩	157.6 g
牛血清アルブミン	10.0 g
適当と認められた 20 倍濃度塩化ナトリウム・エチレンジアミン四酢酸・リン酸緩衝液 (SSPE)	残 量

付記 7 ストレプトアビジン固相化エライザプレート

1列8穴のマイクロストリップ 12列からなる平底エライザ用プレートに、ストレプトアビジンを含むものを固相化したもの

付記 8 洗浄液

濃縮洗浄液（付記 21）を DEPC 処理水で 10 倍に希釈したもの

付記 9 標識抗体

アルカリフォスファターゼ標識ディゴキシンモノクローナル抗体を標識抗体希釈液（付記 22）で 500 倍に希釈したもの

付記 10 基質緩衝液

適当と認められた p-ニトロフェニルフォスフェイト基質液を用いる

付記 11 反応停止液

1,000 mL 中

水酸化ナトリウム

120 g

DEPC 処理水

残量

付記 12 参照陽性鳥インフルエンザ（H5N2）ウイルス核酸抽出液

鳥インフルエンザウイルス A/duck/Penn/10128/84（H5N2）株を生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で培養し得られた漿尿液（ウイルス価 $10^{7.5}$ EID₅₀/mL 以上）を用い、適当と認められた方法で RNA 抽出したもの

付記 13 参照陰性鳥インフルエンザ（H3N8）ウイルス核酸抽出液

鳥インフルエンザウイルス A/Budgariger/1/77（H3N8）株を生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で培養し得られた漿尿液（ウイルス価 $10^{5.0}$ EID₅₀/mL 以上）を用い、適当と認められた方法で RNA 抽出したもの

付記 14 参照陰性鶏伝染性気管支炎ウイルス核酸抽出液

鶏伝染性気管支炎ウイルス H120 株を生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で培養し得られた漿尿液（ウイルス価 $10^{5.0}$ EID₅₀/mL 以上）を用い、適当と認められた方法で RNA 抽出したもの

付記 15 参照陰性ニューカッスル病ウイルス核酸抽出液

ニューカッスル病ウイルス B1 株を生ワクチン製造用材料の規格 1.1 の発育鶏卵で培養し得られた漿尿液（ウイルス価 $10^{6.0}$ EID₅₀/mL 以上）を用い、適当と認められた方法で RNA 抽出したもの

付記 16 ジエチルピロカーボネート処理水（DEPC 処理水）

水 1,000mL にジエチルピロカーボネート 1 mL を加え、37℃ で 12 ~ 16 時間攪拌した後、121℃ で 15 分間高圧蒸気滅菌したもの

付記 17 増幅試薬用溶解用液

1,000mL 中

ジメチルスルフォキシド

300 mL

0.08mol/L トリス塩酸緩衝液 (pH8.3) 700 mL

付記 18 塩化カリウム溶液

1,000 mL 中

塩化カリウム

51 g

DEPC 処理水

残 量

付記 19 H5 プライマー混合液

DEPC 処理水中に、HA 遺伝子を増幅するプライマーセットをそれぞれ 5.0 μ mol/L の濃度となるように含有しているもの

付記 20 酵素試薬溶解用液

1,000mL 中

ソルビトール

683.14 g

DEPC 処理水

残 量

付記 21 濃縮洗浄液

1,000mL 中

塩化ナトリウム

80 g

塩化カリウム

2 g

トリスヒドロキシメチルアミノメタン

30 g

DEPC 処理水

残 量

付記 22 標識抗体希釈液

濃縮洗浄液を DEPC 処理水で 10 倍に希釈したもの