

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）

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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 加える。60 分間振とう後、洗浄液で洗浄する。基質液 200 μ L を加え、10 分間振とう後、基質停止液 50 μ 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。

1.1.2.3 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 μ L と 940 μ L、40 μ L と 960 μ L、及び 20 μ L と 980 μ L 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を 150 μ L に調製済み消化停止用薬 100 μ L 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 μ L と 940 μ L、40 μ L と 960 μ L、及び 20 μ L と 980 μ L 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 150 μ L に調製済み消化停止用薬 100 μ L 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 μ L 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 μ L 加える。60 分間振とう後、洗浄液で洗浄する。基質液 200 μ L を加え、10 分間振とう後、基質停止液 50 μ 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 3mL 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

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

付記 4 陽性コントロール

コントロール溶液 900 μ L 当たり調製済みコントロール 100 μ 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 μ L を、室温で 14 分間、42°C で 30 分間振とうし、調製済み消化停止用薬 100 μ L を加えて室温で 20 分間振とうしたもの

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 μ L 当たり、調製済みコントロール 100 μ 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 μ L を、室温で 14 分間、42°C で 30 分間振とうし、調製済み消化停止用薬 100 μ L を加えて室温で 20 分間振とうしたもの

付記 6 検出用溶液

ペルオキシダーゼ標識抗 PrP 抗体に水 1mL を加えて溶解したもの 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 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

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 変動係数值

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の