使用の前に本電子化された添付文書をよく読んでください。

**2024年5月改訂（新様式第6版）
*2021年3月改訂（新様式第5版）
承認番号：21300AMZ00801000

体外診断用医薬品

B型肝炎ウイルスコア核酸キット
HBV DNA 検出キット（プレコア／コアプロモーター）

[全般的な注意]

1．本品は体外診断用です。それ以外の目的で使用しないでください。
2．本品の結果に基づく臨床診断は、他の関連する検査結果や臨床症状などとあわせて担当医師が総合的に判断してください。
3．添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された方法及び目的以外での使用については、測定値の信頼性を保証致しません。
4．検体希釈溶液A、B、マスターミックスA、B、シークエンス緩衝液・野生型用A、シークエンス緩衝液・変異型用A及び20倍濃度洗浄液A、Bには0.09%以下のアジ化ナトリウムが含まれています。目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
5．試薬の使用時は、保護眼鏡と使い捨て手袋（パウダーフリー）を着用し、試薬が目、皮膚、粘膜に触れないように注意してください。このようなことが起きた場合は、大量の水で十分に洗い流してください。また、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。こぼした場合は、水で希釈してから拭き取ってください。

[形状・構造等（キットの構成）]

＜プレコア変異の検出＞の構成試薬と＜コアプロモーター変異の検出＞の構成試薬を、組み合わせて使用したり、混合したりしないでください。

＜プレコア変異の検出＞（32 tests）
3、4、9、10は－20℃保存
その他は2～8℃保存

	構成試薬	数量
1	検体希釈溶液A (Specimen diluent A) 塩化マグネシウム	5 mL×1
2	マスターミックスA (Master mix A) AA2Lプライマー、AA3Lプライマー	1.8 mL×1
3	Taq DNA ポリメラーゼA (Taq DNA polymerase A) Taq DNAポリメラーゼ	20 μL×1
4	ウラシル N-グリコシラーゼA (Uracil N-glycosylase A)	20 μL×1
5	アルカリ変性溶液A (Denaturation solution A)	12 mL×1
6	ハイブリダイゼーション緩衝液A (Hybridization buffer A)	8 mL×1
7	シークエンス緩衝液・野生型用A (Sequence buffer (Wild) A)	3.5 mL×1
8	シークエンス緩衝液・変異型用A (Sequence buffer (Mutant) A)	3.5 mL×1
9	クレノウ酵素A (Klenow enzyme A) クレノウフラグメント	5 μL×1
10	クレノウ希釈液A (Klenow diluent A)	200 μL×1
11	HRP標識抗DNP抗体溶液A (Anti-DNP-HRP conjugate A) ペルオキシダーゼ標識抗ジニトロフェニル ウサギポリクローナル抗体	8 mL×1
12	基質液A (Substrate A) 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、過酸化水素	12 mL×1
13	反応停止液A (Stop reagent A)	12 mL×1
14	20倍濃度洗浄液A (20x-Wash concentrate A)	100 mL×1
15	プレコアプローブ結合マイクロプレートA (Pre-C probe coated microwell plate A) 83F-23Bプローブ、アビジン結合マイクロプレート	1 plate

＜コアプロモーター変異の検出＞（32 tests）
3、4は－20℃保存
その他は2～8℃保存

	構成試薬	数量
1	検体希釈溶液B (Specimen diluent B) 塩化マグネシウム	5 mL×1
2	マスターミックスB (Master mix B) 012プライマー、AA2R-Dプライマー	1.8 mL×1
3	Taq DNA ポリメラーゼB (Taq DNA polymerase B) Taq DNAポリメラーゼ	20 μL×1
4	ウラシル N-グリコシラーゼB (Uracil N-glycosylase B)	20 μL×1
5	アルカリ変性溶液B (Denaturation solution B)	5 mL×1
6	ハイブリダイゼーション緩衝液B (Hybridization buffer B)	12 mL×1
7	HRP標識抗DNP抗体溶液B (Anti-DNP-HRP conjugate B) ペルオキシダーゼ標識抗ジニトロフェニル ウサギポリクローナル抗体	12 mL×1
8	基質液B (Substrate B) 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、過酸化水素	12 mL×1
9	反応停止液B (Stop reagent B)	12 mL×1
10	20倍濃度洗浄液B (20x-Wash concentrate B)	100 mL×1
11	コアプロモータープローブ結合マイクロプレートB (Core Promoter probe coated microwell plate B) 5B-CP-Wプローブ、5B-CP-m2プローブ、 CC2F-Bプローブ、アビジン結合マイクロプレート	1 plate

[使用目的]

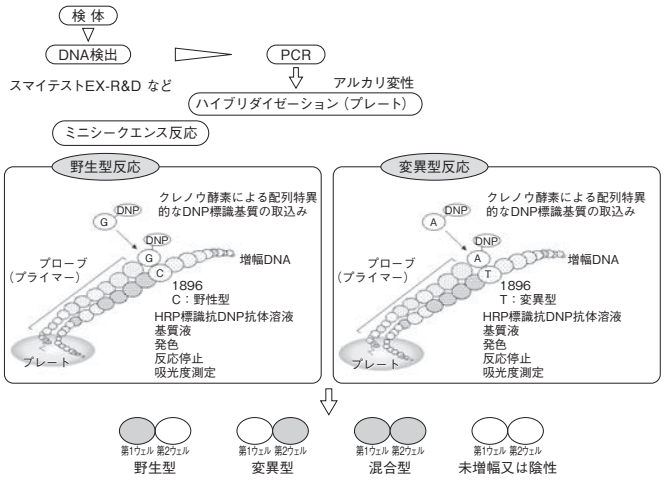
血清中のHBV DNAの検出およびHBV DNAのプレコア変異（nt1896）ならびにコアプロモーター変異（nt1762、1764）の検出

[測定原理]

＜プレコア変異の検出＞

HBVプレコア領域の83番目の塩基の点突然変異（G:Trp → A:Stop codon）を、マイクロプレート上でのミニシークエンス反応を用いて、野生型、変異型、混合型に分別検出します。

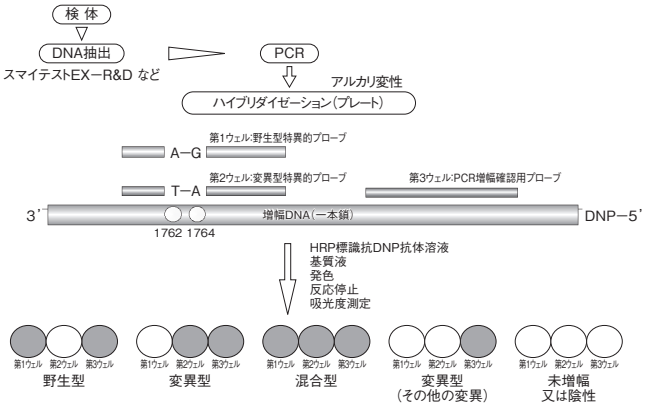
PCR法によってHBV DNAを増幅し、HBV DNAの野生型及び変異型に共通のプローブを用いて、増幅したDNAをマイクロプレート上に捕捉します。捕捉したDNAをテンプレート、プレート上のプローブをプライマーとして、プレート上でシークエンス反応を行い、配列特異的にdinitrophenyl(DNP)標識した基質を取り込ませます。野生型ないし変異型に選択的に取り込まれたDNP標識基質にペルオキシダーゼ標識抗DNP抗体を反応させ、結合したペルオキシダーゼの活性を、テトラメチルベンジジン（TMB）を基質とする発色反応の吸光度を測定することによって検出します。



なお、本品は、ウラシル N-グリコシラーゼ（UNG）によって増幅DNAのキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止します[1)]。本品は増幅反応の基質としてdTTPとdUTPの混合物を用いるため、増幅したDNAの一部のチミン（T）がウラシル（U）になります。増幅したDNAが増幅前の反応液に混入した場合、UNGはU塩基を認識して五炭糖との結合を切断し、U塩基を取り除きます。塩基を失ったDNAは極めて不安定で、増幅過程の最初の加熱によってリン酸結合が切断されるため、増幅反応の鋳型とはなりません。なお、UNG は高温で失活するため、それ以後に増幅されるU塩基を持つ増幅 DNAには影響を与えません。また、UNGは6塩基長以上のDNAのUのみを基質とするため、モノマーのdUTPには影響を与えません。

＜コアプロモーター変異の検出＞

HBV DNA のコアプロモーター領域を含む 200 base pair を、dinitrophenyl(DNP)標識されたプライマーを使用してPCR増幅します。増幅したDNAをアルカリ変性して一本鎖にした後、コアプロモーター領域の野生型配列に対応する野生型プローブ、もしくは、nt1762(A→T)及びnt1764(G→A)の変異に対応する変異型特異的プローブ（specific probe）を結合したマイクロプレートのウェル中でハイブリダイズさせます（第1ウェル：野生型特異的プローブ、第2ウェル：変異型特異的プローブ）。また、増幅する領域で保存性が高い部分をプローブとして結合したウェル（第3ウェル：PCR増幅確認用HBV DNA特異的プローブ）を設けることによって、PCR増幅を確認します。すなわち、specific probeで検出する変異型（nt1762：T、nt1764：A）以外の様々な変異（多変異、欠失、挿入など）のために第1ウェル、第2ウェルにハイブリダイズしない場合と、PCR増幅が起こらない場合を区別することが可能です。プローブにハイブリダイズしたDNAにペルオキシダーゼ標識抗DNP抗体を反応させ、ペルオキシダーゼ活性をテトラメチルベンジジン（TMB）を基質とする発色反応の吸光度を測定することによって検出します。



なお、本品は、ウラシル N- グリコシラーゼ（UNG）によって増幅DNAのキャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止します[1)]。本品は増幅反応の基質としてdTTPの代わりにdUTPを用いるため、増幅したDNAのチミン（T）が全てウラシル（U）になります。増幅したDNAが増幅前の反応液に混入した場合、UNGはU塩基を認識して五炭糖との結合を切断し、U塩基を取り除きます。塩基を失ったDNAは極めて不安定で、増幅過程の最初の加熱によってリン酸結合が切断されるため、増幅反応の鋳型とはなりません。なお、UNGは高温で失活するため、それ以後に増幅されるU塩基を持つ増幅DNAには影響を与えません。また、UNGは6塩基長以上のDNAのUのみを基質とするため、モノマーのdUTPには影響を与えません。

[操作上の注意]

1．コンタミネーションの防止方法

本品は、UNGをマスターミックスに加えることによって、PCRで最も起こりやすい増幅DNAによるキャリーオーバーコンタミネーションを防止することができます。しかしながら、多量の増幅DNAが混入するとUNGでは処理しきれないことがあります。また、検体間のクロスコンタミネーションを防止することはできません。クロスコンタミネーションは、主にエアロゾルや検体、陽性コントロールなどで汚染されたピペットの使用が原因となりますので、検査区域の分割やピペットの専用化、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液などを用いて作業環境を清浄化することで、クロスコンタミネーションの危険を最小限にすることができます。したがって、次の事項に従うことを推奨します。なお、次の事項に従っても、クロスコンタミネーションが起こる可能性がありますので、十分に注意してください。

(1) 操作を行う場所は、エリア1、エリア2、及びエリア3の3区域に分けてください。各エリア専用のピペットとチップなどの器具を用意し、他のエリアとの共用はしないでください。

(2) エリア1では、PCR反応溶液の調製と分注、20倍希釈クレノウ酵素の調製、シークエンス反応溶液の調製を行います。紫外線照射可能なクリーンベンチなどをエリア1として利用すると便利です。

(3) エリア2では検体とコントロールの調製及び調製した検体の分注を行います。チップはポジティブディスプレースメントチップあるいはフィルター付きのものを用いてください。

(4) エリア3では、洗浄液の調製、増幅反応と検出を行います。このエリアで使用する機器や保護衣及び増幅したDNAは、他のエリアに持ち込まないでください。

(5) 実験台、使用器具などがDNAで汚染された場合は、用時調製した0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液でよく拭き取ってください。ピペットなどの器具外部の汚染には、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液による拭き取り、あるいはUV照射を行ってください。ピペットなどの内部が汚染された場合は、直ちに使用を中止してください。

2．検体の調製方法

血清から抽出した核酸溶液を検体として使用します。

調製方法を以下に示します。なお、使用する血清の量は50～100 μLを推奨します。

抽出後、風乾などによって沈渣を乾燥させ、検体希釈溶液50 μLに溶解します。

核酸抽出・精製が確実に行われなかった場合、偽陰性となる可能性があります。十分に注意して操作してください。

(1) 一般的な調製方法［proteinase K、phenol-chloroform による精製］

詳しくは主要文献 2) を参照してください。

(2) スマイテスト™EX-R&D（株式会社医学生物学研究所、GS-J0201）による調製方法

詳しくは当該製品の使用説明書を参照してください。

3．妨害物質

ヘモグロビン（480 mg/dL）、ビリルビン（18.0 mg/dLまで）、乳び（ホルマジン濁度 2850度）及びアルブミン（6.0 g/dL）による影響は認められません。

[用法・用量（操作方法）]

本試験は熟練を要するため、検体の調製方法、試薬の調製方法及び操作方法を十分に修得するまでは2重測定することを推奨します。なお、エリア1～3については[操作上の注意]1. を参照してください。

1．本品以外に必要な器具・器材・試薬

[DNA抽出]
- ・安全キャビネット
- ・マイクロピペット、フィルター付きチップ（疎水性フィルター方式のチップ）
- ・微量高速遠心器（冷却装置付が望ましい）
- ・ヒートブロックあるいはエアー式インキュベーター（55℃を保持できるもの）
- ・連続分注器
- ・ボルテックスミキサー
- ・1.5 mLあるいは2.0 mLマイクロチューブ

[PCR]
- ・溶液調製用クリーンベンチ
- ・マイクロピペット、フィルター付きチップ
- ・サーマルサイクラー（Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700など）
- ・増幅反応用マイクロチューブ（200 μL用）

[検出]
- ・マルチチャンネル式ピペット（25 μL及び100 μLを量り取れるもの）
- ・プレートミキサー
- ・インキュベーター（37℃を保持できるもの）
- ・マイクロプレートウォッシャー
- ・マイクロプレートリーダー（450 nmの波長で測定できるもの。対照波長に620～650 nmを設定できるものが望ましい）
- ・マイクロピペット、チップ
- ・精製水

[その他]
- ・UV照射箱（コンタミネーション防止用）

2．試薬の調製方法

＜プレコア変異の検出＞

(1) PCR反応溶液Aの作製［用時調製］（エリア1で調製してください）
マスターミックスA 1.6 mLにTaq DNAポリメラーゼA 16 μLとウラシル N-グリコシラーゼA 16 μLを加え、十分に転倒混和します。この分量で32テスト分です。検体が混入しないように注意してください。2～8℃で保存し、2時間以内に使用してください。

(2) 20倍希釈クレノウ酵素Aの作製（エリア1で調製してください）
クレノウ酵素A 5 μLにクレノウ希釈液A 95 μLを加え、穏やかにピペッティングしてよく混和します。－20℃の保存で1箇月間安定です。

(3) シークエンス反応溶液の作製［用時調製］（エリア1で調製してください）
シークエンス緩衝液・野生型用A、シークエンス緩衝液・変異型用A、それぞれ3.2 mLに、(2)の20倍希釈クレノウ酵素A 3.2 μLを加えて十分に転倒混和し、シークエンス反応溶液・野生型用A、シークエンス反応溶液・変異型用Aとします。この分量でそれぞれ32テスト分です。2～8℃で保存し、1時間以内に使用してください。

(4) 洗浄液の作製（エリア3で調製してください）
20倍濃度洗浄液Aを精製水で20倍に希釈します。（例えば、20倍濃度洗浄液A 50 mLに精製水 950 mLを加えて混和します。）2～25℃の保存で2週間安定です。

＜コアプロモーター変異の検出＞

(1) PCR反応溶液Bの作製［用時調製］（エリア1で調製してください）
マスターミックスB 1.6 mLにTaq DNAポリメラーゼB 16 μLとウラシル N-グリコシラーゼB 16 μLを加え、十分に転倒混和します。この分量で32テスト分です。検体が混入しないように注意してください。2～8℃で保存し、2時間以内に使用してください。

(2) 洗浄液の作製（エリア3で調製してください）
20倍濃度洗浄液Bを精製水で20倍に希釈します。（例えば、20倍濃度洗浄液B 50 mLに精製水 950 mLを加えて混和します。）2～25℃の保存で2週間安定です。

3．操作方法

＜プレコア変異の検出＞

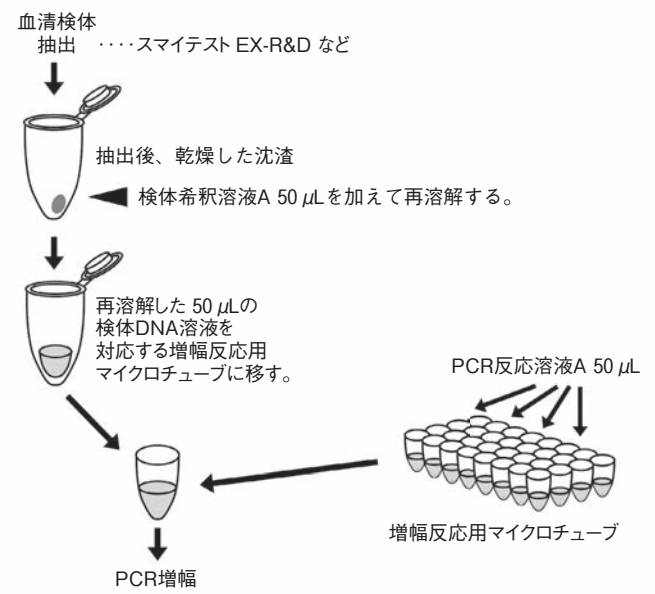
下記 (1) の操作はエリア1で行ってください。

*(1) PCR反応溶液A 50 μL（2. (1) 参照）を増幅反応用マイクロチューブに分注します。

下記 (2)、(3) の操作はエリア2で行ってください。

(2) 検体を調製します。[操作上の注意]2. を参照してください。

(3) 検体希釈溶液Aに再溶解した検体DNA溶液 50 μLを対応する増幅反応用マイクロチューブに加え、蓋をします。
検体は必ず本品の検体希釈溶液Aで溶解してください。



下記(4)～(16)の操作はエリア3で行ってください。

(4) 次の条件でインキュベートします。
(Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700)
Hold　50℃　5 min
Hold　95℃　1 min
Cycle　95℃　15 sec, 64℃ 20 sec (40 cycles)
Cycle　90℃　15 sec, 60℃ 20 sec (30 cycles)
Hold　60℃　4 min
Hold　95℃　10 min
Hold　72℃　FOREVER
(検出操作に移すまで72℃で保温します。4時間以上の放置は避けてください。)

(5) 反応液が飛散しないように注意して増幅反応用マイクロチューブの蓋を開け、直ちに各チューブにアルカリ変性溶液A 100 μLを加えて混和し、室温（20～25℃）で10分間放置します。

(6) 室温（20～25℃）に戻したプレコアプローブ結合マイクロプレートAを取り出し、各増幅反応用マイクロチューブに対応するウェルを設定します。1検体で2ウェル使用します。

(7) 各ウェルにハイブリダイゼーション緩衝液A 100 μLを量り取ります。

(8) (5)で変性させた増幅反応液 25 μLを対応する2ウェルにそれぞれ加え、液が青色から淡黄色になり、全体が均一になるまで、プレートミキサーなどで十分に混和した後、蓋をして、37℃で30分間インキュベートします。

(9) 各ウェルの溶液を吸引除去した後、洗浄液 350 μLを加えて洗浄し、洗浄液を吸引除去します。この操作を更に4回繰り返します。操作後、ペーパータオルなどの上で逆さにして水分を除去します。

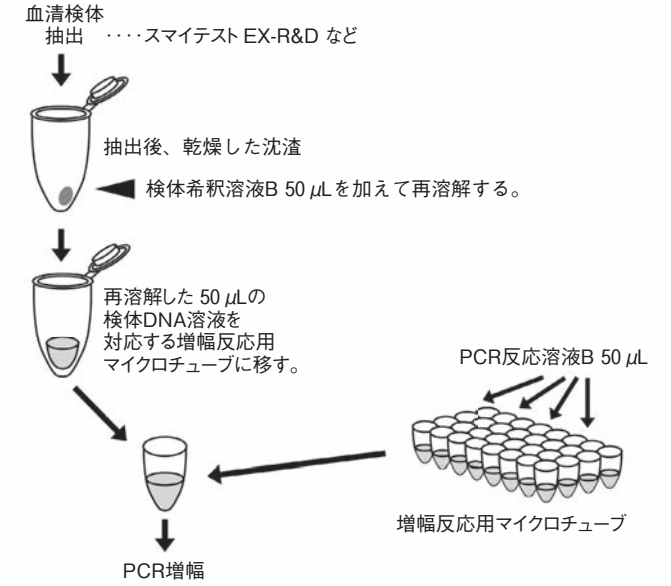
(10) 野生型判定のためのウェルにシークエンス反応溶液・野生型用Aを、変異型判定のためのウェルにシークエンス反応溶液・変異型用Aを、それぞれ100 μL加え、蓋をして、37℃で正確に30分間インキュベートします。

(11) シークエンス反応溶液を加えた順に、各ウェルにアルカリ変

性溶液A 100 μLを加え、室温（20～25℃）で1分間インキュベートしてシークエンス反応を停止します。
(12) 各ウェルの溶液を吸引除去した後、洗浄液 350 μLを加えて洗浄し、洗浄液を吸引除去します。この操作を更に4回繰り返します。操作後、ペーパータオルなどの上で逆さにして水分を除去します。
(13) 各ウェルにHRP標識抗DNP抗体溶液A 100 μLを飛散しないように注意して加え、蓋をして、37℃で30分間インキュベートします。
(14) 各ウェルの溶液を吸引除去した後、洗浄液 350 μLを加えて洗浄し、洗浄液を吸引除去します。この操作を更に4回繰り返します。操作後、ペーパータオルなどの上で逆さにして水分を除去します。
(15) 各ウェルに基質液A 100 μLを加え、蓋をして、室温（20～25℃）、暗所で15分間インキュベートします。
(16) 各ウェルに反応停止液A 100 μLを加え、1時間以内に波長 450 nmの吸光度を測定します。基質液Aと反応停止液Aのみを混合したウェル（15、16の操作）をブランクウェルとして吸光度を0に調整します。620～650 nmを対照波長としてください。

＜コアプロモーター変異の検出＞
下記(1)の操作はエリア1で行ってください。
*(1) PCR反応液B 50 μL（2.(1) 参照）を増幅反応用マイクロチューブに分注します。

下記(2)、(3)の操作はエリア2で行ってください。
(2) 検体を調製します。[操作上の注意]2. を参照してください。
(3) 検体希釈溶液Bに再溶解した検体DNA溶液 50 μLを対応する増幅反応用マイクロチューブに加え、蓋をします。検体は必ず本品の検体希釈溶液Bで溶解してください。



下記(4)～(13)の操作はエリア3で行ってください。
(4) 次の条件でインキュベートします。
(Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700)
Hold　50℃　5 min
Hold　95℃　1 min
Cycle　95℃　15 sec, 64℃ 20 sec (40 cycles)
Cycle　90℃　15 sec, 60℃ 20 sec (30 cycles)
Hold　60℃　4 min
Hold　95℃　10 min
Hold　72℃　FOREVER
（検出操作に移すまで72℃で保温します。4時間以上の放置は避けてください。）
(5) 反応液が飛散しないように注意して増幅反応用マイクロチューブの蓋を開け、直ちに各チューブにアルカリ変性溶液B 100 μLを加えて混和し、室温（20～25℃）で10分間放置します。
(6) 室温（20～25℃）に戻したコアプロモータープローブ結合マイクロプレートBを取り出し、各増幅反応用マイクロチューブに対応するウェルを設定します。1検体で3ウェル（野生型検出用ウェル、変異型検出用ウェル、増幅確認用ウェル、各1ウェル）使用します。
1、4、7、10列：野生型検出用ウェル
2、5、8、11列：変異型検出用ウェル
3、6、9、12列：増幅確認用ウェル
(7) 各ウェルにハイブリダイゼーション緩衝液B 100 μLを量り取ります。
(8) (5)で変性させた増幅反応液 25 μLを対応する3ウェルにそれぞれ加え、液が青色から淡黄色になり、全体が均一になるまで、プレートミキサーなどで十分に混和した後、蓋をして、37℃で30分間インキュベートします。
(9) 各ウェルの溶液を吸引除去した後、洗浄液 350 μLを加えて洗浄し、洗浄液を吸引除去します。この操作を更に4回繰り返します。操作後、ペーパータオルなどの上で逆さにして水分を除去します。
(10) 各ウェルにHRP標識抗DNP抗体溶液B 100 μLを飛散しないように注意して加え、蓋をして、37℃で30分間インキュベートします。
(11) 各ウェルの溶液を吸引除去した後、洗浄液 350 μLを加えて洗浄し、洗浄液を吸引除去します。この操作を更に4回繰り返します。操作後、ペーパータオルなどの上で逆さにして水分を除去します。
(12) 各ウェルに基質液B 100 μLを加え、蓋をして、室温（20～25℃）、暗所で15分間インキュベートします。
(13) 各ウェルに反応停止液B 100 μLを加え、1時間以内に波長 450 nmの吸光度を測定します。基質液Bと反応停止液Bのみを混合したウェル（12、13の操作）をブランクウェルとして吸光度を0に調整します。620～650 nmを対照波長としてください。

[測定結果の判定法]
＜HBV DNA判定＞
[プレコア領域の陽性、陰性の判定法]
第1ウェル又は第2ウェルの吸光度が0.100を超える場合を陽性、第1ウェル及び第2ウェルの吸光度がともに0.100以下の場合を陰性とします。

[コアプロモーター領域の陽性、陰性、判定保留の判定法]
第3ウェルの吸光度が0.800を超える場合を陽性、0.400以下の場合を陰性、0.400を超え0.800以下の場合を判定保留とします。

プレコア領域及びコアプロモーター領域が両領域とも陽性又はどちらか一方の領域が陽性の場合はHBV DNA陽性、両領域とも陰性の場合はHBV DNA陰性、プレコア領域が陰性かつコアプロモーター領域が判定保留の場合はHBV DNA判定保留、とします。以上をまとめると、HBV DNA判定法は下表のとおりです。

		コアプロモーター領域判定		
		陽　性	陰　性	判定保留
プレコア領域判定	陽性	陽　性	陽　性	陽　性
	陰性	陽　性	陰　性	判定保留

＜プレコア領域の判定法＞
吸光度が0.100を超える場合を陽性、0.100以下の場合を陰性とします。
[野生型、変異型、混合型の判定法]
野生型検出用ウェルのみ陽性の場合は野生型、変異型検出用ウェルのみ陽性の場合は変異型、両方陽性の場合は混合型とします。
陰性の場合、ウイルス量が少なく、キットの感度以下あるいはプライマーの領域に変異がある場合等は測定不能であることが考えられます。したがって、ウイルスの存在自体を否定するものではありません。
本品は定性試薬であるため、吸光度とHBV DNAのコピー数に相関はありません。
以下に混合比の計算法を示しますが、正確な比率が求められるものではありません。

変異型、野生型の比率（参考値）計算法
野生型検出用ウェルと変異型検出用ウェルの両方が陽性の場合、下記の式を用いて算出することができます。

$$変異型\% = \frac{変異型OD値 - 0.050}{(変異型OD値-0.050)+(野生型OD値-0.050)} \times 100$$

野生型％＝100－変異型％　【0.050：健常人全体平均+SD】

＜コアプロモーター領域の判定法＞

第3ウェル（PCR増幅確認用HBV DNA特異的プローブが結合されている）の吸光度が0.800を超える場合を陽性、0.400を超え0.800以下の場合を判定保留（増幅不良、未増幅）、0.400以下の場合を陰性とします。

［野生型、変異型、混合型の判定法］

PCR増幅陽性（第3ウェルの吸光度が0.800を超える）の場合のみ、第1ウェル（野生型検出用特異的プローブが結合されている）及び第2ウェル（変異型検出用特異的プローブが結合されている）の吸光度から、下表に従って判定します。

第1ウェル吸光度	第2ウェル吸光度	第3ウェル吸光度	判　定	
0.400を超える	0.400以下	0.800を超える	野生型	陽性
0.400以下	0.400を超える	0.800を超える	変異型	
0.400を超える	0.400を超える	0.800を超える	混合型	
0.400以下	0.400以下	0.800を超える	変異型(その他の変異)(nt1762,1764以外の変異を含む多変異・欠失・挿入)	
－＊	－＊	0.400を超え0.800以下	判定保留（増幅不良、未増幅）	
0.400以下	0.400以下	0.400以下	陰　性	

＊すべての測定値

陰性の場合、ウイルス量が少なく、キットの感度以下あるいはプライマーの領域に変異がある場合等は測定不能であることが考えられます。したがって、ウイルスの存在自体を否定するものではありません。

本品は定性試薬であるため、吸光度とHBV DNAのコピー数に相関はありません。したがって、混合型と判定される場合もその混合比を推定することはできません。

また、本品の性質上、多変異・欠失・挿入などの変異を含むものと野生型あるいは変異型であるが増幅不良により第1ウェル、第2ウェルの吸光度が上昇しないもの及びnt1762、1764は野生型の配列だが他の部分に変異を持ち第1ウェルの発色が弱いものは判定できないことがあります。以上のことから、判定保留の場合は、増幅不良の可能性があるため、再検査することを推奨します。

以下に各種配列パターンにおける検出例を示しますが、クローン化されたDNA単独での測定結果であるため、実際の検体で得られる数値とは異なります。

各配列パターンによる検出例

－シークエンス－

←　プローブ設定領域　→

（nt1762）↓　（nt1764）↓

	5.-TAGGTTAAAGGTCTTTGTACTAGGAGGCT-3.	プレート判定	＜第1ウェル＞	＜第2ウェル＞	＜第3ウェル＞
1	－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－	wild	3.310	0.016	4.000
2	－－－－－－－T－A－－－－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.030	4.000	4.000
3	－－－－－－－T－A－T－－－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.027	3.226	2.571
4	－－－－－－－T－A－－－－－－－－T－－－－－－－－－－－	mutant	0.019	3.156	2.526
5	－－－－－－－T－A－－－－C－－－T－－－－－－－－－－－－	mutant	0.033	1.147	3.004
6	－－－－－－－－－－A－T－A－－－－T－－－－－－－－－－－	mutant	0.021	0.035	3.225
7	－－－－－－－T－A－－－A－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.014	2.822	3.210
8	－－－－－－－T－A－－－C－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.043	2.866	3.409
9	－－－－－－－T－A－－－－－－－－A－－－－－－－－－－－	mutant	0.027	3.905	3.719
10	－－－－－－－T－AC－－－－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.018	3.431	3.403
11	－－－－C－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－	wild	1.493	0.020	3.817
12	－－－－C－－－－－－－－－A－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.124	0.013	3.492
13	－－－－C－－－－－－－－G－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.013	0.008	2.345
14	－－－－C－－－／／／／／－－／－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.105	0.015	2.610
15	／／／／／／／／／／／／／／／／／－－－－－－－－－－－－	mutant	0.017	0.010	1.650
16	－－－－C－－－－－－－－－－／／／／／／／／－－－－－－	mutant	0.019	0.021	3.536
17	－－－－C－－－－－－－－－／／／／／／／／－－－－－－－	mutant	0.026	0.019	3.470
18	－－－－C－－C－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.360	0.011	3.849
19	－－－－C－－－T－A－－－－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.017	2.240	4.000
20	－－－－－－G－－－－－－－－－－－－G－－－－－－－－－－	mutant	0.067	0.044	3.871
21	－－－－－－G－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.797	0.024	3.847
22	－－－－－－－－－－A－T－－－－－－A－－－－－－－－－－	mutant	0.030	0.368	4.000
23	－－－－－－－T－A－T－A－－－－T－－－－－－－－－－－－	mutant	0.051	0.282	4.000
24	－－－－／／／／／／／／／／／／／／／／／／／／－－－－－	mutant	0.008	0.007	2.937
25	－－－－－－－－－－A－T－－－－－－－－－－－－－－－－－	mutant	0.034	2.092	4.000
26	－－－－－－－－－－－－－－－－－－－－T－－－－－－－－－	wild	1.885	0.006	4.000
27	－－－－－－－－T／／／／／／／／－－T－－－－－－－－－－	mutant	0.006	0.006	3.624
28	－－－－－－－－－－－－－－－－－－C－－C－－－－－－－－	wild	4.000	0.013	4.000

（－：保存、／：欠失を示す）

［性能］

＜プレコア変異の検出＞

1．感度試験

(1) 陰性管理検体を3重測定したとき、野生型判定用ウェル（第1ウェル）の吸光度の平均値は0.100以下であり、変異型判定用ウェル（第2ウェル）の吸光度の平均値は0.100以下です。

(2) 野生型管理検体を3重測定したとき、野生型判定用ウェル（第1ウェル）の吸光度の平均値は0.400を超え、変異型判定用ウェル（第2ウェル）の吸光度の平均値は0.100以下です。

(3) 変異型管理検体を3重測定したとき、野生型判定用ウェル（第1ウェル）の吸光度の平均値は0.100以下であり、変異型判定用ウェル（第2ウェル）の吸光度の平均値は0.400を超えます。

(4) 混合型管理検体を3重測定したとき、野生型判定用ウェル（第1ウェル）の吸光度の平均値は0.200を超え、変異型判定用ウェル（第2ウェル）の吸光度の平均値は0.200を超えます。

(5) 野生型管理検体の野生型判定用ウェル（第1ウェル）と対応する陰性管理検体のウェル（第1ウェル）及び変異型管理検体の変異型判定用ウェル（第2ウェル）と対応する陰性管理検体のウェル（第2ウェル）の吸光度の差はそれぞれ0.300以上です。

2．正確性試験

(1) 陰性管理検体を測定するとき、陰性を示します。

(2) 野生型管理検体を測定するとき、野生型を示します。

(3) 変異型管理検体を測定するとき、変異型を示します。

(4) 混合型管理検体を測定するとき、混合型を示します。

3．同時再現性試験

(1) 陰性管理検体を3回同時に測定するとき、すべて陰性を示します。

(2) 野生型管理検体を3回同時に測定するとき、すべて野生型を示します。

(3) 変異型管理検体を3回同時に測定するとき、すべて変異型を示します。

(4) 混合型管理検体を3回同時に測定するとき、すべて混合型を示します。

4．最小検出感度

1回測定当たり10^2コピー（血清から抽出したHBV DNAを溶解した検体希釈溶液50μLあたり）

＜コアプロモーター変異の検出＞

1．感度試験

(1) 陰性管理検体を3重測定したとき、野生型判定用ウェル（第1ウェル）の吸光度の平均値は0.100以下であり、変異型判定用ウェル（第2ウェル）の吸光度の平均値は0.100以下であり、増幅判定用ウェル（第3ウェル）の吸光度の平均値は0.100以下です。

(2) 野生型管理検体を3重測定したとき、野生型判定用ウェル（第1ウェル）の吸光度の平均値は0.700を超え、変異型判定用ウェル（第2ウェル）の吸光度の平均値は0.400以下であり、増幅判定用ウェル（第3ウェル）の吸光度の平均値は1.500を超えます。

(3) 変異型管理検体を3重測定したとき、野生型判定用ウェル（第1ウェル）の吸光度の平均値は0.400以下であり、変異型判定用ウェル（第2ウェル）の吸光度の平均値は0.700を超え、増幅判定用ウェル（第3ウェル）の吸光度の平均値は1.500を超えます。

(4) 混合型管理検体を3重測定したとき、野生型判定用ウェル（第1ウェル）の吸光度の平均値は0.700を超え、変異型判定用ウェル（第2ウェル）の吸光度の平均値は0.700を超え、増幅確認用ウェル（第3ウェル）の吸光度の平均値は1.500を超えます。

(5) 野生型管理検体の野生型判定用ウェル（第1ウェル）と対応する陰性管理検体のウェル（第1ウェル）及び変異型管理検体の変異型判定用ウェル（第2ウェル）と対応する陰性管理検体のウェル（第2ウェル）の吸光度の差はそれぞれ0.600以上です。

2．正確性試験

(1) 陰性管理検体を測定するとき、陰性を示します。

(2) 野生型管理検体を測定するとき、野生型を示します。

(3) 変異型管理検体を測定するとき、変異型を示します。

(4) 混合型管理検体を測定するとき、混合型を示します。

3．同時再現性試験
(1) 陰性管理検体を3回同時に測定するとき、すべて陰性を示します。
(2) 野生型管理検体を3回同時に測定するとき、すべて野生型を示します。
(3) 変異型管理検体を3回同時に測定するとき、すべて変異型を示します。
(4) 混合型管理検体を3回同時に測定するとき、すべて混合型を示します。

4．最小検出感度
1回測定当たり10^2コピー（血清から抽出したHBV DNAを溶解した検体希釈溶液50 μLあたり）

[臨床的意義]

B型肝炎ウイルス(HBV)はDNAウイルスですが、増殖時にRNAからDNAへの逆転写の過程を経るため、プレコア領域、コアプロモーター領域、S領域、P領域、X領域など様々な領域に変異が認められます。そのうちプレコア領域では、83番目の塩基(nt1896)におけるGからAへの点変異が多く報告されています[2)-5)]。この点変異によってHBe抗原前駆体タンパク質の翻訳が途中で停止し、e抗原が分泌されなくなることが知られています(翻訳レベルの障害)。また、コアプロモーター領域は、プレコア領域の上流に位置し、e抗原タンパク質の発現に転写レベルで作用すると考えられています。コアプロモーター領域では、転写因子の結合部位に当たるnt1762の塩基がAからT、nt1764の塩基がGからAに変わる変異が多く報告されています[6),7)]。これらの変異によって転写因子の結合が阻害され、プロモーター活性に影響を与えると考えられています(転写レベルの障害)[8),9)]。

*従来、HBe抗原の陰性化、さらに抗HBe抗体の陽性化とともにB型慢性肝炎は鎮静化すると考えられてきましたが、前述のプレコア領域やコアプロモーター領域に変異を有するHBe抗原非産生株（mutant HBV）の存在が明らかになったため、HBe抗原が消失した後も肝炎が持続する場合は、これらの変異を考慮して、HBV-DNA定量検査やHBs抗原定量検査などを行う必要があります。これらの変異は急性肝炎による劇症肝炎において高頻度に認められ[10),11)]、また、肝細胞がんのリスク因子であることも報告されています[12),13)]。

本品は、プレコア及びコアプロモーター領域における上記の変異の野生型と変異型を、遺伝子増幅法によって検出します。したがって、ウイルス量が少ない場合でもHBV DNAのスクリーニングが可能であり、また、従来の抗原・抗体系の検査では判定できないHBV遺伝子のプレコア及びコアプロモーターの上記の変異株の存在を検出することが可能です。

本品は、プレコア変異の測定にはミニシークエンス法を、コアプロモーター変異の測定にはspecific probe法を採用し[14)]、より簡便な操作で迅速・高感度かつ特異的にプレコア変異とコアプロモーター変異を検出することが可能です。

[臨床性能試験成績]

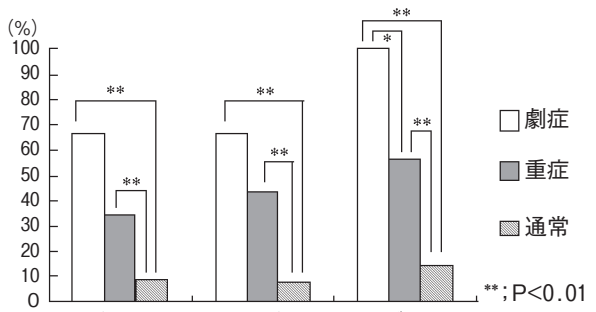
1．B型急性肝炎[15)]

B型急性肝炎と診断された133症例を、通常肝炎、重症肝炎、劇症肝炎に分類し、重症度別に本品でのHBV DNA検出結果ならびにプレコア領域及びコアプロモーター領域における検出結果を比較しました。

	本品でのHBV DNA陽性	プレコア領域陽性	コアプロモーター領域陽性
通常肝炎(n=98)	97(99.0%)	97(99.0%)	86(87.8%)
重症肝炎(n=23)	22(95.7%)	21(91.3%)	21(91.3%)
劇症肝炎(n=12)	12(100.0%)	12(100.0%)	11(91.7%)
合計(n=133)	131(98.5%)	130(97.7%)	118(88.7%)

133症例中131例において本品でHBV DNAを検出し、検出率は98.5%でした。プレコア領域単独での検出率は97.7%、コアプロモーター領域単独での検出率は88.7%であったことから、両領域を測定することによって検出率がより高くなることが期待できます。

また、劇症肝炎、重症肝炎及び通常肝炎の各群におけるプレコア領域及びコアプロモーター領域の変異を測定した結果は以下でした。



	プレコア変異型	コアプロ変異型	いずれか変異型
劇症肝炎	8/12 (66.7%)	8/12 (66.7%)	12/12 (100.0%)
重症肝炎	8/23 (34.8%)	10/23 (43.5%)	13/23 (56.5%)
通常肝炎	9/98 (9.2%)	8/98 (8.2%)	14/98 (14.3%)

2．B型慢性肝炎[16)]

B型慢性肝炎と診断された247症例を、AsC、CPH、CAH2A、CAH2B、LC、HCCの6群に分類し、病型別に本品でのHBV DNAの検出結果（プレコア領域検出率、コアプロモーター領域検出率）、ウイルスのDNA量を比較しました。なお、ウイルスのDNA量はカイロンプローブ法で測定し、検出限界（10^5コピー /mL）以上を陽性としました。

	本品でのHBV DNA陽性	プレコア領域陽性	ｺｱﾌﾟﾛﾓｰﾀｰ領域陽性	ｶｲﾛﾝﾌﾟﾛｰﾌﾞ法陽性
AsC(n=29)	27(93.1%)	27(93.1%)	23(79.3%)	8(27.6%)
CPH(n=32)	32(100%)	32(100%)	32(100%)	20(62.5%)
CAH2A(n=77)	77(100%)	77(100%)	77(100%)	60(77.9%)
CAH2B(n=39)	39(100%)	39(100%)	39(100%)	29(74.4%)
LC(n=36)	35(97.2%)	35(97.2%)	35(97.2%)	25(69.4%)
HCC(n=34)	34(100%)	34(100%)	34(100%)	21(61.8%)
合計(n=247)	244(98.8%)	244(98.8%)	240(97.2%)	163(66.0%)

本品は247症例中244例でHBV DNAを検出し、検出率は98.8%でした。検出しなかった3症例は、いずれもHBs抗原陰性であり、カイロンプローブ法でのウイルスのDNA量は検出限界以下でした。また、下表に示すように、84症例（34.0%）はカイロンプローブ法においてウイルスのDNA量が検出限界以下でしたが、本品で検出しなかった症例は3症例のみ（1.2%）でした。したがって、本品はより高感度にHBV DNAを検出すると考えられます。

		本品によるHBV DNAの検出		
		陽　性	陰　性	合　計
カイロンプローブ法	陽　性	159	0	159
	陰　性	81	3	84
	データなし	4	0	4
	合　計	244	3	247

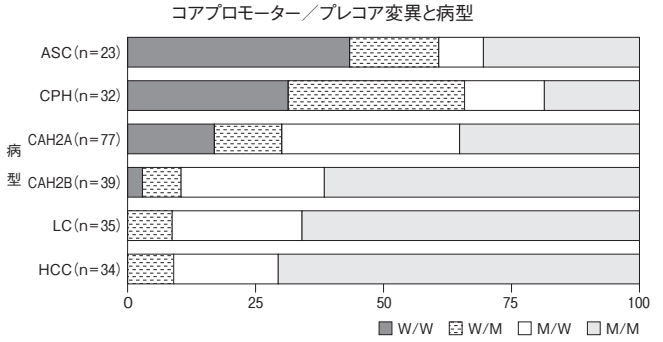
一方、B型肝炎ウイルス（HBV）のプレコア領域及びコアプロモーター領域が変異することによって、e抗原が分泌されなくなることが知られています。そこで、HBe抗原陰性の症例（247症例中113例）における両領域の変異の関連を検討した結果は以下でした。

＜HBe抗原陰性113例＞

		コアプロモーター領域			
		Mutant	Wild	判定保留／－	合計
プレコア領域	Mutant	74	21	3	98
	Wild	7	4	1	12
	－	0	0	3	3
	合計	81	25	7	113

両領域又はどちらか一方の領域が変異である症例は113症例中105例（92.9%）であり、これはHBe抗原陰性の結果とほぼ一致します。またプレコア領域及びコアプロモーター領域の両方が陰性であった3例は、いずれもウイルスのDNA量が検出限界以下かつs抗原が陰性であったことから、ウイルスがほぼ存在しないために両領域とも陰性であったと考えられます。

また、AsC、CPH、CAH2A、CAH2B、LC、HCCの各群におけるHBVプレコア領域及びコアプロモーター領域の変異を測定した結果は以下でした。



W/W：コアプロモーター野生型／プレコア野生型
W/M：コアプロモーター野生型／プレコア変異型
M/W：コアプロモーター変異型／プレコア野生型
M/M：コアプロモーター変異型／プレコア変異型

[使用上又は取扱い上の注意]

1．増幅反応の準備は、紫外線照射装置が装備されたフード内で行ってください。ピペットなどは、常にフード内に置いてください。フード内は使用後に紫外線を十分に照射してください。紫外線を直視したり直接皮膚に照射しないでください。増幅後のDNAは、増幅を準備する部屋に持ち込まないでください。検体の分注には、ポジティブディスプレースメント方式ピペットと使い捨てチップを使用してください。
2．検体や本品を取り扱う際は、使い捨て手袋（パウダーフリー）及び実験着を着用し、測定終了後は手をよく洗ってください。使い捨て手袋はパウダーフリーの製品を使用してください。手袋のパウダーには酵素反応を阻害する物質を含むものがあり、反応中に混在すると吸光度を低減する恐れがあります。特にプレコア変異測定におけるミニシークエンス反応を強く阻害する場合があり注意が必要です。
3．外箱記載の使用期限を過ぎた試薬は、測定結果の信頼性を保証しかねますので、使用しないでください。
4．開封後はなるべく早く使用し、保存する場合は、袋や蓋をしっかりしめ、指定の貯蔵方法で保存してください。特に、Taq DNAポリメラーゼ、ウラシル N-グリコシラーゼ、クレノウ酵素は、室温で放置すると失活する恐れがあるため使用直前まで−20℃で保存してください。
5．特にTaq DNAポリメラーゼ、ウラシル N-グリコシラーゼ、クレノウ酵素の使用量は微量であるため、正確な量を分注できるピペットを使用してください。
6．容器、器具は、清浄なものを使用してください。
7．キット中の容器などを他の目的に転用しないでください。
8．指定された反応温度、時間以外での使用は避けてください。
9．異なるロット番号の試薬を混合して使用しないでください。
10．検体は感染性を有するものとして、施設の安全規定に従って取り扱ってください。検体に使用した器具類は、オートクレーブ処理した後、廃棄してください。
11．使用後の容器は、焼却処理するか、廃棄する場合は、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理してください。
12．検体希釈溶液、マスターミックス、シークエンス緩衝液及び20倍濃度洗浄液には、0.09%以下のアジ化ナトリウムが添加されています。アジ化ナトリウムは配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。アジ化ナトリウムを含む廃液は十分な量の水で洗い流してください。
*13．ハイブリダイゼーション緩衝液は析出する場合がありますが、試薬性能に影響はありません。析出を認めた場合は、ハイブリダイゼーション緩衝液を加温して析出物を十分に溶解させ、室温（20〜30℃）に戻してから使用してください。

[貯蔵方法・有効期間]

貯蔵方法：以下の構成試薬は−20℃で保存
＜プレコア変異の検出＞
3　Taq DNA ポリメラーゼA
4　ウラシル N-グリコシラーゼA
9　クレノウ酵素A
10　クレノウ希釈液A
＜コアプロモーター変異の検出＞
3　Taq DNA ポリメラーゼB
4　ウラシル N-グリコシラーゼB
その他の構成試薬は2〜8℃で保存

有効期間：12箇月
（使用期限は外箱に表示されています。）

[包装単位・製品コード]

包装単位：32回用
製品コード：
GS-B0805 ＜プレコア検出用＞（試薬・プレート）
GS-B0799 ＜プレコア検出用＞（酵素試薬）
GS-B0829 ＜コアプロモーター検出用＞（試薬・プレート）
GS-B0812 ＜コアプロモーター検出用＞（酵素試薬）

***[主要文献]**

1）Mary, C. et al. Gene. 1990, vol. 93, p. 125-128.
2）Okamoto, H. et al. J Virol. 1990, vol. 64, p. 1298-1303.
3）浜崎圭輔, 他. 日本臨牀. 1995, vol. 53 増刊号5, p. 411-414.
4）唐沢達信, 戸田剛太郎. 日本臨牀. 1995, vol. 53 増刊号5, p. 52-57.
5）藤原慶一, 他. 日本臨牀. 1995, vol. 53 増刊号5, p. 401-405.
6）Aikawa, T. et al. J Viral Hepatitis. 2007, vol. 2, p. 243-250.
7）Okamoto, H. et al. J Virol. 1994, vol. 68, p. 8102-8110.
8）Günther, S. et al. J Virol. 1996, vol. 70, p. 8318-8331.
9）Buckwold, V. E. et al. J Virol. 1996, vol. 70, p. 5845-5851.
10）Ozasa, A. et al. Hepatology. 2006, vol. 44, p. 326-334.
11）Kusakabe, A. et al. Hepatol Res. 2009, vol. 39, p. 648-656.
12）Wei, F. et al. Medicine. 2017, vol. 96, e6835.
13）B型肝炎治療ガイドライン（第3. 2版). 日本肝臓学会 肝炎診療ガイドライン作成委員会 編. 2020.
14）Aritomi, T. et al. J Gastroenterol Hepatol. 1999, vol. 13, p. 1125-1132.
15）矢野右人. 肝胆膵. 1999, vol. 39, p. 583-588.
16）松山和弘. 肝胆膵. 2000, vol. 41, p. 59-71.

***[問い合わせ先]**

株式会社医学生物学研究所　学術部
〒105-0012　東京都港区芝大門二丁目１１番８号
住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL：03-6854-3613　E-mail：kensa@mbl.co.jp

****[製造販売元]**

株式会社医学生物学研究所
〒105-0012　東京都港区芝大門二丁目１１番８号
住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL：03-6684-6860　FAX：03-6854-3615

「スマイテスト」は株式会社医学生物学研究所の登録商標です。
（登録商標 第4231559号）

プレコア変異検出操作方法

PCR増幅産物

サーマルサイクラーから取り出したら直ちにアルカリ変性溶液A 100μL を加え、
混合した後、室温（20～25℃）で10分間放置します。

変性したPCR増幅産物 25μL を、対応するマイクロプレートの2ウェルに加え、
溶液が青色から淡黄色になるまで混合します。

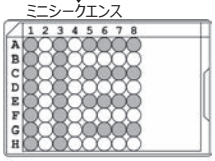
使用するプレコアプローブ結合マイクロプレートAの各ウェルに、
あらかじめハイブリダイゼーション緩衝液A 100μL を分注しておきます。

2ウェル／1検体

プレートに蓋をして、37℃で30分間インキュベートします。

吸引除去し、洗浄液 350μL で5回洗浄します。
（洗浄液：20倍濃度洗浄液Aを精製水で20倍希釈します。）

ミニシークエンス



もしくは

同一検体のサンプルを2ウェルに分注します。

シークエンス反応溶液（用時調製）：
各型用のシークエンス緩衝液 3.2mL に、
クレノウ希釈液Aで20倍希釈したクレノウ酵素A 3.2μL を添加し、
転倒混和します。

野生型検出用ウェル：シークエンス反応溶液・野生型用A (クレノウ酵素添加済) 100μL を加えます。
変異型検出用ウェル：シークエンス反応溶液・変異型用A (クレノウ酵素添加済) 100μL を加えます。

プレートに蓋をして、37℃で正確に30分間インキュベートします。

アルカリ変性溶液A 100μL を加え、室温（20～25℃）で1分間インキュベートします。

吸引除去し、洗浄液 350μL で5回洗浄します。

HPR標識抗DNP抗体溶液A 100μL を加え、
プレートに蓋をして、37℃で30分間インキュベートします。

吸引除去し、洗浄液 350μL で5回洗浄します。

基質液A 100μL を加え、室温（20～25℃）、暗所で15分間インキュベートします。

反応停止液A 100μL を加え、1時間以内に、波長450nmの吸光度を測定します。
620～650nmを対照波長としてください。

コアプロモーター変異検出操作方法

PCR増幅産物

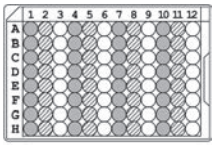
サーマルサイクラーから取り出したら直ちにアルカリ変性溶液B 100μL を加え、
混合した後、室温（20～25℃）で10分間放置します。

変性したPCR増幅産物 25μL を、対応するマイクロプレートの3ウェルに加え、
溶液が青色から淡黄色になり、全体が均一になるまで十分に混合します。

使用するコアプロモータープローブ結合マイクロプレートBの各ウェルに、
あらかじめハイブリダイゼーション緩衝液B 100μL を分注しておきます。

列 1 2 3
4 5 6
7 8 9
10 11 12

3ウェル／1検体



1,4,7,10列：野生型検出用プローブが結合したウェル
2,5,8,11列：変異型検出用プローブが結合したウェル
3,6,9,12列：増幅検出用プローブが結合したウェル

プレートに蓋をして、37℃で30分間インキュベートします。

吸引除去し、洗浄液 350μL で5回洗浄します。
（洗浄液：20倍濃度洗浄液Bを精製水で20倍希釈します。）

HPR標識抗DNP抗体溶液B 100μL を加え、
プレートに蓋をして、37℃で30分間インキュベートします。

吸引除去し、洗浄液 350μL で5回洗浄します。

基質液B 100μL を加え、室温（20～25℃）、暗所で15分間インキュベートします。

反応停止液B 100μL を加え、1時間以内に、波長450nmの吸光度を測定します。
620～650nmを対照波長としてください。