体外診断用医薬品

＊＊2023年 4月改訂(第5版)
＊2020年 4月改訂(第4版)

承認番号　16200EZZ01656000

** ご使用の際は，電子化された添付文書をよくお読みください

クラスⅢ免疫検査用シリーズ
日本脳炎ウイルス抗体キット

日本脳炎ＣＦ，ＨＩ試薬「生研」

ＣＦ，ＨＡ抗原(中山予研株)　ＣＦ，ＨＡ抗原(JaGAr#01株)

【全般的な注意】

1．本品は体外診断用医薬品でありそれ以外の目的に使用しないでください。

2．診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。

**3．電子化された添付文書以外の使用方法については，結果の信頼性を保証致しません。

【形状・構造等(キットの構成)】

・ＣＦ，ＨＡ抗原(中山予研株)
日本脳炎ウイルス(中山予研株)ＣＦ，ＨＡ抗原　1mL分　1本
日本脳炎ウイルス(中山予研株)ＣＦ,ＨＡ抗原を含みます。

・ＣＦ，ＨＡ抗原(JaGAr#01株)
日本脳炎ウイルス(JaGAr#01株)ＣＦ，ＨＡ抗原　1mL分　1本
日本脳炎ウイルス(JaGAr#01株)ＣＦ,ＨＡ抗原を含みます。

以下の補助試薬を別売品として用意しています。
(別売品は体外診断用医薬品ではありません。)

・日本脳炎ＣＦ，ＨＩ試薬「生研」ＣＦ正常抗原　0.5mL分　1本
・日本脳炎ＣＦ，ＨＩ試薬「生研」
ＣＦ抗血清(中山予研株)　1mL分　1本
・日本脳炎ＣＦ，ＨＩ試薬「生研」
ＣＦ抗血清(JaGAr#01株)　1mL分　1本
・日本脳炎ＣＦ，ＨＩ試薬「生研」
ＨＩ抗血清(中山予研株)　1mL分　1本
・日本脳炎ＣＦ，ＨＩ試薬「生研」
ＨＩ抗血清(JaGAr#01株)　1mL分　1本

【使用目的】

血清中の日本脳炎ウイルスＣＦ，ＨＩ抗体価の測定

【測定原理】

国立予防衛生研究所学友会編：ウイルス実験学，総論，改訂2版に記載された，補体結合反応の50%溶血法(マイクロタイター法)[1)2)3)]及び赤血球凝集抑制試験[4)]に基づいています。

【操作上の注意】

1．測定試料の性質，採取法
分離した血清は分離当日中に試験を行ってください。試験が翌日以降になる場合は血清を-20℃以下で凍結保存し，試験時に常温(15～25℃)で融解して使用してください。-20℃の凍結保存では凍結後1箇月まで，安定な成績が得られることが確認されています。また，凍結した血清は凍結融解を2回以上繰り返さないでください。凍結融解を繰り返すと抗体価が変動し，試験結果に影響を与える可能性があります。

2．妨害物質・妨害薬剤
1) 検体は薬剤添加などの処理をしない新鮮な血清を用いてください。
2) ＨＩ試験の場合
検体の前処理(非特異的インヒビター及び赤血球自然凝集素の除去)は，判定に影響しますので必ず行ってください。
3) ＣＦ試験の場合
(1)被検血清中の補体が反応に影響しますので，必ず1:4に希釈した後，非働化(56℃で30分間加温処理)を行ってください。
(2)被検血清がＣＦ正常抗原と反応しないことを必ず確認してください。

3．その他
試験結果に影響しますので反応に使用する希釈液，ヒツジ赤血球液，ガチョウ赤血球液，溶血素，補体等の調製には十分注意してください。

【用法・用量(操作方法)】[1)4)]

1．準備する器具
1) マイクロピペット及びチップ
(10μＬ～100μＬ用，100μＬ～1 000μＬ用)
2) ダイリューター(25μＬ用)
3) ドロッパー(25μＬ用，50μＬ用)
4) Ｕ型マイクロプレート(リジットタイプ)
5) 小試験管(容量5～7mL)
6) メスピペット
7) マイクロプレート用ミキサー
8) プレートシール用フィルム
9) マイクロプレート用遠心機
10) 恒温槽(37℃，56℃)
11) 分光光度計
12) 真空乾燥装置
13) ゴム栓(小試験管用)

2．試薬の調製
日本脳炎ウイルスＣＦ，ＨＡ抗原(中山予研株又はJaGAr#01株)は滅菌精製水1mLを加え，溶解して抗原液とします。
溶解後は，2～10℃に保存し当日中に使用します。
1) ＨＡ試験用抗原液
0.4%ＥＡ液(pH9.0)[※1]を希釈液として，抗原液を100倍に希釈します。
Ｕ型マイクロプレート(以下，プレートと略す)を用いて，表1に従ってＨＡ価を測定します。抗原液は100倍から12 800倍まで2倍階段希釈します。

表１．ＨＡ試験の手順

穴番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
希釈倍数	1:100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	(血球対照)
希釈液μL	－	25	25	25	25	25	25	25	25
抗原液(1:100)μL	50 →	25	25	25	25	25	25	25	25 捨てる
希釈液μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25
0.33%ガチョウ赤血球浮遊液μL	50	50	50	50	50	50	50	50	50
反応	37℃，60分間								
判定	完全凝集した終末の希釈倍数を，その抗原のＨＡ価とします。例えば，1:1600希釈までＨＡ陽性の場合，その抗原のＨＡ価は1:1600[※2]です。								

0.33%ガチョウ赤血球浮遊液は，ＶＡＤ[※3]で調製します。

※1，※3：文献4)を参照してください。
※2：ＨＩ試験に用いる抗原の希釈度は，その抗原のＨＡ価の1/4希釈を用います。この例の場合，1:400希釈でこの25μＬ(4単位ＨＡ含有)ずつを用いればよいことになります。

2) ＣＦ希釈液
ベロナール緩衝塩化ナトリウム液(ＶＢＳ)に，ゼラチンを0.01w/v%に添加したもので，通常，5倍濃度ＶＢＳを調製保存し，使用時に精製水4倍容を加えて5倍に希釈し，かつ，1w/v%ゼラチン保存液を1/100容加えて調製します。
pH7.2～7.5　　イオン強度　0.147

表２．5倍濃縮ＶＢＳ調製例：2L（ＶＢＳ 10L分）

NaCl	85.0g	精製水で加熱溶解して2Lとします。
バルビタール	5.75g	
バルビタール・ナトリウム	3.75g	
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.68g	
$CaCl_2$	0.28g	

3）1.7%ヒツジ赤血球浮遊液

ヒツジ血液を生理食塩液等で遠心洗浄し，市販のヘモグロビン測定用試薬を用いて，1.7%ヒツジ赤血球浮遊液を調製します。調製後は2～10℃に保存して，3日間以内に使用してください。なお保存中に溶血が認められた場合は，使用しないでください。

4）溶血素の定量※4

あらかじめ，溶血素を定量して至適希釈度を決めておきます。

5）感作赤血球

1.7%ヒツジ赤血球浮遊液に等量の至適希釈溶血素を少しずつ加えよく混和し，37℃恒温槽に15分間入れて赤血球を感作します。

6）補体の定量※5

あらかじめ，補体を定量して5CH_{50}/50μLとなる希釈度を決めておきます。

※4，※5：文献3)を参照してください。

7）ＣＦ試験用抗原液(以下，ＣＦ抗原とします。)

抗原液をＣＦ希釈液で2倍階段希釈し，以下のBox titrationで至適抗原希釈倍数を求めます。

8）ＣＦ抗原及びＣＦ抗血清の力価測定(Box titration)

プレートを用い，表３のようにレイアウトします。

表３．ＣＦ抗原の定量－Box titration （例）

		抗血清希釈							補体対照				
		1:4	8	16	32	64	128	256	5	3.75	2.5	1.25 CH_{50}	
ＣＦ抗原希釈	1:4[a]	4[b]	4	3	2	−	−	−	−	−	±	4	
	8	4	4	4	3	−	−	−	−	−	±	4	至適抗原希釈
	16	4	4	4	3	±	−	−	−	−	±	3	
	32	4	4	4	2	±	−	−	−	−	−	2	
	64	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	2	
	128	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	2	
Ｎ 1:4		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	2	
希釈液		−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	3	

a 1:2から始まってもよい

b 4：不溶血 3：25%溶血 2：50%溶血 1：75%溶血

±：わずかに未溶血血球存在 −：100%溶血

(1)ＣＦ抗血清1:4(56℃30分間加温処理済み)希釈から，2倍階段希釈液をつくり，補体対照を除く各希釈ごとの縦列の穴にそれぞれドロッパーで25μL入れます。

(2)ＣＦ抗原の2倍階段希釈液をつくり，ＣＦ正常抗原(Ｎ抗原)及び希釈液対照を除く対応ＣＦ抗原希釈列に，それぞれ25μL加えます。

(3)ＣＦ正常抗原を1:4に希釈し，Ｎ列の穴に25μLずつ加えます。また，希釈液のみの対照列の穴にも希釈液を25μLずつ加えます。

(4)補体を5CH_{50}/50μLになるように希釈し，氷水中で冷却したものを，50μLずつ加えます。ただし，補体対照は表４のようにして調製します。

表４．補体対照群における希釈補体の加え方

	5 CH_{50}	3.75 CH_{50}	2.5 CH_{50}	1.25 CH_{50}
希釈液 (μL)	25	−	25	50
5CH_{50}/50μL (μL)	50	−	−	−
2.5CH_{50}/50μL (μL)	−	75	50	25

(5)マイクロプレート用ミキサーで反応液を混和後，4～6℃に一夜置きます。

(6)プレートを取り出し，常温(15～25℃)に15分間静置します。

(7)37℃に加温調製した感作赤血球をすべての穴に50μLずつ加えます。

(8)プレート表面の水分を，ろ紙等で拭きとってから，接着力のよい圧着フィルムでシールします。次いで，プレートをよく振り，反応液を十分に混和してから37℃の恒温槽に60分間入れます。(途中，20分おきにプレートをよく振ります。)

(9)プレートを1 000rpmで3分間遠心してから，別に作った溶血度標準(表５)に照応しながら観察し，溶血度を判定します。

表５．溶血度標準の作り方

	溶血度 (%)				
	0	25	50	75	100
表示	4	3	2	1	−
1:2希釈感作赤血球(溶血)※6 (μL)		25	50	75	100
1:2希釈感作赤血球(不溶血) (μL)	100	75	50	25	
希釈液 (μL)	50	50	50	50	50

※6：凍結融解で溶血させる。

注）溶血度標準もプレートを用いてつくり，前記のように1 000rpmで3分間遠心してから観察します。

(10)ＣＦ抗血清，ＣＦ抗原等の抗補体作用等の有無を調べます。希釈液対照のＣＦ抗血清希釈列が完全溶血を示せば，このＣＦ抗血清には抗補体作用がありません。また，Ｎ抗原対照列も同様であれば，このＣＦ抗血清にはＣＦ正常抗原に対する抗体を含有しません。ＣＦ抗原の抗補体作用は，表６の許容範囲と照合して確かめます。

表６．補体対照群における溶血度の許容範囲

	5 CH_{50}	3.75 CH_{50}	2.5 CH_{50}	1.25 CH_{50}
ＣＦ抗原	−	−	±	2～4
Ｎ抗原	−	−	±	1～4
希釈液	−	−	±	2～3

(11)抗補体作用を示さないＣＦ抗原希釈で，4及び3の溶血度表示を示すものをＣＦ反応陽性とし，最も血清抗体価の高くでたＣＦ抗原希釈を至適抗原希釈とします。

３．操作法

1）血清HI 抗体価の測定

(1)抗原液

HI 試験には，HA価(4単位)を保持するように希釈した抗原液を25μLずつ用います。

(2)検体の前処理

①非特異的インヒビターの除去

a. 被検血清，HI 抗血清，各0.2mLに冷アセトンを一気に4mL加え，ゴム栓をしてよく振盪し5分間静置します。

b. 1 500rpmで5分間冷却遠心して，上清を捨てて沈渣に冷アセトンを4mL加えて再浮遊し，再び同じ条件で冷却遠心します。

c. 上清を捨てて，沈渣を真空乾燥します。

d. 乾燥後，BS(pH9.0)※7を1mL加えて溶解して，4℃に一夜静置します。

※7：文献4)を参照してください。

②赤血球自然凝集素の除去

a. ①の処理済み検体に遠心濃縮したガチョウ赤血球(packed cells)を0.05mL加え，氷浴中で60分間静置します。

b. 3 000rpmで5分間冷却遠心して，上清を採取し，56℃で30分間加温処理します。

①，②の処理済み検体の希釈度は1:5であり，血清(1:5)とします。

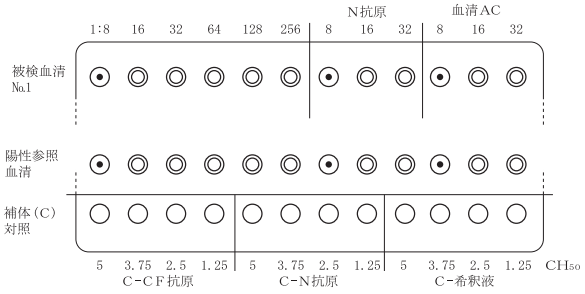
(3)表７に従ってHI 価を測定します。

表７．ＨＩ試験の手順

穴　番　号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
血清希釈	1:10	20	40	80	160	320	640	1280	1:5（血球対照）
希釈液μL	25	25	25	25	25	25	25	25	25
血清(1:5)μL	25	25	25	25	25	25	25	25 捨てる	25
抗原液μL	25	25	25	25	25	25	25	25	－
反　　応	4℃，一夜								
0.33%ガチョウ赤血球浮遊液μL	50	50	50	50	50	50	50	50	50
反　　応	37℃，60分間								

2）血清ＣＦ抗体価の測定(line titration)
血清(検体)のline titrationでは，ＣＦ抗体陽性血清(ＣＦ抗血清など)を用いて使用抗原のＣＦ抗原活性を確認するとともに，被検血清のＣＦ正常抗原に対する抗体及び抗補体作用(ＡＣ)対照(各血清希釈にＣＦ抗原のかわりに希釈液を加えた列)が陰性であることを必ず確認します。
(1)検体の前処理
被検血清0.1mLに希釈液0.3mLを加えて1:4に希釈し，56℃で30分間加温処理を行います。
(2)出発希釈は1:4か1:8にし，1:8から始める場合は図１のようにします。

図１．血清ＣＦ抗体価の測定



(3)1:8希釈血清をマイクロピペットで50μLずつ1:8の⊙の穴に入れます。各検体ごとにマイクロピペットのチップを替えます。
(4)希釈液25μLずつを◎穴に入れます。
(5)25μLのダイリューターで左端から1:256まで，Ｎ抗原の1:8から1:32まで，血清ＡＣの1:8から1:32まで，それぞれ2倍階段希釈をします。
(6)至適濃度に希釈した(至適抗原希釈)ＣＦ抗原25μLずつを血清の1:8～1:256の全部の穴及びC−ＣＦ抗原対照の4穴に入れます。
(7)至適濃度に希釈したＮ抗原25μLずつをＮ抗原の1:8～1:32及びC−Ｎ抗原対照の穴に入れます。
(8)希釈液25μLずつを血清ＡＣの1:8～1:32及びC−希釈液対照の穴に入れます。以下，前項の8)box titrationの(4)～(10)と同様に行います。

【測定結果の判定法】
１．血清ＨＩ抗体価の判定法
1）赤血球凝集を完全に阻止した最終希釈倍数をHI価とします。
2）HI抗血清についても，瓶ラベルに表示のHI抗体価と1管差以内であることを確認します。
3）血清対照が凝集していないことを確認します。凝集している場合は，再度，赤血球自然凝集素の除去処理を行ってから試験してください。
4）HI試験時に，抗原液のHA価が4単位であることを確認するHA試験を同時に行います。

２．血清ＣＦ抗体価の判定法
1）溶血度判定の結果，Ｎ抗原と血清ＡＣが(－)であれば，ＣＦ抗原を加えた血清希釈で溶血度表示4又は3を示す最高希釈倍数がＣＦ抗体価になります。
2）陽性血清対照(ＣＦ抗血清)が既知のＣＦ抗体価と1管差以内を示し，かつ，C−ＣＦ抗原対照が前記溶血度の許容範囲内を示せば，この試験の信頼性が確認されたことになります。

「判定上の注意」
ＣＦ抗体価判定の場合，以下のことを確認してください。抗補体作用が強い場合，又は被検血清のＣＦ正常抗原に対する抗体が強い場合は判定不能となります。
1）ＣＦ抗原，ＣＦ正常抗原，ＣＦ抗血清の抗補体作用の有無を確認します。
2）被検血清のＣＦ正常抗原に対する抗体及び抗補体作用の有無を必ず確認します。

【性能】
１．感度
自家参照抗日本脳炎ウイルス(中山予研株又はJaGAr#01株)ＣＦ，HIの各陽性パネル血清を用いて，ＣＦ，HI試験を行ったとき，16倍以上のＣＦ抗体価，40倍以上のHI抗体価を示します。

２．正確性
自家参照抗日本脳炎ウイルス(中山予研株又はJaGAr#01株)ＣＦ，HIの各陰・陽性パネル血清を用いて，ＣＦ，HI試験を行ったとき，ＣＦ陰性は4倍未満であり，陽性は4倍以上のＣＦ抗体価を示します。HI陰性は10倍未満であり，陽性は10倍以上のHI抗体価を示します。

３．同時再現性
自家参照抗日本脳炎ウイルス(中山予研株又はJaGAr#01株)ＣＦ，HIの各陽性パネル血清を用いて，3回同時にＣＦ，HI試験を行ったとき，ＣＦはいずれも16～32倍の抗体価を示し，HI抗体価はいずれも40～80倍の抗体価を示します。

【使用上又は取扱い上の注意】
１．取扱い上(危険防止)の注意
1）検体はＨＩＶ，ＨＢＶ，ＨＣＶ等の感染の恐れがあるものとして取り扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるため保護具(眼鏡，手袋，マスク等)を着用し，また，口によるピペッティングを行わないでください。
2）検体を取扱う際には，検体が手指・衣服等に付着しないように注意し，付着した場合は速やかに消毒してください。
3）検体処理に使用するアセトンは，第2種有機溶剤・危険物第4類であるため，取扱いには十分注意してください。

２．使用上の注意
1）マイクロタイター法の手技，特に，ドロッパーやダイリューターの操作及び赤血球の濃度等は，試験精度の基本となるため，正しい操作の習熟が必要です。
2）使用期限を過ぎた製品は使用しないでください。
3）容器のゴム栓は取り違えないようにしてください。
4）同一製造番号の製品であっても，注ぎ足すことは行わないでください。
5）検体相互間の汚染を防ぐため，検体をサンプリングする際，同一チップの使用は避けてください。

３．廃棄上の注意
1）検体中には感染性物質が存在する可能性がありますので，廃液，使用済み器具などは，次のいずれかの方法で滅菌処理を行ってください。
(1)最終濃度3.5vol%グルタルアルデヒド溶液に，30分間以上浸漬する。
(2)0.5w/v%次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素5 000ppm)に，1時間以上浸漬する。
(3)121℃で20分間以上高圧蒸気滅菌をする。
2）本品及び器具等を廃棄する場合には，廃棄物の処理及び清掃に関する法律，水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】
貯蔵方法　10℃以下で保存
有効期間　1年
(ラベルに表示の使用期限内にご使用ください。)

F3-18CF/R05

【包装単位】

コードNo.	製品名	包装
311054	日本脳炎ＣＦ，HI 試薬「生研」ＣＦ，HA抗原(中山予研株)	1mL分×1本
311061	日本脳炎ＣＦ，HI 試薬「生研」ＣＦ，HA抗原(JaGAr#01株)	1mL分×1本

◎当社別売として，次の製品も用意してありますのでご利用ください。

コードNo.	製品名	包装
310774	日本脳炎ＣＦ，HI 試薬「生研」ＣＦ正常抗原	0.5mL分×1本
300478	日本脳炎ＣＦ，HI 試薬「生研」ＣＦ抗血清(中山予研株)	1mL分×1本
300485	日本脳炎ＣＦ，HI 試薬「生研」ＣＦ抗血清(JaGAr#01株)	1mL分×1本
300096	日本脳炎ＣＦ，HI 試薬「生研」HI 抗血清(中山予研株)	1mL分×1本
300102	日本脳炎ＣＦ，HI 試薬「生研」HI 抗血清(JaGAr#01株)	1mL分×1本

【主要文献】

1) 国立予防衛生研究所学友会編：補体結合反応，ウイルス実験学，総論，改訂2版，丸善，226(1973).
2) 井上　榮：マイクロ法による補体結合試験，臨床検査，17，838(1973).
3) 厚生省監修：補体結合反応，微生物検査必携，ウイルス・クラミジア・リケッチア検査，第3版，第Ⅰ分冊，総論，日本公衆衛生協会，31(1987).
4) 厚生省監修：日本脳炎ウイルス，微生物検査必携，ウイルス・クラミジア・リケッチア検査，第3版，第Ⅱ分冊，各論1，日本公衆衛生協会，81(1987).

**【問い合わせ先】

デンカ株式会社　試薬学術担当
〒103-8338　東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号
フリーダイヤル　0120-206-072
受付時間　9:00～17:00　（土日祝日・弊社休業日を除く）

＊製造販売元
デンカ株式会社
新潟県五泉市木越字鏡田１３５９番地１