

## 伝達性海綿状脳症（TSE）スクリーニング検査要領

### 第1. 実験室内でのプリオン材料の取扱いについて

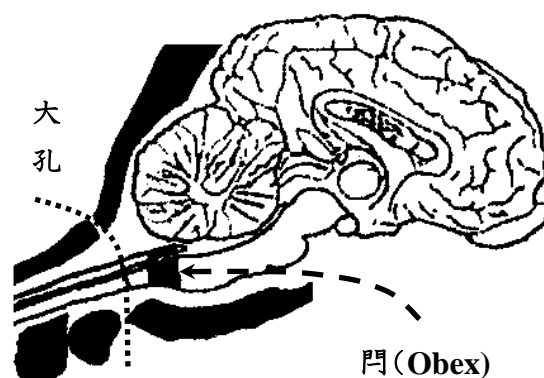
- 作業は**区画された専用の実験室内**において、原則として**安全キャビネット内**で行う。
- 作業者は傷口からの感染、飛沫による目及び口からの汚染を防ぐために、ラテックス又はビニール製手袋、マスク、予防衣及び帽子を着用し、必要に応じ防護眼鏡等も使用する。
- 作業をはじめ各種器具器材は可能なかぎり**ディスポーザブル**の製品を使用する。
- 検査材料の取扱いは**ベンチシート**上で行い、飛沫、エアロゾルを発生させないように気をつける。
- 検査材料をこぼした時及び業務終了時には、作業場所の表面を**次亜塩素酸ナトリウム溶液**で清拭する。
- 使用済みベンチシート、ディスポーザブル器具類はオートクレーブバッグに入れ、**132～134℃ 1時間の高圧蒸気滅菌**をする。
- ハサミ、ピンセット類は再使用するため、ティッシュ等の紙あるいはアルコール綿で汚れを拭い、**3～5% SDS**に浸漬して**5～10分間の煮沸**（1%に炭酸ナトリウムを添加すると金属の腐食が押さえられる。）又は**132～134℃ 1時間の高圧蒸気滅菌**をする。
- 加熱できないプラスチック器具は、**5%以上の次亜塩素酸ナトリウム**又は**2規定以上のNaOH**に2時間以上浸漬する。
- 可燃物はオートクレーブバッグに入れ、**132～134℃ 1時間の高圧蒸気滅菌**をする。
- 医療廃棄物用焼却炉が使用できる場合は、プラスチック器具及び可燃物は共にバイオハザードバックに入れて焼却する。
- 操作を続けなければならない遠心管等の外側が汚染した場合、汚染していない新しいものに移しかえて作業を続ける。
- 通常のオートクレーブしか利用できないとき、耐アルカリ容器に入れた汚染物を**1～2規定のNaOH**に浸漬して**121度30分間処理**をすることも有効な方法である。
- 焼却できない器具器材の除染を行う際は、原則として、高度に汚染している場合や組織塊等では、当然残留するプリオン量が多いため、まず紙又はアルコール綿などの可燃物で拭ってできるだけ汚れを除いた後に、滅菌処理を行う。

## 第2. 採材部位

頭部を図1点線のところから分離した後、大孔からスプーンあるいは薬匙を差し込んで、図1及び図2に示す**門 (Obex)** (図1中黒色に塗った部位)を含むように採材する。黒色部は頭蓋骨及び頸椎を示す。病変及びプリオンの蓄積はほぼ左右対称に起きるため、正中で2分し、一方を15%~20%濃度の緩衝ホルマリンで固定し**病理組織検査**及び**免疫組織化学検査材料**に、残りを**免疫生化学的検査 (ELISA 法、ウエスタンブロット法等)** 材料とする。

免疫生化学的検査材料の中で**門 (Obex)** を含むように横断した組織片を切り出し、スクリーニング検査試料とする。プリオンは**門 (Obex)** 中に一様に蓄積しているわけではないので、平均的に採取する必要がある。したがって、試料調整時には、切り出した組織片を、おおまかにハサミで細切して混ぜ、平均化して必要量を分取する。ただし、切り出し法以外の方法で採取する場合はこの限りではない。

図1. 牛脳の断面図



## 第3. 牛海綿状脳症用キット操作法

スクリーニング検査は、「プラテリア BSE」、「ダイナボット エンファーBSEテスト」、「フレライザ BSE」、「テセーBSE」、「プリオンスクリーン」又は「ニッピーブルBSE」のいずれかの検査キットを用いることとし、その操作法はそれぞれ別添1-1、別添1-2、別添1-3、別添1-4、別添1-5又は別添1-6のとおりとする。

## 第4. 検査結果の保管

マイクロプレートリーダーにて読み出された生データについては、**別紙様式1-1**に入力する。**別紙様式1-1**の残りの記入事項についても入力し、署名した用紙及び電子データを保管すること。また、保管する用紙にはマイクロプレートリーダーにて読み出された生データ(感光紙にあっては、普通紙に印刷したものをを用いる。)を貼付すること。なお、確認検査のために検体送付を行う際には、生データを貼付した保管データの写しを併せて送付すること。

## 第5. 確認検査のための検体送付

牛海綿状脳症用キットにより**陽性<sup>1</sup>**と判定された検体については都道府県等において確認検査を実施する場合を除き、以下の方法にて、確認検査のための検体送付を行う。

### 1. 送付先

送付先については、平成16年4月7日付け食安監発第0407001号通知の別添によるものとする。

### 2. 確認検査結果の連絡方法

監視安全課から検査依頼自治体あて連絡することとする。

なお、本件に関する問い合わせ先は、監視安全課乳肉安全係（電話）03-3595-2337とする。

### 3. 送付部位（図2のとおり）

問（Obex）を含む周辺組織を正中で2分し、

- (1) 一方を病理組織検査及び免疫組織化学検査材料として、15%～20%濃度の緩衝ホルマリンで固定し、常温にて送付する。なお、検体を入れる容器は50 mlのものとし、緩衝ホルマリンで満たすこと。
- (2) 残りを免疫生化学的検査（ELISA法、ウエスタンブロット法等）材料として、凍結状態にて送付する。検体採取の際に残ったサンプル及びELISAに用いたサンプルの残り（ホモジナイズした乳剤サンプル等）についても凍結状態にて併せて送付すること。

### 4. 送付の際の連絡方法

スクリーニング検査陽性と判定された検体の送付の際には、**別紙様式1-1**の検査結果表及び**別紙様式1-2**の検体送付票を添付し、検査機関への到着日及び時間帯（午前9時から12時又は午後1時から4時）を指定の上、送付すること。

また、**別紙様式1-1**の検査結果表及び**別紙様式1-2**の検体送付票を監視安全課乳肉安全係（FAX）03-3503-7964 あてあらかじめ送付するとともに、同係（電話）03-3595-2337 あて連絡すること。

なお、休日等の緊急連絡先については追って連絡することとする。

### 5. 検体送付に当たっての注意

郵便規則（昭和22年逓信省令第34号）第8条第2号及び第3号に基づき、国連規格容器の適切な包装等を行い、送付すること。

また、検体送付のための運搬容器に関する情報及び梱包時の注意事項等については、別途通知することとする。

なお、差出しに当たっては、当該郵便物の輸送方法を自所の配達を受け持つ集配郵便局（以下「受持郵便局」という。）に照会し、輸送方法により次のとおり措置の上、当該郵便局に差し出すこと。

---

<sup>1</sup> 第3の再検査において陽性と判定された場合をいう。

- (1) 運送の途中において航空機による輸送が行われない検体在中郵便物  
次の様式の紙片に必要事項をすべて記入し、郵便物の表面の見やすいところに貼付すること。

品 名： **牛の組織等 「危険物」** (注1)  
差出人：  
自治体名：  
検査所名：  
住 所：  
電話番号：  
資 格： と畜検査員 (獣医師)  
氏 名：

(注1) 朱記すること。

- (2) 運送の途中において航空機による輸送が行われる検体在中郵便物 (注3)  
1) 次の様式の紙片に必要事項をすべて記入し、郵便物の表面の見やすいところに貼付すること。

品 名： **牛の組織等 「危険物」** (注1)  
国連番号：  
差出人：  
自治体名：  
検査所名：  
住 所：  
電話番号：  
資 格： と畜検査員 (獣医師)  
氏 名：  
**ドライアイス〇〇kg 在中** (注2)

(注1) 朱記すること。

(注2) ドライアイスを入れて送付する場合は朱記すること。

- 2) 検体を格納する容器は「国連規格容器」とすること。

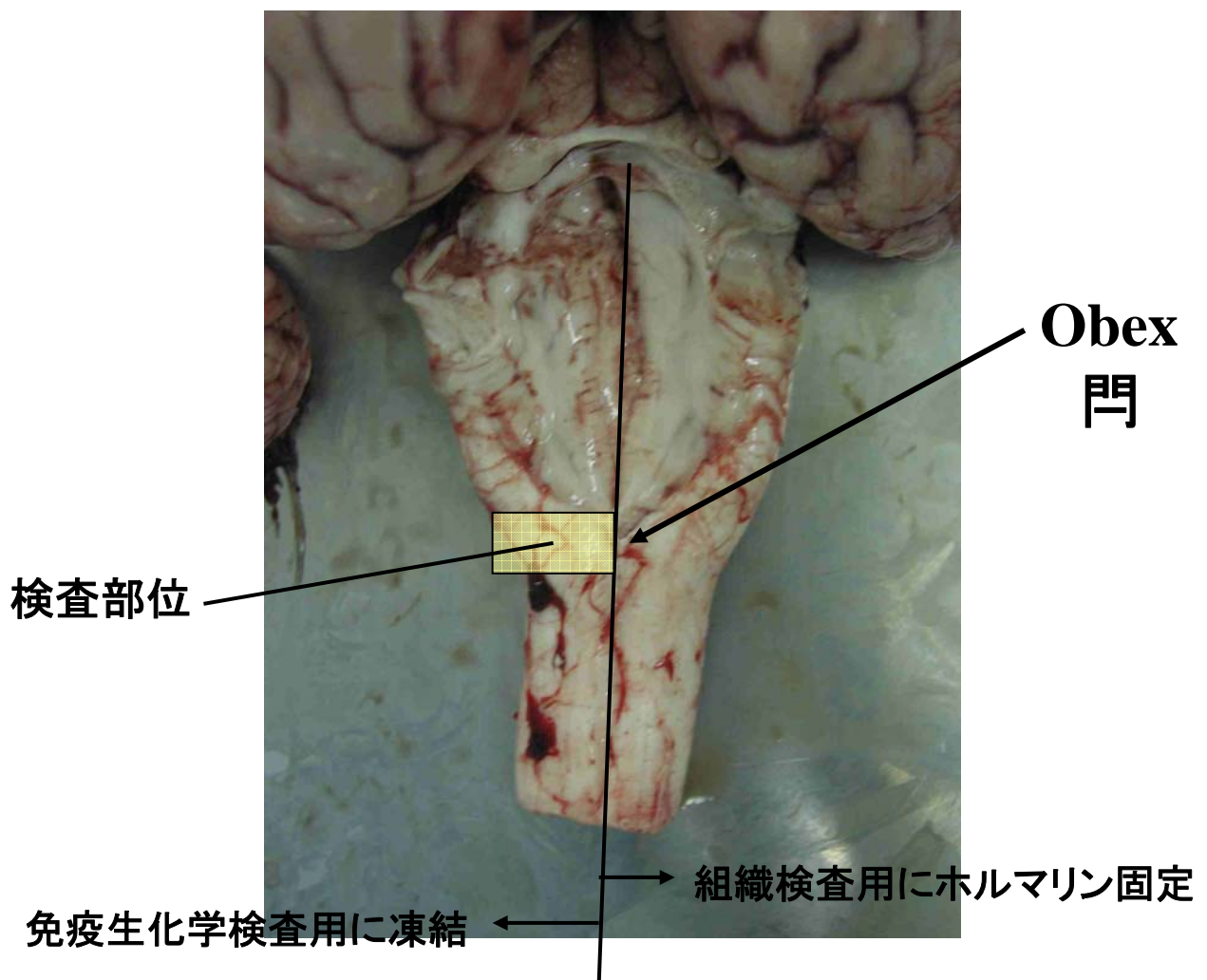
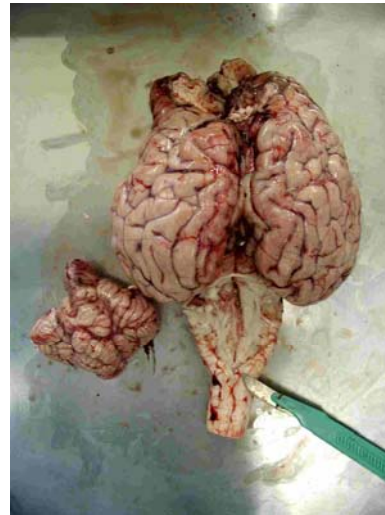
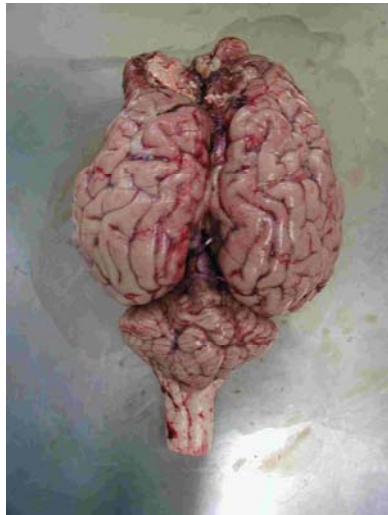
- 3) 1 容器当たりの内容量は、液体の場合は 1,000ml 未満、個体の場合は 50 g を限度とすること。
- 4) 郵便物の表面の見やすいところに輸送許容物件表示ラベル（分類番号：6.2）を貼付すること。（注 4）
- 5) 国連規格容器の外側にドライアイスを入れダンボール等で包んだ場合は、郵便物の表面の見やすいところに輸送許容物件表示ラベル（分類番号：9）を貼付すること。（注 4）
- 6) 上記 5) の場合は、郵便物の引受時に、検体が国連規格容器に格納されているかどうかを確認するため、郵便局職員が外側のダンボール等の開示を求める場合があるので、これに応じること。
- 7) 危険物申告書を 2 部作成し、小包とともに差し出すこと。（注 5）  
なお、小包には、「危険物申告書在中」と記載した開封された封筒を貼付すること。郵便局において危険物申告書の内容を確認した後、返付されるので、郵便局職員立ち会いのもと、当該封筒に封入すること。

（注 3）航空機による輸送の場合、航空法第 8 6 条、航空法施行規則第 1 9 4 条及び関係告示等による規制を受ける。

（注 4）表示ラベルの様式は別紙様式 1 - 3 のとおり。（受持郵便局に必要分を請求する。）

（注 5）危険物申告書は別紙様式 1 - 4 のとおり。（なお、本件については、今回の検体輸送用に郵政公社・各航空会社間で特別に定めたものであり、他には使用できない。）

図2. BSE検査のための採材部位



## 完全に異常プリオン蛋白を不活化させる処理

表1. 完全に異常プリオン蛋白を不活化させる処理<sup>2</sup>

薬 剤	濃 度	処 理 時 間	温 度
ギ 酸	≥60%	2 時間	室 温
チオシアン酸グアニジン	≥ 4 M	2 時間	室 温
塩酸グアニジン	≥ 7 M	2 時間	室 温
三塩化酢酸	≥ 3 M	2 時間	室 温
S D S	≥ 3 %	5 分間	100℃
フェノール	≥50%	2 時間	室 温

表2. 汚染材料の消毒法<sup>3</sup>

薬剤・方法等	温度 (℃)	時間 (分)	対象
焼 却	≥800	—	臓器、可燃物等
オートクレーブ	134	60	各種機材、器機、臓器、その他
3% S D S 浸漬**	100	5	各種機材、器機、その他
2 規定 NaOH 浸漬	室温	60	各種機材、器機、その他
1 規定 NaOH 浸漬	室温	120	各種機材、器機、その他
1～5%次亜塩素酸 ナトリウム浸漬	室温	120	各種機材、器機、その他

症例は、解剖室などにビニールシートを敷いてその上で解剖を行い、必要最小限の解体にとどめる。頭部を取り外す際、血液を容器に受けて汚染を最小限とする。また分離した頭部はプラスチック袋に収め、頸部にはプラスチック袋をかぶせる等の処置を行って汚染の拡大を防ぐ。

<sup>2</sup> 小野寺節、北本哲之、倉田毅、佐藤猛、立石潤：クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル，(厚生省保健医療局疾病対策課監修)，18-23，新企画出版社、東京（1997）

<sup>3</sup> 同上

( 試 験 ・ 再 試 験 )

検 査 日 平成 年 月 日

所属自治体名

所属検査所名

検査員名 (署名)

カットオフ値

カットオフ値の-10%

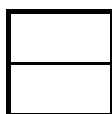
検 体 数

(陽性検体数、陰性検体数)

ロット番号

ブラテリアBSE プロティナーゼK 精製キット 検出キット  
テセーBSE 精製キット 検出キット  
ダイナボットエンファーBSE 試薬パック 抗体パック バッファーパック  
フレライザBSE 試薬Aセット 試薬Bセット 検出用試薬セット  
プリオンスクリーン 試薬キット ホモジナイズ用プレート  
ニッピブルBSE 前処理用試薬セット 前処理用器材セット 検出用試薬セット

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



← サンプル名 (個体識別に用いている記号等) を記入

← 測定値を記入

※1 上記の表は、96穴プレートを示す。実際の検査において用いたウェルと対応して記入すること。

※2 なお、未使用のウェルには斜線を引くこと。



確認検査機関名：  
受取人名：

自治体名：  
担当者：  
電話：

伝達性海綿状脳症確認検査検体送付票

送付年月日	検体送付元(検査所名)	検体番号	検体重量(g)	検体採取年月日	採取動物に関する情報					備考
					種類・品種	性別	月齢	臨床症状	とさつ年月日	
1			ELISA用乳剤							
			WB用							
			病理用							
			出荷者							
氏名	住所	電話	氏名	住所	電話					
2			ELISA用乳剤							
			WB用							
			病理用							
			出荷者							
氏名	住所	電話	氏名	住所	電話					

検査キットの種類・ロット番号：

検査機関への検体到着予定日及び時間帯  
月 日( ) 午前 時～ 時  
午後 時～ 時

1 輸送許容物件表示ラベル (分類番号 : 6. 2)



2 輸送許容物件表示ラベル (分類番号 : 9)



(航空輸送)

(別紙様式 1 - 4)

郵便物に含まれる危険物申告書 (牛の組織等)

下記の郵便物の品名、数量等はすべて正確であり、国連規格容器に納入し、包装、表示等は航空法及びその関連規則に従って行われています。この郵便物は航空機への積載の制限範囲内のものであり、航空機による輸送に適した状態にあります。

申告書作成年月日		平成 年 月 日	
品名	牛の組織等		
	UN2814 UN2900	人体及び動物に対し伝染性がある病 毒を移しやすい物質 (液体)	(注1)  ml
	UN2814 UN2900	人体及び動物に対し伝染性がある病 毒を移しやすい物質 (固体)	(注2)  g
	UN1845	ドライアイス	kg
国連規格容器の外側にドライアイスを入れて更に別の容器等で包装			

差出人 自治体名： 検査所名： 住所： 電話番号： 氏名：と畜検査員 (獣医師)
受取人 機関名： 住所： 電話： 氏名：

航空会社使用欄
---------

(注1) 内容物が液体の場合、1容器に納めることのできる総量は1,000ml未満です。

(注2) 内容物が個体の場合、1容器に納めることのできる総量は50gまでです。

(航空輸送)

(別紙様式 1 - 4) (記入例)

郵便物に含まれる危険物申告書 (牛の組織等)

下記の郵便物の品名、数量等はすべて正確であり、国連規格容器に納入し、包装、表示等は航空法及びその関連規則に従って行われています。この郵便物は航空機への積載の制限範囲内のものであり、航空機による輸送に適した状態にあります。

申告書作成年月日		平成 14 年 10 月 30 日	
品 名		牛の組織等	
	UN 2814 UN 2900	人体及び動物に対し伝染性がある病 毒を移しやすい物質 (液体)	(注 1)  ml
✓	UN 2814 UN 2900	人体及び動物に対し伝染性がある病 毒を移しやすい物質 (固体)	(注 2)  40 g
✓	UN 1845	ドライアイス	3 kg
✓	国連規格容器の外側にドライアイスを入れて更に別の容器等で包装		

差出人 自治体名 : ○○県 検査所名 : ○○食肉衛生検査所 住 所 : ○○市○○1-2-3 電話番号 : ○○○○-○○○-○○○○ 氏 名 : と畜検査員 (獣医師) ○○ ○○
受取人 機 関 名 : ○○検査センター 住 所 : 〒000-000 ○○県○○市3-2-1 電 話 : ○○○○-○○○-○○○○ 氏 名 : ○○ ○○

航空会社使用欄
---------

(注 1) 内容物が液体の場合、1 容器に納めることのできる総量は 1,000ml 未満です。

(注 2) 内容物が個体の場合、1 容器に納めることのできる総量は 50g までです。

## 「プラテリア BSE」 操作法

### 1. サンプルの精製

#### (1) 試薬の調整

処理検体数に応じて（下表参照）、BSE精製キットの溶解液(Reagent A)でプロテイナーゼ Kを 250 倍に希釈する。

（希釈したプロテイナーゼK溶液は、室温で4時間保存可能である。）

検体数	Reagent A の容量	プロテイナーゼ K の容量
2	2 ml	8 $\mu$ l
10	6 ml	24 $\mu$ l
18	10 ml	40 $\mu$ l
26	14 ml	56 $\mu$ l
34	18 ml	72 $\mu$ l
42	22 ml	88 $\mu$ l
50	26 ml	104 $\mu$ l
58	30 ml	120 $\mu$ l
66	34 ml	136 $\mu$ l
74	38 ml	152 $\mu$ l
82	42 ml	168 $\mu$ l
90	46 ml	184 $\mu$ l

#### (2) 異常プリオンペプチド精製

- ウシの胃 (Obex) 部位を  $350 \pm 40$  mg を量り取る。
- 量り取った検体をグライディングチューブに入れる。
- グライディングチューブに入れたサンプルを完全にホモジナイズする。（この時点でホモジナイズしたサンプルは、 $-20$  °Cで数週間保存可能である。保存する場合、凍結・融解は一回限りとする。）
- ホモジネートされたサンプルから固形物を含まないように注意しながら  $500$   $\mu$ l 量り取り、 $2$  ml マイクロチューブ等に移す。（この時点でサンプルは、 $2 \sim 8$  °Cで  $8$  時間、 $-20$  °Cで数週間保存可能である。）
- 上記 1. (1) で希釈したプロテイナーゼ K溶液を  $500$   $\mu$ l 加え、よく混和する。酵素活性を均一にするため、プロテイナーゼK溶液を加える作業は、**5分以内**にすばやく行う。氷上に置いた場合は  $10$  分以内に行う。
- よく混和したら、すばやく湯浴、インキュベーター又はヒートブロック等に置き、 **$37 \pm 1$  °C、 $10 \pm 1$  分間のインキュベーション**を行う。5) と 6) との操作の間の時間は **2分以上**置いてはならない。

- 7) インキュベーション終了後、**2分以内**（チューブを氷上においた場合には**10分以内**）に **Reagent B** を 500  $\mu$ l 加え、溶液全体が青くなるまでよく混和する。（**Reagent B** を加える作業は、**5分以内**にすばやく行う。氷上においた場合は10分以内に行う。）
- 8) **20,000  $\times$  g** で **5分間** 又は **15,000  $\times$  g** で **7分間** 遠心する。
- 9) 遠心終了後、**5分以内** に上清を廃棄する。上清をできるだけ取り除くために、チューブを上下逆さにしてペーパー上に5分間置くか、あるいはアスピレーターで5分間吸引乾燥させる。
- 10) 上清を廃棄した後、**10分以内** にマイクロチューブに **Reagent C1** を 50  $\mu$ l 加える。ここではボルテックスで混和してはならない。
- 11) すばやく湯浴、インキュベーターまたはヒートブロック等に置き、**100 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、5 $\pm$ 1分間** のインキュベーションを行うこと。10) と 11) の操作の間の時間は**2分以上置い**てはならない。
- 12) インキュベーターからマイクロチューブを取り出し、ボルテックスでよく混和する。（この時点で、サンプルは2 $\sim$ 8 $^{\circ}$ Cで5時間、-20 $^{\circ}$ Cで数週間保存可能である。保存した場合は、いずれも**100 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、5 $\pm$ 1分間** のインキュベーションを行った後、ボルテックスでよく混和する。）
- 13) **BSE 検出キットの希釈液(R6)** を 250  $\mu$ l 加え、混和する。（この時点でサンプルは2 $\sim$ 8 $^{\circ}$ Cで5時間保存可能である。保存した場合は、よく混和してから、次の作業を行う。）混和後、検出キットのマイクロプレートのウェルにサンプルを分注する。（2. (2) 2) に続く。）

## 2. サンプル検出

### (1) 試薬の調整

- 1) 使用する試薬、固相化マイクロプレートは、使用する前に冷蔵庫から出して常温（20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C）に戻しておく。
- 2) **洗浄原液（R2）** を精製水で 10 倍希釈し、混和して**洗浄液（R2'）** とする。（2 $\sim$ 8 $^{\circ}$ C で 2 週間保存可能である。）
- 3) **陽性コントロール（R4）** の瓶を軽くタッピングしてから開封し、精製水または希釈液（R6）を 2 ml 加える。1 分間放置した後、緩やかに混和して、溶解する。（2 $\sim$ 8 $^{\circ}$ C で 2 時間、適量に分注した後、-20 $^{\circ}$ C で 6 ヶ月間保存可能である。）冷凍保存する場合は溶解後、直ちにマイクロチューブ等に小分けし-20 $^{\circ}$ C で保存する。
- 4) 使用直前に**酵素標識抗体（R7）** を洗浄液で 10 倍希釈し、緩やかに混和して**酵素標識抗体液（R7'）** とする。1 本のストリップに対して 1 ml の酵素標識抗体液（R7'）が必要となる。（2 $\sim$ 8 $^{\circ}$ C で 6 時間保存可能である。）
- 5) アルミ箔等で遮光した容器に、**基質緩衝液（R8）** と **発色液（R9）** を 10 : 1 の割合で混合し、**基質発色液（R8+R9）** とする。1 本のストリップに対して 1 ml の基質発色液（R8+R9）が必要となる。（室温で 6 時間保存可能である。ただし、使用時に青く呈色している場合は、使用できないので新しく調整し直す。）

## (2) 異常プリオンの検出

- 1) マイクロプレートラックから必要な数だけストリップを取り出す。(使用しないストリップは袋に戻し、乾燥剤を入れ、しっかりと空気を除きながら開封口を閉める。2~8℃で1ヶ月保存可能である。)
- 2) 以下のように**陰性コントロール(R3)**、**陽性コントロール(R4)**及び BSE 精製キットで調整した**サンプル**をマイクロプレートのウェルに分注する。複数枚のプレートを使用して検査する場合はプレートごとに、また1枚のマイクロプレートを複数回に分けて使用する場合は測定ごとに、それぞれコントロールをおく。

–A1, B1, C1, D1:	<b>陰性コントロール(R3)</b>	100 $\mu$ l
–E1, F1:	<b>陽性コントロール(R4)</b>	100 $\mu$ l
–G1, H1:	<b>サンプル</b>	100 $\mu$ l
- 3) シーリングフィルムで覆い、ヒートブロック (が望ましい) や孵卵器等で 37±1℃で75±15分のインキュベーションを行う。
- 4) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22℃) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800  $\mu$ l のオーバーフロー設定で3回の洗浄サイクルとする。手動で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350  $\mu$ l を注入・除去する作業を3~6回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 5) **酵素標識抗体液(R7')**を 100  $\mu$ l ずつ、各ウェルに分注する。
- 6) シーリングフィルムで覆い、2℃~8℃で 60±5分のインキュベーションを行う。
- 7) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22℃) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800  $\mu$ l のオーバーフロー設定で5回の洗浄サイクルとする。手動で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350  $\mu$ l を注入・除去する作業を5~10回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 8) 基質発色液 (**R8+R9**) 100  $\mu$ l をウェルに分注し、アルミ箔でプレートを覆う等の処置をし、暗所遮光で30分、室温 (18~22℃) でインキュベーションを行う。インキュベーションの際、フィルムは使用してはならない。
- 9) **反応停止液(R10)**100  $\mu$ l をウェルに分注する。
- 10) 停止液添加後、30分以内にマイクロプレートリーダーで**主波長 450nm**、**副波長<sup>1</sup>620nm**における OD を測定する。測定を行うまでは、常に光を避けるようにすること。

<sup>1</sup> 副波長については、600nm~700nm までの範囲においては判定に影響を及ぼさない。

### 3. 判定

判定は、次のようにカットオフ値を計算し、それを利用する。

$$\text{カットオフ値} = (\text{4つの陰性コントロールの平均吸光度} + \text{定数 } 0.210)$$

定数は、定期的に見直しを行うためキットの説明書に記載されている値を適用すること。

OD 値 < カットオフ値の-10% のとき陰性

OD 値  $\geq$  カットオフ値の-10% のとき再検査

上記により再検査となったときは、マイクロプレートの2穴を利用し、1. (2) 4)における保存サンプルを用いて行う（再検査は、別の検査員が行うことが望ましい。）。

また、測定系は、陰性コントロール及び陽性コントロールの吸光度が以下の条件を満たしていることにより確認する。

- ① 陰性コントロールの吸光度が4穴とも全て < 0.150
- ② 陽性コントロールの吸光度が2穴とも全て  $\geq$  1.000

再検査における判定は次のとおりとする。

- (1) 2穴のうち、いずれか一方のOD値がカットオフ値以上、又はカットオフ値の-10%以内のOD値を得たときは、陽性と判定する。
- (2) 2穴ともカットオフ値の-10%未満であったときは、陰性と判定する。



(別添 1 - 2)

## 「ダイナボット エンファー BSE テスト」 操作法

### 1. キットの構成

#### (1) ダイナボット エンファー BSE テストの構成

##### 試薬パック (2~8°Cで保存)

試薬	容量	保存条件	試薬調製方法	調製後の保存条件・ 使用期限
試薬 3	20mL× 1 本	2~30°C	該当なし	該当なし
洗浄剤 1	100g 粉末 × 1 ボトル	2~30°C	精製水 1L あたり 50g の 洗浄剤 1 を添加し、溶 解する。	2~8°Cで 6 ヶ月
ヤギ血清	150 $\mu$ L× 1 本	2~8°C	抗プリオン抗体の項 参照	該当なし
コンジュゲート	濃縮コンジュ ゲート 100 $\mu$ L× 1 本	2~8°C	洗浄剤 2 溶液を用いて コンジュゲートをロット 毎に指定された希釈 倍率で希釈する。	調製から 2 時間 以内に使用
基質 A	10mL× 1 ボトル	2~8°C	同量の基質 A と基質 B を混合する。	暗所で保管し、 調製当日に使用
基質 B	10mL× 1 ボトル	2~8°C		
遠心プレート	2 プレート	2~30°C	該当なし	該当なし
アッセイプレート	1 プレート	2~30°C	該当なし	該当なし
陽性コントロールウエル	8 ウエル	2~8°C	該当なし	該当なし
ブランクコントロール	30mL× 1 本	2~30°C	該当なし	該当なし

##### 抗体パック (-25~-15°Cで保存)

試薬	容量	保存条件	試薬調製方法	調製後の保存条件・ 使用期限
試薬 2	3mL× 1 本	-25~-15°C	該当なし	該当なし
抗プリオン抗体 (ウサギ血清)	濃縮抗体 50 $\mu$ L× 1 ボトル	-25~-15°C	洗浄剤 2 溶液を用いて 抗プリオン抗体を 500 倍希釈、ヤギ血清をロ ット毎に指定された希 釈倍率で希釈する。	調製当日に使用

##### バッファー/ウォッシュパック (10~30°Cで保存)

試薬	容量	保存条件	試薬調製方法	調製後の保存条件・ 使用期限
試薬 1	1L× 1 本	10~30°C	該当なし	該当なし
洗浄剤 2	10 倍濃縮液 500mL× 1 ボト ル	10~30°C	精製水 900mL あたり、 洗浄剤 2 を 100mL 添 加し、混合する。	10~30°Cで 2 週間 2~8°Cで 1 ヶ月

## (2) 成分及び分量

構成試薬	成分	含有量 (100mL 中)
試薬 1	メタノール	16 mL
	ラウリル硫酸ナトリウム (SDS)	15 g
試薬 2	プロティナーゼK	0.2 g
試薬 3	グアニジン塩酸塩	28.659 g
洗浄剤 1	塩化ナトリウム	100 g *1
洗浄剤 2	ラウロマクロゴール	0.5 mL
抗プリオン抗体	ウサギ抗プリオン血清	100 mL
コンジュゲート	西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ標識抗 ウサギ免疫グロブリン(ヤギ)	100 mL
ヤギ血清	正常ヤギ血清	100 mL
陽性コントロールウェル	合成プリオンペプチド	2.4 ng *2
基質 A	基質 A (過酸化水素水)	100 mL
基質 B	基質 B (3-アミノフタルヒドラジド溶液)	100 mL
ブランクコントロール	メタノール	16 mL
	ラウリル硫酸ナトリウム	15 g
アッセイプレート	96 穴マイクロプレート	1 枚 *3
遠心プレート	96 穴マイクロプレート	2 枚 *3

\*1: 1 ボトル中

\*2: 1 ウェル中

\*3: プレート数

## 2. 必要な器具および試薬類

### キットに含まれる材料

45 検体を検査するのに十分な試薬がキットに含まれている。

### キットに含まれない材料

- ・ 高品質の脱イオン水、蒸留水、または逆浸透水を使用する（以下精製水と略）。
- ・ Stomacher Biomaster 80 (Seward 社製) ホモジナイザー\*
- ・ ホモジナイザーバッグ (フィルター付き) (Interscience 社製)
- ・ Skatron Skanwasher<sup>R</sup> 300 (Skatron 社製) マイクロプレートの洗浄機 2 台\*
- ・ iEMS インキュベーター/シェーカー (Thermo LabSystems 社製) \*
- ・ ルミノスキャンアセント (Thermo LabSystems 社製) 化学発光測定器\*
- ・ マイクロプレート遠心器 (2750G 以上)
- ・ マイクロプレート用シール
- ・ ピペット類
- ・ 検体採材器類
- ・ 抗プリオン抗体およびコンジュゲート希釈用容器
- ・ その他試薬の希釈用ガラスまたはポリプロピレン容器
- ・ 組織からの陰性コントロール (組織コントロールの調製の項を参照)

\*印は、本検査に必要な指定の機器を示す。

### 3. 機器のパラメータ設定

推奨された機器に設定されているパラメータ情報を以下に示す。

(ユーザーによる設定作業は不要である)

#### 洗浄機

- ・ 本検査には、2台の洗浄機が必要である。
- ・ 洗浄プロトコール1および洗浄プロトコール2の両方に対して、
  - ・ 空気圧：0.25 気圧
  - ・ 容量/流速、調整オフセット  $\gg \sigma v$  : 1.00
  - ・ 吸引ポジション (通常 3.00~4.00mm)
  - ・ 分注ポジション : 0.00mm

洗浄プロトコール1*			洗浄プロトコール2		
(洗浄剤1溶液を使用) ステップ:			(洗浄剤2溶液を使用) ステップ:		
# 1	Aspirate (吸引)	6 秒	# 1	Aspirate (吸引)	4 秒
# 2	Dispense (分注)	300 $\mu$ L	# 2	Wash (洗浄)	3 秒
# 3	Soak (浸漬)	5 秒	# 3	Soak (浸漬)	5 秒
# 4	Aspirate (吸引)	4 秒	# 4	Aspirate (吸引)	2 秒
# 5	Wash (洗浄)	5 秒	# 5	Wash (洗浄)	3 秒
# 6	Soak (浸漬)	5 秒	# 6	Soak (浸漬)	5 秒
# 7	Aspirate (吸引)	3 秒	# 7	Aspirate (吸引)	2 秒
# 8	Wash (洗浄)	2.5 秒	# 8	Wash (洗浄)	3 秒
# 9	Soak (浸漬)	5 秒	# 9	Soak (浸漬)	5 秒
# 10	Aspirate (吸引)	2 秒	# 10	Aspirate (吸引)	2 秒
# 11	Wash (洗浄)	2 秒	# 11	Wash (洗浄)	2 秒
# 12	Soak (浸漬)	5 秒	# 12	Soak (浸漬)	5 秒
# 13	Aspirate (吸引)	5 秒	# 13	Aspirate (吸引)	4 秒
# 14	End Wash (洗浄終了)		# 14	End Wash (洗浄終了)	

\* 洗浄プロトコール1の操作は、バイオセーフティキャビネット内で行うこと。

#### 振盪インキュベーター

- ・ Shake value (振盪値): 5 (1400rpm)、 Temperature (設定温度): 34°C

#### 化学発光測定器

- ・ Plate acceleration (プレート加速) : 10、 Settle delay (セトルディレイ) : 100、  
Filter (フィルター) : なし、 Measurement type (測定タイプ) : シングル、  
Integration time (積算時間) : 300、 Lag time (遅延時間) : 30 秒、  
Measurement count (測定カウント) : 1、  
Photomultiplier (PMT) voltage (光電子増倍管 (PMT) 電圧) : デフォルト値、  
Plate type (適応プレート) : 96 ウェル、 Scale factor (倍率) : ~8

#### 4. 試薬の調製

調製した試薬類は、使用時に室温に達しているようにすること。

##### (1) 洗浄剤1溶液

**洗浄剤1 (Enfer Wash 1)** 粉末 50g に 1 リットルの精製水を添加して、洗浄剤 1 溶液を調製する。溶解するまで振盪し（または回転ボトル振盪器で 10 分間）、使用する前に溶解していることを確認する。

（調製した洗浄剤 1 溶液は、2～8℃で 6 ヶ月間保存可能である。）

##### (2) 洗浄剤2溶液

**洗浄剤2 (Enfer Wash 2)** 原液を精製水で 10 倍希釈し、洗浄剤 2 溶液を調製する。

（調製した洗浄剤 2 溶液は 10～30℃で 2 週間、2～8℃で 1 ヶ月間保存可能である。）

##### (3) 抗プリオン抗体+ヤギ血清溶液

**抗プリオン抗体 (Anti-PrP- 1° Ab (Rabbit))**及び**ヤギ血清 (Normal Goat Serum(Goat))**を洗浄剤 2 溶液で希釈し、転倒混和して、抗プリオン抗体+ヤギ血清溶液を調製する。希釈倍率はロットごとに異なるため、ボトルラベルの記載に従って希釈すること。

（抗プリオン抗体+ヤギ血清溶液は、調製した日に使用する。）

##### (4) コンジュゲート溶液

**コンジュゲート (Enzyme-conjugate- 2° Ab (goat anti-rabbit))**を洗浄剤 2 溶液で希釈し、転倒混和して、コンジュゲート溶液を調製する。希釈倍率はロットごとに異なるため、ボトルラベルの記載に従って希釈すること。

（調製したコンジュゲート溶液は暗所に保存し、調製後 2 時間以内に使用する。）

##### (5) 基質溶液

**基質B (Substrate Solution B)**に等量の**基質A (Substrate Solution A)**を添加する。

基質溶液は使用の 1 時間以上前に調製し、使用時には室温に達しているようにする。

（調製した基質溶液は暗所に保存し、調製した日に使用する。）

#### 5. 検体の調製

1) **500±40mg** の採材した牛延髄(検体)を用いてホモジネートを調製する。

2) 検体をホモジナイザーバッグ(本バッグは中がフィルターで仕切られている)の中のフィルターの手前側に入れ、検体がバッグの底まで押し込まれていることを確認する。ホモジナイズしやすいように、あらかじめ検体を親指と人指し指でつぶす。

3) **7.5mL** の**試薬1 (Enfer Buffer 1(Bovine))**をホモジナイザーバッグにあるフィルターの奥側に添加する。**試薬1**添加後、ホモジナイズするまでの時間に関しては特段の規定はないが、円滑にイムノアッセイのステップに入れるよう配慮すること。

4) ストマッチャーホモジナイザー (Stomacher) の速度を「high (高速)」に設定し、検体を 2 分間ホモジナイズする。フィルター付きのホモジナイザーバックを使用して乳剤を調製するため、膜等不要部分は除かれる。

注：ホモジナイズした検体は調製後、ただちにイムノアッセイのステップに入る。

試験に用いた乳剤の残分は、1回目の検査の判定が出るまでホモジナイザーバックに入れて、室温にて保管する。冷蔵保存を行うと結晶化が起こるため行わないこと。

## 6. イムノアッセイ手順

1) 遠心プレート (Centrifuge Plates) の A1 及び A2 の位置は、陽性コントロールウェル (Peptide Indicator Wells) のために空けておく。

B1 の位置からブランクコントロール (Blank Control Reagent(Bovine)) を 4 ウェル、各検体を 1 検体につき 2 ウェルずつそれぞれ 180  $\mu$ L を分注する。

- 2) 遠心プレートをプレート用シールで被う。
- 3) 遠心プレートを 5 分間、2750 *G* で遠心分離する。
- 4) 20  $\mu$ L の試薬 2 (Enfer Buffer 2) をアッセイプレート (Enfer Test Plate) の測定に使用する全てのウェルの底に滴下する。
- 5) 遠心分離が終了した遠心プレートのプレート用シールを取り除き、各検体及びブランクコントロールの上清 100  $\mu$ L 採取し、試薬 2 の入ったアッセイプレートに移す。
- 6) アッセイプレートをプレート用シールで被う。
- 7) アッセイプレートを 34°C で 60 分間振盪する。
- 8) プレート用シールを取り除き、洗浄剤 1 溶液及び〈洗浄プロトコール 1〉を用いてアッセイプレートを洗浄する。
- 9) アッセイプレートを柔らかい紙の上に裏返し、よく叩いて残存する液体を除去する。
- 10) 150  $\mu$ L の試薬 3 (Enfer Buffer 3) をすべてのウェルに添加する。
- 11) アッセイプレートをプレート用シールで被う。
- 12) アッセイプレートを 34°C で 15 分間振盪する。
- 13) プレート用シールを取り除き、洗浄剤 2 溶液及び〈洗浄プロトコール 2〉を用いてアッセイプレートを洗浄する。
- 14) アッセイプレートを柔らかい紙の上に裏返し、よく叩いて残存する液体を除去する。
- 15) アッセイプレートから A1 及び A2 のウェルを取り除き、陽性コントロールウェルと交換する。
- 16) 調製した抗プリオン抗体+ヤギ血清溶液を 150  $\mu$ L ずつ各ウェルに分注する。
- 17) アッセイプレートをプレート用シールで被う。
- 18) アッセイプレートを 34°C で 40 分間振盪する。
- 19) プレート用シールを取り除き、洗浄剤 2 溶液及び〈洗浄プロトコール 2〉を用いてアッセイプレートを洗浄する。
- 20) アッセイプレートを柔らかい紙の上に裏返し、よく叩いて残存する液体を除去する。
- 21) 調製したコンジュゲート溶液を 150  $\mu$ L ずつアッセイプレートに分注する。
- 22) アッセイプレートをプレート用シールで被う。
- 23) アッセイプレートを 34°C で 30 分間振盪する。

- 24) プレート用シールを取り除き、洗浄剤 2 溶液及び〈洗浄プロトコール 2〉を用いてアッセイプレートを洗浄する。
- 25) アッセイプレートを柔らかい紙の上に裏返し、よく叩いて残存する液体を除去する。
- 26) 調製した基質溶液を 150  $\mu$ L ずつアッセイプレートに添加する。
- 27) アッセイプレートをプレート用シールで被う。
- 28) アッセイプレートを 34°C で 10 分間振盪する。
- 29) プレート用シールを取り除き、化学発光測定器を用いて発光強度を読み取る。

#### アッセイプレート (Enfer Test Plate) の配置例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
B	B	B	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
C	B	B	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
D	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
E	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
F	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43
G	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36	S44	S44
H	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37	S45	S45

P : 陽性コントロールウェル (Peptide Indicator Wells)

B : ブランクコントロール (Blank Control Reagent (Bovine))

S1~S45 : サンプル

## 測定作業フロー

ステップ	作業	時間/温度	使用機器 / 器具	次工程の準備作業等	注意事項
検体採取・調製工程					
検体採取・ 秤量	検体秤量: 500±40mg		天秤		
ホモジナイズ	組織 500±40mg に対して試薬 1 を 7.5 mL 添加	2 min (Speed "High")	Stomacher 80 ホモジナイザー		フィルターバッグの底近くに組織試料を入れる  終了後サンプルの気泡消失まで数分間室温静置
ホモジネート を移す	ホモジネートを 遠心用プレート に移す: 180 μL		ピペット	ブランクコントロールも同様に 180 μL プレートに移す	シールでプレートを覆う
遠心	遠心: 2,750 <i>G</i>	5 min 室温	遠心器	インキュベーターの 温度が 34°C になって いることを確認して おく。	遠心前にバランスをとる  2~8°C での遠心は厳禁
試薬 2 (PK) 添加	アッセイプレートに添加: 20 μL		(8 連)ピペット		ウエルの底の角に添加すること (最後に目視で試薬 2 の添加確認)
プレートへの 検体分注	遠心後の上清を プレートへ添 加: 100 μL		(8 連)ピペット		沈殿物に注意して上清をとる
インキュベ ーション 1	インキュベ ーション	60 min at 34°C	LabSystem iEMS インキュベ ーター		
洗浄 1	洗浄剤 1 を用 い、プロトコー ル 1 で洗浄		Skanshaker 300 洗浄器		洗浄後、紙タオルの上で数回逆さにして叩いて残液を除去する
試薬 3 添加	試薬 3 150 μL 添加		(8 連)ピペット		
インキュベ ーション 2	インキュベ ーション	15 min at 34°C	LabSystem iEMS インキュベ ーター	第 1 抗体溶液の調製 (抗プリオン抗体、ヤギ血清を調製済み洗浄剤 2 で希釈する) コンジュゲート (第 2 抗体) 溶液の調製 (コンジュゲートを調製済み洗浄剤 2 で希釈する) 又、基質溶液の調製を行う	

洗浄 2	洗浄剤 2 を用い プロトコール 2 で洗浄		Skanswasher 300 洗浄器	洗浄後 A1,A2 の位置 のウェルを折り取り 陽性コントロールウ ェルをセットする	洗浄後、紙タオ ルの上で数回逆 さにして叩いて 残液を除去する
ELISA 工程					
第 1 抗体	第 1 抗体の添 加: 150 $\mu$ L		(8 連)ピペット		A1,A2 の位置に 陽性コントロー ルウェルがある ことを確認して から一次抗体添 加
インキュベ ーション 3	インキュベ ーション	40 min at 34°C	LabSystem iEMS インキュベ ーター		
洗浄 3	洗浄剤 2 を用 い、プロトコ ール 2 で洗浄		Skanswasher 300 洗浄器		洗浄後、紙タオ ルの上で数回逆 さにして叩いて 残液を除去する
コンジュゲー ト	コンジュゲー トの添加: 150 $\mu$ L		(8 連)ピペット		
インキュベ ーション 4	インキュベ ーション	30 min at 34°C	LabSystem iEMS インキュベ ーター		
洗浄 4	洗浄剤 2 を用 い、プロトコ ール 2 で洗浄		Skanswasher 300 洗浄器		洗浄後、紙タオ ルの上で数回逆 さにして叩いて 残液を除去する
基質	基質の添加: 150 $\mu$ L		(8 連)ピペット		
インキュベ ーション 5	インキュベ ーション	10 min at 34°C	LabSystem iEMS インキュベ ーター		
測定	化学発光の測定		ルミノメーター		



## 7. 判定方法

### (1) 検査性能の検証

検体の結果を判定する前にコントロールの結果を検証する必要がある。ブランクコントロール及び陽性コントロールウェルの平均発光強度を求める。以下の基準を満たしていない場合は、アッセイの結果は無効であるため、「5. 検体の調製」の牛延髄(検体)の採材の工程に戻って再試験を行う。この際も2ウェルを用いた測定の結果をもって判定を行う。

#### 1) ブランクコントロール

ブランクコントロールの4ウェルを用いた測定の中央値は4.0LU未満でなければならない。中央値は4ウェルを用いた測定値の最大値と最小値を除く2つの値の平均によって求められる。

#### 2) 陽性コントロールウェル

ブランクコントロールの中央値を引き算した後、陽性コントロールウェルの平均値は、使用したロットの陽性コントロールウェルの管理範囲(陽性コントロールウェルのラベルに記載されている)内であることを確認する。

陽性コントロールウェルの個々の測定値は、陽性コントロールウェルの平均値から±30%を超えてはならない。

### (2) 測定結果の判定

本キットのカットオフ値は5.5LUである。また、全ての検体の測定値はブランクコントロールの中央値を差し引いた後で判定に用いる。

2ウェルの測定値が両方とも5.5LU以下であった場合、本キットで陰性と判断される。一方、2ウェルを用いた測定の少なくとも一方において5.5LUを上回る数値が得られた検体は、すべてについて「5. 検体の調製」の牛延髄(検体)の採材の工程に戻って2ウェルを用いた試験で再検査し、確認する必要がある。

再検査の結果、2ウェルを用いた測定の少なくとも一方が5.5LUを上回った場合、本キットでは陽性となり、陽性が疑われるため確定検査が必要である。再検査の結果、2ウェルを用いた測定値が両方とも5.5LU以下であった場合、本キットで陰性と判断される。

検体の測定結果 (n = 2)



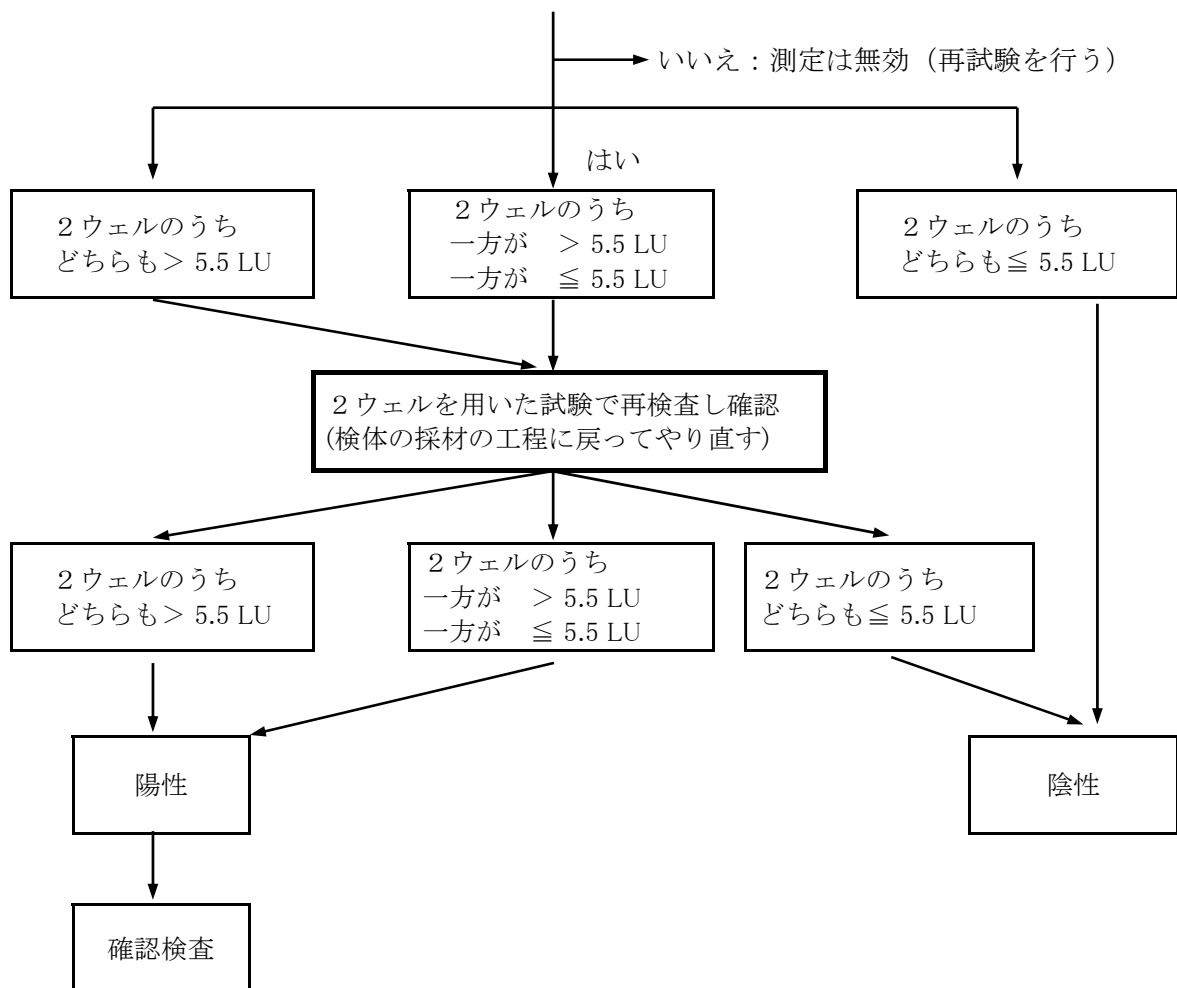
### ブランクコントロール

- ブランクコントロールの4重測定の中央値は4.0 LU未満でなければならない。中央値は4重測定の値の最大値と最小値を除く2つの値の平均によって求められる。

### 陽性コントロールウェル

(本キット添付の陽性コントロールウェルを使用する場合にのみ適用される)

- ブランクコントロールの中央値を引き算した後、陽性コントロールウェルの平均値は、使用したロットの陽性コントロールウェルの管理範囲内であることを確認する。
- 陽性コントロールウェルの個々の測定値は、陽性コントロールウェルの平均値から±30%を超えてはならない。



#### 8. キットの分割使用

検体数が少ない場合、キットを最大4回に分けて分割使用することができる。また、この際の最小検体数は1検体である。

#### 9. 本試験法にて陽性と判定された検体に関する取扱い

判定が出るまでホモジナイザーバック中に室温にて保管されている乳剤は、判定の結果、再検査を要する場合（2つのウェルとも陽性、または、一方のみ陽性の場合）は、その乳剤を培養用の15 mlのプラスチック遠心管に移し、凍結保存する。

再検査の結果、陽性の場合、再検査で使用した乳剤を培養用の15 mlのプラスチック遠心管に移し、凍結後、初回検査の凍結保存乳剤とともに確認検査のために使用する。

確認検査を実施するにあたり、輸送が必要な場合は、乳剤の入った培養用15mlのプラスチック遠心管の蓋をパラフィルムで固定し、プラスチック遠心管が割れた場合やキャップが外れた場合の吸収剤及び衝撃に対する緩衝材として、ティッシュ等で全体を巻いた上で、ウェスタンブロット用の送付検体としてバイオハザード缶等に同梱し、送付する。

再検査の結果、2つのウェルの両者が陰性の場合、初回検査後に凍結保存した乳剤は廃棄する。

## 「フレライザ®BSE」操作方法

## 1. キットの構成

## ① フレライザ®BSE の構成

フレライザ®BSE は下記に示すように 17 の構成試薬を含む 3 つの試薬セット (抽出用試薬 A セット・抽出用試薬 B セット及び検出用試薬セット) からなる BSE スクリーニング試薬である。

## フレライザBSE構成試薬

No.	構成試薬	剤型	容量	本数
<b>【抽出用試薬Aセット】</b> (-30~-10°C保存)	1 DNase I 溶液	凍結	1mL	1
	2 コラゲナーゼ溶液	凍結	5mL	1
	3 プロティナーゼK溶液	凍結	1mL	2
	4 PK反応停止液	凍結	1.5mL	1
<b>【抽出用試薬Bセット】</b> (2~10°C保存)	5 ホモジネート液	液状	48mL	2
	6 界面活性剤液	液状	38mL	1
	7 濃縮液	液状	22mL	1
	8 可溶化液	液状	7mL	1
	9 検体希釈液	液状	25mL	1
<b>【検出用試薬セット】</b> (2~10°C保存)	10 抗体結合プレート	ウエル	96ウエル	1
	11 酵素標識抗体液	液状	0.8mL	1
	12 標識抗体希釈液	液状	8mL	1
	13 陰性コントロール	液状	1.5mL	2
	14 陽性コントロール	液状	1.5mL	1
	15 基質液	液状	18mL	1
	16 洗浄液	液状	50mL	2
	17 反応停止液	液状	18mL	1

## ② 試薬調製方法

キット構成試薬は使用前に室温に戻し、下表に従い調製したものを用いる。なお、ホモジネート用調製試薬 1 及び調製試薬 2,3 の具体的な調製方法を下記に示す。

No.	構成試薬	剤型	試薬調製法
1	DNase I 溶液	凍結	ホモジネート液に対し126倍希釈し用いる(ホモジネート用調製試薬1)
2	コラゲナーゼ溶液	凍結	ホモジネート液に対し21倍希釈し用いる(ホモジネート用調製試薬1)
3	プロティナーゼK溶液	凍結	界面活性剤液を用い18倍希釈し用いる(調製試薬2)
4	PK反応停止液	凍結	濃縮液を用い31倍希釈し用いる(調製試薬3)
5	ホモジネート液	液状	そのまま用いる。
6	界面活性剤液	液状	そのまま用いる。
7	濃縮液	液状	そのまま用いる。
8	可溶化液	液状	そのまま用いる。
9	検体希釈液	液状	そのまま用いる。
10	抗体結合プレート	ウエル	そのまま用いる。
11	酵素標識抗体液	液状	標識抗体希釈液を用い、11倍希釈して用いる。
12	標識抗体希釈液	液状	そのまま用いる。
13	陰性コントロール	液状	そのまま用いる。
14	陽性コントロール	液状	そのまま用いる。
15	基質液	液状	そのまま用いる。
16	洗浄液	液状	精製水にて、20倍希釈し用いる。
17	反応停止液	液状	そのまま用いる。

ホモジネート用調製試薬 1：ホモジネート液に対し DNase I 溶液を 126 倍に、コラゲナーゼ溶液を 21 倍に希釈し、ホモジネート用調製試薬 1 を調製する。測定検体数ごとの目安として下表を添付する。

ホモジネート用調製試薬 1			
検体数	DNase I 溶液 ( $\mu$ L)	コラゲナーゼ溶液 ( $\mu$ L)	ホモジネート液 (mL)
5	40	250	5
10	80	500	10
25	160	1000	20
50	320	2000	40
80	520	3250	65
100	640	4000	80

調製試薬 2：プロティナーゼ K 溶液を界面活性剤液で 18 倍希釈し、調製試薬 2 を調製する。測定検体数ごとの目安として下表を添付する。

調製試薬 2		
検体数	プロティナーゼ K 溶液 ( $\mu$ L)	界面活性剤液 (mL)
5	118	2
10	235	4
25	500	8.5
50	1000	17
80	1412	24
100	1765	30

調製試薬 3：PK 反応停止液を濃縮液で 31 倍希釈し、調製試薬 3 を調製する。測定検体数ごとの目安として下表を添付する。

調製試薬 3		
検体数	PK 反応停止液 ( $\mu$ L)	濃縮液 (mL)
5	<u>50</u>	<u>1.5</u>
10	<u>80</u>	<u>2.4</u>
25	<u>160</u>	<u>4.8</u>
50	<u>300</u>	<u>9.0</u>
80	<u>450</u>	<u>13.5</u>
100	<u>600</u>	<u>18.0</u>

## 2. 必要な器具および試薬類

### ① 器具

電子天びん：マスター天びん LA120S（ザルトリウス社製）若しくは同等品（読取限度：0.1mg,最大値 10g 以上、フード付き）

ホモジナイザー：ファストプレップ（Qbiogene 社製）若しくはマルチビーズシヨッカー（安井器械製）

恒温水槽①：37℃が設定できる恒温水槽若しくはドライブロックヒーター。

恒温水槽②：100℃以上が設定できる恒温水槽若しくはドライブロックヒーター。

遠心機：高速遠心機 CF15R（日立製）若しくは同等品（15,000Gが得られる本体とローターの組み合わせ）

インキュベーター：37℃が設定できるふ卵器若しくは ELISA 用プレートインキュベーター。

プレート洗浄機：PW-40（バイオラッド社製）若しくは同等品

プレートリーダー：マイクロプレートリーダーモデル 550(バイオラッド社製)若しくは同等品（主/副波長が設定できる機種）

マイクロピペット：200  $\mu$  L 用,1,000  $\mu$  L 用,5,000  $\mu$  L 用等

### ② 消耗品

採材用具：採材セット（富士レビオ社製）若しくはサンプリングシリンジ

ホモジナイズ用チューブ：凍結保存チューブ 2mL 用若しくは破砕用チューブ(安井器械製)

メタルコーンまたはセラミックビーズ：磁性体メタルコーン（安井器械製）又は YTZ ボール（ニッカトー製）\*

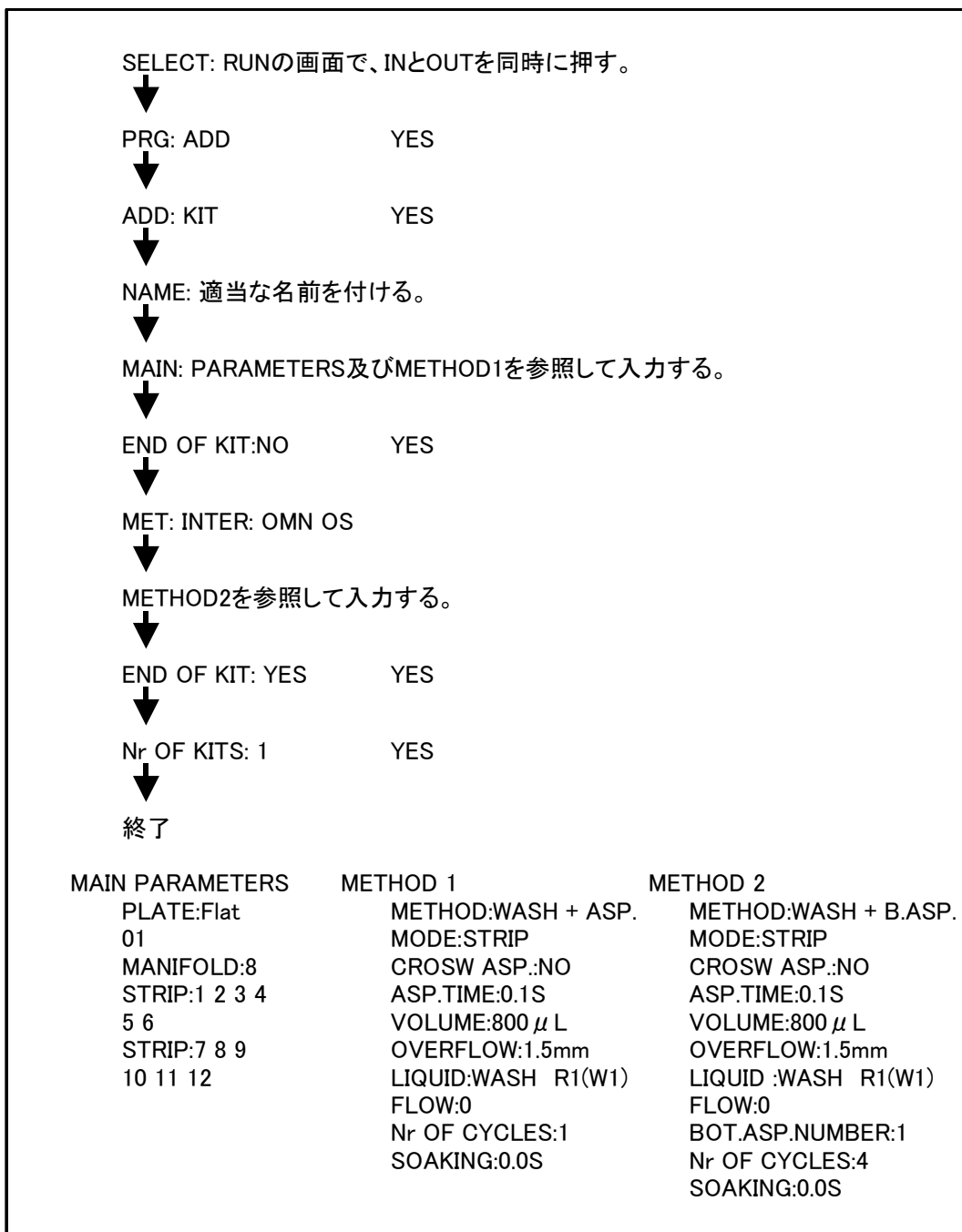
サンプルチューブ：サンプリングチューブ 2mL 用若しくは凍結保存チューブ 2 mL 用

マイクロピペット用チップ：各種

\* ;凍結保存チューブ 2mL 用に YTZ ボール（ニッカトー社製）を 0.6（ $\pm$ 0.1）g 分注したものを富士レビオ社より「ホモジネートチューブ」として販売

③ 機器の設定

プレート洗浄機：下記に PW40 の設定方法を示す。



プレートリーダー：下記に従いパラメーターの設定を行う。

ブランク：エアークランク

主波長：450nm

副波長：600～630nm

### 3. 試験方法

#### ① 乳剤の調製

破砕担体は使用者の状況に合わせてメタルコーン又はセラミックビーズのどちらかを選択する。

①-1 測定検体数に合わせてホモジネート用調製試薬 1 を作製する。

①-2 セラミックビーズを含むホモジナイズ用チューブにホモジネート用調製試薬 1 を 800  $\mu$ L 添加する（メタルコーンを使用する場合はウシ延髄門部をホモジナイズ用チューブに先に採取し、後からメタルコーンを加え、最後にホモジネート用調製試薬 1 を添加する）。

①-3 ウシ延髄門部を 200 $\pm$ 20mg 採取し、ホモジナイズ用チューブに移す。

①-4 ホモジナイズ用チューブの蓋を閉め、ホモジナイザーにセットする。

ホモジナイザーの推奨条件

【セラミックビーズ使用の場合】

ファストプレップ：スピード；6.5、時間；45 秒

マルチビーズショッカー：スピード；3,000rpm、時間；1 分

【メタルコーン使用の場合】

ファストプレップ：スピード；4.0、時間；45 秒

マルチビーズショッカー：スピード；2,000rpm、時間；1 分

①-5 攪拌後のものを 20w/v%乳剤とする（目視で明らかな塊が認められる場合は再度攪拌を行う）。

#### ② 抽出操作

②-1 測定検体数に合わせて調製試薬 2 を作製する。

②-2 20w/v%乳剤 250  $\mu$ L を 2mL 用のサンプルチューブに移し、調製試薬 2 を 300  $\mu$ L 加え攪拌し、37( $\pm$ 1) $^{\circ}$ C で 30 $\sim$ 35 分間インキュベートする。

②-3 インキュベートの間に調製試薬 3 を作製する。

②-4 上記反応終了後、調製試薬 3 を 150  $\mu$ L 加え、攪拌する。

②-5 高速冷却遠心機を用い、15,000G, 10 分間 (25 $\sim$ 30 $^{\circ}$ C) 遠心分離する。

②-6 遠心分離後、上清を十分に除去する（デカンテーション後マイクロピペットを用いチューブ底に溜まっている溶液を抜き取るか、又は転倒静置する。転倒静置する場合は沈澱が流れ落ちないように注意する）。

②-7 遠心分離にて得られた沈殿に可溶化液 50  $\mu$ L を加え、100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱処理を行う（沈殿がチューブ横壁に付着し、可溶化液に漬からない状態が発生する可能性があるため攪拌を行わない）。

②-8 加熱処理終了後、十分に攪拌し、懸濁する。

②-9 冷却後、検体希釈液 100  $\mu$ L を加え攪拌し、処理済み検体とする（必要に応じて超音波処理を行う）。



③ 検出 (ELISA) 操作

- ③-1 検体数に合わせて酵素標識抗体液を標識抗体希釈液を用い 1:1 倍希釈調製する。
- ③-2 検体数に合わせて洗浄液を調製する (45 検体まで 500mL(洗浄液 25mL+蒸留水 475mL))。
- ③-3 処理済み検体(1 ウェル)、陰性コントロール(2 ウェル)及び陽性コントロール(1 ウェル)を、それぞれ 100  $\mu$  L ずつ抗体結合プレートの各ウェルにサンプリングする。サンプリング後、直ちに希釈調製済みの酵素標識抗体液を各ウェルに 50  $\mu$  L ずつ加える。プレートシールを貼った後、緩やかに攪拌混合し、37°C で 1 時間反応を行う。
- ③-4 反応終了後、プレートシールをとり、希釈調製済み洗浄液で (800  $\mu$  L、5 回) 洗浄する。洗浄後、ペーパータオル等の上で軽くプレートを転倒してたたき、ウェル中に洗浄液が残らないようにする (洗浄に関しては使用する自動洗浄機の機種により個別に洗浄モードを設定する)。
- ③-5 基質液 100  $\mu$  L を各ウェルに加え緩やかに攪拌し、遮光し、室内温度 (20 ~ 30°C) にて 30 分間反応を行う。
- ③-6 反応停止液 100  $\mu$  L を各ウェルに加え、緩やかに攪拌混合する。
- ③-7 マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450nm、副波長 600~630nm で測定を行う。

アッセイプレートの配置例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	S-6	S-14	S-22	S-30	S-38	S-46	S-54	S-62	S-70	S-78	S-86
B	NC	S-7	S-15	S-23	S-31	S-39	S-47	S-55	S-63	S-71	S-79	S-87
C	PC	S-8	S-16	S-24	S-32	S-40	S-48	S-56	S-64	S-72	S-80	S-88
D	S-1	S-9	S-17	S-25	S-33	S-41	S-49	S-57	S-65	S-73	S-81	S-89
E	S-2	S-10	S-18	S-26	S-34	S-42	S-50	S-58	S-66	S-74	S-82	S-90
F	S-3	S-11	S-19	S-27	S-35	S-43	S-51	S-59	S-67	S-75	S-83	S-91
G	S-4	S-12	S-20	S-28	S-36	S-44	S-52	S-60	S-68	S-76	S-84	S-92
H	S-5	S-13	S-21	S-29	S-37	S-45	S-53	S-61	S-69	S-77	S-85	S-93

S1~S93: サンプル  
 NC: 陰性コントロール  
 PC: 陽性コントロール

#### 4. 判定方法

##### ① カットオフ値の算出

同時に試験した陰性コントロール 2 ウェルの平均値に 0.150 を加えた値を、カットオフ値とする。

カットオフ値＝陰性コントロールの平均値＋0.150

##### ② 測定系の確認

陰性コントロールの吸光度の平均が 0.1 以下

陽性コントロールの吸光度が 1.0 以上

陰性コントロール及び陽性コントロールの反応が上記基準に適合していることが確認された場合、測定が正常に実施されたと判断する。測定が正常に実施されたと判断された場合は、③判定方法に従って結果の判定を実施する。ただし、上記基準に満たない場合は操作に問題がある可能性があるため再度試験を行う。

##### ③ 結果の判定方法

試験した検体の吸光度がカットオフ値以上の場合を陽性、カットオフ値未満の場合を陰性と判定する。

ただし、本製剤で陽性と判定された検体については、他の免疫学的検査、病理組織検査及び免疫組織化学的検査等を用いて確認を行い、最終判定とする。

##### ④ 陽性の取り扱い

初回の試験で陽性と判定された検体およびカットオフ値よりわずかに低い吸光度（－10%以内）を示した検体については、再検査を実施する。

再試験は1サンプルについて2ウェル分を 3. 試験方法②抽出操作から行う。この時少なくとも一方がカットオフ値以上の吸光度を示した場合は陽性と判定する。

#### 5. 注意事項

○抽出操作において 37℃の反応温度が保たれなかった場合、酵素処理が充分に行われず偽陰性や偽陽性の原因となるため温度管理には気をつけること。

○処理済み検体に沈査が多い場合、検出操作時の洗浄が充分に行われず非特異反応が認められる場合があるため、最終攪拌若しくは超音波処理は充分に行う。

○検出（ELISA）操作の酵素反応時の遮光が充分でない場合、バックグラウンドが高くなる恐れがあるので、遮光は充分に行うこと。

作業フロー

工程名	作業	温度/時間	器具/機器	次工程準備	注意事項
<b>乳剤調製</b>					
検体採取 秤量	200±20mg		採取具 天びん	ホモジネート 用調製試薬1 作製	検体採取⇒秤量までは安全キャビネット内で作業を行う
ホモジナイズ	ホモジネート用調製試薬1添加:800μL	スピード:6.5 時間:45秒	ホモジネート チューブ		セラミックビーズ/ファストブレップを使用した場合
<b>抽出操作</b>					
サンプリング	乳剤採取: 250μL		マイクロピペット	調製試薬2 作製	サンプリング⇒希釈までは安全キャビネット内で作業を行う。
PK処理	調製試薬2 添加:300μL	37(±1)°C、 30-35分	連続分注器/ ウォーターバス/ ドライブロック ヒーター	調製試薬3 作製	
濃縮	調製試薬3 添加:150μL/遠 心分離	15,000G,10分 (25-30°C)	連続分注器/ 高速遠心機		廃液はまとめて滅菌処理してから廃棄する。
可溶化	可溶化液 添加:50μL	100°C、5分	連続分注器/ ウォーターバス/ ドライブロック ヒーター		
希釈	検体希釈液 添加:100μL				
<b>検出(ELISA)操作</b>					
標識抗体液 調製	酵素標識抗体液 の希釈x11				
洗浄液調製	洗浄液希釈: x20				
1次反応	サンプル:100μL NC:100μL(2ウエル) PC:100μL(1ウエル) + 希釈標識抗体液:50μL	37°C、1時間	マイクロピペット / 連続分注器/ インキュベーター		標識抗体を分注する際に飛沫が近隣のウエルに飛ばないように気をつける
洗浄	0.8mL x 5回		プレート洗浄器		廃液は滅菌処理してから廃棄する
酵素反応	基質液添加:100μL	室内温度 (20-30°C)	連続分注器/ インキュベーター		遮光に気をつける
反応停止	反応停止液添加: 100μL		連続分注器		測定前に気泡を除去する
吸光度測定			プレートリーダー		使用後のプレートは感染物として廃棄する

## 6. 使用上又は取扱い上の注意

### 【一般的注意】

- 1) 本製剤は定められた用法及び用量を厳守すること。
- 2) 検体として延髄以外は使用しないこと。
- 3) 本製剤で陽性と判定された検体については、他の免疫学的検査（ウエスタンブロット法）、病理組織学的検査及び免疫組織化学的検査等により確認すること。
- 4) ウシ、めん羊、山羊の海綿状脳症（BSE）の診断に関しては国の定める要領等に基づき実施すること。

### 【使用者に対する注意】

- 1) ウシ、めん羊、山羊の延髄からのプリオン蛋白質の抽出操作は原則として安全キャビネット内で行い、飛沫、エアロゾルを発生させないように取扱いに注意すること。
- 2) 作業者はゴム手袋又は防護手袋、マスク、防護メガネ、防護衣等を着用し作業すること。

### 【使用時の注意】

- 1) 検体を 2～10℃に保存した場合は 24 時間以内に使用すること。それ以上保存する場合は凍結保存すること。
- 2) 作業着を始め、使用する器具はなるべくディスポーザブル製品を用いること。
- 3) 検体抽出時及び検出操作時には他の検体の汚染がないように注意すること。
- 4) 異なったロット番号の試薬を混ぜて使用しないこと。
- 5) 検体の採取等に使用するサンプルチップはその都度新しいものを使用すること。
- 6) ホモジネート用調製試薬 1 は調製後、室内温度（20～30℃）で保存する場合には 4 時間以内に、4℃で保存する場合には 7 日以内に使用すること。調製試薬 2 は、調製後 4℃～室内温度（20～30℃）で保存する場合には、6 時間以内に使用すること。
- 7) ホモジナイズ工程における 20%脳乳剤の調製温度は 20～60℃で実施すること。FastPrep を使用する場合は連続運転により温度上昇する可能性があるため、ホモジネート用調製試薬 1 を使用前に 10℃以下に冷却し使用するか又は運転間隔を調整し温度上昇を避けること。
- 8) FastPrep を使用する場合は同一検体の連続ホモジネートは 1 回とする。但し、ホモジナイズが充分でないと判断した場合は検体を 10℃以下に冷却し、再度ホモジナイズを行うこと。

- 9) 本キットにより調製された 20%脳乳剤は室内温度(20～30℃)で放置する場合には 4 時間以内に、4℃保存する場合には 24 時間以内に使用すること。
- 10) 抽出用試薬 A セットは融解後攪拌してから使用すること。冷蔵保存の抽出用試薬 B セット及び検出用試薬セットは使用前に室内温度 (20～30℃) に戻してから使用すること。
- 11) 抗体結合プレートの洗浄には決められた回数を守り、充分洗浄されていることを確認すること。
- 12) 抗体結合プレート洗浄後は速やかに基質液を分注すること。
- 13) 基質液を分注した後は、遮光して反応を行うこと。
- 14) 反応停止液分注後は 10 分以内に吸光度測定を行うこと。
- 15) 洗浄液は 4℃保存により結晶が析出する場合がありますので、その場合はあらかじめ 37℃で溶解させた後に使用すること。
- 16) 濃縮液は 1-ブタノールとメタノールの混合液です。火のそば等での使用を避けてください。また、有害なので蒸気を吸入しないようにし、皮膚、粘膜に付着しない等取扱いに際しては関係法令に従ってください。

#### 【取扱い上の注意】

- 1) 使用期限の切れたキットは使用しないこと。
- 2) 外観又は内容に異常を認めたものは使用しないこと。
- 3) 抽出用試薬Aセットは 12 回以上凍結融解しないこと。
- 4) ストリップは必要な数だけ取り出し、使用しないストリップは袋に戻し、乾燥剤を入れて密閉し 2～10℃に保管すること。
- 5) 試薬類はあらかじめ必要量だけ分取し、室温に戻すが、使用しないものは速やかに保管温度に戻し保管すること。
- 6) 検査材料をこぼした場合は次亜塩素酸溶液(有効塩素濃度 2%)で拭き取り、その溶液に 120 分以上浸漬すること。
- 7) 検体及び使用した器具類等の汚染材料は以下のいずれかの滅菌処理を行った後、廃棄して下さい。
  - ・ オートクレーブ滅菌 (134～138℃、3 気圧、20 分以上)
  - ・ 3%SDS 溶液に 100℃・3 分以上浸漬
  - ・ 3%SDS 溶液に浸潤し、オートクレーブ (121℃、10 分以上)
  - ・ 次亜塩素酸溶液(有効塩素濃度 2%)に 120 分以上浸漬
  - ・ 1mol/L 水酸化ナトリウム溶液に 60 分以上浸潤
- 8) 使用後のキットを廃棄する場合には関係法令並びに地方公共団体条例等に従い廃棄すること。
- 9) 試験は清潔な環境で行うこと。試薬を複数回に分けて使用する場合には、他からの汚染を避けるよう取扱いには十分注意すること。

**【保管上の注意】**

- 1) 小児の手の届かないところに保管すること。
- 2) 直射日光・加温等は品質の劣化を招くので避けること。

## 「テセーBSE」 操作法

## 1. サンプルの精製

## (1) 試薬の調製

処理検体数に応じて（下表参照）、BSE精製キットの溶解液(Reagent A)でプロテイナーゼ Kを 250 倍に希釈する。

（希釈したプロテイナーゼK溶液は、室温（18～30℃）で 6 時間保存可能である。）

検体数	Reagent Aの容量	プロテイナーゼ Kの容量
2	1ml	4 μl
10	3ml	12 μl
18	5ml	20 μl
26	7ml	28 μl
34	9ml	36 μl
42	11ml	44 μl
50	13ml	52 μl
58	15ml	60 μl
66	17ml	68 μl
74	19ml	76 μl
82	21ml	84 μl
90	23ml	92 μl

## (2) 異常プリオンペプチド精製

試薬は室温（18～30℃）に戻してから使用する

- ウシの胃（Obex）部位を **350±40 mg** を量り取る。
- 量り取った検体をグライディングチューブに入れる。
- グライディングチューブに入れたサンプルを完全にホモジナイズする。（この時点でホモジナイズしたサンプルは、室温（18～30℃）で 8 時間、2～8℃で 15 時間、-20℃で 1 年間保存可能である。保存する場合、凍結・融解は 3 回限りとする。）
- ホモジネートされたサンプルから固形物を含まないように注意しながら **250 μl** 量り取り、**2 ml マイクロチューブ**等に移す。（この時点でサンプルは、室温（18～30℃）で 8 時間、2～8℃で 1 5 時間、-20℃で 1 年間保存可能である。）
- 上記 1. (1) で希釈した**プロテイナーゼ K溶液**を **250 μl** 加え、よく混和する。酵素活性を均一にするため、プロテイナーゼ K溶液は、**最初のサンプルから最後のサンプルまで 5 分以内**にすばやく加える。氷上に置いた場合は 10 分以内に行う。
- よく混和したら、すばやく湯浴、インキュベーター又はヒートブロック等に置き、**37±2℃、10±1 分間**のインキュベーションを行う。5) のサンプル混和とインキュベーションの間の時間は**2分以上置いてはならない**。
- インキュベーション終了から **2 分以内**（チューブを氷上においた場合には 10 分以

内)に **Reagent B** を  $250\ \mu\text{l}$  加え、溶液全体が青くなるまでよく混和する。(Reagent B は最初のサンプルから最後のサンプルまで、**5分以内**にすばやく加える。氷上においた場合は10分以内に行う。)

- 8) **20,000×g** で **5分間** 又は **15,000×g** で **7分間** 遠心する。
- 9) 遠心終了から、**5分以内** に上清を廃棄する。上清をできるだけ取り除くために、チューブを上下逆さにしてペーパー上に5分間置くか、あるいはアスピレーターで5分間吸引乾燥させる。
- 10) 上清を廃棄した後、**10分以内** にマイクロチューブに **Reagent C** を  $25\ \mu\text{l}$  加える。ここではボルテックスで混和してはならない。
- 11) すばやく湯浴、インキュベーターまたはヒートブロック等に置き、**100±5 °C、5±1分間** のインキュベーションを行うこと。**Reagent C 添加とインキュベーションの間の時間は2分以上置いてはならない。**
- 12) インキュベーターからマイクロチューブを取り出し、ボルテックスでよく混和する。(この時点で、サンプルは2~8°Cで5時間、-20°Cで**72時間**保存可能である。保存した場合は、いずれも **100±5°C、5±1分間** のインキュベーションを行った後、ボルテックスでよく混和する。)
- 13) BSE 検出キットの**希釈液(R6)**を  $125\ \mu\text{l}$  加え、混和する。混和後、検出キットのマイクロプレートのウェルにサンプルを分注する。(2. (2) 2) に続く。)

## 2. サンプル検出

### (1) 試薬の調製

- 1) 使用する試薬、固相化マイクロプレートは、使用する前に冷蔵庫から出して**室温(18~30°C)**に戻しておく。
- 2) **洗浄原液(R2)**を精製水で10倍希釈し、混和して**洗浄液(R2')**とする。(室温(18~30°C)で24時間、2~8°Cで2週間保存可能である。)
- 3) **陽性コントロール(R4)**の瓶を軽くタッピングしてから開封し、希釈液(R6)を4ml加える。1分間放置した後、緩やかに混和して、溶解する。(室温(18~30°C)で**2時間**、2~8°Cで**4時間**、適量に分注した後、-20°Cで6ヶ月間保存可能である。)冷凍保存する場合は溶解後、直ちにマイクロチューブ等に小分けし-20°Cで保存する。
- 4) 使用直前に**酵素標識抗体(R7)**を洗浄液で10倍希釈し、緩やかに混和して**酵素標識抗体液(R7')**とする。1本のストリップに対して1mlの酵素標識抗体液(R7')が必要となる。(18~30°Cで8時間保存可能である。)
- 5) アルミ箔等で遮光した容器に、**基質緩衝液(R8)**と**発色液(R9)**を10:1の割合で混合し、**基質発色液(R8+R9)**とする。1本のストリップに対して1mlの基質発色液(R8+R9)が必要となる。(室温(18~30°C)で**遮光**し、6時間保存可能である。ただし、使用時に青く呈色している場合は、使用できないので新しく調製し直す。)



(2) 異常プリオンの検出

- 1) マイクロプレートラックから必要な数だけストリップを取り出す。(使用しないストリップは袋に戻し、乾燥剤を入れ、しっかりと空気を除きながら開封口を閉める。2~8℃で1ヶ月保存可能である。)
- 2) 以下のように**陰性コントロール(R3)**、**陽性コントロール(R4)**及びBSE精製キットで調製した**サンプル**をマイクロプレートのウェルに分注する。複数枚のプレートを使用して検査する場合はプレートごとに、また1枚のマイクロプレートを複数回に分けて使用する場合は測定ごとに、それぞれコントロールをおく。

—A1, B1, C1, D1:	陰性コントロール(R3)	100 $\mu$ l
—E1, F1:	陽性コントロール(R4)	100 $\mu$ l
—G1, H1:	サンプル	100 $\mu$ l
- 3) シーリングフィルムで覆い、ヒートブロック (が望ましい) や孵卵器等で **37±2℃** で **75±15分** のインキュベーションを行う。
- 4) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22℃) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800  $\mu$ l のオーバーフロー設定で3回の洗浄サイクルとする。手で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350  $\mu$ l を注入・除去する作業を3~6回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 5) **酵素標識抗体液(R7')** を 100  $\mu$ l ずつ、各ウェルに分注する。
- 6) シーリングフィルムで覆い、2~8℃で60±5分のインキュベーションを行う。
- 7) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22℃) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800  $\mu$ l のオーバーフロー設定で5回の洗浄サイクルとする。手で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350  $\mu$ l を注入・除去する作業を5~10回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 8) 基質発色液 (**R8+R9**) 100  $\mu$ l をウェルに分注し、アルミ箔でプレートを覆う等の処置をし、暗所遮光で **30±5分**、18~22℃でインキュベーションを行う。インキュベーションの際、フィルムは使用してはならない。
- 9) **反応停止液(R10)** 100  $\mu$ l をウェルに分注する。
- 10) 停止液添加後、30分以内にマイクロプレートリーダーで**主波長 450nm、副波長**

<sup>\*1</sup> **620nm** における OD を測定する。測定を行うまでは、常に光を避けるようにすること。

---

\*1 副波長については、600nm~700nm までの範囲においては判定に影響を及ぼさない。

### 3. 判 定

判定は、次のようにカットオフ値を計算し、それを利用する。

$$\text{カットオフ値} = (\text{4つの陰性コントロールの平均吸光度} + \text{定数 } 0.210)$$

OD 値 < カットオフ値の-10% のとき陰性

OD 値  $\geq$  カットオフ値の-10% のとき再検査

上記により再検査となったときは、マイクロプレートの2穴を利用し、1. (2) 4)における保存サンプルを用いて行う（再検査は、別の検査員が行うことが望ましい。）。

また、測定系は、陰性コントロール及び陽性コントロールの吸光度が以下の条件を満たしていることにより確認する。

- ① 陰性コントロールの吸光度が4穴とも全て < 0.150
- ② 陽性コントロールの吸光度が2穴とも全て  $\geq$  1.000

再検査における判定は次のとおりとする。

- (1) 2穴のうち、いずれか一方のOD値がカットオフ値以上、又はカットオフ値の-10%以内のOD値を得たときは、陽性と判定する。
- (2) 2穴ともカットオフ値の-10%未満であったときは、陰性と判定する。

## 「プリオンスクリーン」 操作法

### 1. キットの構成

240 回用、2~8°C 保存

ボトル番号	構成試薬名	英名	略号	内容
1	ホモジナイズ用緩衝液	Homogenization Buffer	HB	・ 100 mL / 1 ボトル (3 倍濃縮液)
2a	コントロール	Control Reagent	CR	・ 6 mL 用 / 1 ボトル ・ 凍結乾燥品
2b	コントロール溶解液	Control Buffer	CB	・ 8 mL / 1 ボトル
2c	コントロール溶液	Control Solution	CS	・ 25 mL / 1 ボトル
3	消化用試薬	Digestion Reagent	DR	・ 10 mL 用 / 1 ボトル
4a	消化停止薬溶解液	Stopping Buffer	StB	・ 40 mL / 1 ボトル
4b	消化停止薬	Stopping Reagent	StR	・ 12 mL 用 / 3 ボトル ・ 凍結乾燥品
5	ビオチン標識抗 PrP 抗体	Anti-PrP-Biotin	aPrPB	・ 1 mL 用 / 1 ボトル ・ 凍結乾燥品
6	ペルオキシダーゼ標識抗 PrP 抗体	Anti-PrP Peroxidase [HRP]	aPrPPOD	・ 1 mL 用 / 1 ボトル ・ 凍結乾燥品
7	インキュベーション用緩衝液	Incubation Buffer	IB	・ 80 mL / 1 ボトル
8	洗浄液	Washing Buffer	WB	・ 100 mL / 2 ボトル (5 倍濃縮液)
9	基質液	TMB Substrate Solution	TMBSuS	・ 80 mL / 1 ボトル
10	基質停止液	TMB Stop Solution	TMBStS	・ 20 mL / 1 ボトル
11	消化用プレート	Digestion Plate	DiP	・ 96 穴プレート × 3
12	検出用プレート	Detection Plate	DeP	・ 8 穴ストリップ × 12

ボトル番号	付属品名	英名	略号	内容
13	密封用フィルム	Sealing Film [SeF]	-	15 枚

## 2. 試薬・試液の調製方法

試薬は室温（22±5℃）に戻してから使用すること。

試薬等の希釈または溶解には精製水を用い、凍結乾燥品を溶解する時にはローラーミキサーを用いること。

名称	調製方法	安定性
調製済みホモジナイズ用緩衝液 (溶液 1)	ボトル1の内容を精製水200 mLで希釈し（22±5℃）、混和する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5℃で12時間</li> <li>● 5±3℃で1週間</li> </ul>
調製済みコントロール (溶液 2a)	コントロール（ボトル2a）にコントロール溶解液（ボトル2b）6 mLを加えて溶解し（22±5℃）、透明になるまでよく混和（少なくとも15分間）する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5℃で12時間</li> <li>● 5±3℃で1週間</li> <li>● 一部を凍結保存する場合、-20±5℃で1ヵ月</li> </ul>
コントロール溶解液 (溶液 2b)	そのまま用いる、使用前に22± 5℃にする。	キットの使用期限と同様
コントロール溶液 (溶液 2c)	そのまま用いる、使用前に22± 5℃にする。	キットの使用期限と同様
調製済み消化用試薬 (溶液 3)	ボトル3の内容を精製水10 mLを加えて溶解し（22±5℃）、透明赤色になるまで少なくとも5分間混和する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5℃で12時間</li> <li>● 5±3℃で1週間</li> <li>● 分割および冷凍する場合 -20±5℃で1ヵ月</li> </ul>
消化停止薬溶解液 (溶液 4a)	22±5℃に置き、少なくとも30分間混和して沈殿物を溶解し、透明無色の溶液にする。	● 22±5℃で1ヵ月
調製済み消化停止薬 (溶液 4b)	ボトル4bの内容を消化停止薬溶解液（溶液4a）12 mLを加えて溶解し（22±5℃）、透明無色になるまでよく混和する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5℃で12時間</li> <li>● 5±3℃で1週間</li> </ul>
調製済みビオチン標識抗PrP抗体 (溶液 5)	ボトル5の内容を精製水1 mLを加えて溶解し（22±5℃）、透明無色になるまでよく混ぜる。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5℃で6時間</li> <li>● 5±3℃で1週間</li> </ul>
調製済みペルオキシダーゼ抗標識抗PrP抗体 (溶液 6)	ボトル6の内容を精製水1 mLを加えて溶解し（22±5℃）、透明無色になるまでよく混和する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5℃で6時間</li> <li>● 5±3℃で1週間</li> </ul>
インキュベーション用緩衝液 (溶液 7)	そのまま用いる、使用前に22±5℃にする。やや乳白色の無色溶液。	キットの使用期限と同様
調製済み洗浄液 (溶液 8)	ボトル8の内容を精製水 400 mLを加えて希釈し（22±5℃）、よく混和する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5℃で12時間</li> <li>● 5±3℃で1週間</li> </ul>
基質液 (溶液 9)	そのまま用いる、使用前に22±5℃にする。	キットの使用期限と同様
基質停止液 (溶液 10)	そのまま用いる、使用前に22±5℃にする。	キットの使用期限と同様
ホモジナイズ用溶液 (溶液 11)	1プレート（96穴）分： 調製済み消化用試薬（溶液 3）3 mLを調製済みホモジナイズ用緩衝液（溶液 1）97 mLに加え、22±5℃で透明なピンク色になるまで均等に混和する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5℃で12時間</li> <li>● 5±3℃で1週間</li> </ul>

検出用溶液 (溶液 12)	1プレート (96穴) 分： 調製済みペルオキシダーゼ標識抗PrP抗体 (溶液 6) 0.3 mLと調製済みビオチン標 識抗PrP抗体 (溶液 5) 0.3 mLを、インキ ュベーション用緩衝液 (溶液 7) 25 mL に加え、やや乳白色の溶液になるまで少な くとも15分間静かに混和する。	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 22±5°Cで2時間</li> <li>● 5±3°Cで24時間</li> </ul>
------------------	--	--

### 3. 操作方法

本キットを使用する場合は、結果の判定のために1プレートあたり8検体以上の測定が必要である。反応温度は、特に定めのない場合には室温 (22±5°C) とする。

- 1) 調製済み ホモジナイズ用溶液 (溶液 11) 0.9 mL を、陰性コントロール用チューブ (8本) 及び検体用チューブにそれぞれ分注する。(ホモジナイズ用プレートを使用する場合には、図1の列2~12のチューブに分注する。)
- 2) コントロール溶液 (溶液 2c) 0.9 mL を、陽性コントロール用チューブ (8本) に分注する。(ホモジナイズ用プレートを使用する場合には、図1の列1のチューブに分注する。)
- 3) 牛延髄の門 (Obex) 部位より 180±60 mg の組織を採取する。別売の採取器具 (組織カッター) を用いると、180±60 mg を定量的に簡便な操作で採取できる。
- 4) 採材した検体は、ピンセットを用いて検体用チューブに入れる。(ホモジナイズ用プレートを使用する場合には、図1の3列目以降のチューブに入れる。)
- 5) 調製済みコントロール (溶液 2a) 100 µL を陰性コントロール及び陽性コントロール用チューブにそれぞれ分注する。(ホモジナイズ用プレートを使用する場合には、図1の列1~2の全てのチューブに分注し、キャップを用いて密閉する。)
- 6) 適当なホモジナイザーを用いて、検体をホモジナイズする。(ホモジナイズ用プレートを使用する場合には、ホモジナイザーのアダプターを用いて固定し、30 Hz で5分間ホモジナイズする。一度アダプターを外してから、ホモジナイズ用プレートを180度回転し、再びホモジナイザーに固定して、30 Hz で5分間ホモジナイズする。)
- 7) 遠心器を用いて、1,000g で2分間遠心する。
- 8) コントロール及びホモジナイズした検体各 150 µL を図1に示した分注ポジションにしたがって消化用プレートへ移す (ホモジナイズ用プレートを使用する場合には、キャップを取り外してから消化用プレートに移す)。なお、消化用プレートへ移した残りの脳乳剤は確認検査のため速やかに凍結保存すること (-20±5°C)。
- 9) 密封用フィルムにて消化用プレートを被い、マイクロプレート用シェーカーにて、14±2分間振とう (600±50 rpm) する。
- 10) 消化用プレートをマイクロプレート用インキュベーター (振とう機能つき) に移し、42±2°C で30±2分間振とう (700±50 rpm) する。

- 11) 密封用フィルムを剥がし、調製済み消化停止用薬（溶液 4b）100  $\mu\text{L}$  を各ウェルに分注し、3 回ずつ上下にピペッティングを行って混和し、密封用フィルムにてウェルを被う。マイクロプレート用シェーカーにて、 $30 \pm 2$  分間振とう（ $400 \pm 50$  rpm）する。
- 12) 密封用フィルムを剥がし、消化用プレートから検出用プレートの同じポジションのウェルへ試料をそれぞれ 40  $\mu\text{L}$  ずつ移す。なお、消化用プレート中の試料は、判定結果が出るまでの間、冷凍にて保存する（ $-20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$  で 1 ヶ月まで保存可能）。
- 13) 検出用プレートの各ウェルに、検出用溶液（溶液 12）200  $\mu\text{L}$  を分注し、少なくとも 1 回ずつ上下にピペッティングを行って混和し、密封用フィルムにてウェルを被います。マイクロプレート用シェーカーにて、 $60 \pm 5$  分間振とう（ $400 \pm 50$  rpm）する。
- 14) マイクロプレート洗浄機にて、検出用プレートの各ウェルより溶液を吸引除去した後、調製済み洗浄液（溶液 8）300  $\mu\text{L}$  を用いて 3 回洗浄を行う。
- 15) 検出用プレートの全てのウェルに基質液（溶液 9）200  $\mu\text{L}$  を分注し、密封用フィルムにてウェルを被います。マイクロプレート用シェーカーにて、 $10 \pm 2$  分間振とう（ $400 \pm 50$  rpm）する。
- 16) 密封用フィルムを剥がし、基質停止液（溶液 10）50  $\mu\text{L}$  を分注する。
- 17) 基質停止液添加後 10 分以内に、マイクロプレートリーダーにて、主波長 450 nm、副波長 620 nm における吸光度を測定する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	C-	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73
B	C+	C-	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74
C	C+	C-	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75
D	C+	C-	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76
E	C+	C-	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77
F	C+	C-	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78
G	C+	C-	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79
H	C+	C-	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80

略語：C+= 陽性コントロール、C-= 陰性コントロール、S1~S80 = 検体1~80

図1 プレートの分注ポジション

#### 4. 判定方法

- 1) 陽性コントロール 8 つの吸光度（OD）の中央値を算出する。（列 1、行 A~H）  
（中央値は 4 番目と 5 番目の平均値をとる。）
- 2) 陰性コントロール 8 つの吸光度（OD）の中央値を算出する。（列 2、行 A~H）  
（中央値は 4 番目と 5 番目の平均値をとる。）
- 3) 全検体の吸光度（OD）の中央値を算出する（最低 8 検体以上）。（列 3~12、行 A~H）  
（偶数検体の場合の中央値は、真中の 2 つの値の平均値をとる。）
- 4) 測定結果有効性の検証  
以下の基準を全て満たした場合、測定結果は有効である。  
(4-a) 陽性コントロールの吸光度（OD）の中央値が 1.2 以上であること。

(4-b) 陽性コントロール 8 つのうち、中央値から 20%以上の偏差となるものが 2 つまでであること。

(4-c) 陰性コントロールの吸光度 (OD) の中央値が 0.2 以下であること。

(4-d) 陰性コントロール 8 つのうち、吸光度 (OD) が 0.2 を超えるものは 2 つまでであること。

上記の条件が満たされない場合は、測定結果は無効となるので再検すること。

5) カットオフ値の計算

カットオフ値は、以下の計算式を利用して算出する。

$$\text{カットオフ値} = 0.5 \times \text{陰性コントロールの中央値} + 0.25$$

6) カットオフ値有効性の検証

(6-a) カットオフ値を全検体の中央値 (上記 3) で算出した数値) で除算する。

(6-b) (6-a)の数値が 1.5~23.0 の範囲であればカットオフの信頼性と測定結果の有効性が確認されたことになる。

上記の基準を満たさない場合は測定無効となるため、再検すること。

7) 結果の判定方法

吸光度	判定
検体の吸光度 < カットオフ値	陰性
検体の吸光度 $\geq$ カットオフ値	陽性

測定結果の判定に際しては、測定者以外の者がデータの検証を行うこと。

8) 再検査について

検体の吸光度がカットオフ値以上であった場合は、以下の手順で再検査を行う。

8-1) 使用サンプルについて

消化用プレートに残っている消化済み試料を用いる。この試料は、PK添加後、さらにPK反応を停止させたものである。

注：本キットで作成されたホモジネート（脳乳剤）は使用しないこと。このホモジネートには、PKは添加されているが消化反応が停止していないことなどにより保存温度による影響を受けやすいため。

また、脳幹延髄組織からの再採材については、門部位よりやや離れたところからの採材になるためプリオン蛋白の濃度が低い可能性もあり、これにより偽陰性をまねくおそれがある。よって、延髄組織からの再採材は、操作の失敗等不測の事態によって測定結果が得られなかった場合にのみ実施すること。

8-2) 再検査の手順について

消化用プレートから、陰性コントロール及び陽性コントロールは各ウェルから 1 つずつ (8 重測定)、陽性反応が出た検体は 2 重測定のため 2 つをそれぞれ 40  $\mu$ L ずつ検出用プレートに移し、3. 操作方法、手順 13) 以降の操作を行う。

注：再検査の場合は、結果解析のため陽性検体を含め最低 8 つの試料を測定する。またカットオフ値の有効性を検証するために“陰性結果の数>陽性結果の数”の条件を満たすこと。

#### 例 1：陽性 1 検体の場合

陽性検体の消化済み試料 2 つと、陰性が確認されている 6 検体の消化済み試料各 1 つ（シングル測定）をダミーとして測定する。

#### 例 2：陽性 2 検体の場合

陽性検体の消化済み試料をそれぞれ 2 つ（計 4 つ）と、陰性が確認されている 5 検体の消化済み試料各 1 つ（シングル測定）をダミーとして測定する。

#### 8-3) 再検査の結果の判定

再検査の結果、2 重測定の最低一つが陽性となった場合は陽性と判定する。

### 5. データ解析ソフトウェアについて

プリオンスクリーン専用ソフトウェア（キットとは別にメーカーより提供）を使用する場合は、以下の手順に沿って操作を行う（詳細は操作マニュアル参照）。

- 1) プリオンスクリーンソフトウェアを起動する。
- 2) 必要に応じ検体情報の登録を行う。
- 3) 最終反応を終えた検出用プレートをマイクロプレートリーダーにセットする。
- 4) ユーザー名とパスワードを入力する。
- 5) キットの Lot No., プレート No., 及びサンプル No. など必要項目を入力する。
- 6) 測定を開始する。
- 7) 測定終了後、測定値の信頼性の検証が自動計算により行われる。
- 8) 検査結果が判定が自動計算により行われる。
- 9) 測定結果を保存する。
- 10) 検査結果のレポートを作成し印刷する。

### 6. 確認検査のための送付サンプルについて

確認検査のためには、本キットで作成された 16.7%ホモジネート（脳乳剤）を凍結（ $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ）状態で送付する。

備考：

このホモジネート（脳乳剤）には既に PK が添加されているが消化反応は停止されていない。よって反応の過度の進行を抑え、この状態でのサンプルの安定性を保持するために必ず凍結保存すること。なお、凍結条件下では 1 ヶ月間の安定性が保たれる。



## 「ニッピブル®BSE」操作方法

## 1. キットの構成

## [構成]

## 1) ニッピブル®BSE 検査キット前処理用

## 1-1) 前処理用試薬セット (2箱)

No. 名称	容量 (1箱)
① 試薬 A 破砕用緩衝液	60mL×1本
② 試薬 B プロテイナーゼ K	0.6mL×1本
③ 試薬 C マイクロバイアルセリンプロテイナーゼ	0.6mL×1本

## 1-2) 前処理用器材セット (2箱)

No. 名称	容量 (1箱)
④ 採材用トレイ	50個
⑤ 採材用メス	50個
⑥ 採材用フォーク	50個
⑦ バイオマッシャー® (図1) I 破砕棒	50個
II フィルターチューブ	50個
⑧ 回収用チューブ (ジルコニアビーズ入り)	50個

## 2) ニッピブル®BSE 検査キット検出用 (96検体)

## 検出用試薬セット (1箱)

No. 名称	容量 (1箱)
⑨ 抗体プレート 抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体	96 ウェル×1枚
⑩ 標識抗体溶液 HRP 標識抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体	0.4mL×1本
⑪ 標識抗体用希釈液 トリス緩衝液	12mL×1本
⑫ 陽性コントロール リコンビナント牛プリオン蛋白質	凍結乾燥品×1本
⑬ 陰性コントロール トリス緩衝液	3mL×1本
⑭ 基質液 TMB 発色基質液	15mL×1本
⑮ 停止液 0.5mol/L 硫酸	12mL×1本
⑯ 濃縮洗浄液 リン酸緩衝液	50mL×1本

付属品 プレートカバーシール 4枚

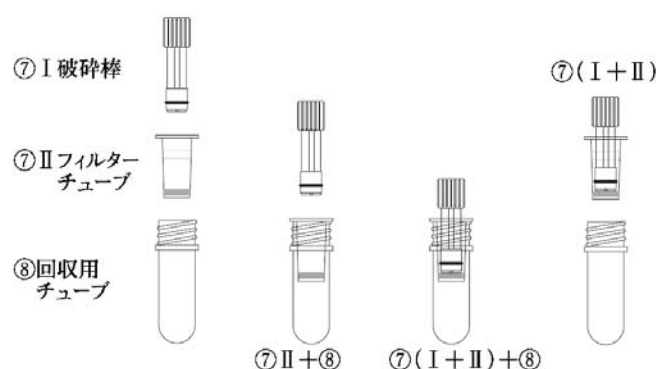


図1. バイオマッシャー®

### [貯法]

前処理用器材セット	: 室温
前処理用試薬セット	: 2~8℃
検出用試薬セット	: 2~8℃

### [キットには含まれない器具および器材]

- 消毒液 (2%次亜塩素酸ナトリウム又は 1mol/L 水酸化ナトリウム液)
- 吸湿性用紙又はペーパータオル
- バイザー付き保護眼鏡およびマスク
- 使い捨て手袋
- 冷蔵庫 (4~8℃)
- 恒温器 (37℃、96 ウェルプレートを保温できるもの)
- 恒温器 (56℃、2mL チューブを保温できるもの)
- 恒温器 (100℃、2mL チューブを保温できるもの) または煮沸器
- 遠心分離機 (2mL チューブが使用可能であり 15,000×g の回転が可能なもの)
- 細胞破碎装置
- プレートリーダー (測定波長: 450nm および 580~650nm の任意の波長)
- プレートウォッシャー
- マイクロピペット (20μL~1000μL 可変対応) およびチップ
- 標識抗体液調製用試験管 (5mL 又は 10mL 又は 20mL)
- 洗浄液作製用メスシリンダー (100mL) およびビーカー (2L)
- 基質液 (TMB 溶液) 採取用試験管 (5mL~15mL)
- 精製水

## 2. 前処理操作のための準備

### 1) 恒温器の設定

前処理の作業を開始する前に2台の恒温器の電源を入れ、温度をそれぞれ 56℃と 100℃に設定する。

### 2) 酵素混合液の調製

①試薬 A、②試薬 B および③試薬 C を静かに転倒混和し、変化のないことを確認する。

試薬 A の量は (検体数+1) mL とする。試薬 A、試薬 B および試薬 C を表に従い 100:1:1 の比率で混合し、酵素混合液を調製する。酵素混合液は緑色を呈する。酵素混合液は用時調製し、使用まで氷上、あるいは冷蔵庫内で静置する。

表. ①試薬 A、②試薬 B および③試薬 C の混合例

検体数	①試薬 A (mL)	②試薬 B (μL)	③試薬 C (μL)
2	3 mL	30 μL	30 μL
10	11 mL	110 μL	110 μL
15	16 mL	160 μL	160 μL
20	21 mL	210 μL	210 μL
25	26 mL	260 μL	260 μL
30	31 mL	310 μL	310 μL
35	36 mL	360 μL	360 μL
40	41 mL	410 μL	410 μL
45	46 mL	460 μL	460 μL
50	51 mL	510 μL	510 μL

### 3. 前処理操作方法

- ④採材用トレイ、⑤採材用メス、および⑥採材用フォークを用いて、門部を含む延髄 110±20mg を採取する。
- バイオマッシャー®の⑦Ⅱフィルターチューブを⑧回収用チューブ内にセットし、採取した組織を入れ、試料がフィルター面に接するまで⑦Ⅰ破碎棒を確実に押し込む。
- 15,000×g, 30 秒間の遠心分離操作を行う。
- フィルターチューブと破碎棒(⑦Ⅰ + ⑦Ⅱ)を取り外し破棄する。⑧回収用チューブに酵素混合液 1mL を加える。
- 蓋を閉め、細胞破碎装置\*により全体が均一になるまで攪拌する。  
\*FastPrep (Qbiogene) を使用する場合は、強度 4 で 30 秒間攪拌する。  
マルチビーズショッカー (安井器械) を使用する場合は、2,000rpm で 30 秒間攪拌する。
- 恒温器 (56°C) で 10 分間反応させる。
- 数回転倒混和し、すぐに 100°C で 10 分間反応させる。
- 室温まで冷却する。
- 冷却後、転倒混和し (ボルテックスでも可) 検出用試薬セットにより異常プリオン蛋白質の検出を行う。

### 4. 検出操作のための準備

- 洗浄液の調製  
⑯濃縮洗浄液は、40 倍の濃度である。使用前に常温に戻し十分に転倒混和する。濃縮洗浄液 25 mL に対して精製水を 975mL 加え混和する。これを洗浄液とする。冷蔵保存し 2 週間以内に使用する。
- 希釈標識抗体液の調製  
希釈標識抗体液は、1 検体当たり 100 μL 必要である。  
使用前に、別に用意した標識抗体液調製用試験管を用いて、⑰標識抗体用希釈液で⑱標識抗体溶液を 30 倍希釈し、希釈標識抗体液とする。この操作は、希釈標識抗体液添加の直前の洗浄前に行う。  
⑱標識抗体溶液の残りは、強く蓋を閉め冷蔵で保存する。有効期限内に再度使用できる。  
\*例：1 ストリップ (8 ウェル) の場合  
標識抗体溶液 30 μL を取り、標識抗体用希釈液を 870 μL 加えよく混和後 100 μL ずつ使用する。
- 基質液  
⑲基質液は、1 検体当たり 100 μL 必要である。  
測定検体数分に余剰分を加味した分量を、別に用意した基質液採取用試験管に直接移し、そこから正確に 100 μL ずつ使用する。一度試験管に移した基質液は元に戻さないこと。パツ

クグラウンドの上昇の原因となる。

⑭基質液の残りは、強く蓋を閉め冷蔵で保存する。有効期限内に再度使用できる。

#### 4) 陽性コントロールの調製

⑫陽性コントロールのバイアル瓶に精製水を 2mL 加えて完全に溶解し、そのまま使用する。調製後の陽性コントロールを長期間測定に供しない場合は小分け分注して凍結保存する。凍結後 12 ヶ月の保存が可能である。凍結融解の繰り返しは行わないこと。

#### 5. 検出操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事確かめること。検体の測定と同時に陽性コントロールと陰性コントロールを測定する。

- 1) ⑨抗体プレートの 2 ウェルに⑬陰性コントロールを 100  $\mu$ L ずつ分注する。
- 2) 調製済み検体と⑫陽性コントロールを抗体プレートにそれぞれ 100  $\mu$ L ずつ分注する。
- 3) 抗体プレートにシールをして 37°C の恒温器中で 1 時間反応させる。
- 4) 300  $\mu$ L 以上の洗浄液で洗浄操作を 4 回行う。4 回の洗浄後、残液を完全に取り除く。次の操作までに 5 分以上の間隔をあけない。
- 5) 希釈標識抗体液を各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ分注する。
- 6) 抗体プレートにシールをして 4~8°C で 30 分間反応させる。
- 7) 300  $\mu$ L 以上の洗浄液で洗浄操作を 6 回行う。6 回の洗浄後、残液を完全に取り除く。次の操作までに 5 分以上の間隔をあけない。
- 8) すべてのウェルに⑭基質液を 100  $\mu$ L ずつ分注し、遮光下、常温で 30 分間反応させる。陽性コントロールのウェルは徐々に青色に変化する。
- 9) すべてのウェルに⑮停止液を 100  $\mu$ L ずつ分注する。陽性コントロールのウェルは青色から黄色に変化する。
- 10) プレート底面のよごれや水滴を拭き取り、液面に気泡がないことを確認した後、30 分以内に検体・陽性コントロール・陰性コントロールのそれぞれについて、主波長 450nm および副波長 580~650nm の吸光度を測定する。

ニッピブル®BSE検査キット 操作方法

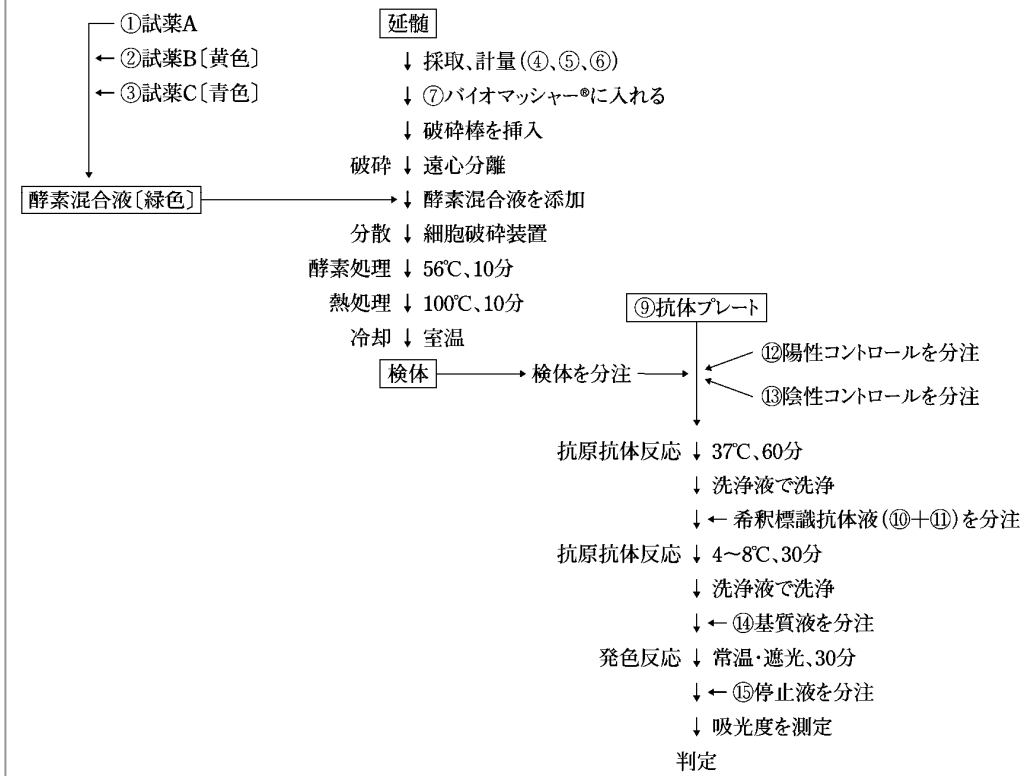


図2. ニッピブル®BSE 検査キット操作方法

## 6. 判定方法

### 1) 測定系の確認

陰性コントロールの平均吸光度および陽性コントロールの吸光度が以下の条件を満たしていることを確認する。以下の条件を満たしていない場合は操作方法に問題がある可能性があるため、再度試験を実施する。この場合の再検査には前処理を終了した検体を用い、5. 検出操作方法から行う。

$$[\text{陰性コントロールの平均吸光度}] \leq 0.20$$

$$[\text{陽性コントロールの吸光度}] - [\text{陰性コントロールの平均吸光度}] \geq 1.20$$

### 2) カットオフ値の算出

陰性コントロールの平均吸光度に 0.30 を足した数値をカットオフ値とする。

$$[\text{カットオフ値}] = [\text{陰性コントロールの平均吸光度}] + 0.30$$

### 3) 結果の判定方法

試験した検体の吸光度がカットオフ値以上の場合を陽性、カットオフ値未満の場合を陰性と判定する。

$$\text{陽性} : [\text{検体の吸光度}] \geq [\text{カットオフ値}]$$

$$\text{陰性} : [\text{検体の吸光度}] < [\text{カットオフ値}]$$

### 4) 判定上の注意

4-1) カットオフ値よりわずかに低い吸光度 (-10%以内) を示した検体および陽性と判定された検体は再検査を実施する。

4-2) 再検査は、2.2) と 3.1) の前処理操作に従い、門部位が含まれる先に採取した部位の近傍から検体 110±20mg を採取するところから行う。

4-3) 再検査は 1 検体につき 2 ウェルを使用して試験する。

4-4) 再検査において少なくとも 1 つのウェルがカットオフ値以上の値を示した場合は陽性と判定する。

4-5) 本製剤で陽性と判定された検体は、他の免疫学的検査、病理組織学的検査および免疫組織化学的検査等を用いて確認を行い、最終判定とする。

4-6) 確認検査のためのサンプル送付に際しては、前処理操作を終了した検体（冷凍状態）も同封する。