

## 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

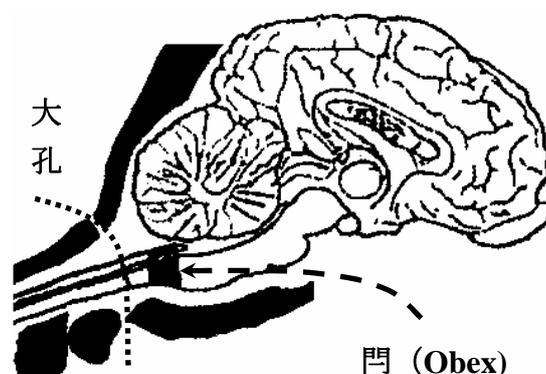
- 作業は**区画された専用の実験室内**において、原則として**安全キャビネット内**で行う。
- 作業者は傷口からの感染、飛沫による目及び口からの汚染を防ぐために、ラテックス又はビニール製手袋、マスク、予防衣及び帽子を着用し、必要に応じ防護眼鏡等も使用する。
- 作業をはじめ各種器具器材は可能なかぎり**ディスポーザブル**の製品を使用する。
- 検査材料の取扱いは**ベンチシート**上で行い、飛沫、エアロゾルを発生させないように気をつける。
- 検査材料をこぼした時及び業務終了時には、作業場所の表面を**次亜塩素酸ナトリウム溶液**で清拭する。
- 使用済みベンチシート、ディスポーザブル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」又は「テセー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又は別添1-4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。

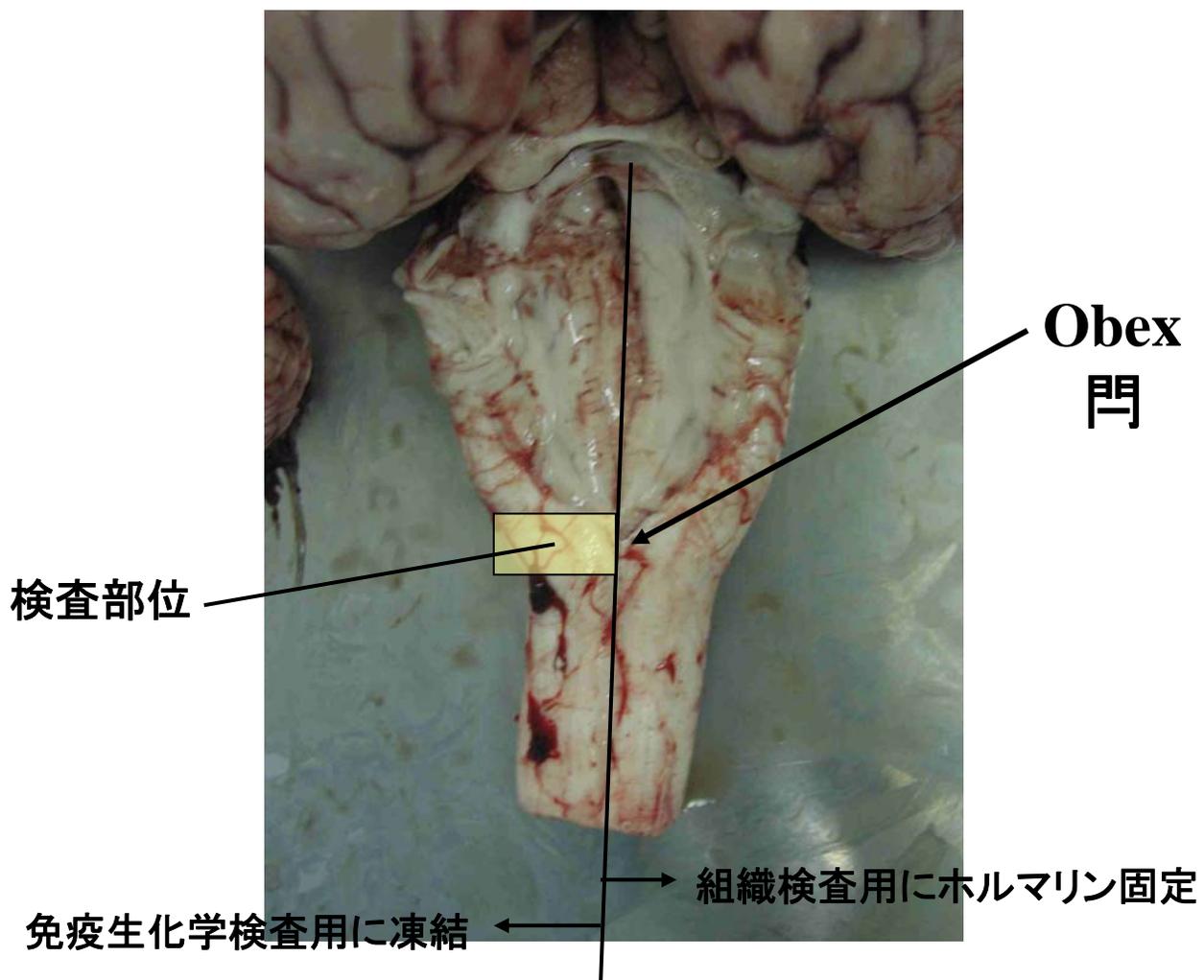
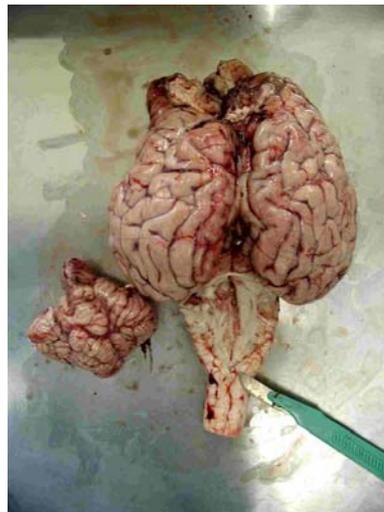
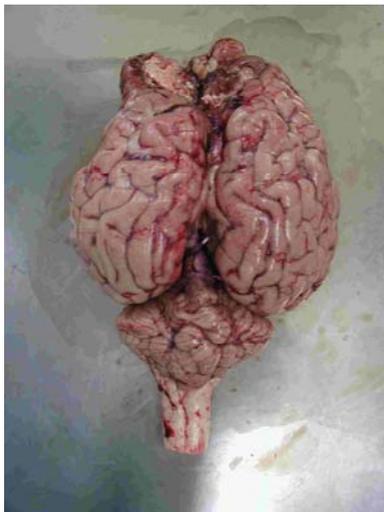
- 3) 1 容器当たりの内容量は、液体の場合は 1,000ml 未満、個体の場合は 50 g を限度とすること。
- 4) 郵便物の表面の見やすいところに輸送許容物件表示ラベル（分類番号：6.2）を貼付すること。（注 4）
- 5) 国連規格容器の外側にドライアイスを入れダンボール等で包んだ場合は、郵便物の表面の見やすいところに輸送許容物件表示ラベル（分類番号：9）を貼付すること。（注 4）
- 6) 上記 5) の場合は、郵便物の引受時に、検体が国連規格容器に格納されているかどうかを確認するため、郵便局職員が外側のダンボール等の開示を求める場合があるので、これに応じること。
- 7) 危険物申告書を 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



(参考資料)

## 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>1</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>2</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<br>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>1</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>2</sup> 同上

(別紙様式 1 - 1)

( 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)

|   | 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。

(別紙様式 1 - 1) (記入例)

( 試 験 ) ・ ( 再 試 験 )

検 査 日 平成 1 3 年 1 0 月 1 8 日

所属自治体名 〇 〇 市

所属検査所名 △ △ 食肉衛生検査所

検査員名 (署名) 厚生 太郎

カットオフ値 0.251

カットオフ値の-10% 0.2259

検 体 数 18

(陰性検体数、陽性検体数) (18 , 0)

|   | 1                      | 2                      | 3                      | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 陰性コントロール<br>3<br>0.041 | bovine-<br>3<br>0.172  | bovine-<br>11<br>0.104 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B | 陰性コントロール<br>4<br>0.040 | bovine-<br>4<br>0.132  | bovine-<br>12<br>0.082 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C | 陰性コントロール<br>5<br>0.042 | bovine-<br>5<br>0.156  | bovine-<br>13<br>0.101 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D | 陰性コントロール<br>6<br>0.041 | bovine-<br>6<br>0.122  | bovine-<br>14<br>0.166 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E | 陽性コントロール<br>7<br>2.53  | bovine-<br>7<br>0.098  | bovine-<br>15<br>0.145 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F | 陽性コントロール<br>8<br>2.45  | bovine-<br>8<br>0.087  | bovine-<br>16<br>0.191 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G | bovine-<br>1<br>0.083  | bovine-<br>9<br>0.115  | bovine-<br>17<br>0.072 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H | bovine-<br>2<br>0.106  | bovine-<br>10<br>0.095 | bovine-<br>18<br>0.126 |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

|  |
|--|
|  |
|  |

← 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<br>(検査所名) | 検体番号 | 検体重量<br>(g) | 検体採取<br>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<br>氏名   |             |            |    |    |      |        |    |
| 2     |                 |      | ELISA用乳剤    |             |            |    |    |      |        |    |
|       |                 |      | WB用         |             |            |    |    |      |        |    |
|       |                 |      | 病理用         |             |            |    |    |      |        |    |
|       |                 |      | 出荷者<br>氏名   |             |            |    |    |      |        |    |

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<br>UN2900 | 人体及び動物に対し伝染性がある病<br>毒を移しやすい物質 (液体) | (注1)<br><br>ml |
|                                | UN2814<br>UN2900 | 人体及び動物に対し伝染性がある病<br>毒を移しやすい物質 (固体) | (注2)<br><br>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<br>自治体名：<br>検査所名：<br>住所：<br>電話番号：<br>氏名：と畜検査員 (獣医師) |
| 受取人<br>機関名：<br>住所：<br>電話：<br>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<br>UN 2900             | 人体及び動物に対し伝染性がある病<br>毒を移しやすい物質 (液体) | (注 1)<br><br>ml   |
| ✓        | UN 2814<br>UN 2900             | 人体及び動物に対し伝染性がある病<br>毒を移しやすい物質 (固体) | (注 2)<br><br>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<br>自治体名：〇〇県<br>検査所名：〇〇食肉衛生検査所<br>住 所：〇〇市〇〇 1 - 2 - 3<br>電話番号：〇〇〇〇 - 〇〇〇 - 〇〇〇〇<br>氏 名：と畜検査員 (獣医師)<br>〇〇 〇〇 |
| 受取人<br>機 関 名：〇〇検査センター<br>住 所：〒000-000 〇〇県〇〇市 3 - 2 - 1<br>電 話：〇〇〇〇 - 〇〇〇 - 〇〇〇〇<br>氏 名：〇〇 〇〇                   |

|         |
|---------|
| 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

- 1) ウシの胃 (Obex) 部位を  $350 \pm 40$  mg を量り取る。
- 2) 量り取った検体をグライディングチューブに入れる。
- 3) 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、 $-20^{\circ}\text{C}$ 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。）
- 4) 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  $500 \mu\text{l}$  量り取り、 $2\text{ ml}$  マイクロチューブ等に移す。（この時点でサンプルは、 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で8時間、 $-20^{\circ}\text{C}$ で数週間保存可能である。）
- 5) 上記1. (1) で希釈したプロテイナーゼ K溶液を  $500 \mu\text{l}$  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。
- 6) 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、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $10 \pm 1$  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: | 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 $\pm$ 1℃で75 $\pm$ 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 $\pm$ 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・<br>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<br>×1ボトル          | 2~30°C | 精製水 1L あたり 50g の<br>洗浄剤 1 を添加し、溶<br>解する。             | 2~8°Cで6ヶ月          |
| ヤギ血清        | 150μL×1本                  | 2~8°C  | 抗プリオン抗体の項<br>参照                                      | 該当なし               |
| コンジュゲート     | 濃縮コンジュ<br>ゲート<br>100μL×1本 | 2~8°C  | 洗浄剤 2 溶液を用いて<br>コンジュゲートをロット<br>毎に指定された希釈<br>倍率で希釈する。 | 調製から2時間<br>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<br>を混合する。                              | 暗所で保管し、<br>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・<br>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<br>(ウサギ血清) | 濃縮抗体<br>50μL×1ボトル | -25~-15°C | 洗浄剤 2 溶液を用いて<br>抗プリオン抗体を 500<br>倍希釈、ヤギ血清をロ<br>ット毎に指定された希<br>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・<br>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<br>500mL×1ボト<br>ル | 10~30°C | 精製水 900mL あたり、<br>洗浄剤 2 を 100mL 添<br>加し、混合する。 | 10~30°Cで2週間<br>2~8°Cで1ヶ月 |

(2) 成分及び分量

| 構成試薬        | 成分                                  | 含有量<br>(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<br>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こと。

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・<br>秤量     | 検体秤量:<br>500±40mg                      |                            | 天秤                            |  |  |
| ホモジナイズ          | 組織 500±40mg<br>に対して試薬 1<br>を 7.5 mL 添加 | 2 min<br>(Speed<br>"High") | Stomacher 80<br>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<br><br>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<br>を移す   | ホモジネートを<br>遠心用プレート<br>に移す:<br>180 μL   |                            | ピペット                          | ブランクコントロールも同様に 180 μL<br>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<br>室温                | 遠心器                           | インキュベーターの<br>温度が 34°C になって<br>いることを確認して<br>おく。   | 遠心前にバランスをとる<br><br>2~8°C での遠心は厳禁                   |
| 試薬 2 (PK)<br>添加 | アッセイプレートに添加:<br>20 μL                  |                            | (8 連)ピペット                     |  | ウエルの底の角に添加すること<br>(最後に目視で試薬 2 の添加確認)               |
| プレートへの<br>検体分注  | 遠心後の上清を<br>プレートへ添加:<br>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<br>at 34°C          | LabSystem<br>iEMS<br>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                 |                            | Skanswasher 300<br>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<br>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<br>at 34°C          | LabSystem<br>iEMS<br>インキュベーター | 第 1 抗体溶液の調製<br>(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)<br>コンジュゲート (第 2 抗体) 溶液の調製<br>(コンジュゲートを調製済み洗浄剤 2 で希釈する)<br>又、基質溶液の調製を行う |  |

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



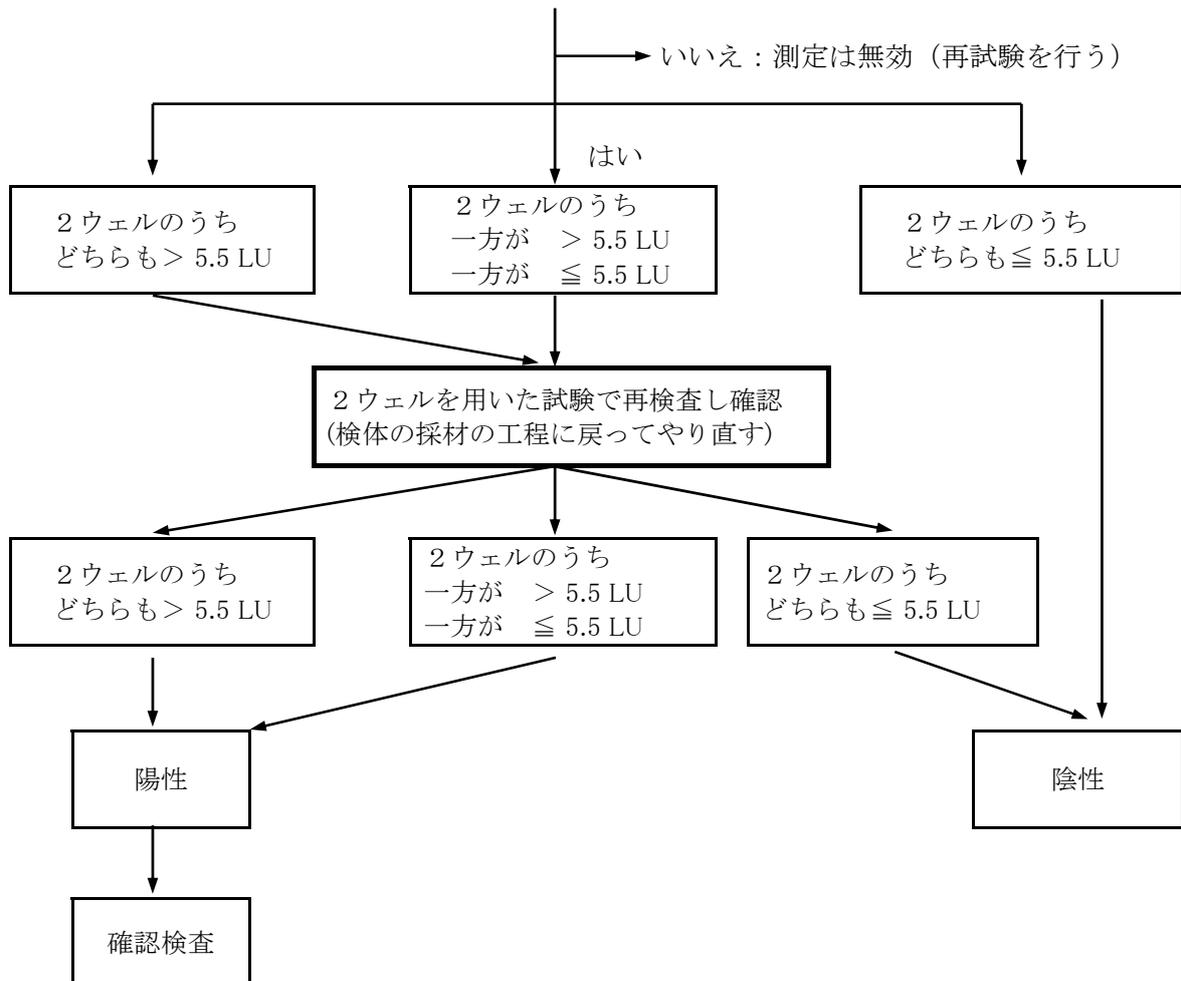
### ブランクコントロール

- ・ 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。

(別添1-3)

## 「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。

|                              | No. | 構成試薬       | 剤型  | 容量    | 本数 |
|------------------------------|-----|------------|-----|-------|----|
| 【抽出用試薬Aセット】<br>(-30~-10°C保存) | 1   | DNase I 溶液 | 凍結  | 0.3mL | 1  |
|                              | 2   | コラゲナーゼ溶液   | 凍結  | 1.8mL | 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  |
| 【抽出用試薬Bセット】<br>(2~10°C保存)    | 5   | ホモジネート液    | 液状  | 45mL  | 2  |
|                              | 6   | 界面活性剤液     | 液状  | 35mL  | 1  |
|                              | 7   | 濃縮液        | 液状  | 12mL  | 1  |
|                              | 8   | 可溶化液       | 液状  | 7mL   | 1  |
|                              | 9   | 検体希釈液      | 液状  | 25mL  | 1  |
| 【検出用試薬セット】<br>(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  | 0.6mL | 1  |
|                              | 12  | 標識抗体希釈液    | 液状  | 6mL   | 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  | 12mL  | 1  |
|                              | 16  | 洗浄液        | 液状  | 50mL  | 2  |
|                              | 17  | 反応停止液      | 液状  | 12mL  | 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、調製試薬1、2及び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  | 界面活性剤液に対し126倍希釈し用いる(調製試薬1) |
| 2   | コラゲナーゼ溶液   | 凍結  | 界面活性剤液に対し21倍希釈し用いる(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6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。                   |

調製試薬 1：界面活性剤液に対しDNase I 溶液を 126 倍に、コラゲナーゼ溶液を 21 倍に希釈し、調製試薬 1 を製する。測定検体数ごとの目安として下表を添付する。

| 検体数 | DNaseI溶液<br>( $\mu$ L) | コラゲナーゼ溶液<br>( $\mu$ L) | 界面活性剤液<br>(mL) |
|-----|------------------------|------------------------|----------------|
| 5   | 12                     | 75                     | 1.5            |
| 10  | 24                     | 150                    | 3.0            |
| 20  | 48                     | 300                    | 6.0            |
| 40  | 84                     | 525                    | 10.5           |
| 60  | 108                    | 675                    | 13.5           |
| 80  | 144                    | 900                    | 18.0           |
| 100 | 180                    | 1.125                  | 22.5           |

調製試薬 2：プロティナーゼK溶液を界面活性剤液で 6 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<br>( $\mu$ L) | 界面活性剤液<br>(mL) |
|-----|--------------------------|----------------|
| 5   | 200                      | 1.0            |
| 10  | 300                      | 1.5            |
| 20  | 500                      | 2.5            |
| 40  | 900                      | 4.5            |
| 60  | 1200                     | 6.0            |
| 80  | 1600                     | 8.0            |
| 100 | 2000                     | 10.0           |

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。測定検体数毎の目安として下表を添付する。

| 検体数 | PK反応停止液<br>( $\mu$ L) | 濃縮液<br>(mL) |
|-----|-----------------------|-------------|
| 5   | 40                    | 1.2         |
| 10  | 60                    | 1.8         |
| 20  | 100                   | 3.0         |
| 40  | 170                   | 5.1         |
| 60  | 250                   | 7.5         |
| 80  | 320                   | 9.6         |
| 100 | 400                   | 12.0        |

## 2. 必要な器具及び試薬類

### 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：0.1 mg, 最大値 10 g 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ョッカー（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℃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合せ）

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\_富士レビオ社製）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（アシスト社製）\*  
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（アシスト社製）

マイクロピペット用チップ：各種

\* ; 凍結保存チューブ 2mL 用（アシスト社製）に YTZ ボール（ニッカトー社製）を 0.5 g 分注したものを富士レビオ社から「ホモジネートチューブ FR」（仮称）として販売予定

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。

|   |                     |                 |
|---|---------------------|-----------------|
| SELECT:RUN の画面で、IN と OUT を同時に押す。          |                     |                 |
| ↓   |                     |                 |
| PRG:ADD                                   |                     | YES             |
| ↓   |                     |                 |
| ADD:KIT                                   |                     | YES             |
| ↓   |                     |                 |
| NAME: 適当な名前を付ける。                          |                     |                 |
| ↓   |                     |                 |
| MAIN PARAMETERS および METHOD1を参照して入力してください。 |                     |                 |
| ↓   |                     |                 |
| END OF KIT:NO                             |                     | YES             |
| ↓   |                     |                 |
| MET.INTER:0MN 0S                          |                     |                 |
| ↓   |                     |                 |
| METHOD2を参照して入力してください。                     |                     |                 |
| ↓   |                     |                 |
| END OF KIT:YES                            |                     | YES             |
| ↓   |                     |                 |
| Nr OF KITS: 1                             |                     | YES             |
| 終了  |                     |                 |
| METHOD 1                                  | METHOD 2            | MAIN PARAMETERS |
| MODE: STRIP                               | MODE: STRIP         | PLATE: Flat 01  |
| CROSW ASP.:NO                             | CROSW ASP.:NO       | MANIFOLD: 8     |
| ASP.TIME:0.1S                             | ASP.TIME:0.1S       | STRIP:-         |
| VOLUME: 800ul                             | VOLUME: 800ul       | Nr OF KITS: 1   |
| OVERFLOW: 2.5mm                           | OVERFLOW: 2.5mm     |                 |
| LIQUID: WASH R1(W1)                       | LIQUID: WASH R1(W1) |                 |
| FLOW: 0                                   | FLOW: 0             |                 |
| Nr OF CYCLES: 1                           | BOT.ASP.NUMBER: 1   |                 |
| SOAKING: 0.0S                             | Nr OF CYCLES: 4     |                 |
| MET.INTER: 0MN 0S                         | SOAKING: 0.0S       |                 |

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 乳剤の調整

破砕担体は使用者の状況に合わせ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 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液を 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液を添加する）。

①-2 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。

①-3 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処理条件

【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

①-4 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調製試薬 1 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 1 を 200  $\mu$ L 加え攪拌し、37 $^{\circ}$ C で 30 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 2 を作製する。

②-4 上記反応終了後、直ちに調製試薬 2 を 100  $\mu$ L 加え攪拌し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートする。

②-5 インキュベートの間に調製試薬 3 を作製する。

②-6 上記反応終了後、調製試薬 3 を 100  $\mu$ L 加え、攪拌する。

②-7 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。

②-8 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殿が流れ落ちないように注意する。）。

②-9 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）。

②-10 加熱処理終了後、十分に攪拌し、懸濁する。

②-11 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を標識抗体希釈液を用い 11 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 500 mL(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 陽性の取扱い

初回の試験で陽性と判定された検体及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               |   |                                | 採材具                                   |             | 検体採取⇒秤量までは安全キャビネット内で作業を行う                     |
| 秤量                 | 200±20mg  |                                | 天びん                                   |             |   |
| ホモジナイズ             |   | スピード:6.5<br>時間:45秒             | ホモジネート<br>チューブFR                      | 調製試薬1作<br>製 | セラミックビーズ/ファスト<br>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:250<br>μL  |                                | マイクロピペット                              |             | サンプリング⇒希釈ま<br>では安全キャビネット内<br>で作業を行う           |
| 酵素処理-1             | 調製試薬1添<br>加:200 μL  | 37°C,30分                       | 連続分注器/ウ<br>オーターバス/ド<br>ライブロックヒー<br>ター | 調製試薬2作<br>製 |   |
| 酵素処理-2             | 調製試薬2添<br>加:100 μL  | 37°C,30分                       | 連続分注器/ウ<br>オーターバス/ド<br>ライブロックヒー<br>ター | 調製試薬3作<br>製 |   |
| 濃縮                 | 調製試薬3添<br>加:100 μL/遠<br>心分離                                 | 15000G,10<br>min.(25-<br>30°C) | 連続分注器/<br>高速遠心機                       |             | 廃液は一つにまとめ滅<br>菌処理してから廃棄す<br>る                 |
| 可溶化                | 可溶化液添<br>加:50 μL  | 100°C,5min.                    | 連続分注器/ウ<br>オーターバス/ド<br>ライブロックヒー<br>ター |             |   |
| 希釈                 | 検体希釈液添<br>加:100 μL  |                                |                                       |             |   |
| <b>検出(ELISA)操作</b> |   |                                |                                       |             |   |
| 標識抗体調製             | 酵素標識抗体<br>の希釈:x11   |                                |                                       |             |   |
| 洗浄液調製              | 洗浄液希釈:<br>x20   |                                |                                       |             |   |
| 1次反応               | サンプル:100 μL<br>NC:100 μLx2<br>PC:100 μL<br>+<br>標識抗体液:50 μL | 37°C,1時間                       | マイクロピペット<br>/連続分注器/<br>インキュベー<br>ター   |             | 標識抗体を分注する際<br>に飛沫が近隣のウェル<br>に飛ばないように気をつ<br>ける |
| 洗浄                 | 0.8mL x 5回  |                                | プレート洗浄<br>機                           |             | 廃液は滅菌処理してか<br>ら廃棄する                           |
| 酵素反応               | 基質液添加:<br>100 μL  | 室温,30分                         | 連続分注器/イ<br>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<br>加:100 μL  |                                | 連続分注器                                 |             | 測定前に気泡を除去す<br>る                               |
| 吸光度測定              |   |                                | プレートリー<br>ダー                          |             | 使用後のプレートは感<br>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（ウエスタンプロット法）、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) DNase I 溶液，コラゲナーゼ溶液及びプロテイナーゼK溶液より調製された調製試薬は4時間以内に使用すること。
- 5) 異なったロット番号の試薬を混ぜて使用しないこと。
- 6) 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。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。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 抗体結合プレート洗浄後は速やかに基質を分注すること。
- 10) 基質を分注した後は、遮光して反応を行うこと。
- 11) 反応停止液分注後は 10 分以内に吸光度測定を行うこと。
- 12) 洗浄液は 4℃保存により結晶が析出する場合があるので、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。

- 13) 濃縮液は危険物である 2-ブタノールから成っているので、火のそばでの使用は避けること

#### 【取扱い上の注意】

- 1) 試験は清潔な環境で行うこと。試薬を再利用する場合には、細菌等の混入を避けるように十分注意すること
- 2) 使用期限の切れたキットは使用しないこと。
- 3) 外観又は内容に異常を認めたものは使用しないこと。
- 4) 抽出用試薬Aセットは 12 回以上凍結融解しないこと。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 検査材料をこぼした場合は次亜塩素酸溶液（有効濃度 2%）で拭き取り、その溶液に 120 分以上浸漬すること。
- 8) 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、廃棄してください。
  - ・オートクレーブ滅菌（134~138℃、3 気圧、20 分以上）
  - ・3%SDS 溶液に 100℃・5 分以上浸漬、
  - ・3%SDS 溶液に浸漬し、オートクレーブ（120℃、10 分以上）
  - ・次亜塩素酸溶液（有効濃度 2%）に 120 分以上浸漬
  - ・1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液に 60 分以上浸漬

#### 【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±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。