

(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 μ 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 μ 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 μ 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^R 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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	

洗淨 2	洗淨剤 2 を用い プロトコール 2 で洗淨		Skanswasher 300 洗淨器	洗淨後 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	洗淨後、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 μ 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		
洗淨 3	洗淨剤 2 を用 い、プロトコ ール 2 で洗淨		Skanswasher 300 洗淨器		洗淨後、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 μ 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		
洗淨 4	洗淨剤 2 を用 い、プロトコ ール 2 で洗淨		Skanswasher 300 洗淨器		洗淨後、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 μ 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)



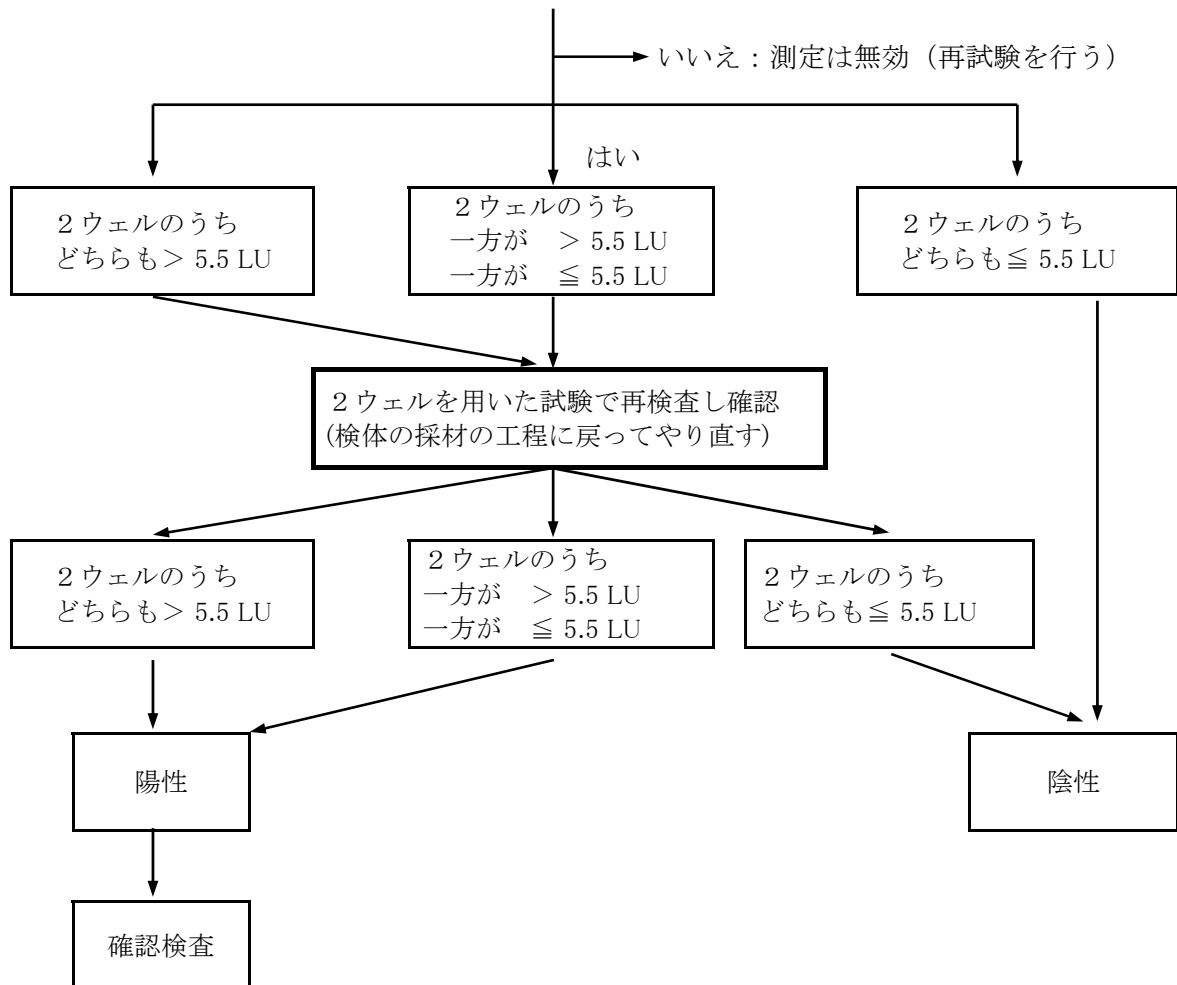
ブランクコントロール

- 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。