

「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
【抽出用試薬Aセット】 (-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
【抽出用試薬Bセット】 (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
【検出用試薬セット】 (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 (μ L)	コラゲナーゼ溶液 (μ 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 (μ 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 (μ 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 μ L 用, 1,000 μ L 用, 5,000 μ 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）*

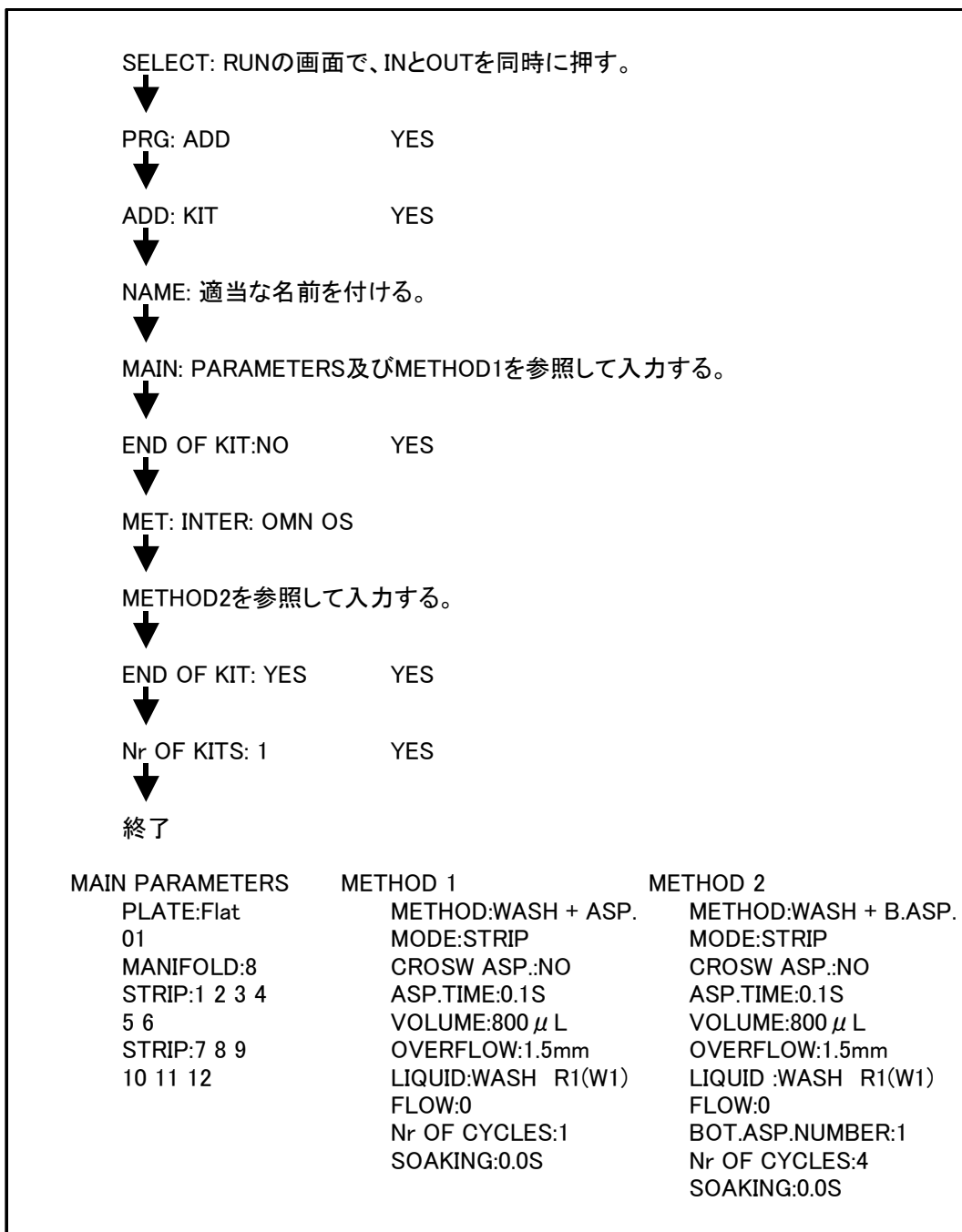
サンプルチューブ：サンプリングチューブ 2mL 用若しくは凍結保存チューブ 2 mL 用

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 μ 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 μ L を 2mL 用のサンプルチューブに移し、調製試薬 2 を 300 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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
乳剤調製					
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
抽出操作					
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				
検出(ELISA)操作					
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場合があるため、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。