

「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"> ● 22±5℃で12時間 ● 5±3℃で1週間
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"> ● 22±5℃で12時間 ● 5±3℃で1週間 ● 一部を凍結保存する場合、-20±5℃で1ヵ月
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"> ● 22±5℃で12時間 ● 5±3℃で1週間 ● 分割および冷凍する場合 -20±5℃で1ヵ月
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"> ● 22±5℃で12時間 ● 5±3℃で1週間
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"> ● 22±5℃で6時間 ● 5±3℃で1週間
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"> ● 22±5℃で6時間 ● 5±3℃で1週間
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"> ● 22±5℃で12時間 ● 5±3℃で1週間
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"> ● 22±5℃で12時間 ● 5±3℃で1週間

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"> ● 22±5°Cで2時間 ● 5±3°Cで24時間
------------------	--	--

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 μL 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 ± 2 分間振とう（ 400 ± 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 μL 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 μL 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 ± 5 分間振とう（ 400 ± 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 μL 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 μL 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 ± 2 分間振とう（ 400 ± 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 μL 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 μ 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。