

第80回麻布獣医学会 一般講演5

BSEスクリーニング検査結果に影響する因子の検証

山中 章弘

愛知県食品衛生検査所半田駐在

1 はじめに

平成13年10月18日から食肉処理場で処理される全ての牛を対象にした牛海綿状脳症（以下、BSE）スクリーニング検査が全国一斉に実施され、愛知県においても平成17年3月末までに4,826頭の検査を行い全て陰性であった。

BSEスクリーニング検査で採用されているエライザ法は感度が高く、種々の要因で偽反応が発生し、光学濃度（以下、OD値）がカットオフ値を超え再検査を要するケースが発生する。

そこで今回、より安定したデータを得るためBSEスクリーニング検査結果に影響する因子について検証したので報告する。

2 材料及び方法

(1) 材料 BSEスクリーニング検査結果陰性が判明したできる限り新鮮な延髄を試料とした。

(2) 実施期間 平成17年1月下旬から2月にかけて

(3) 方法

BSEスクリーニング検査結果に影響する因子を検証するために次のように条件を設定し実験した。

- ①細切とファーストプレップ（以下、FP）による破碎条件（細切+FP2回、細切+FP1回、細切なし+FP2回、細切なし+FP1回）を変えての実験
- ②洗浄液の温度（10℃、20℃、30℃）を変えての実験
- ③試料に陽性コントロール、酵素標識抗体、高濃度塩素、軟膜を混入しての実験
- ④空のウェル内に軟膜、鉄サビ、アルミホイル、エアコン付着の塵、高濃度塩素を混入し発色液

と反応するか否かの実験を行った。

実験は、厚生労働省医薬局食品保健部長通知（平成13年10月16日付け食発第307号）の「BSEスクリーニング検査要領」に準じて実施し、検査キットはバイオラッド社の「PLATERIA BSE KIT」を使用した。（検査キットはBSE検査に使用した残余分を用いた。）

(4) 主な装置

細胞破碎装置：フナコシ社製 ファーストプレップ
マイクロプレートウォッシャー：バイオラッド社製モデル1575
マイクロプレートリーダー：バイオラッド社製モデル550解析システム

3 結果及び考察

(1) 試料の破碎条件による影響

表1のとおり破碎条件を設定し、OD値を比較した。破碎が不十分で組織の塊が残っていると、プロテイナーゼKが十分作用せず、最終的にOD値が高くなる傾向があるといわれているが、今回の実験からこのことが検証され、当所が実施している試料秤量後の眼科バサミとピンセットによる細切とFPによ

表1 破碎条件による影響（カットオフ値0.236）

破碎条件	OD値		平均
細切+FP2回	0.056	0.059	0.058
細切+FP1回	0.063	0.066	0.065
細切なし+FP2回	0.073	0.071	0.072
細切なし+FP1回	0.092	0.096	0.094

る2回ホモジナイズ(6.5 m/S, 45秒)は偽反応の防止に有効であることがわかった。

(2) 洗浄液温度の影響

表2のとおり洗浄液温度(インキュベーター内に洗浄液を保存)を設定し、OD値を比較した。

今回の設定温度条件では、OD値に顕著な差は認められなかったが、今後さらに設定を変え検証していきたい。

一般に洗浄液の温度が高いとOD値が高くなるといわれているので、プレートを洗浄する時は洗浄液の温度管理(18~22℃)に十分注意する必要がある。

(3) 異常プリオンタンパク精製工程における原因検証

表3のとおり精製工程において、混入することにより検査結果に影響すると思われる物質について、OD値を比較した。

表2 洗浄液温度の影響(カットオフ値0.239)

洗浄液温度(℃)	OD値		平均
10	0.077	0.079	0.078
20	0.085	0.090	0.088
30	0.076	0.074	0.075

表3 精製工程における原因検証(カットオフ値0.234)

混入物質	OD値
陽性コントロール	0.268
酵素標識抗体	0.080
高濃度塩素	0.064
軟膜	0.051
※異物混入なし	0.056

陽性コントロール、酵素標識抗体、高濃度塩素については10μLを前処理が完了したウェル内に混入させた。

また、軟膜については、延髄に直接混入させた。

今回の実験で顕著なOD値の上昇がみられたのは、陽性コントロールのみであった。

軟膜については、ホモジナイズの後グライディングチューブから検体を吸引する際注意すれば、分別できるものと思われる。

また、酵素標識抗体と高濃度塩素については、今回誤ってウェル内に飛散することを想定した10μLの量しか設定しなかったため、今後さらに検討していきたい。

(4) 検出工程における原因検証

基質発色液は金属イオン、塩素、塵等に対し鋭敏に反応して発色するとされている。

これらを検証するため、空のウェル内に軟膜、鉄サビ、アルミホイル、エアコン付着の塵、高濃度塩素10μLを混入し、基質発色液を100μLずつ分注後遮光し、20℃で30分間反応させたところ、軟膜と高濃度塩素が発色液と反応し青色を呈した。

今後はこの結果を踏まえ異物混入には十分注意する必要がある。

4 まとめ

BSEスクリーニング検査の開始から3年以上が経過した。

今回の検証結果から、検査のチェックポイントを知るうえで有用な知見が得られ、特に不完全な乳剤化が、偽反応の主因になるものと推察された。

今後もより精度の高い検査を目指し努力していきたい。