

BSE 検査におけるマイクロプレートの各ウエルの吸光度に関する検討

田邊輝雄¹, 藤井三郎¹

The optical density of test samples in Screening for Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)

Teruo TANABE, Saburo FUJII

Abstract : For 173 days in a year, screening test for BSE was performed on 8,193 samples. Of which a total of 37 samples were retested at 20 times and all confirmed to be false positive. To analyze the occurrence of false-positive reaction, we examined if the optical density was abnormally high at certain wells on the microplate. We found that the sample wells placed later tended to be false-positive (show higher optical density) more than the ones placed earlier. These results must be kept in mind when reading screening data.

Key words : 牛海綿状脳症 Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), 吸光度 optical density, 疑陽性 false-positive reaction

I はじめに

平成13年10月18日の BSE 検査開始から約1年が経過しているが、その間に当所では173日の検査が実施され、20回の再試験が行われた。検査を実施していく上で、検体の吸光度が初めの方のウエルに注入した検体に比べて、終わりの方が高値を示す傾向があり、疑陽性の発生に関連があると思われたので、各ウエルの吸光度について調査し、あわせて疑陽性の発生場所の傾向を検討した。

II 方法

検査は厚生労働省の BSE スクリーニング検査要領¹⁾に基づいて行われ、平成13年10月18日から平成14年9月30日までに検査を実施した8,193検体を対象に調査を行った。検体の吸光度について各ウエルでの平均値を算出し、そのウエルの位置による傾向を調査した。また、同一検体を、同列の隣同士に連続注入した場合と、一方を初めの方で注入し他方を2列以上後の方で注入した場合での吸光度の差について検討した。さらに、疑陽性の発生したウエルの位置及びその傾向の有無を調査した。

III 結果及び考察

調査した検体数と疑陽性発生数について表1のとおりである。検体の平均吸光度については表2にまとめた。各ウエルの検査検体数はその日の頭数により異なり、1列目の上から順に入れ、ついで2列目へと進めていくので前の方

ほど多くなる傾向である（ただし1-A から1-D は陰性コントロール、1-E 及び1-F は陽性コントロールを注入している）。しかし、当所のデータで1列目と2列目の検体数が少ないのは、試験検査において2-E のウエルの位置で疑陽性が2度続けて発生し、1-E の陽性コントロールの影響を考慮し、25日目の検査から2列目を空けて試験を行うようにしたことによるものである。さらに念のため、1-G も空けることとし、通常は3-A から検体を注入することにしたので、1列目の検体数も少なくなっている。表1から疑陽性の出たウエルについては2-E が8.7%と高かった。これは陽性コントロールが近くにあり、疑陽性が出る可能性の高いウエルと思われるが、25日目以後は使用しておらず、以後の調査対象から外れているので明確ではない。次いで9-F の3.0%、10-G の2.9%となるがこれらは検体数が少なかった。検体数の多い3列目から7列目で調べたところ、疑陽性の発生に関して特定のウエルに傾向はみられなかった。しかしながら、表3にまとめたその日の検体数に対してどの辺りに疑陽性の発生があるかをみた場合には、後半の検体に多く出る傾向にあった。また、疑陽性が同日に数検体発生することが6回あり、近いウエルの位置で発生している場合がほとんどであったので、同一ストリップで1つの発生とみなすと傾向がよりはっきりとする。近い検体で複数発生する場合はそれぞれの検体において前処理の工程や試薬作成・注入などにおいて共通の要因があると思われた。

表2に各ウエルの吸光度が示されており、全体の吸光度の平均値は 0.079 ± 0.032 であった。高値を示したのは12-F

¹⁾ 京都市衛生公害研究所 病理部門

表 1 検査検体数及び疑陽性件数

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	列計
A		24	171	171	164	149	129	102	81	53	23	6	1,073
B		24	171	171	164	149	126	102	78	51	21	6	1,063
C		23	172	171	163	148	125	100	74	47	20	2	1,045
D		23	172	171	162	146	116	100	72	44	15	2	1,023
E		23	172	169	157	145	115	98	68	41	14	2	1,004
F		23	171	166	156	141	113	98	66	38	12	2	986
G	39	23	170	166	156	137	110	94	63	35	10	2	1,005
H	53	23	171	166	152	136	108	89	58	30	8	0	994
列計	92	186	1,370	1,351	1,274	1,151	942	783	560	339	123	22	8,193

*上段:疑陽性件数 下段:検査検体数

表 2 平均吸光度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	列全体
A	N	0.065	0.076	0.075	0.076	0.083	0.081	0.080	0.083	0.077	0.076	0.078	0.078
B	N	0.070	0.077	0.075	0.078	0.088	0.084	0.087	0.086	0.080	0.075	0.085	0.081
C	N	0.063	0.074	0.076	0.073	0.085	0.083	0.078	0.082	0.085	0.074	0.098	0.078
D	N	0.065	0.072	0.073	0.074	0.081	0.083	0.080	0.085	0.082	0.079	0.088	0.077
E	P	0.080	0.074	0.074	0.076	0.087	0.084	0.082	0.081	0.082	0.082	0.095	0.079
F	P	0.062	0.076	0.078	0.076	0.089	0.087	0.087	0.081	0.080	0.075	0.106	0.081
G	0.066	0.066	0.075	0.079	0.082	0.084	0.085	0.084	0.086	0.081	0.080	0.082	0.080
H	0.067	0.067	0.073	0.076	0.081	0.085	0.087	0.082	0.084	0.080	0.079	-	0.079
列全体	0.066	0.067	0.074	0.076	0.077	0.085	0.084	0.082	0.083	0.080	0.077	0.087	0.079

* Nは陰性コントロール, Pは陽性コントロールの位置

表 3 疑陽性の発生傾向

その日のどの辺りか	25%	25-50%	50-75%	75-100%
発生検体数	5	8	8	16
同ーストリップを 1 検体とした場合	4	4	6	13

表 4 各ストリップの吸光度の差について(n=29)

列	平均吸光度	最大値	最小値	4	5	6	7	8	9	10
3	0.066 ±0.029	0.171	0.026	○	○	×	×	×	×	×
4	0.068 ±0.035	0.419	0.024		○	×	×	×	×	×
5	0.068 ±0.031	0.208	0.023			×	×	×	×	×
6	0.076 ±0.033	0.227	0.029				○	○	○	○
7	0.075 ±0.034	0.244	0.030					○	○	○
8	0.078 ±0.034	0.209	0.025						○	○
9	0.080 ±0.035	0.180	0.031							○
10	0.081 ±0.034	0.198	0.030							

* 平均吸光度 ○:等しい ×:等しくない

表5 同一検体の吸光度について

		平均吸光度	相関
連続注入 (n=27)	① x	0.137 ±0.048	r=0.986
	② y	0.137 ±0.050	y=1.02x-0.003
前後注入 (n=21)	① x	0.067 ±0.017	r=0.791
	② y	0.080 ±0.020	y=0.88x+0.02

や12-Cであり、低値を示したのは2-Cや2-Fであったが、これらは検体数が少ないので明確なことはいえない。しかしながら、全体的な傾向として前列では低く、後列では高い傾向にあるといえる。また、ウォッシャーのノズルの不調による洗浄不良がたびたび起こっていたので、同一ノズルで洗浄するA～Hの列ごとにみたところ、差は認められなかった。

検査環境やロットの影響を除くため、3～10列の全てのウェルを使用した29回について吸光度の検討をしたのが表4である。3～5列目、6～10列目はそれぞれ平均吸光度が等しいと判断されたが、前者と後者では有意差が認められた。さらにそれを裏付けるために、同一検体を、同一列に連続注入した場合及び初めと終わりに注入した場合のそれぞれについて検討した結果が表5である。前者は平均吸光度が等しく、後者は後の方で注入したものの方が高い吸光度を示す傾向にあった。

前の方と後の方の検体で後の方が高い吸光度となる原因としては基質発色液の感光時間の差が最も考えられた。基

質発色液をウェルに注入する際には、当所では使用直前に遮光したスピッツ管で液を作成しリザーバーに開けて8連ピペッターで注入している。停止液もリザーバーに開けて注入しているが、基質発色液及び反応停止液を入れる際に光に当たった時間が前列に比べ後列は幾分多くかかり、感光する時間が長くなるためと考えられた。その他に破碎機の連続使用による温度上昇が検体に与える影響や異常プリオン蛋白精製という前処理の工程を数回に分けた場合に、次の検出の工程に入るまでの時間や温度などが要因に挙げられる。

今回のデータを含め、通常の検査結果をさらに検討していくことで検査における精度をあげることに繋がっていければと考える。

IV 文献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部長：牛海綿状脳症に関する検査の実施について、平成13年10月16日、食発第307号(2001)