

生食発0601第10号
平成28年6月1日

各 $\left[\begin{array}{l} \text{都道府県知事} \\ \text{保健所設置市長} \end{array} \right]$ 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局
生活衛生・食品安全部長
(公 印 省 略)

伝達性海綿状脳症検査実施要領の改正について

伝達性海綿状脳症（TSE）に関する検査については、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日付け食発第307号。以下「通知」という。）により実施しているところですが、通知別添の伝達性海綿状脳症検査実施要領を別添のとおり改正することとしたので、御了知の上、対応方よろしく申し上げます。

(参考) 改正内容

改正後	改正前
<p>3 検査申請に関する指導事項及び受理時の留意事項</p> <p>(1) と畜検査申請者に対して次の事項についてあらかじめ指導するとともに、関係業者に指導すること。</p> <p>ア (略)</p> <p>イ めん羊及び山羊については、めん羊、山羊血統登録証明書(公益社団法人畜産技術協会発行)、めん羊及び山羊出生確認書(公益社団法人畜産技術協会発行)など月齢が確認可能な書面を添付することが望ましいこと。</p> <p>ウ (略)</p>	<p>3 検査申請に関する指導事項及び受理時の留意事項</p> <p>(1) と畜検査申請者に対して次の事項についてあらかじめ指導するとともに、関係業者に指導すること。</p> <p>ア (略)</p> <p>イ めん羊及び山羊については、めん羊、山羊血統登録証明書(社団法人畜産技術協会発行)、めん羊及び山羊出生確認書(社団法人畜産技術協会発行)など月齢が確認可能な書面を添付することが望ましいこと。</p> <p>ウ (略)</p>
<p>6 解体後検査</p> <p>(1) 牛に対する検査等</p> <p>ア (略)</p> <p>イ 次に掲げる分類について、スクリーニング検査及び確認検査結果を集計すること。</p> <p>ア) 生後24ヶ月齢以上の牛のうち、生体検査において運動障害、知覚障害、反射又は意識障害等の神経症状が疑われたもの及び全身症状を呈する牛。</p> <p>イ) (略)</p> <p>ウ) (略)</p> <p>(2) めん羊及び山羊に対する検査等</p> <p>ア スクリーニング検査は、<u>獣畜の月齢に関わらず、生体検査において、削瘦、被毛粗剛、脱毛、そう痒症、関節炎、異常行動、運動失調等の臨床症状を呈するめん羊及び山羊について、原則としてとさつ解体を行った当日に実施すること。</u></p> <p>イ (略)</p>	<p>6 解体後検査</p> <p>(1) 牛に対する検査等</p> <p>ア (略)</p> <p>イ 次に掲げる分類について、スクリーニング検査及び確認検査結果を集計すること。</p> <p>ア) 生後24ヶ月齢[※]以上の牛のうち、生体検査において運動障害、知覚障害、反射又は意識障害等の神経症状が疑われたもの及び全身症状を呈する牛。</p> <p>(※) <u>牛海綿状脳症に関する特定家畜伝染病防疫指針(平成16年11月29日農林水産大臣公表)において、24ヶ月齢以上で死亡した牛を検査することとされている。</u></p> <p>イ) (略)</p> <p>ウ) (略)</p> <p>(2) めん羊及び山羊に対する検査等</p> <p>ア スクリーニング検査は<u>12ヶ月齢以上のめん羊及び山羊について、原則としてとさつ解体を行った当日に実施すること。</u></p> <p><u>なお、12ヶ月齢未満のめん羊及び山羊であっても、疾病鑑別の観点等からと畜検査員が必要と認める場合には、スクリーニング検査を実施することが可能であること。</u></p> <p>イ (略)</p>
<p>別紙様式2</p> <p>変更内容については別紙参照のこと。</p>	<p>別紙様式2</p> <p>変更内容については別紙参照のこと。</p>

改正後

別紙様式2

めん羊及び山羊の伝達性海綿状脳症(TSE)のスクリーニング検査結果(月報)

月 日～ 月 日搬入分

自治体名

	TSE疑いのめん羊及び山羊※1			スクリーニング検査を行っためん羊及び山羊※2			計			めん羊及び山羊で検査を実施しなかった頭数
	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計	
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
計										

※1 生体検査において運動障害、知覚障害、反射又は意識障害等の神経症状が疑われたもの及び全身症状を呈するめん羊及び山羊
月 日～ 月 日までにTSEの疑いがあるためとさつ禁止措置を講じた件数 件

※2 生体検査において削癒、被毛粗剛、脱毛、そう痒症、関節炎、異常行動や運動失調等の臨床症状を呈するめん羊及び山羊

※3 週毎(日曜日～土曜日を1週とする)に分けて各段に記入すること

改正前

別紙様式2

めん羊及び山羊の伝達性海綿状脳症(TSE)のスクリーニング検査結果(月報)

月 日～ 月 日搬入分

自治体名

	症状を呈するめん羊及び山羊※1			その他のめん羊及び山羊			計			12ヶ月齢未満のめん羊及び山羊で検査を実施しなかった頭数
	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計	
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
計										

※1 生体検査において運動障害、知覚障害、反射又は意識障害等の神経症状が疑われたもの及び全身症状を呈するめん羊及び山羊
月 日～ 月 日までにTSEの疑いがあるためとさつ禁止措置を講じた件数 件

※2 週毎(日曜日～土曜日を1週とする)に分けて各段に記入すること

伝達性海綿状脳症検査実施要領

1 趣旨

本要領は、と畜場法（昭和 28 年法律第 114 号。以下「法」という。）及び牛海綿状脳症対策特別措置法（平成 14 年法律第 70 号。）に基づき、牛、めん羊及び山羊の伝達性海綿状脳症（以下「T S E」という。）に係る検査を実施し、T S E に罹患した牛、めん羊及び山羊が食用として流通しないよう措置することにより、食肉の安全を確保するとともに、併せて我が国における T S E の罹患状況の評価に資することを目的とする。

2 T S E 検査の必要性

と畜場における食肉の安全対策として、異常プリオンたん白質の蓄積部位である特定部位の適切な除去に加えて、異常プリオンたん白質に汚染された可能性がある T S E 患畜に由来する肉等を排除することが必要であり、法第 14 条に基づき検査を実施する。

3 検査申請に関する指導事項及び受理時の留意事項

(1) と畜検査申請者に対して次の事項についてあらかじめ指導するとともに、関係営業者に指導すること。

ア 牛については、と畜場法施行規則（以下「規則」という。）第 15 条第 1 項に規定すると畜検査申請書を提出する際、必要に応じて、と畜検査申請書に記載する生年月日等の根拠となる、牛の個体識別のための情報の管理及び伝達に関する特別措置法（平成 15 年法律第 72 号）に基づく牛個体識別台帳の写しを添付すること。

イ めん羊及び山羊については、めん羊、山羊血統登録証明書（公益社団法人畜産技術協会発行）、めん羊及び山羊出生確認書（公益社団法人畜産技術協会発行）など月齢が確認可能な書面を添付することが望ましいこと。

ウ T S E 検査陽性の場合に畜産主管部局による調査に必要な出荷者、飼養者の氏名及び住所等の情報についても、あらかじめ確認して申請すること。

(2) と畜検査申請書の受理に当たっては、次の事項に留意すること。

ア 申請に係る牛の月齢について、と畜検査申請書の「生年月日」及び「月齢」欄の記載及び上記（1）のアに定める書面を確認すること。

めん羊及び山羊の月齢については、上記（1）のイに定める書面が添付されている場合には、当該書面に基づき確認すること。

イ 上記（１）のウの事項が不明な場合には、確認するよう申請者に対し指導すること。

4 生体検査

（１）法第 14 条第 1 項の規定に基づく検査において、牛については、と畜検査申請書及び申請書に添付された上記 3 の（１）のアに定める書面により月齢を確認すること。

めん羊及び山羊については、歯列の確認を行い、生後 12 ヶ月を判断するに当たっては、第 2 後臼歯（上顎及び下顎）の萌出がその指標になること。

（２）すべての牛、めん羊及び山羊について、奇声、旋回等の行動異常、運動失調等の神経症状の有無を歩様検査の結果もあわせて判断すること。

なお、生体検査に当たっては、平成 15 年 3 月 26 日付け事務連絡により送付した伝達性海綿状脳症の臨床症状に関する教育ビデオを参考とすること。

5 生体検査の結果に基づく措置

（１）生体検査の結果、上記 4 の（２）に該当し、当該牛、めん羊及び山羊が T S E に罹患している疑いがあると判断した場合（家畜伝染病予防法第 2 条に規定する疑似患畜に該当。）には、当該牛、めん羊及び山羊のとさつ又は解体によりウイルス（異常プリオンたん白質）を伝染させるおそれがあると認められるため、法第 16 条第 1 号の規定に基づきとさつ解体禁止の措置をとること。

（２）（１）の措置をとった食肉衛生検査所等は、その旨を申請者、と畜場設置者及び家畜保健衛生所等に通報するとともに、都道府県及び保健所設置市（以下「都道府県等」という。）食品衛生主管課を通じて、当該都道府県等畜産主管課に通報すること。また、出荷者を管轄する関係都道府県等の食品衛生主管課及び畜産主管課に情報提供すること。

（３）T S E の症状が確認できないような全身症状を呈するものであって、敗血症、高度の黄疸等上記以外の理由により法第 16 条第 1 号に基づくとさつ解体禁止の措置をとった牛、めん羊及び山羊についても、食肉衛生検査所等は、申請者及びと畜場設置者等に通報するとともに、都道府県等食品衛生主管課を通じて、当該都道府県等畜産主管課に通報すること。また、出荷者を管轄する関係都道府県等の食品衛生主管課及び畜産主管課に情報提供すること。

6 解体後検査

（１）牛に対する検査等

ア スクリーニング検査は 48 ヶ月齢超の牛について、原則としてとさつ解体を行った当日に実施すること。

なお、48 ヶ月齢以下の牛であっても、疾病鑑別の観点等からと畜検査員が必要と認める場合には、スクリーニング検査を実施することが可能であること。

イ 次に掲げる分類について、スクリーニング検査及び確認検査結果を集計すること。

ア) 生後 24 ヶ月齢以上の牛のうち、生体検査において運動障害、知覚障害、反射又は意識障害等の神経症状が疑われたもの及び全身症状を呈する牛。

イ) 生後 48 ヶ月齢超の牛。

ウ) その他の牛（検査を実施した具体的な理由を記載すること。）。

(2) めん羊及び山羊に対する検査等

ア スクリーニング検査は、獣畜の月齢に関わらず、生体検査において、消瘦、被毛粗剛、脱毛、そう痒症、関節炎、異常行動、運動失調等の臨床症状を呈するめん羊及び山羊について、原則としてとさつ解体を行った当日に実施すること。

イ スクリーニング検査及び確認検査結果を集計すること。

(3) 検体採取等

牛、めん羊及び山羊の検体については、頭部の大孔から延髄をスパーテル等により採取すること。延髄の片側の一部をスクリーニング検査用検体とし、別添 1 の「伝達性海綿状脳症（T S E）スクリーニング検査要領」により検査を実施するとともに、延髄の残りを凍結し、送付用検体とすること。

延髄の反対側は 15%～20%濃度の緩衝ホルマリンで固定し、送付用検体とすること。当該固定は、検体採取後速やかに行うこととし、困難な場合であっても、1 回目の ELISA 検査結果判明後直ちに行うこと。

(4) スクリーニング検査結果が陽性の場合の措置

スクリーニング検査が終了し（2 回目の ELISA 検査終了時）、その結果、陽性と判断された場合には、食肉衛生検査所等は直ちにその旨を申請者及びと畜場設置者等に通報するとともに、都道府県等食品衛生主管課に通報し、当該都道府県等畜産主管課、当該牛、めん羊及び山羊の出荷者を管轄する関係都道府県等の食品衛生主管課及び畜産主管課に情報提供すること。

当該牛、めん羊及び山羊の確認検査を実施するため、上記（3）においてあらかじめ確保した検体を別添により指定する機関に送付すること。なお、都道府県等において確認検査を実施する場合は、別添 2 の「都道府県等における伝達性海綿状脳症（T S E）確認検査実施要領」により検査を実施すること。

(5) 確認検査結果の連絡

確認検査結果については、前記（4）の確認検査実施機関から厚生労働省医薬・生活衛生局生活衛生・食品安全部監視安全課（以下「監視安全課」という。）を通じて当該都道府県等食品衛生主管課に連絡する。

なお、都道府県等において確認検査を実施した場合にあっては、当該都道府県等食品衛生主管課を通じて監視安全課あて連絡すること。

当該都道府県等食品衛生主管課は、直ちに食肉衛生検査所等を通じて、確認検査結果を申請者及びと畜場設置者等に通報するとともに、当該都道府県等畜産主管課、出荷者を管轄する関係都道府県等の食品衛生主管課及び畜産主管課に情報提供すること。

(6) 確定診断

確認検査の結果、TSE陽性と判断された場合には、厚生労働省の牛海綿状脳症の検査に係る専門家会議において確定診断を行うこと。

(7) スクリーニング検査及び確認検査実施中のと畜等に関する措置

スクリーニング検査及び確認検査の実施中は、当該牛、めん羊及び山羊に由来する肉、内臓、血液（再利用するものに限る）、骨、皮、頭部、脚、尾部等については、分離した廃棄部位を含め、個体識別が可能な方法で、かつ可食部分が微生物等の汚染を受けないよう保管すること。一頭ごとの保管が困難な場合は、数頭分又は1日分まとめて保管し、TSE陽性の場合には一括して措置（焼却）して差し支えないこと。

7 解体後の検査に基づく措置

規則第16条第3号又は第4号に基づき、と畜検査員等の立会いのもと、次のとおり措置すること。

(1) スクリーニング検査結果又は確認検査結果が陽性の場合

ア 規則の別表第一に掲げる部分に接触した又はそのおそれがある施設設備、機械器具等について、8に定める消毒措置等を確実に行うこと。また、規則の別表第一に掲げる部分に接触しない施設設備、機械器具等については、入念な洗浄消毒を行うこと。

イ 6の(7)により保管している当該牛、めん羊及び山羊に由来する肉、内臓、血液（再利用するものに限る）、骨、皮、頭部、脚、尾部、分離した廃棄部位等の一部を必要に応じて焼却すること。

(2) 確定診断の結果、TSEと判断された場合

監視安全課から確定診断の結果、TSEと判断された旨の通知を受けた都道府県等は、次により措置すること。

ア 規則の別表第一に掲げる部分に接触した又はそのおそれがある施設設備、機械器具等について、8に定める消毒措置等を確実に行うとともに、別表第一に掲げる部分に接触しない施設設備、機械器具等についても入念な洗浄消毒を行うこと（上記(1)のAにより措置したものを除く。）。イ 6の(7)により保管している当該牛、めん羊及び山羊に由来する肉、

内臓、血液（再利用するものに限る）、骨、皮、頭部、脚、尾部、分離し

た廃棄部位等（上記（１）のイにより焼却したものを除く。）を焼却すること。

8 廃棄を命じたもの等の消毒方法

検査の結果、T S E に罹患している牛、めん羊及び山羊が発見された場合の現時点での病原体の不活化法は次のとおりであるので、これらに基づき、消毒措置等を確実に行うこと。

- （１）800℃以上の完全な焼却（と体、ゴム手袋、防護衣服等）
- （２）132～134℃、1時間の高圧蒸気滅菌（器具等）
- （３）水酸化ナトリウム1モル濃度以上、20℃、1時間の処理（施設、汚物等）
- （４）次亜塩素酸ナトリウム有効塩素濃度が最低2%溶液で1時間による処理（施設、汚物等）

9 設置者、管理者、と畜業者、従事者等への指導事項

- （１）規則の別表第一に掲げる部分については、処理の過程で除去し、と畜検査員の確認を受け、焼却すること。
- （２）T S E 検査中のと体等を保管する際に保留用冷却設備が狭隘な場合は、他のと体等を汚染しないよう、保管用冷蔵庫を仕切るなど現在の施設を有効に活用して対応すること。
- （３）本要領はT S E 検査に関連した必要な措置を定めたものであり、実施の結果、と畜場の使用を制限する必要が生じた場合には、法第11条に規定する「正当な理由」に該当するものと解される。

また、必要に応じて、処理頭数の見直しを行うこと。

T S E 陽性牛、めん羊及び山羊が発見された場合は、と体等について焼却処分が必要であることから、あらかじめ利用可能な焼却設備を指定しておくこと。

10 監視安全課への検査結果の報告及びその公表

- （１）都道府県等食品衛生主管課は、5の（１）のとさつ解体禁止措置を講じた場合には、別紙様式1により直ちに監視安全課まで報告すること。
- （２）スクリーニング検査結果については、前月分の検査結果を翌月の7日までに、牛については、食肉検査支援システムを利用し、めん羊及び山羊については別紙様式2により報告すること。

なお、食肉検査支援システムに不具合が生じた場合は、別紙様式3により、監視安全課あて報告すること。

- （３）監視安全課においては、確定診断の結果、T S E とされたものについては判明次第公表し、スクリーニング検査及び確認検査の結果が陰性のものについては、その総数を毎月公表することとしているので、結果の報告に遺漏の

ないようにすること。

(改正記録)

平成13年10月18日一部改正	:	実施要領内容追記
平成13年11月5日一部改正	:	検体郵送に係る取扱い変更
平成14年1月23日一部改正	:	スクリーニング検査結果日報を週報に改正
平成14年11月11日一部改正	:	検体郵送に係る取扱い変更等
平成15年2月28日一部改正	:	確認検査実施要領追加
平成15年7月1日一部改正	:	牛海綿状脳症用検査キットの追加等
平成16年4月13日一部改正	:	生体検査に係る教育ビデオの追加等
平成16年8月4日一部改正	:	スクリーニング検査キットの追加等
平成17年7月1日一部改正	:	検査対象月齢の改正等
平成18年6月23日一部改正	:	スクリーニング検査キットの追加等
平成19年2月1日一部改正	:	別紙様式1-1の変更
平成19年2月26日一部改正	:	スクリーニング検査キットの仕様変更
平成19年10月19日一部改正	:	検査結果の公表頻度等
平成20年6月27日一部改正	:	スクリーニング検査キットの追加
平成20年8月22日一部改正	:	スクリーニング検査キットの追加等
平成20年12月24日一部改正	:	スクリーニング検査キットの仕様変更
平成23年1月12日一部改正	:	スクリーニング検査キットの仕様変更
平成23年12月13日一部改正	:	スクリーニング検査キットの仕様変更
平成25年3月29日一部改正	:	検査対象月齢の改正等
平成25年6月3日一部改正	:	検査対象月齢の改正等
平成28年4月15日一部改正	:	スクリーニング検査キットの仕様変更等
平成28年6月1日一部改正	:	めん羊及び山羊のスクリーニング検査の改正等

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課 行

FAX : 03-3503-7964

TSE疑いのある牛、めん羊及び山羊の発生確認報告書

1	自治体名		と畜場名			
2	とさつ禁止措置日時	年 月 日 時				
	とさつ禁止措置を講じた理由					
3	当該動物	種類 品種	性別	♂ ♀	生年月日 月 日	年 月 日 ヶ月
4	生体検査所見					
5	備 考					
	個体識別番号 :					

めん羊及び山羊の伝達性海綿状脳症(TSE)のスクリーニング検査結果(月報)

月 日～ 月 日搬入分

自治体名

	TSE疑いのめん羊及び山羊※1			スクリーニング検査を行っためん羊及び山羊※2			計			めん羊及び山羊で検査を実施しなかった頭数
	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計	
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
月 ~ 日										
計										

※1 生体検査において運動障害、知覚障害、反射又は意識障害等の神経症状が疑われたもの及び全身症状を呈するめん羊及び山羊
月 日～ 月 日までにTSEの疑いがあるためとさつ禁止措置を講じた件数 件

※2 生体検査において削瘦、被毛粗剛、脱毛、そう痒症、関節炎、異常行動や運動失調等の臨床症状を呈するめん羊及び山羊

※3 週毎(日曜日～土曜日を1週とする)に分けて各段に記入すること

牛海綿状脳症（BSE）のスクリーニング検査結果（月報）
 月 日～ 月 日搬入分

自治体名

	症状を呈する牛 ※1			生後48ヶ月齢超の牛			その他の牛※3			計		
	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計	陰性	陽性	計
月 ~ 日												
月 ~ 日												
月 ~ 日												
月 ~ 日												
月 ~ 日												
月 ~ 日												
月 ~ 日												
月 ~ 日												
月 ~ 日												
計												

※1 生後24ヶ月齢以上の牛のうち、生体検査において運動障害、知覚障害、反射又は意識障害等の神経症状が疑われたもの及び全身症状を呈する牛

月 日～ 月 日までにBSEの疑いがあるためとさつ禁止措置を講じた件数

件

※2 週毎(日曜日～土曜日を1週とする)に分けて各段に記入すること

※3 検査を実施した具体的な理由を以下に記載すること

()

伝達性海綿状脳症（TSE）スクリーニング検査要領

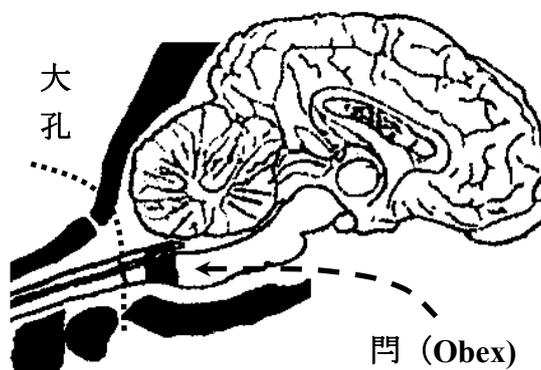
第1. 実験室内でのプリオン材料の取扱いについて

- 作業は区画された専用の実験室内において、原則として安全キャビネット内で行う。
- 作業者は傷口からの感染、飛沫による目及び口からの汚染を防ぐために、ラテックス又はビニール製手袋、マスク、予防衣及び帽子を着用し、必要に応じ防護眼鏡等も使用する。
- 作業着はじめ各種器具器材は可能なかぎりディスポーザブルの製品を使用する。
- 検査材料の取扱いはベンチシート上で行い、飛沫、エアロゾルを発生させないように気をつける。
- 検査材料をこぼした時及び業務終了時には、作業場所の表面を次亜塩素酸ナトリウム溶液で清拭する。
- 使用済みベンチシート、ディスポーザブル器具類はオートクレーブバッグに入れ、132～134℃ 1時間の高圧蒸気滅菌をする。
- ハサミ、ピンセット類は再使用するため、ティッシュ等の紙あるいはアルコール綿で汚れを拭い、3～5% SDS に浸漬して5～10分間の煮沸（1%に炭酸ナトリウムを添加すると金属の腐食が押さえられる。）又は132～134℃ 1時間の高圧蒸気滅菌をする。
- 加熱できないプラスチック器具は、5%以上の次亜塩素酸ナトリウム又は2規定以上のNaOHに2時間以上浸漬する。
- 可燃物はオートクレーブバッグに入れ、132～134℃ 1時間の高圧蒸気滅菌をする。
- 医療廃棄物用焼却炉が使用できる場合は、プラスチック器具及び可燃物は共にバイオハザードバックに入れて焼却する。
- 操作を続けなければならない遠心管等の外側が汚染した場合、汚染していない新しいものに移しかえて作業を続ける。
- 通常のオートクレーブしか利用できないとき、耐アルカリ容器に入れた汚染物を1～2規定のNaOHに浸漬して121℃ 30分間処理をすることも有効な方法である。
- 焼却できない器具器材の除染を行う際は、原則として、高度に汚染している場合や組織塊等では、当然残留するプリオン量が多いため、まず紙又はアルコール綿などの可燃物で拭ってできるだけ汚れを除いた後に、滅菌処理を行う。

第2. 採材部位

頭部を図1点線のところから分離した後、大孔からスプーンあるいは葉匙を差し込んで、図1及び図2に示す**門 (Obex)** (図1中黒色に塗った部位) を含むように採材する。黒色部は頭蓋骨及び頸椎を示す。病変及びプリオンの蓄積はほぼ左右対称に起きるため、正中で2分し、一方を15%~20%濃度の緩衝ホルマリンで固定し送付用検体 (病理組織検査及び免疫組織化学検査材料) とすること。に、残りを**免疫生化学的検査 (ELISA法、ウエスタンブロット法等)** 材料とする。免疫生化学的検査材料の中で**門 (Obex)** を含むように横断した組織片を切り出し、スクリーニング検査試料とする。プリオンは**門 (Obex)** 中に一様に蓄積しているわけではないので、平均的に採取する必要がある。したがって、試料調整時には、切り出した組織片を、おおまかにハサミで細切して混ぜ、平均化して必要量を分取する。ただし、切り出し法以外の方法で採取する場合はこの限りではない。

図1. 牛脳の断面図



第3. 牛海綿状脳症用キット操作法

スクリーニング検査は、「プラテリア BSE」、「ダイナボット エンファーBSEテスト」、「フレライザ BSE」、「テセーBSE」、「プリオンスクリーン」又は「ニッピブルBSE」のいずれかの検査キットを用いることとし、その操作法はそれぞれ別添1-1、別添1-2、別添1-3、別添1-4、別添1-5又は別添1-6のとおりとする。

第4. 検査結果の保管

マイクロプレートリーダーにて読み出された生データについては、**別紙様式1-1**に入力する。**別紙様式1-1**の残りの記入事項についても入力し、署名した用紙及び電子データを保管すること。また、保管する用紙にはマイクロプレートリーダーにて読み出された生データ (感光紙にあつては、普通紙に印刷したものをを用いる。) を貼付すること。なお、確認検査のために検体送付を行う際には、生データを貼付した保管データの写しを併せて送付すること。

第5. 確認検査のための検体送付

牛海綿状脳症用キットにより**陽性**¹と判定された検体については都道府県等において確認検査を実施する場合を除き、以下の方法にて、確認検査のための検体送付を行う。

1. 送付先

送付先については、平成16年4月7日付け食安監発第0407001号通知の別添によるものとする。

2. 確認検査結果の連絡方法

監視安全課から検査依頼自治体あて連絡することとする。

なお、本件に関する問い合わせ先は、監視安全課乳肉安全係（電話）03-3595-2337とする。

3. 送付部位（図2のとおり）

問（Obex）を含む周辺組織を正中で2分し、

- (1) 一方を病理組織検査及び免疫組織化学検査材料として15%～20%濃度の緩衝ホルマリンで固定し、常温にて送付する。なお、検体を入れる容器は50mlのものとし、緩衝ホルマリンで満たすこと。
- (2) 残りを免疫生化学的検査（ELISA法、ウェスタンブロット法等）材料として、凍結状態にて送付する。検体採取の際に残ったサンプル及びELISAに用いたサンプルの残り（ホモジナイズした乳剤サンプル等）についても凍結状態にて併せて送付すること。

4. 送付の際の連絡方法

スクリーニング検査陽性と判定された検体の送付の際には、**別紙様式1-1**の検査結果表及び**別紙様式1-2**の検体送付票を添付し、検査機関への到着日及び時間帯（午前9時から12時又は午後1時から4時）を指定の上、送付すること。

また、**別紙様式1-1**の検査結果表及び**別紙様式1-2**の検体送付票を監視安全課乳肉安全係（FAX）03-3503-7964あてあらかじめ送付するとともに、同係（電話）03-3595-2337あて連絡すること。

なお、休日等の緊急連絡先については、BSE緊急連絡網を用いて連絡することとする。

5. 検体送付に当たっての注意

内国郵便約款（平成24年10月1日実施）第9条第4項に基づき、国連規格容器の適切な包装等を行い、送付すること。

また、検体送付のための運搬容器に関する情報及び梱包時の注意事項等については、別途通知²することとする。

なお、差出しに当たっては、当該郵便物の輸送方法を自所の配達を受け持つ集配郵便局（以下「受持郵便局」という。）に照会し、輸送方法により次のとおり措置の上、当該郵便局に差し出すこと。

¹ 第3の再検査において陽性と判定された場合をいう。

² 平成17年9月20日付け食安監発第0920005号監視安全課長通知

(1) 運送の途中において航空機による輸送が行われない検体在中郵便物

次の様式の紙片に必要事項をすべて記入し、郵便物の表面の見やすいところに貼付すること。

品名：	牛の組織等 「危険物」 (注1)
差出人：	
自治体名：	
検査所名：	
住所：	
電話番号：	
資格：	と畜検査員 (獣医師)
氏名：	

(注1) 朱記すること。

(2) 運送の途中において航空機による輸送が行われる検体在中郵便物 (注3)

1) 次の様式の紙片に必要事項をすべて記入し、郵便物の表面の見やすいところに貼付すること。

品名：	牛の組織等 「危険物」 (注1)
国連番号：	
差出人：	
自治体名：	
検査所名：	
住所：	
電話番号：	
資格：	と畜検査員 (獣医師)
氏名：	
	ドライアイス〇〇kg 在中 (注2)

(注1) 朱記すること。

(注2) ドライアイスを入れて送付する場合は朱記すること。

2) 検体を格納する容器は「国連規格容器」とすること。

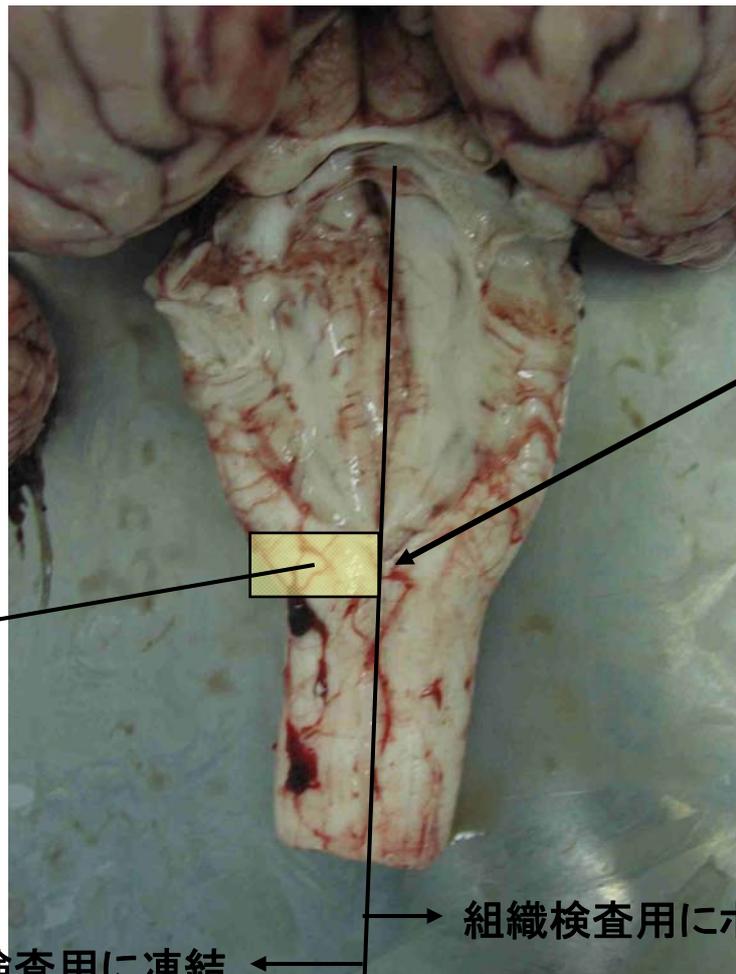
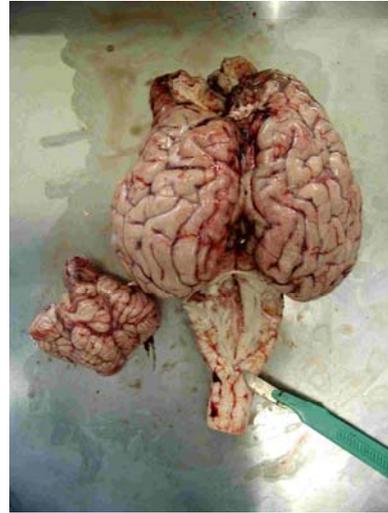
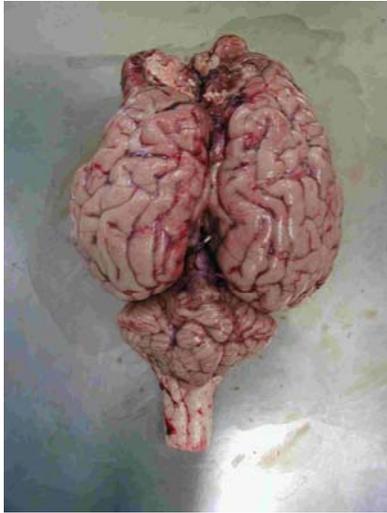
- 3) 1 容器当たりの内容量は、液体の場合は 1,000ml 未満、個体の場合は 50 g を限度とすること。
- 4) 郵便物の表面の見やすいところに輸送許容物件表示ラベル（分類番号：6.2）を貼付すること。（注 4）
- 5) 国連規格容器の外側にドライアイスを入れダンボール等で包んだ場合は、郵便物の表面の見やすいところに輸送許容物件表示ラベル（分類番号：9）を貼付すること。（注 4）
- 6) 上記 5) の場合は、郵便物の引受時に、検体が国連規格容器に格納されているかどうかを確認するため、郵便局職員が外側のダンボール等の開示を求める場合があるので、これに応じること。
- 7) 危険物申告書を 2 部作成し、小包とともに差し出すこと。（注 5）
なお、小包には、「危険物申告書在中」と記載した開封された封筒を貼付すること。郵便局において危険物申告書の内容を確認した後、返付されるので、郵便局職員立ち会いのもと、当該封筒に封入すること。

（注 3）航空機による輸送の場合、航空法第 8 6 条、航空法施行規則第 1 9 4 条及び関係告示等による規制を受ける。

（注 4）表示ラベルの様式は別紙様式 1 - 3 のとおり。（受持郵便局に必要分を請求する。）

（注 5）危険物申告書は別紙様式 1 - 4 のとおり。（なお、本件については、今回の検体輸送用に郵政公社・各航空会社間で特別に定めたものであり、他には使用できない。）

図2. BSE検査のための採材部位



検査部位

Obex
門

免疫生化学検査用に凍結

組織検査用にホルマリン固定

完全に異常プリオン蛋白を不活化させる処理

表1. 完全に異常プリオン蛋白を不活化させる処理¹

薬 剤	濃 度	処理時間	温 度
ギ 酸	≥60%	2時間	室 温
チオシアン酸グアニジン	≥ 4 M	2時間	室 温
塩酸グアニジン	≥ 7 M	2時間	室 温
三塩化酢酸	≥ 3 M	2時間	室 温
S D S	≥ 3 %	5分間	100℃
フェノール	≥50%	2時間	室 温

表2. 汚染材料の消毒法²

薬剤・方法等	温度 (℃)	時間 (分)	対象
焼 却	≥800	—	臓器、可燃物等
オートクレーブ	134	60	各種機材、器機、臓器、その他
3% S D S 浸漬**	100	5	各種機材、器機、その他
2 規定 NaOH 浸漬	室温	60	各種機材、器機、その他
1 規定 NaOH 浸漬	室温	120	各種機材、器機、その他
1～5%次亜塩素酸 ナトリウム浸漬	室温	120	各種機材、器機、その他

症例は、解剖室などにビニールシートを敷いてその上で解剖を行い、必要最小限の解体にとどめる。頭部を取り外す際、血液を容器に受けて汚染を最小限とする。また分離した頭部はプラスチック袋に収め、頸部にはプラスチック袋をかぶせる等の処置を行って汚染の拡大を防ぐ。

¹ 小野寺節、北本哲之、倉田毅、佐藤猛、立石潤：クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル，(厚生省保健医療局疾病対策課監修)，18-23，新企画出版社、東京（1997）

² 同上

(別紙様式 1 - 1)

(試 験 ・ 再 試 験)

検 査 日 平成 年 月 日

所属自治体名

所属検査所名

検査員名 (署名)

カットオフ値

カットオフ値の-10%

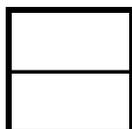
検 体 数

(陽性検体数、陰性検体数)

ロット番号

プラテリアBSE	プロティナーゼK	精製キット	検出キット
テセーBSE	精製キット	検出キット	
ダイナボットエンファーBSE	試薬パック	抗体パック	バッファーパック
フレライザBSE	試薬Aセット	試薬Bセット	検出用試薬セット
プリオンスクリーン	試薬キット	ホモジナイズ用プレート	
ニッピブルBSE	前処理用試薬セット	前処理用器材セット	検出用試薬セット

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



← サンプル名 (個体識別に用いている記号等) を記入

← 測定値を記入

※1 上記の表は、96穴プレートを示す。実際の検査において用いたウェルと対応して記入すること。
※2 なお、未使用のウェルには斜線を引くこと。

確認検査機関名:

受取人名:

自治体名:

担当者:

電話:

伝達性海綿状脳症確認検査検体送付票

1	送付年月日	検体送付元 (検査所名)	検体番号	検体重量 (g)	検体採取 年月日	採取動物に関する情報					備考
						種類・品種	性別	月齢	臨床症状	とさつ年月日	
				ELISA用乳剤							
				WB用							
				病理用							
出荷者			飼養者								
氏名	住所		電話	氏名	住所		電話				
2	送付年月日	検体送付元 (検査所名)	検体番号	検体重量 (g)	検体採取 年月日	採取動物に関する情報					備考
						種類・品種	性別	月齢	臨床症状	とさつ年月日	
				ELISA用乳剤							
				WB用							
				病理用							
出荷者			飼養者								
氏名	住所		電話	氏名	住所		電話				

検査キットの種類・ロット番号:

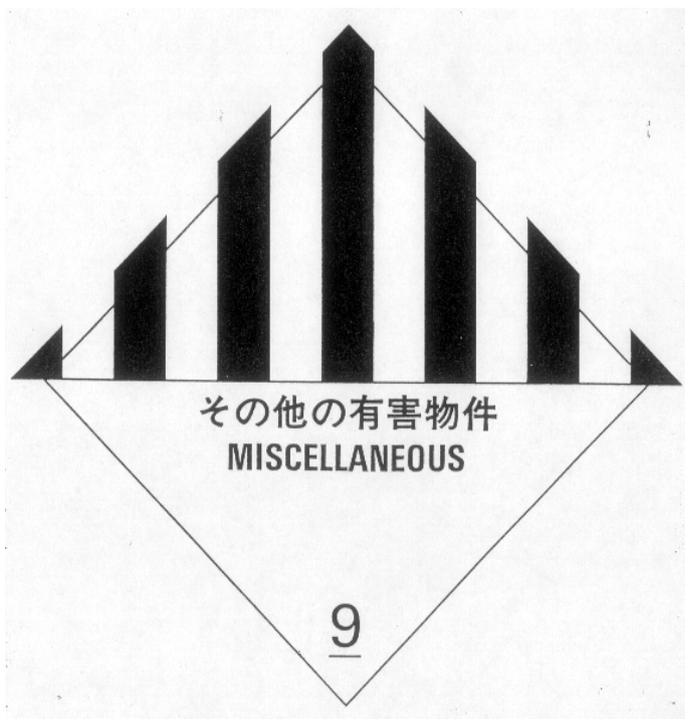
検査機関への検体到着予定日及び時間帯

月 日() 午前 時~ 時
午後 時~ 時

1 輸送許容物件表示ラベル (分類番号 : 6. 2)



2 輸送許容物件表示ラベル (分類番号 : 9)



(航空輸送)

(別紙様式 1 - 4)

郵便物に含まれる危険物申告書 (牛の組織等)

下記の郵便物の品名、数量等はすべて正確であり、国連規格容器に納入し、包装、表示等は航空法及びその関連規則に従って行われています。この郵便物は航空機への積載の制限範囲内のものであり、航空機による輸送に適した状態にあります。

申告書作成年月日		平成 年 月 日	
品名	牛の組織等		
	UN2814 UN2900	人体及び動物に対し伝染性がある病 を移しやすい物質 (液体)	(注1) ml
	UN2814 UN2900	人体及び動物に対し伝染性がある病 を移しやすい物質 (固体)	(注2) g
	UN1845	ドライアイス	kg
国連規格容器の外側にドライアイスを入れて更に別の容器等で包装			

差出人 自治体名： 検査所名： 住所： 電話番号： 氏名：と畜検査員 (獣医師)
受取人 機関名： 住所： 電話： 氏名：

航空会社使用欄

(注1) 内容物が液体の場合、1容器に納めることのできる総量は1,000ml未満です。

(注2) 内容物が個体の場合、1容器に納めることのできる総量は50gまでです。

(航空輸送)

(別紙様式 1 - 4) (記入例)

郵便物に含まれる危険物申告書 (牛の組織等)

下記の郵便物の品名、数量等はすべて正確であり、国連規格容器に納入し、包装、表示等は航空法及びその関連規則に従って行われています。この郵便物は航空機への積載の制限範囲内のものであり、航空機による輸送に適した状態にあります。

申告書作成年月日		平成 14 年 10 月 30 日	
品 名		牛の組織等	
	UN 2814 UN 2900	人体及び動物に対し伝染性がある病 毒を移しやすい物質 (液体)	(注 1) ml
✓	UN 2814 UN 2900	人体及び動物に対し伝染性がある病 毒を移しやすい物質 (固体)	(注 2) 40 g
✓	UN 1845	ドライアイス	3 kg
✓	国連規格容器の外側にドライアイスを入れて更に別の容器等で包装		

差出人 自治体名：〇〇県 検査所名：〇〇食肉衛生検査所 住 所：〇〇市〇〇 1 - 2 - 3 電話番号：〇〇〇〇 - 〇〇〇 - 〇〇〇〇 氏 名：と畜検査員 (獣医師) 〇〇 〇〇
受取人 機 関 名：〇〇検査センター 住 所：〒000-000 〇〇県〇〇市 3 - 2 - 1 電 話：〇〇〇〇 - 〇〇〇 - 〇〇〇〇 氏 名：〇〇 〇〇

航空会社使用欄

(注 1) 内容物が液体の場合、1 容器に納めることのできる総量は 1,000ml 未満です。

(注 2) 内容物が個体の場合、1 容器に納めることのできる総量は 50g までです。

「プラテリア BSE」 操作法

1. サンプルの精製

(1) 試薬の調整

処理検体数に応じて（下表参照）、BSE精製キットの溶解液(Reagent A)でプロテイナーゼ Kを 250 倍に希釈する。

（希釈したプロテイナーゼK溶液は、室温で4時間保存可能である。）

検体数	Reagent A の容量	プロテイナーゼ K の容量
2	2 ml	8 μ l
10	6 ml	24 μ l
18	10 ml	40 μ l
26	14 ml	56 μ l
34	18 ml	72 μ l
42	22 ml	88 μ l
50	26 ml	104 μ l
58	30 ml	120 μ l
66	34 ml	136 μ l
74	38 ml	152 μ l
82	42 ml	168 μ l
90	46 ml	184 μ l

(2) 異常プリオンペプチド精製

- ウシの胃 (Obex) 部位を 350 ± 40 mg を量り取る。
- 量り取った検体をグライディングチューブに入れる。
- グライディングチューブに入れたサンプルを完全にホモジナイズする。（この時点でホモジナイズしたサンプルは、 -20 °Cで数週間保存可能である。保存する場合、凍結・融解は一回限りとする。）
- ホモジネートされたサンプルから固形物を含まないように注意しながら 500 μ l 量り取り、 2 ml マイクロチューブ等に移す。（この時点でサンプルは、 $2 \sim 8$ °Cで 8 時間、 -20 °Cで数週間保存可能である。）
- 上記 1. (1) で希釈したプロテイナーゼ K溶液を 500 μ l 加え、よく混和する。酵素活性を均一にするため、プロテイナーゼK溶液を加える作業は、**5分以内**にすばやく行う。氷上に置いた場合は 10 分以内に行う。
- よく混和したら、すばやく湯浴、インキュベーター又はヒートブロック等に置き、 **37 ± 1 °C、 10 ± 1 分間のインキュベーション**を行う。5) と 6) との操作の間の時間は **2分以上**置いてはならない。

- 7) インキュベーション終了後、**2分以内**（チューブを氷上においた場合には**10分以内**）に **Reagent B** を 500 μ l 加え、溶液全体が青くなるまでよく混和する。（**Reagent B** を加える作業は、**5分以内**にすばやく行う。氷上においた場合は10分以内に行う。）
- 8) **20,000 \times g** で **5分間**又は **15,000 \times g** で **7分間**遠心する。
- 9) 遠心終了後、**5分以内**に上清を廃棄する。上清をできるだけ取り除くために、チューブを上下逆さにしてペーパー上に5分間置くか、あるいはアスピレーターで5分間吸引乾燥させる。
- 10) 上清を廃棄した後、**10分以内**にマイクロチューブに **Reagent C1** を 50 μ l 加える。ここではボルテックスで混和してはならない。
- 11) すばやく湯浴、インキュベーターまたはヒートブロック等に置き、**100 \pm 1 $^{\circ}$ C**、**5 \pm 1分間**のインキュベーションを行うこと。10) と 11) の操作の間の時間は**2分以上置い**てはならない。
- 12) インキュベーターからマイクロチューブを取り出し、ボルテックスでよく混和する。（この時点で、サンプルは2 \sim 8 $^{\circ}$ Cで5時間、-20 $^{\circ}$ Cで数週間保存可能である。保存した場合は、いずれも **100 \pm 1 $^{\circ}$ C**、**5 \pm 1分間**のインキュベーションを行った後、ボルテックスでよく混和する。）
- 13) **BSE 検出キットの希釈液(R6)**を 250 μ l 加え、混和する。（この時点でサンプルは2 \sim 8 $^{\circ}$ Cで5時間保存可能である。保存した場合は、よく混和してから、次の作業を行う。）混和後、検出キットのマイクロプレートのウェルにサンプルを分注する。（2. (2) 2) に続く。）

2. サンプル検出

(1) 試薬の調整

- 1) 使用する試薬、固相化マイクロプレートは、使用する前に冷蔵庫から出して常温（20 \pm 5 $^{\circ}$ C）に戻しておく。
- 2) **洗浄原液（R2）**を精製水で10倍希釈し、混和して**洗浄液（R2'）**とする。（2 \sim 8 $^{\circ}$ Cで2週間保存可能である。）
- 3) **陽性コントロール（R4）**の瓶を軽くタッピングしてから開封し、精製水または希釈液（R6）を2 ml 加える。1分間放置した後、緩やかに混和して、溶解する。（2 \sim 8 $^{\circ}$ Cで2時間、適量に分注した後、-20 $^{\circ}$ Cで6ヶ月間保存可能である。）冷凍保存する場合は溶解後、直ちにマイクロチューブ等に小分けし-20 $^{\circ}$ Cで保存する。
- 4) 使用直前に**酵素標識抗体（R7）**を洗浄液で10倍希釈し、緩やかに混和して**酵素標識抗体液（R7'）**とする。1本のストリップに対して1 ml の酵素標識抗体液（R7'）が必要となる。（2 \sim 8 $^{\circ}$ Cで6時間保存可能である。）
- 5) アルミ箔等で遮光した容器に、**基質緩衝液（R8）**と**発色液（R9）**を10：1の割合で混合し、**基質発色液（R8+R9）**とする。1本のストリップに対して1 ml の基質発色液（R8+R9）が必要となる。（室温で6時間保存可能である。ただし、使用時に青く呈色している場合は、使用できないので新しく調整し直す。）

(2) 異常プリオンの検出

- 1) マイクロプレートラックから必要な数だけストリップを取り出す。(使用しないストリップは袋に戻し、乾燥剤を入れ、しっかりと空気を除きながら開封口を閉める。2~8°Cで1ヶ月保存可能である。)
- 2) 以下のように**陰性コントロール(R3)**、**陽性コントロール(R4)**及び BSE 精製キットで調整した**サンプル**をマイクロプレートのウェルに分注する。複数枚のプレートを使用して検査する場合はプレートごとに、また1枚のマイクロプレートを複数回に分けて使用する場合は測定ごとに、それぞれコントロールをおく。

-A1, B1, C1, D1:	陰性コントロール(R3)	100 μ l
-E1, F1:	陽性コントロール(R4)	100 μ l
-G1, H1:	サンプル	100 μ l
- 3) シーリングフィルムで覆い、ヒートブロック (が望ましい) や孵卵器等で 37 \pm 1°C で75 \pm 15分のインキュベーションを行う。
- 4) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22°C) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800 μ l のオーバーフロー設定で3回の洗浄サイクルとする。手動で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350 μ l を注入・除去する作業を3~6回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 5) **酵素標識抗体液(R7')**を 100 μ l ずつ、各ウェルに分注する。
- 6) シーリングフィルムで覆い、2°C~8°Cで 60 \pm 5分のインキュベーションを行う。
- 7) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22°C) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800 μ l のオーバーフロー設定で5回の洗浄サイクルとする。手動で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350 μ l を注入・除去する作業を5~10回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 8) 基質発色液 (**R8+R9**) 100 μ l をウェルに分注し、アルミ箔でプレートを覆う等の処置をし、暗所遮光で30分、室温 (18~22°C) でインキュベーションを行う。インキュベーションの際、フィルムは使用してはならない。
- 9) **反応停止液(R10)**100 μ l をウェルに分注する。
- 10) 停止液添加後、30分以内にマイクロプレートリーダーで**主波長 450nm**、**副波長¹620nm**における OD を測定する。測定を行うまでは、常に光を避けるようにすること。

¹ 副波長については、600nm~700nm までの範囲においては判定に影響を及ぼさない。

3. 判定

判定は、次のようにカットオフ値を計算し、それを利用する。

$$\text{カットオフ値} = (\text{4つの陰性コントロールの平均吸光度} + \text{定数 } 0.210)$$

定数は、定期的に見直しを行うためキットの説明書に記載されている値を適用すること。

OD 値 < カットオフ値の-10% のとき陰性

OD 値 \geq カットオフ値の-10% のとき再検査

上記により再検査となったときは、マイクロプレートの2穴を利用し、1.(2)4)における保存サンプルを用いて行う（再検査は、別の検査員が行うことが望ましい。）。

また、測定系は、陰性コントロール及び陽性コントロールの吸光度が以下の条件を満たしていることにより確認する。

- ① 陰性コントロールの吸光度が4穴とも全て < 0.150
- ② 陽性コントロールの吸光度が2穴とも全て \geq 1.000

再検査における判定は次のとおりとする。

- (1) 2穴のうち、いずれか一方のOD値がカットオフ値以上、又はカットオフ値の-10%以内のOD値を得たときは、陽性と判定する。
- (2) 2穴ともカットオフ値の-10%未満であったときは、陰性と判定する。

(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。

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、2750G 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		Skanswasher 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	

洗浄 2	洗浄剤 2 を用い プロトコール 2 で洗浄		Skanswasher 300 洗浄器	洗浄後 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
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		
洗浄 3	洗浄剤 2 を用 い、プロトコ ール 2 で洗浄		Skanswasher 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
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		
洗浄 4	洗浄剤 2 を用 い、プロトコ ール 2 で洗浄		Skanswasher 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
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)



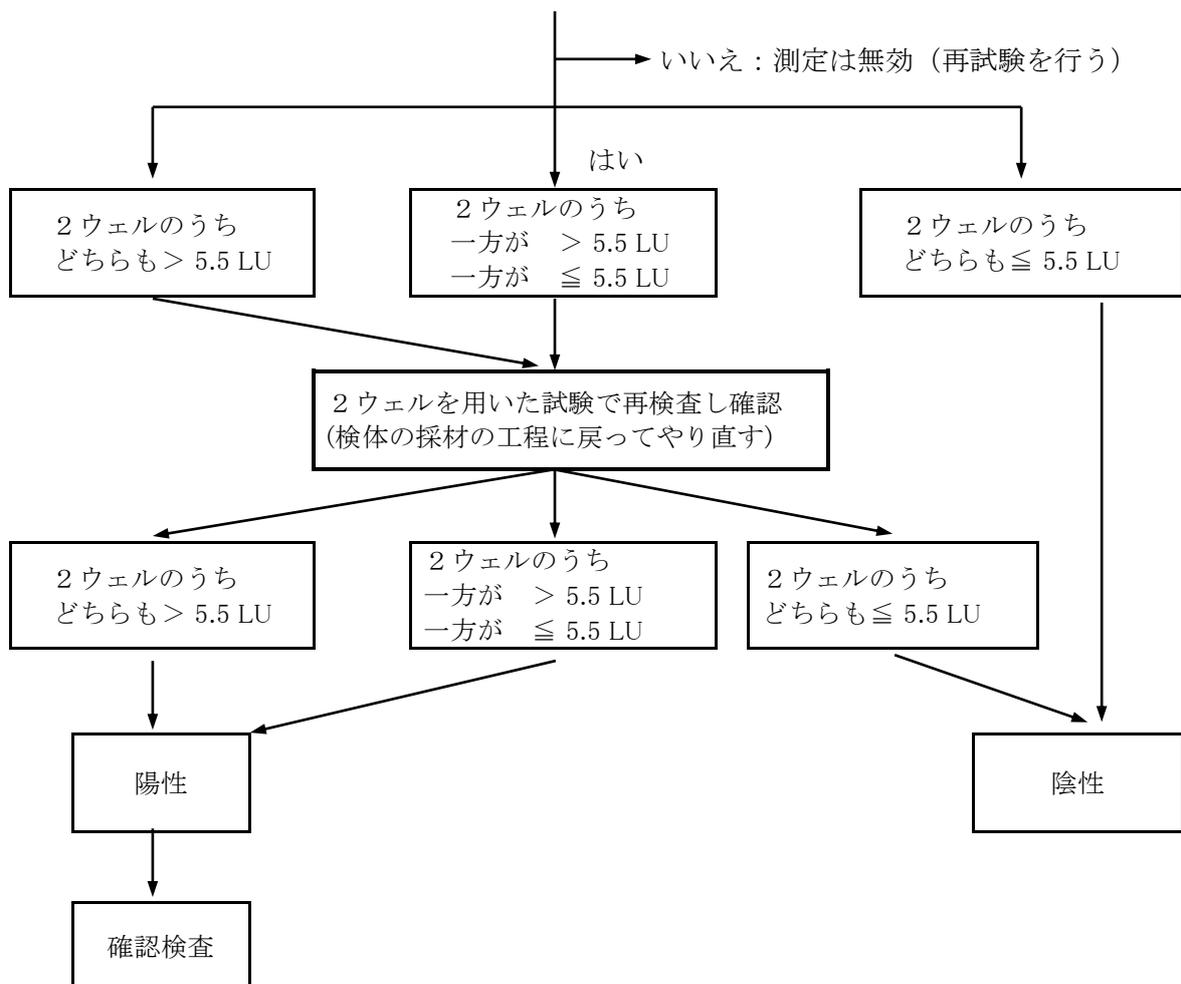
ブランクコントロール

- ・ 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、再検査で使った乳剤を培養用の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。

「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	ウェル	96ウェル	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	ウェル	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	50	1.5
10	80	2.4
25	160	4.8
50	300	9.0
80	450	13.5
100	600	18.0

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 用若しくは破碎用チューブ（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）*

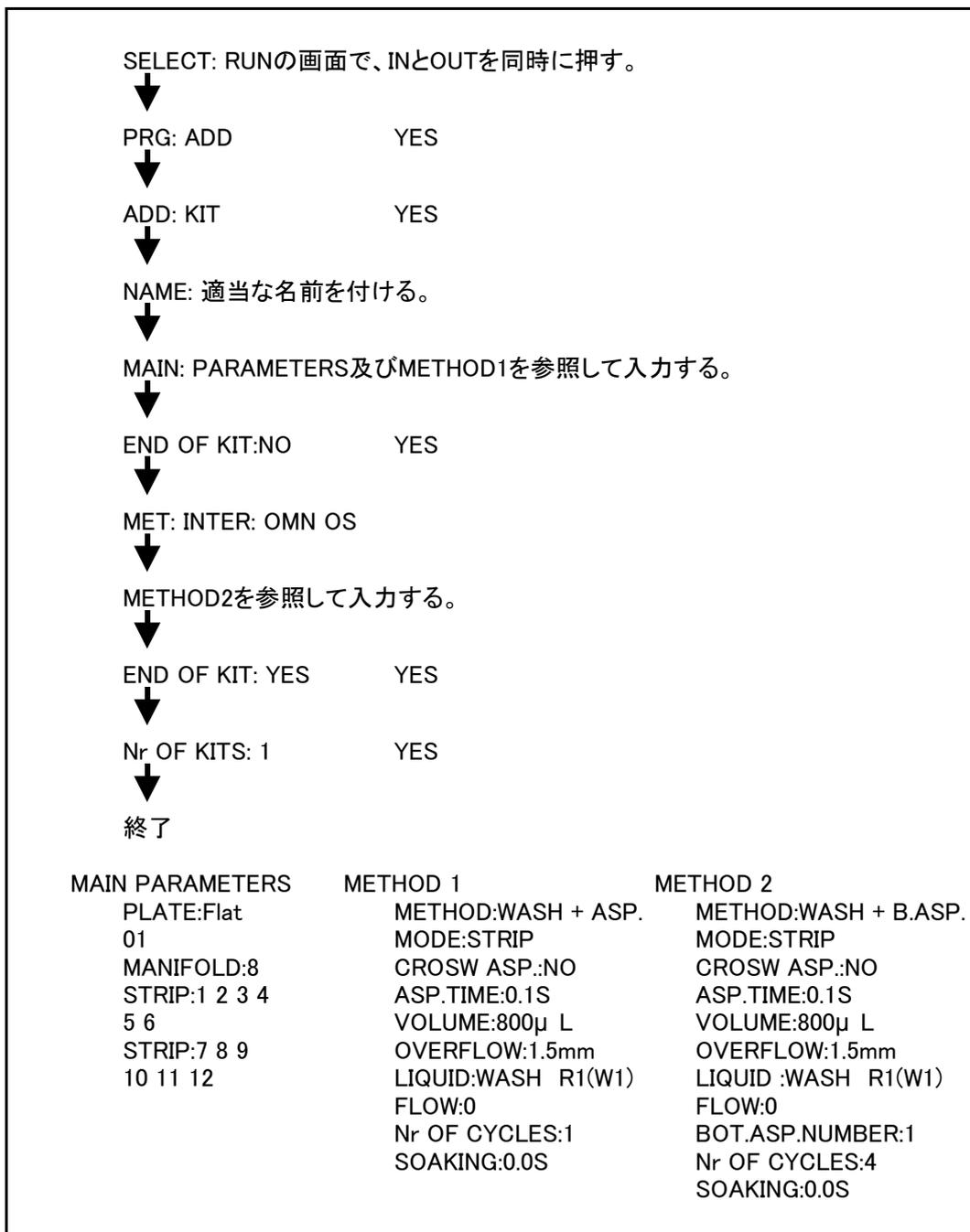
サンプルチューブ：サンプリングチューブ 2mL 用若しくは凍結保存チューブ 2 mL 用

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:800μ L	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: 250μ L		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:300μ L	37(±1)℃、 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:150μ L/遠 心分離	15,000G,10分 (25-30℃)	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:50μ L	100℃、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:100μ L				
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:100μ L NC:100μ L(2ウェル) PC:100μ L(1ウェル) + 希釈標識抗体液:50μ L	37℃、1時間	マイクロピペット / 連続分注器/ インキュベータ -		標識抗体を分注する際に飛沫が近隣のウェ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:100 μ L	室内温度 (20-30℃)	連続分注器/ インキュベータ -		遮光に気をつける
反応停止	反応停止液添加: 100μ L		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可能性があるため、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。

「テセーBSE」 操作法

1. サンプルの精製

(1) 試薬の調製

処理検体数に応じて（下表参照）、BSE精製キットの溶解液(Reagent A)でプロテイナーゼ Kを 250 倍に希釈する。

（希釈したプロテイナーゼK溶液は、室温（18～30℃）で 6 時間保存可能である。）

検体数	Reagent Aの容量	プロテイナーゼ Kの容量
2	1ml	4 μl
10	3ml	12 μl
18	5ml	20 μl
26	7ml	28 μl
34	9ml	36 μl
42	11ml	44 μl
50	13ml	52 μl
58	15ml	60 μl
66	17ml	68 μl
74	19ml	76 μl
82	21ml	84 μl
90	23ml	92 μl

(2) 異常プリオンペプチド精製

試薬は室温（18～30℃）に戻してから使用する

- ウシの胃（Obex）部位を **350±40 mg** を量り取る。
- 量り取った検体をグラインディングチューブに入れる。
- グラインディングチューブに入れたサンプルを完全にホモジナイズする。（この時点でホモジナイズしたサンプルは、室温（18～30℃）で 8 時間、2～8℃で 15 時間、-20℃で 1 年間保存可能である。保存する場合、凍結・融解は 3 回限りとする。）
- ホモジネートされたサンプルから固形物を含まないように注意しながら **250 μl** 量り取り、**2 ml マイクロチューブ**等に移す。（この時点でサンプルは、室温（18～30℃）で 8 時間、2～8℃で 1 5 時間、-20℃で 1 年間保存可能である。）
- 上記 1. (1) で希釈した**プロテイナーゼ K溶液**を **250 μl** 加え、よく混和する。酵素活性を均一にするため、プロテイナーゼK溶液は、**最初のサンプルから最後のサンプルまで 5 分以内**にすばやく加える。氷上に置いた場合は 10 分以内に行う。
- よく混和したら、すばやく湯浴、インキュベーター又はヒートブロック等に置き、**37±2℃、10±1 分間**のインキュベーションを行う。5) のサンプル混和とインキュベーションの間の時間は**2 分以上置いてはならない**。
- インキュベーション終了から **2 分以内**（チューブを氷上においた場合には 10 分以

内)に **Reagent B** を $250\ \mu\text{l}$ 加え、溶液全体が青くなるまでよく混和する。(Reagent B は最初のサンプルから最後のサンプルまで、**5分以内**にすばやく加える。氷上においた場合は10分以内に行う。)

- 8) **20,000×g** で **5分間** 又は **15,000×g** で **7分間** 遠心する。
- 9) 遠心終了から、**5分以内**に上清を廃棄する。上清をできるだけ取り除くために、チューブを上下逆さにしてペーパー上に5分間置くか、あるいはアスピレーターで5分間吸引乾燥させる。
- 10) 上清を廃棄した後、**10分以内**にマイクロチューブに **Reagent C** を $25\ \mu\text{l}$ 加える。ここではボルテックスで混和してはならない。
- 11) すばやく湯浴、インキュベーターまたはヒートブロック等に置き、**100±5 °C、5±1 分間**のインキュベーションを行うこと。**Reagent C 添加とインキュベーションの間の時間は2分以上置いてはならない。**
- 12) インキュベーターからマイクロチューブを取り出し、ボルテックスでよく混和する。(この時点で、サンプルは2~8°Cで5時間、-20°Cで**72時間**保存可能である。保存した場合は、いずれも **100±5°C、5±1 分間**のインキュベーションを行った後、ボルテックスでよく混和する。)
- 13) BSE 検出キットの**希釈液(R6)**を $125\ \mu\text{l}$ 加え、混和する。混和後、検出キットのマイクロプレートのウェルにサンプルを分注する。(2. (2) に続く。)

2. サンプル検出

(1) 試薬の調製

- 1) 使用する試薬、固相化マイクロプレートは、使用する前に冷蔵庫から出して**室温 (18~30°C)** に戻しておく。
- 2) **洗浄原液 (R2)** を精製水で10倍希釈し、混和して**洗浄液 (R2')** とする。(室温 (18~30°C) で24時間、2~8°Cで2週間保存可能である。)
- 3) **陽性コントロール (R4)** の瓶を軽くタッピングしてから開封し、希釈液 (R6) を $4\ \text{ml}$ 加える。1分間放置した後、緩やかに混和して、溶解する。(室温 (18~30°C) で**2時間**、2~8°Cで**4時間**、適量に分注した後、-20°Cで6ヶ月間保存可能である。) 冷凍保存する場合は溶解後、直ちにマイクロチューブ等に小分けし-20°Cで保存する。
- 4) 使用直前に**酵素標識抗体 (R7)** を洗浄液で10倍希釈し、緩やかに混和して**酵素標識抗体液 (R7')** とする。1本のストリップに対して $1\ \text{ml}$ の酵素標識抗体液 (R7') が必要となる。(18~30°Cで8時間保存可能である。)
- 5) アルミ箔等で遮光した容器に、**基質緩衝液 (R8)** と**発色液 (R9)** を10:1の割合で混合し、**基質発色液 (R8+R9)** とする。(発色液 (R9) においては稀に成分の析出が認められるため、確実に室温に戻し溶解を確認した後、使用する。) 1本のストリップに対して $1\ \text{ml}$ の基質発色液 (R8+R9) が必要となる。(室温 (18~30°C) で遮光し、6時間保存可能である。ただし、使用時に青く呈色している場合は、使用できないので新しく調製し直す。)

(2) 異常プリオンの検出

- 1) マイクロプレートラックから必要な数だけストリップを取り出す。(使用しないストリップは袋に戻し、乾燥剤を入れ、しっかりと空気を除きながら開封口を閉める。2~8℃で1ヶ月保存可能である。)
- 2) 以下のように**陰性コントロール(R3)**、**陽性コントロール(R4)**及びBSE精製キットで調製した**サンプル**をマイクロプレートのウェルに分注する。複数枚のプレートを使用して検査する場合はプレートごとに、また1枚のマイクロプレートを複数回に分けて使用する場合は測定ごとに、それぞれコントロールをおく。

-A1, B1, C1, D1:	陰性コントロール(R3)	100 μ l
-E1, F1:	陽性コントロール(R4)	100 μ l
-G1, H1:	サンプル	100 μ l
- 3) シーリングフィルムで覆い、ヒートブロック (が望ましい) や孵卵器等で **37±2℃** で **75±15分** のインキュベーションを行う。
- 4) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22℃) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800 μ l のオーバーフロー設定で3回の洗浄サイクルとする。手で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350 μ l を注入・除去する作業を3~6回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 5) **酵素標識抗体液(R7')** を 100 μ l ずつ、各ウェルに分注する。
- 6) シーリングフィルムで覆い、2~8℃で 60±5 分のインキュベーションを行う。
- 7) シーリングフィルムをはがし、プレートを洗浄液 (18~22℃) で洗浄する。自動のマイクロプレートウォッシャーで洗浄する場合は、1ウェルあたり 800 μ l のオーバーフロー設定で5回の洗浄サイクルとする。手で洗浄する場合は、ウェル上の溶液を除去した後、洗浄液 350 μ l を注入・除去する作業を5~10回 (洗浄回数は値を見ながら調整する) 繰り返す。洗浄終了後、洗浄液をウェルの中から完全に除去するために、ペーパーの上で液を叩き出す。この状態で5分以上置いてはならない。
- 8) 基質発色液 (**R8+R9**) 100 μ l をウェルに分注し、アルミ箔でプレートを覆う等の処置をし、暗所遮光で **30±5分**、18~22℃でインキュベーションを行う。インキュベーションの際、フィルムは使用してはならない。
- 9) **反応停止液(R10)** 100 μ l をウェルに分注する。
- 10) 停止液添加後、30分以内にマイクロプレートリーダーで**主波長 450nm**、**副波長**

^{*1} **620nm** における OD を測定する。測定を行うまでは、常に光を避けるようにすること。

*1 副波長については、600nm~700nm までの範囲においては判定に影響を及ぼさない。

3. 判 定

判定は、次のようにカットオフ値を計算し、それを利用する。

$$\text{カットオフ値} = (\text{4つの陰性コントロールの平均吸光度} + \text{定数 } 0.210)$$

OD 値 < カットオフ値の-10% のとき陰性

OD 値 \geq カットオフ値の-10% のとき再検査

上記により再検査となったときは、マイクロプレートの2穴を利用し、1. (2) 4)における保存サンプルを用いて行う（再検査は、別の検査員が行うことが望ましい。）。

また、測定系は、陰性コントロール及び陽性コントロールの吸光度が以下の条件を満たしていることにより確認する。

- ① 陰性コントロールの吸光度が4穴とも全て < 0.150
- ② 陽性コントロールの吸光度が2穴とも全て \geq 1.000

再検査における判定は次のとおりとする。

- (1) 2穴のうち、いずれか一方のOD値がカットオフ値以上、又はカットオフ値の-10%以内のOD値を得たときは、陽性と判定する。
- (2) 2穴ともカットオフ値の-10%未満であったときは、陰性と判定する。

「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。

「ニッピブル® BSE 検査 キット」 操作方法

1. キットの構成

[構成]

1) ニッピブル®BSE 検査キット前処理用

1-1) 前処理用試薬セット

No. 名称	容量
① 試薬 A 破砕用緩衝液	220mL×1 本
② 試薬 B プロテイナーゼ K	2.2mL×1 本
③ 試薬 C マイクロバイアルセリンプロテイナーゼ	2.2mL×1 本

1-2) 前処理用器材セット

No. 名称	容量
④ バイオマッシャー® 【図 1】 I 破砕棒	186 個
II フィルターチューブ	186 個
⑤ 回収用チューブ (ジルコニアビーズ入り)	186 個

2) ニッピブル®BSE 検査キット検出用

検出用試薬セット

No. 名称	容量
⑥ 抗体プレート 抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体	96 ウェル×2 枚
⑦ 標識抗体溶液 HRP 標識抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体	0.8mL×1 本
⑧ 標識抗体用希釈液 トリス緩衝液	24mL×1 本
⑨ 陽性コントロール リコンビナント牛プリオン蛋白質	凍結乾燥品×1 本
⑩ 陰性コントロール トリス緩衝液	6mL×1 本
⑪ 基質液 TMB 発色基質液	15mL×2 本
⑫ 停止液 0.5mol/L 硫酸	30mL×1 本
⑬ 濃縮洗浄液 リン酸緩衝液	100mL×1 本

付属品 プレートカバーシール 8 枚

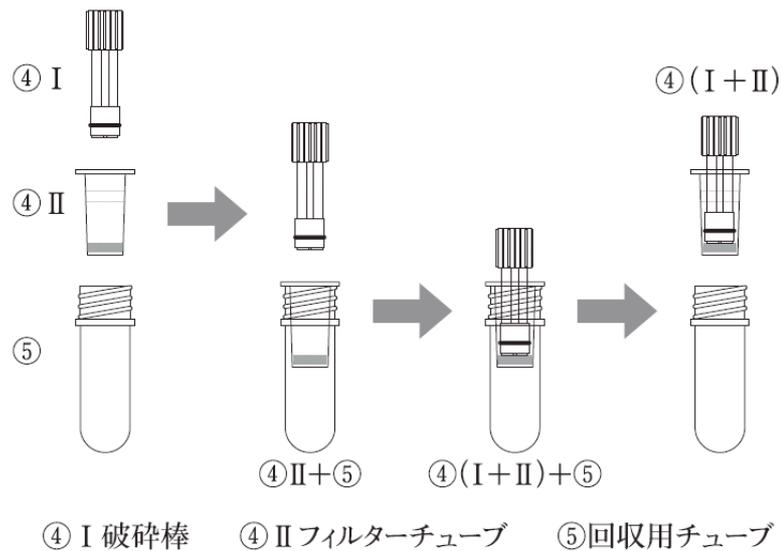


図 1. バイオマッシャー®

【貯蔵方法】

前処理用器材セット	: 室温
前処理用試薬セット	: 2~8°C
検出用試薬セット	: 2~8°C

【キットには含まれない器具および器材】

- 冷蔵庫 (2~8°C)
- 恒温器 (37°C。96 ウェルプレートを保温できるもの)
- 恒温器 (56°C。2mL チューブを保温できるもの)
- 恒温器 (100°C。2mL チューブを保温できるもの) または煮沸器
- 遠心分離機 (2mL チューブが使用可能であり 15,000×g の回転が可能なもの)
- 細胞破碎装置
- プレートリーダー (測定波長: 450nm および 580~650nm を測定できるもの)
- プレートウォッシャー
- マイクロピペットおよびチップ
- 酵素混合液用試験管
- 希釈標識抗体液用試験管
- 洗浄液調製用メスシリンダーおよびビーカー
- 基質液用試験管
- 精製水

2. 前処理操作のための準備

1) 恒温器の設定

前処理の作業を開始する前に 2 台の恒温器の電源を入れ、温度をそれぞれ 56°C と 100°C に設定する。

2) 酵素混合液の調製

①試薬 A、②試薬 B および③試薬 C を静かに転倒混和し、変化のないことを確認する。

試薬 A の量は (検体数+1) mL とする。試薬 A、試薬 B および試薬 C を表に従い 100:1:1 の比率で混合し、酵素混合液を調製する。酵素混合液は緑色を呈する。酵素混合液は用時調製し、使用まで氷上、あるいは冷蔵庫内で静置する。

表. ①試薬 A、②試薬 B および③試薬 C の混合例

検体数	①試薬 A	②試薬 B	③試薬 C
2	3 mL	30 μ L	30 μ L
10	11 mL	110 μ L	110 μ L
15	16 mL	160 μ L	160 μ L
20	21 mL	210 μ L	210 μ L
25	26 mL	260 μ L	260 μ L
30	31 mL	310 μ L	310 μ L
35	36 mL	360 μ L	360 μ L
40	41 mL	410 μ L	410 μ L
45	46 mL	460 μ L	460 μ L
50	51 mL	510 μ L	510 μ L

3. 前処理操作

- 1) 門部を含む延髄 110 \pm 20mg を採取する。
- 2) バイオマッシャー®の④ II フィルターチューブを⑤回収用チューブ内にセットし、採取した組織を入れ、試料がフィルター面に接するまで④ I 破碎棒を確実に押し込む。
- 3) 15,000 \times g, 30 秒間の遠心分離操作を行う。
- 4) フィルターチューブと破碎棒(④ I +④ II)を取り外し廃棄する。⑤回収用チューブに酵素混合液 1mL を加える。
- 5) 蓋を締め、細胞破碎装置*により全体が均一になるまで攪拌する。
*FastPrep (Qbiogene) を使用する場合は、強度 4 で 30 秒間攪拌する。
マルチビーズショッカー (安井器械) を使用する場合は、2,000rpm で 30 秒間攪拌する。
- 6) 恒温器 (56 $^{\circ}$ C) で 10 分間反応させる。
- 7) 数回転倒混和し、すぐに 100 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させる。
- 8) 室温まで冷却する。氷冷等による急冷も可能である。
- 9) 冷却後、混和し (試験管ミキサーでも可) 検出用試薬セットにより異常プリオン蛋白質の検出を行う。

4. 検出操作のための準備

- 1) 恒温器の設定
検出の作業を開始する前に恒温器の電源を入れ、温度を 37 $^{\circ}$ C に設定する。
- 2) 洗浄液の調製
③濃縮洗浄液は、40 倍の濃度である。使用前に常温に戻し十分に転倒混和する。濃縮洗浄液 25 mL に対して精製水を 975mL 加え混和する。これを洗浄液とする。保存をする場合は冷蔵し、2 週間以内に使用する。
- 3) 希釈標識抗体液の調製
希釈標識抗体液は、1 検体当たり 100 μ L 必要である。
使用前に、別に用意した標識抗体液用試験管を用いて、⑧標識抗体用希釈液 [青色] で⑦標識抗体溶液を 30 倍希釈し、希釈標識抗体液とする。希釈標識抗体液は青色を呈する。
この操作は、希釈標識抗体液添加の直前の洗浄前に行う。
⑦標識抗体溶液の残りは、強く蓋を締め冷蔵で保存する。有効期限内に再度使用できる。
*例: 1 ストリップ (8 ウェル) の場合
標識抗体溶液 30 μ L を取り、標識抗体用希釈液を 870 μ L 加えよく混和後、100 μ L ずつ使用する。
- 4) 基質液
①基質液は、1 検体当たり 100 μ L 必要である。
測定検体数分に余剰分を加味した分量を、別に用意した基質液用試験管に直接移し、そこから正確に 100 μ L ずつ使用する。一度試験管に移した基質液は元に戻さないこと。バックグ

ラウンドの上昇の原因となる。

⑪基質液の残りは、強く蓋を締め冷蔵で保存する。有効期限内に再度使用できる。

5) 陽性コントロールの調製

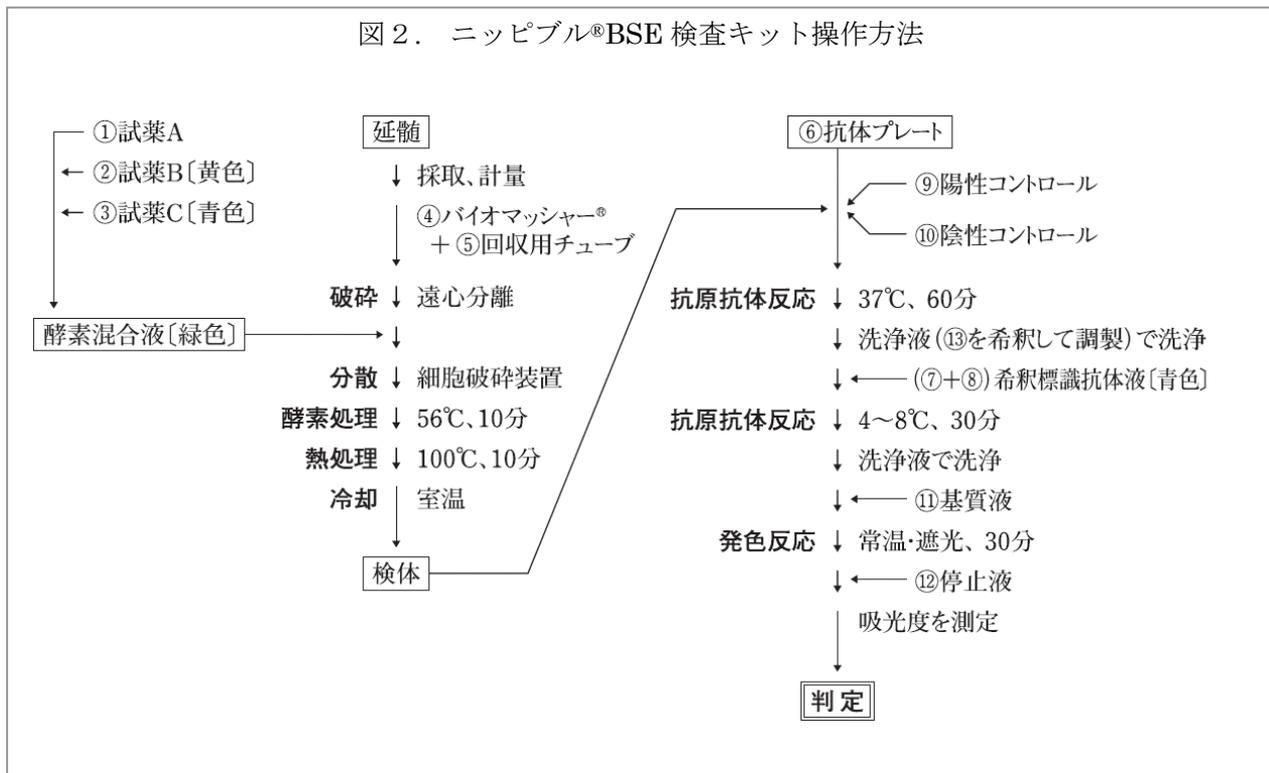
⑨陽性コントロールのバイアル瓶に精製水を 3mL 加えて完全に溶解し、そのまま使用する。溶解当日に測定に供しないものは冷蔵する。

5. 検出操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事確かめること。検体の測定と同時に陽性コントロールと陰性コントロールを測定する。

- 1) ⑥抗体プレートの2ウェルに⑩陰性コントロールを 100 μ L ずつ分注する。
- 2) 調製済み検体と⑨陽性コントロールを抗体プレートにそれぞれ 100 μ L ずつ分注する。
- 3) 抗体プレートにシールをして 37°Cの恒温器中で 60 分間反応させる。
- 4) 300 μ L 以上の洗浄液で洗浄操作を 4 回行う。(推奨設定：1 回の洗浄につき洗浄液 700uL のオーバーフロー洗浄)
4 回の洗浄後、残液を完全に取り除く。次の操作までに 5 分間以上空けない。
- 5) 希釈標識抗体液を各ウェルに 100 μ L ずつ分注する。
- 6) 抗体プレートにシールをして 4~8°Cで 30 分間反応させる。
- 7) 300 μ L 以上の洗浄液で洗浄操作を 6 回行う。(推奨設定：1 回の洗浄につき洗浄液 700uL のオーバーフロー洗浄)
6 回の洗浄後、残液を完全に取り除く。次の操作までに 5 分間以上空けない。
- 8) すべてのウェルに⑪基質液を 100 μ L ずつ分注し、遮光下、常温で 30 分間反応させる。陽性コントロールのウェルは徐々に青色に変化する。
- 9) すべてのウェルに⑫停止液を 100 μ L ずつ分注する。陽性コントロールのウェルは青色から黄色に変化する。
- 10) プレート底面のよごれや水滴を拭き取り、液面に気泡がないことを確認した後、30 分以内に検体・陽性コントロール・陰性コントロールのそれぞれについて、主波長 450nm および副波長 580~650nm の吸光度を測定する。

図 2. ニッピブル®BSE 検査キット操作方法



6. 判定方法

1) 測定系の確認

陰性コントロールの吸光度の平均値および陽性コントロールの吸光度が以下の条件を満たしていることを確認する。以下の条件を満たしていない場合は検出操作に問題がある可能性がある。3.前処理操作を終了した検体を用いて、5. 検出操作から繰り返し実施する。

$$[\text{陰性コントロールの吸光度の平均値}] \leq 0.20$$

$$[\text{陽性コントロールの吸光度}] - [\text{陰性コントロールの吸光度の平均値}] \geq 1.20$$

2) カットオフ値の算出

陰性コントロールの吸光度の平均値に 0.30 を足した数値をカットオフ値とする。

$$[\text{カットオフ値}] = [\text{陰性コントロールの吸光度の平均値}] + 0.30$$

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。

$$\text{陽性：} [\text{検体の吸光度}] \geq [\text{カットオフ値}]$$

$$\text{陰性：} [\text{検体の吸光度}] < [\text{カットオフ値}]$$

4) 判定上の注意

4-1) カットオフ値よりわずかに低い吸光度（-10%以内）を示した検体および陽性と判定された検体は再検査を実施する。

4-2) 再検査は、3. 前処理操作から実施する。先に採取した部位の近傍から延髄 110±20mg を採取する。

4-3) 再検査は 1 検体につき 2 ウェルを使用して試験する。

4-4) 再検査において少なくとも 1 つのウェルがカットオフ値以上の値を示した場合は陽性と判定する。

4-5) 本製剤で陽性と判定された検体は、他の免疫学的検査、病理組織学的検査およ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。

4-6) 確認検査のためのサンプル送付に際しては、前処理操作を終了した検体（冷凍状態）も同封する。

都道府県等における伝達性海綿状脳症（TSE）確認検査実施要領

1. 検査実施機関

(1) 監視安全課は、(2)に掲げる要件を満たす都道府県等の検査機関を「TSE確認検査機関」として指定する。

(2) 指定要件

- ア 監視安全課の開催するTSE確認検査に係る技術研修受講者又は監視安全課が同等以上の能力を有すると認める者が在籍していること。
- イ 本検査実施要領に示されている必要な機器等が整備されていること。
- ウ 2に掲げる検査法を遵守すること。
- エ 別途通知する外部精度管理等の検査技術の確認を実施すること。

2. 確認検査の実施

(1) ウエスタンブロット法については、別添2-1の「免疫生化学的検査（ウエスタンブロット法）実施要領」により検査を実施するとともに、都道府県等で行う確認検査は1回に限り実施すること。

なお、十分な検査結果が得られない場合、国立感染症研究所等に検体送付し確認検査を実施すること。

検体を送付する場合は、確認検査のため検体を送付する方法に準じて、免疫生化学的検査（ELISA法、ウエスタンブロット法）材料として凍結した保存検体及び免疫生化学的検査で使用したサンプルの残りについても凍結状態で送付すること。

(2) 免疫組織化学検査及び組織学検査については、都道府県等で別添2-2の「免疫組織化学的検査実施要領」により検査を実施するとともに、当分の間、国立感染症研究所等に検体送付し確認検査を実施すること。

なお、検体送付部位は、別添2-2の免疫組織化学的検査実施要領の図1中に図示された切り出し部位A（A*）～C（C*）の残りを含めすべての部位とし、緩衝ホルマリンを満たした50ml容器に入れて常温にて送付すること。

3. 確定診断

1) 確認検査実施機関は、確認検査のデータを電子媒体で監視安全課あて送付すること。なお、都道府県等において確認検査を実施する場合には、当該都道府県等が確認検査のデータを電子媒体で監視安全課あて送付すること。

2) 監視安全課は、確認検査のデータを「牛海綿状脳症の検査に係る専門家会議」の委員に送付し、確定診断を実施する。

3) 必要に応じ、病理組織標本（染色標本）の鏡検による専門家の診断を受けること。

4) 確定診断の結果については、監視安全課から確認検査実施都道府県等あて連絡する。

免疫生化学的検査（ウエスタンブロット法）実施要領

1. 機器等

- ・電気泳動槽：XCell SureLock Mini-Cell 電気泳動槽一式 (Invitrogen, EI0001)
- ・ブロットイング槽：ミニトランスブロットセル (Bio-Rad, 170-3930)
または、Xcell II™ ブロットモジュール (Invitrogen, EI0002)
- ・パワーサプライ：パワーパック 200 (Bio-Rad, 165-5052)
PowerEase 500 power Supply (Invitrogen E, I8600) など
- ・メンブレンローラーまたは水平震盪機：メンブレンローラー(アドバンテック, EBA-200)、
水平震盪機 (バイオクラフト, BC-740) など
- ・超音波破碎機：出力 750 W 程度以上のもの、もしくはブースター効果により相同の出力が得られるもの (例：Bramson 社 Digital sonifier S450D)
- ・マルチビーズショッカー：安井器械のオリジナル製品
- ・恒温槽（ウォーターバスまたはブロックヒータ）：37 度で使用可能なもの（ブロックヒータは、冷却機能付きが望ましい）
- ・電子天秤：最小計量単位が 10 mg かそれ以下のもの
- ・微量高速冷却遠心機：15,000rpm 以上の回転数で作動できるもの

2. 試薬等

・ Collagenase (細胞分散用)	和光	100 mg, No. 038-10531
・ Pefablock	Roche	500 mg, No. 1585916
・ Proteinase K, PCR グレード	Roche	1.25 ml, No. 3115887
・ DNase I	Roche	100 mg, No 104159
・ N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl)	Sigma	100g, No. L-5125
・ Zwittergent 3-14	Calbiochem	5 g, No. 693017
・ Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma	500 g, No. L-4509
・ 2-Mercaptoethanol	Sigma	100 ml, M-6250
・ Urea (試薬特級)	和光	500 g, 217-00615
・ 2-Butanol	和光	500 ml, 020-11215
・ Tween 20	和光	500 ml, 167-11515
・ Skim milk	COOP、明治、雪印、Difco など	
・ 牛胎児血清(FBS)	メーカー不問	
・ Phosphate buffered saline (PBS)	JRH/ニチレイ	56064-10L
・ 水	蒸留水 (DDW)、ミリ Q 水、または同等の純水	
・ PVDF 膜	Immobilon-PVDF (Millipore) No. IPVH00010 またはインビトロロン PVDF (Invitrogen) No. LC2005	
・ Filter paper	Bio-Rad	7.5x10cm, No.170-3932

	ADVANTEC	60 x 60 cm, No. 514A
・ X線フィル (RX-U)	富士フィルム	六切, No. 03D051
・ ECL ウェスタンブロット検出試薬	GE ヘルスケアバイオサイエンス	No. RPN2209
・ Anti-rabbit IgG HRP 標識	GE ヘルスケアバイオサイエンス	1ml, NA 9340
・ Anti-mouse IgG HRP 標識	GE ヘルスケアバイオサイエンス	1ml, NA 9310
・ O-リング付き 2ml チューブ	アシスト	No. 72.693S
(マルチピーズシヨッカー用のチューブではない)		

3. 試薬の調製

- ・ TN buffer : 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- ・ Detergent buffer : 4% Zwittergent 3-14, 1% Sarkosyl, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- ・ Butanol-Methanol solution : 2-Butanol:Methanol = 5 : 1 (v/v)
- ・ Proteinase K : 1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM CaCl₂, 分注して-20°C保存
- ・ Pefablock : 0.1 M in DDW, 分注して-20°C保存
- ・ Collagenase : 20 mg/ml in DDW, 分注して-20°C保存
- ・ DNase I : 10 mg/ml の濃度で 50% glycerol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂ に溶解して-20°Cに保管
- ・ 10% Skim milk : DDW にて調製する。必ず 80°C程度に加温して溶解させること。雑菌の混入を避け、4°Cにて 10 日間ほど保存可 (この期間内であっても、凝集コロイドなどが生じたら使用不可)。
- ・ PBST : PBS 粉末(JRH)を製造元が指示する方法にて DDW にて溶解し、これに 10% Tween 20 (DDW にて調製) を 1/100 容量加える。
- ・ ブロッキング液 : x2 PBST (= 2 倍濃度) を調製し、x2 PBS と 10% skim milk を等量混合する。さらに最終濃度 5%になるように FBS を加える (44B1 は PVDF 膜のバックグラウンドが高くなる傾向があるので、ブロッキング効果を上げるために FBS を加えている)。PVDF 膜を浸らせるのに十分な液量を用時調製する。
- ・ Sample buffer (x1) : 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% glycerol, 3 mM EDTA, 5% SDS, 4 M Urea, 4% β-mercapthoethanol, 0.04% bromo phenol blue, 使用中の少量は室温保存可能, 長期間の保存は 4°C (Urea, SDS が析出するが使用時に 50°C程度に加温溶解可) が望ましい

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
Glycerol	1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	120 μl
β-Mercapthoethanol	800 μl
1% bromo phenol blue	800 μl

SDS	1 g
Urea	4.8 g
<hr/>	
Up to 20ml	

- Sample buffer (x2) : 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol, 6 mM EDTA, 10% SDS, 8 M Urea, 8% β -mercapthoethanol, 0.08% bromo phenol blue, 使用中の少量は室温保存可能, 長期間の保存は 4 °C (Urea, SDS が析出するが使用時に 50°C程度に加温溶解可) が望ましい

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 ml
Glycerol	2 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	240 μ l
β -Mercapthoethanol	1600 μ l
1% bromophenol blue	1600 μ l
SDS	2 g
Urea	9.6 g
<hr/>	
Up to 20ml	

4. 乳剤の調製

- マルチビーズショッカー(安井器械)を用いる場合
 - メタルコーン (No MC-01212PP) を専用の 2ml O-ring 付きチューブに入れる。
 - 200 mg の脳組織をチューブに入れる。
 - TN buffer を 800 μ l 加える。
 - マルチビーズショッカーで 2000rpm, 30 秒振盪する。
- これを 20%(W/W)脳乳剤とし、O-リング付きチューブに保存する。b) 超音波破碎機を用いる場合
 - 200 mg の脳組織をパラフィルム上で細切し、2 ml チューブに移す。
 - TN buffer を 800 μ l 加える。
 - カップホーン式超音波破碎機で組織が均一な乳剤状になるまで超音波処理する。
 - これを 20% (W/W) 脳乳剤とし、O-リング付きチューブに保存する。
- エンファー法ストマチャーホモジナイザー (Stomacher) を用いる場合
 - 500 \pm 40mg の脳組織をホモジナイザーバックに入れる。
 - エンファーキット試薬 1 (Enfer Buffer 1 (Bovine)) を 7.5ml 入れる。
 - ストマチャーホモジナイザーにてスピード High で 2 分間処理する。
 - これを 6.25% (W/W) 脳乳剤とし、1ml 小分け保存する。

5. 試料調製

- 1) O-リング付き 2ml チューブの 20% (W/W) 脳乳剤 250 μ l に Detergent buffer 250 μ l を加え Vortex (必要があれば超音波処理を併用する) する (注¹)。
- 2) 12.5 μ l の 20 mg/ml collagenase を加え Vortex する。
- 3) 37°C で 30 分間消化する (必ずウォーターバス中で行う)。
- 4) 20 μ l の 1 mg/ml PK を加え Vortex する。
- 5) 37°C で 30 分間消化する (必ずウォーターバス中で行い、消化中に 1 ~ 2 度 Vortex する)。
- 6) 10 μ l の 0.1 M Pefablock を加え Vortex する。
- 7) 2 μ l の 10 mg/ml DNase を加え Vortex し、室温で 5 分間放置する。
- 8) 250 μ l の Butanol-Methanol solution を加え Vortex する。
- 9) 15,000 rpm、10 分、20°C 遠心する。
- 10) 上清を除き沈殿を軽く乾燥させる (注²)。
- 11) 100 μ l の 1x Sample buffer を加えて、100°C、5 分間ボイルする。
沈殿が溶けにくい場合は、超音波処理を行う。

a) BSE purification kit(Bio-Rad 社) で作製した 20% brain homogenate の調製

- 1) 20% brain homogenate 250 μ l に detergent buffer 250 μ l を加え、Vortex 及び超音波処理を行う (注¹)。
- 2) 12.5 μ l の 20 mg/ml collagenase を加え Vortex する。
- 3) 37°C で 30 分間消化する。
- 4) 20 μ l の 1 mg/ml PK を加え Vortex する。
- 5) 37°C で 30 分間消化する。
- 6) 10 μ l の Pefablock を加え Vortex する。
- 7) 250 μ l の Butanol-Methanol solution を加える。
- 8) Vortex する。
- 9) 15,000 rpm、10 分、20°C 遠心する。
- 10) 上清を除き、沈殿を乾燥させる (注²)。
- 11) 100 μ l の 1x sample buffer を加えて、100°C、5 分ボイルする。
沈殿が溶けにくい場合は、超音波処理を行い溶解する。

(注¹) Detergent buffer 添加後 25 μ l (5%) の 2-Butanol を加えて超音波処理し、以下の酵素消化を行うと正常型プリオンタンパク質及び抗体反応性の非特異タンパク質の消化が促進され、ウエスタンブロットの仕上がりがきれいになる。

(注²) 遠心上清は Butanol を含むため、有機溶媒として処理する。プリオン不活

化のために1/10量の10 NaOHを加えて2時間以上放置したのち、中和する。

b) エンファー法ストマチャーホモジナイザーで作製した6.25% brain homogenateの調製

- 1) 脳乳剤、1ml分を15,000 rpm、10分、20°C遠心後、上澄800ml (50mg組織等量)を別の2mlチューブに移す。
- 2) 20 μ lの20mg/ml collagenaseを加えVortexする。
- 3) 37°Cで30分間消化する。
- 4) 20 μ lの19.2mg/ml proteinase Kを加えVortexする。
- 5) 37°Cで30分間消化する。
- 6) 16 μ lの0.1M Pefablockを加えVortexする。
- 7) 3.4 μ lの10mg/ml DNaseを加えVortexし、室温で5分間放置する。
- 8) 400 μ lの2-Butanolを加えVortexする。
- 9) 15,000 rpm、10分、20°C遠心する。
- 10) 上清を除き、サンプルチューブをペーパータオルの上に逆さに立て5分間程放置し、沈殿を乾燥させる。
- 11) 100 μ lの1x sample bufferを加えて100°C、5分間ボイルする。沈殿が溶けにくい場合は、超音波処理を行う。

c) フレイザ BSE で作成した20w/v% 脳乳剤よりのサンプル調製

基本的には免疫生化学検査（ウエスタンブロット法）実施要領に準拠する。

- 1) 20w/v%脳乳剤を250 μ l取り、別の2mlチューブに移す。
- 2) Detergent buffer 250 μ l（フレイザBSE添付の界面活性剤液でも代用可能）を加えVortexを用いよく攪拌する（必要があれば超音波処理を併用する）。
- 3) 12.5 μ lの20mg/ml collagenaseを加えVortexを用い攪拌する。
- 4) 37°Cで30分間消化する（必ずウォーターバス中で行なう）。
- 5) 20 μ lの1mg/ml proteinase Kを加えVortexを用い攪拌する。
- 6) 37°Cで30分間消化する（必ずウォーターバス中で行い、消化中に1~2度Vortexを用い攪拌する）。
- 7) 10 μ lの0.1M Pefablockを加えVortexを用い攪拌する。
- 8) 2 μ lの10mg/ml DNase Iを加えVortexを用い攪拌し、室温で5分間放置する。
- 9) 250 μ lのButanol-Methanol solutionを加えVortexを用い攪拌する。
- 10) 15,000 rpm、10分、20°C遠心する。
- 11) 上清を除き沈殿を軽く乾燥させる。
- 12) 100 μ lの1x Sampling bufferを加えて、100°C、5分間ボイルする（Sampling buffer 添

加後攪拌は行わない)。

13) ボイル後 Vortex を用い攪拌する (沈殿が解けにくい場合は超音波処理を行う)。

上記操作に使用する buffer 類及び試薬類は「牛海綿状脳症実施要領：免疫生化学的検査 (ウエスタンブロット法) 実施要領」の記載に従うこと。

d)「プリオンスクリーン」で作成した 16.7%脳乳剤 (brain homogenate)からのサンプル調製

基本的には免疫生化学的検査 (ウエスタンブロット法) 実施要領に準拠する。

- 1) 16.7%脳乳剤を 300 μ l (50mg組織等量) 取り、別の 2ml チューブに移す。
- 2) 12.5 μ l の 20mg/ml Collagenase を加え Vortex を用い攪拌する。
- 3) 37°C で 30 分間消化する (必ずウォーターバス中で行う)。
- 4) 10 μ l の 0.1M Pefablock を加え Vortex を用い攪拌する。
- 5) 2 μ l の 10mg/ml DNase I を加え Vortex を用い攪拌し、室温で 5 分間放置する。
- 6) 250 μ l の Butanol-Methanol solution を加え Vortex を用い攪拌する。
- 7) 15,000 rpm、10 分、20°C 遠心する。
- 8) 上清を除き沈殿を軽く乾燥させる。
- 9) 100 μ l の 1x Sampling buffer を加えて、100°C、5 分間ボイルする。
- 10) ボイル後 Vortex を用い攪拌する (沈殿が溶けにくい場合は超音波処理を行い溶解する)。

e) 「ニッピブル B S E」で作成した 11%脳乳剤よりのサンプル調製

- 1) 脳乳剤を 50 μ l 取り、別の 2ml チューブに移す。
- 2) sample buffer (2x) を 50 μ l 加えピペッティングによりよく攪拌する。
- 3) 100°C、5 分間の熱処理を行う。
- 4) ボイル後 Vortex を用い攪拌する。

※試料調製に使用した器具類の除染について

- ・ハサミ、ピンセット、チップ、チューブ等は耐圧耐熱性容器に入れて、135°C、30 分オートクレーブ処理する。その際、容器内に 150ml 程度の水を入れ、蓋は閉じないこと。
- ・可燃物も同様にオートクレーブ処理により除染する。

6. SDS-PAGE

- ・ Invitrogen 社 (旧 Novex 社) のプレキャストゲルを使用する。
- ・ Gel: NuPAGE 12% Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 12 well (Invitrogen No. NP0342)
- ・ ゲルローディングチップ (フナコシ SRPT-1381 など) を使用して 20 μ l (10 mg 組織等量)、5 μ l (2.5 mg 組織等量) を load する。
- ・ Buffer: NuPAGE MOPS SDS Running buffer (Invitrogen No. NP0001)。陰極側のバッファーには、200ml のバッファーに対して 500 μ l の Antioxidant (Invitrogen No. NP0005) を加える。
- ・ 200V 定電圧で泳動する。

<感度測定用陽性コントロールについて>

陽性コントロール (MoPrP^{Sc}, 100mg/ml 組織当量) を Sample buffer で 10 倍に希釈したものを原液 (4⁰, 100 μ g/10 μ l 組織等量) とする。原液(4⁰)を作製時に一度 100°C 2min 加熱する。原液は 50 μ l/tube 程度に分注して -20°C に保存する。さらに、4⁻¹(25 μ g/10 μ l)、4⁻²(6.25 μ g/10 μ l)、4⁻³(1.6 μ g/10 μ l)、4⁻⁴(0.4 μ g/10 μ l) の 4 階段希釈列を作製しこれらも分注して -20°C に保存する。作製した希釈列は使用時に 50°C の温湯で溶解する。100°C で再加熱しないこと。4⁻¹~4⁻⁴ の陽性コントロールを 10 μ l/lane ロードする (レーンの使用状況によっては 4⁻²~4⁻⁴ でも良い)。これら陽性コントロール希釈列は WB の感度評価に必要であるので、必ずサンプルと同一のゲル上で電気泳動する。4⁻³ まで PrP^{Sc} が検出されていれば、その結果は評価可能である。

陽性コントロールは国立感染症研究所等から配布する。

7. ウェスタンブロット (WB)

- ・ プロッティング槽: バイオラッド、ミニトランスブロットセル(170-3930)
- ・ トランスファーバッファー

NuPAGE transfer buffer (Invitrogen No. NP0006)	50 ml
Antioxidant (Invitrogen No. NP0005)	1 ml
メタノール	200 ml final 20%
20% SDS	0.5 ml final 0.01%

Up to 1 L

- ・ PVDF 膜 (Immobilon-PVDF) を 7.5 x 9 cm に切り、メタノールに 1 分間浸し湿潤させる。その後、DDW で洗い、トランスファーバッファーに浸しておく。
- ・ 電気泳動が終了したゲルをトランスファーバッファーに浸す。

- ・トランスファーバッファーで濡らした濾紙2枚 (Bio-Rad の filter paper を使用する場合は1枚) の上に PVDF 膜を置く。その上にゲルを置く。この時ゲルと PVDF 膜の間に気泡が入らないよう注意する。ゲルの上にトランスファーバッファーで濡らした濾紙 (2枚) を重ねる。
- ・上記の濾紙-PVDF-ゲル-濾紙のサンドウィッチをプロットングパッドではさみ、プロットング装置にセットする。蛋白質は陰極から陽極へと移動するのでゲルの陽極側に PVDF 膜が位置するようセットすること。
- ・ミニトランスプロットセル (Bio-Rad, 170-3930) を用いる場合には、a)~c) の条件でプロットングを行う。a) 又は b) が推奨される。急を要する場合は c) では可能だがバックグラウンドが高くなる傾向がある。
 - a) 30V 定電圧 6 時間 ~ 15 時間
 - b) 60V 定電圧 2 時間
 - c) 80V 定電圧 1 時間
- ・Xcell II™ プロットモジュール (Invitrogen, EI0002) を用いる場合には、25V 定電圧 1 時間 ~ 1 時間 30 分の条件でプロットングを行う。

8. 免疫-化学発光検出

44B1 を主に、B103 を従とすることが望ましい。

【1】44B1 モノクローナル抗体を使用する場合 (注3)(注4)

- 1) ブロッキング液：5% skim milk, 5% FBS in PBST。Skim milk は必ず加温溶解 (80°C 程度) すること。44B1 は PVDF 膜のバックグラウンドが高くなる傾向があるので、ブロッキング効果を挙げるために FBS を加えている。2) PVDF 膜を充分量のブロッキング液に浸し、メンブレンローラー (Advantec, No. EBA-200) または水平震盪機上で、室温にて 1 時間インキュベートする。
- 3) 一次抗体：1% skim milk, 1% FBS in PBST (=上記 2) で未使用のブロッキング液を PBST で 5 倍に希釈して調製する) で一次抗体を希釈する。0.1-0.2 μ g/ml が使用濃度の目安である。
- 4) ブロッキング後の PVDF 膜に一次抗体液を加え、メンブレンローラーまたは水平震盪機上で 1 時間インキュベートする。
- 5) PBST で 20 分間洗浄 (水平震盪機で震盪洗浄) する。4 分間毎に計 5 回 PBST を交換する。
- 6) 二次抗体 (Amersham NA9310)：1% skim milk, 1% FBS in PBST で 1 : 2,500 に希釈する。
- 7) PVDF 膜に二次抗体液を加え、メンブレンローラーまたは水平震盪機上で 45 分。
- 8) PBST で 20 分間洗浄 (水平震盪機で震盪洗浄) する。4 分間毎に計 5 回 PBST を交換する。

- 9) ECL ウェスタンブロッティング検出試薬で発光させる。
- 10) X線フィルムに2分間露光し、現像する。
- 11) 現像している間に、次のX線フィルムを露光させる。
- 12) 30分後に現像する(2分及び30分露光のX線フィルムを作成する)^(注5)。
- 13) その後必要に応じてオーバーナイトで露光させる。

現像液：ハイレンドール

停止液：3%酢酸

定着液：スーパー富士フィックス

(自動現像機を用いる場合には、機種に応じた現像・定着液を使用する)

【2】B103 アフィニティー精製ポリクローナル抗体を使用する場合^(注6)

(【1】44B1の場合と1), 3), 6)が異なる。)

- 1) ブロッキング：5% skim milk in PBST (0.1% Tween 20)。Skim milk は必ず加温溶解 (80℃程度) すること。
- 2) メンブレンローラー (Advantec, No. EBA-200) 上で1時間。
- 3) 一次抗体：1% skim milk in PBST で希釈。1 μ g/ml が使用濃度の目安。
- 4) メンブレンローラー上で1時間。
- 5) PBST で20分間洗浄する。5回PBST交換を行う。
- 6) 二次抗体(Amersham NA9340)：1% skim milk in PBST で1:2,500希釈。
- 7) メンブレンローラー上で45分。
- 8) PBST で20分間洗浄する。5回PBST交換を行う。
- 9) ECL ウェスタンブロッティング検出試薬で発光させる。
- 10) X線フィルムに2分間露光し、現像する。
- 11) 現像している間に、次のX線フィルムを露光させる。
- 12) 30分後に現像する(2分及び30分露光のX線フィルムを作成する)^(注5)。
- 13) その後必要に応じてオーバーナイトで露光させる。

現像液：ハイレンドール

停止液：3%酢酸

定着液：スーパー富士フィックス

(注3) 44B1 抗体は、国立感染症研究所等から配布する。現在のロットは、02011, 6.5mg/ml。

(注4) 上記操作でPVDF膜のバックグラウンドが高く、所定の感度(p18参照)が得られない場合には以下の方法で改善することができる。

- ①ブロッキング溶液及び抗体反応液をそれぞれ5% skim milk in 50mM Tris-HCl (0.1% Tween 20)、1% skim milk in 50mM Tris-HCl (0.1% Tween 20) に変える。
- ②抗体反応後の膜の洗浄を0.1% Tween 20 inPBS (50ml) で5分×6回行なう。
- ③インビトロゲン社の転写装置(エクセルIIプロットモジュールE19051)、転写用緩衝液(ニューページトランスファーバッファー: NP0006, NP0006-1)及びPVDF

膜 (LC2005) を用い 20V 1 時間転写する。

(注 5) 30 分間の露光時間はあくまで目安であり、2 分間露光の結果から臨機応変に対応すること。

(注 6) B103 抗体は、富士レビオ株式会社が販売している。現在のロットは、SB21103, 1mg/ml。

参考：実施例

【例1】 1日目:試料調製 (2時間)

2日目: PAGE (1.5時間) → WB (2時間) → 検出 (4時間)

【例2】 1日目:試料調製 (2時間)→ PAGE (1.5時間) →WB (最大12時間)

2日目:検出 (4時間)

【例3】 1日目:試料調製 (2時間) →PAGE (1.5時間) → WB (2時間) →検出 (4時間)

9. 精度管理

- 1) 国立感染症研究所等から配布された陽性コントロール及びスクリーニング検査で陰性を確認したサンプルを用いて、1ヶ月に1回以上の頻度で内部精度管理を実施すること。
- 2) 別途通知する外部精度管理を実施すること。

免疫組織化学的検査実施要領

1. パラフィンブロックの作製

<準備>

ディスポベンチシート (ラボシート), まな板, 切り出し用ブレード, ピンセット, ステンレストレイ, 番号を記入したプラスチックカセット必要数, ブレード捨て缶, キムタオル, 1N NaOH, ギ酸処理用容器

<作業>

- 1) ホルマリン固定組織の切り出しは安全キャビネット内で、規定の服装で行う (スクリーニング検査の服装に準拠)。
- 2) 検体容器の周囲を 1N NaOH で拭き、水拭きをする。
- 3) ホルマリン固定組織の切り出しを行う。

ラボシートを敷き、プラスチックのまな板の上でディスポのブレードで切り出す。かんぬき部の切り出し組織の厚さは 3 mm 以内とする。かんぬき部とその上部 2 個、計 3 個切り出し、プラスチックカセットに入れる。

15~20%ホルマリン液にて 60° C 最低 1 時間振盪固定する (生材料を切り出す場合には 2~3 時間程度が望ましい)。翌日に処理を行う場合は包埋器処理 1 時間 30 分前まで 37° C で固定する。

- 4) ギ酸処理を室温 1 時間行う。
プラスチックカセットに入れた固定済み脳組織を、直接 98%ギ酸液にいれ、振盪器で室温 1 時間攪拌する。流水水洗を 30 分行う。(感染性低下)
- 5) 密閉式自動包埋機により 4 時間のプロトコールあるいは手回しにより処理を行う。
- 6) パラフィン包埋は専用の機器で、専用のモルドを使用する。

<後処理>

- 1) ホルマリンは専用の廃液タンクに捨てる。後日、焼却する。
- 2) 切り出しに使ったピンセット、ブレードはステンレストレイに置き、1N NaOH で室温 2 時間浸す (あるいは専用の缶に入れ、後でオートクレーブ処理を行う)。その後、水洗する。ブレードは廃棄する。
- 3) まな板は 1N NaOH でぬらしたキムタオルをかぶせて、室温 2 時間後、水洗する。
- 4) 残った脳組織は固定瓶に戻して保存する。不要になったら、オートクレーブ処理後 (以下を参照)、廃棄する。

2. 薄切

<準備>

ベンチシート, ミクロトーム, 水桶, パラフィン伸展器, 加湿器, 替え刃捨て缶, スライドガラス (シランコートスライド), 1N NaOH, キムタオル.

<作業>

- 1) 手袋、シールド付きマスク、ガウンを着用する。必要時にはアンチカットグローブを使う。
- 2) ベンチシートを敷き、ミクロトームを置き、薄切する。専用のパラフィン伸展器及び水おけをおき、切片をシランコートスライドにのせる。
- 3) ヘパフィルター付き専用掃除機で、切片くずを吸い取る。後で、焼却あるいはオートクレーブ処理を行う。
- 4) ナイフホルダーは 135°C 60 分間のオートクレーブ処理後、水洗、乾燥を行う。
- 5) ブレードは、1N NaOH で室温時間浸す (あるいは専用の缶に入れ、後でオートクレーブ処理を行う。)
- 6) 薄切切片は 45°C で乾燥させる。

<後処理>

すべての切片屑を前述の掃除機で吸い取る。

3. HE 染色 (専用の脱パラフィン・染色用バット系列を用意する)

- 1) 脱パラフィン、エタノール、水洗を行う。
- 2) ハリスヘマトキシリン染色を室温 2 分間行う。
- 3) むるま湯で 10 分色出しを行う。
- 4) エオジン染色を室温 3 分間行う。
- 5) 分別・脱水・透徹を行う。
- 6) 封入する。

4. 免疫組織化学

<試薬類>

エンビジョン+キット (DAKO, マウスおよびウサギ用), シンプルステイン DAB 溶液 (ヒストファイン), 3%過酸化水素水, 一次抗体, ヘマトキシリン, PBS

PB(免疫用 0.1M PB)の作り方

Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	28.7 g
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	3.3 g
D.W.(蒸留水)	1.0 L

PBS(0.01MPBS)の作り方

PB	100 ml
D.W.(蒸留水)	900 ml
NaCl	8.5 g

<作業>

- 1) 脱パラフィン、エタノール、水洗いを行う。
- 2) 専用のオートクレーブにステンレスバットに蒸留水を入れた状態で 121℃ 20 分処理する。温度が下がったら出して PBS 洗浄を行う。
- 3) 内因性ペルオキシダーゼ処理 (3%過酸化水素水、室温 5 分) を行う。
- 4) ブロッキング (10%正常ヤギ血清—PBS, 室温 5 分) を行う。(省略可能)
- 5) 一次抗体 (後述) をのせ、常温 30~40 分反応させる。
- 6) PBS 洗浄を行う。
- 7) Envision+液で室温 30 分反応後、PBS 洗浄を行う。
- 8) DAB 発色反応を行う。
- 9) 水道水で洗浄後、マイヤーヘマトキシリンで室温 30 秒反応させる。
- 10) ぬるま湯で色だし後、脱水、透徹、封入する。

<後処理>

脱パラフィン用キシレン、エタノール及び蒸留水は別々の専用容器に廃棄し焼却する。
専用の染色バット及び染色カゴは 135℃で1時間処理後水洗いする。
ヘマトキシリン及びエオジン等の染色液は廃棄する。

5. 精度管理

- 1) 国立感染症研究所等から配布された陽性コントロール及びスクリーニング検査で陰性を確認したサンプルを用いて、1ヶ月に1回以上の頻度で内部精度管理を実施すること。
- 2) 別途通知する外部精度管理を実施すること。

1. パラフィンブロックの作製の図解 (1)
: 切り出しから固定・包埋まで (手回し)

切り出し後 20%ホルマリンにて振盪浸漬 60°C 60分 再固定

↓

98%ギ酸にて振盪浸漬 60分

↓

流水洗 30分

↓

濾紙で余分な水分の除去

↓

80%Al 15分

90%Al 15分

100%Al 15分

100%Al : Acetone

(1:1) 15分

Acetone 15分

Xylene 15分

Xylene 15分

Xylene 15分

Paraffin 15分

Paraffin 15分

Paraffin 15分

包埋

所要時間 : 2時間45分

(ただし、標本は細胞間の空隙ができやすい。)

1. パラフィンブロックの図解（2）

：自動包埋器による脱水・透徹・パラフィン浸漬時間

使用機器：サクラ密閉式自動固定包埋装置

	設定時間
80% アルコール	10分
90% アルコール	10分
95% アルコール	10分
99% アルコール	20分
100%アルコール I	20分
100%アルコール II	30分
100%アルコール III	30分
キシレン I	20分
キシレン II	20分
キシレン III	20分
パラフィン I	10分
パラフィン II	10分
パラフィン III	10分
パラフィン IV	20分

計 4時間30分

バキュームを常にON状態にする。

4. 免疫組織化学の図解

: 確認検査のための迅速免疫染色法の手順

脱パラフィン	10分
↓	
水洗	5分
↓	
オートクレーブ処理 (蒸留水に浸漬)	121℃, 20分 (所要時間1. 5時間)
↓	
3%過酸化水素水滴下	5分
↓	
PBS洗浄	5分×2～3回
↓	
一次抗体の反応*	室温30～40分
↓	
PBS洗浄	5分×3回
↓	
二次抗体の反応**	室温30分
↓	
PBS洗浄	5分×3回
↓	
DABによる発色	7～10分
↓	
流水洗	5分
↓	
ヘマトキシリン核染色	30秒
↓	
流水洗 (温湯)	5分
↓	
脱水・封入	10分

* 一次抗体の希釈はPBSで行う
ネガティブはウサギ(マウス)正常血清 (×1000)

** ENVISION+ポリマー試薬(DAKO)

試薬・機器一覧

(一般試薬・一般器具に関しては、同様製品であればメーカーは問わない)

	試薬名	メーカー名	規格	単位
1	水酸化ナトリウム	和光	197-02125	500 g
2	ホルマリン(37.5%)	和光	061-00411	3L
3	ギ酸(99%)	和光	066-00466	500 ml
4	パラフィン	和光	164-13345	500 g
5	アルコール	シグマ		4 L
6	DAKO PEN	ダコ		1本
7	ハリスヘマトキシリン	ムトウ	2002	500 ml
8	マイヤーヘマトキシリン	ムトウ	3001	500 ml
9	エオジン	ムトウ		500 ml
10	B103あるいは44B1抗プリオン抗体	富士レビオ(44B1は、配布品)		
11	エンビジョン+キット(マウスあるいはウサギ用)	ダコ		110 ml
12	シンプルステイン DAB キット	ヒストファイン	415172	1セット
13	過酸化水素水	和光	081-04215	500 ml
14	ウサギ正常血清	メーカー不問		
15	病理用キシレン	ムトウ		15 Kg
16	マウントクイック(封入剤)	大道産業		30cc
17	リン酸二水素ナトリウム(二水和物)	和光	199-02825	500 g
18	リン酸水素二ナトリウム・12水	和光	196-02835	500 g
19	塩化ナトリウム	和光	191-01665	500 g

	器具・機器類	メーカー名	規格	単位
1	デスポベンチシート	ワットマン	40 x 57 cm	50 枚
2	切り出し用替え刃 (ブレード)	フェザー	No. 130	50 枚入り
3	プラスチックカセット	ティッシュテック	プロカセット	1,000 個
4	キムタオル	クレシア	J-120	24 束
5	ギ酸処理用容器	ナルゲン	2118-0032	個
6	シランコートスライド	ムトウ	1106	100 枚
7	カバーガラス	ムトウ	24 x 36	1,000 枚
8	マイクローム替え刃	フェザー	A35	50 枚
9	染色バット (20 枚用)	マツナミ		個
10	染色カゴ (20 枚用)	マツナミ	B-20	個
11	ステンレスバット		0.6 ㍓	個
12	湿潤箱	コスモバイオ	20 枚用	個
13	ラテックス手袋	旭エマーズ	DPG-350	箱(100 枚)
14	シーフド付きマスク	ホギテック	FBM-281	50 枚
15	ガウン	ホギテック	MGM-14	30 枚
16	アンチカットグローブ	井内	LA132	10 枚
17	安全キャビネット	Laboconco	LAD-1300XA	
18	スライドウオッシャー	十慈フィールド	SW-4	
19	オートクレーブ 135℃	トミー	KS-323	
20	HEPAフィルター付きフード	オリエンタル	Aura-700	
21	HEPAフィルター付き掃除機	アトミック	FC-111-A13	
22	自動包埋器	サクラファインテック	ETV-150CV	
23	パラフィン伸展器	サクラファインテック	PS-53	
24	加湿器	サクラファインテック	SMB-1	

(補) 抗 PrP 抗体および病理切片の前処理法について

現在、抗 PrP ペプチドウサギ抗体とマウスモノクローナル抗体が BSE 確認検査に利用可能である。前者には B103 (帯畜大) と T4 (感染研) があり、後者には 44B1 と 43C5 (ともに帯畜大) がある。抗体と切片の前処理法との組み合わせが結果に影響を与えることが判明した。現状では蒸留水中でのオートクレーブ後に、抗体は B103 を主に、44B1 を従とするのが望ましい。

1. 切片の前処理法

脱パラ後の病理組織切片の前処理は PrP^C を壊し、PrP^{Sc} に対する反応性を高める (抗原性の回復ないし抗原露出) 目的で行われ、BSE 検査には必須な処理である。以下の 2 種類の前処理方法が検討されてきた。

1) 蒸留水中で 121°C、20 分

2) 1mM 塩酸水溶液で 121°C、20 分

古くはプロイテイナーゼ処理が追加して行われたが、現在の迅速固定包埋法では不要である。

上記 2 方法はいずれも 400 ml の蓋付きステンレス製バットに、切片をいれた染色カゴを入れて全く同じ条件下でオートクレーブ処理した。

2. 抗体の性状

a) B103 ウサギ抗体: PrP タンパク N 末の 103-121 ペプチドを抗原として作製。4.6 mg/ml

b) T4 ウサギ抗体: PrP タンパク C 末の 221-239 ペプチドを抗原として作製。0.6 mg/ml

* 上記二つのウサギ抗体は affinity purified antibody である。

c) 44B1 マウスモノクローナル抗体: 155-231 を認識。4 mg/ml

d) 43C5 マウスモノクローナル抗体: 161-169 を認識。4.6 mg/ml

3. 抗体と前処理法

抗体および 希釈倍数	1) DDW 121°C, 20 分		2) 1mM HCl 121°C, 20 分	
	Pos	Neg	Pos	Neg
B103 x500	+/-	-/-	3+</+N	-/+D
T4 x1000	2+/-	-/-	3+>/-	-/+
44B1 x500	+/-	-/-	2+</-	-/-
43C5 x2000	2+>+D	-/+	3+>2+D	-/3+D

Pos: 陽性対照 (北海道 2 例目)、Neg: 陰性対照 (以前非特異がみられたもの; B026)

+/-: シグナル陽性 (程度) / 非特異反応 (程度)

今回使用した抗体は富士レビオ製なので抗体濃度は 1 mg/ml。

4. コメント

1) B103 抗体は monospecific polyclonal 抗体であり、複数以上の抗原決定基を認識すると考えられる。1) の条件では通常、問題なく PrP^{Sc} を検出することができる。ただし反応性はやや弱い。ときに細胞の核に弱く非特異反応が認められる。2) 条件下では、核に非特異染色が強く認められる。2) 条件下での染色が最も良いが非特異反応があるので現状では 1) がよい。

2) T4 抗体は 2) 条件下で最も良い結果が得られる。過去 3 例に非特異染色所見が観察された。この非特異陽性反応は B103、43C5 でも全く同じであったが、44B1 では非特異所見はみられなかった。なお T4 は配布する量が残っていない。

3) 44B1 はどの条件でも使用でき非特異反応が見られない特徴があるが、若干反応強度 (シグナルの強さ) が弱い。抗体染色力価は 43C5 の方が 44B1 より高い。

4) 43C5 はいずれの方法においてもオリブ核等の神経網にびまん性に着色する非特異反応が見られる。

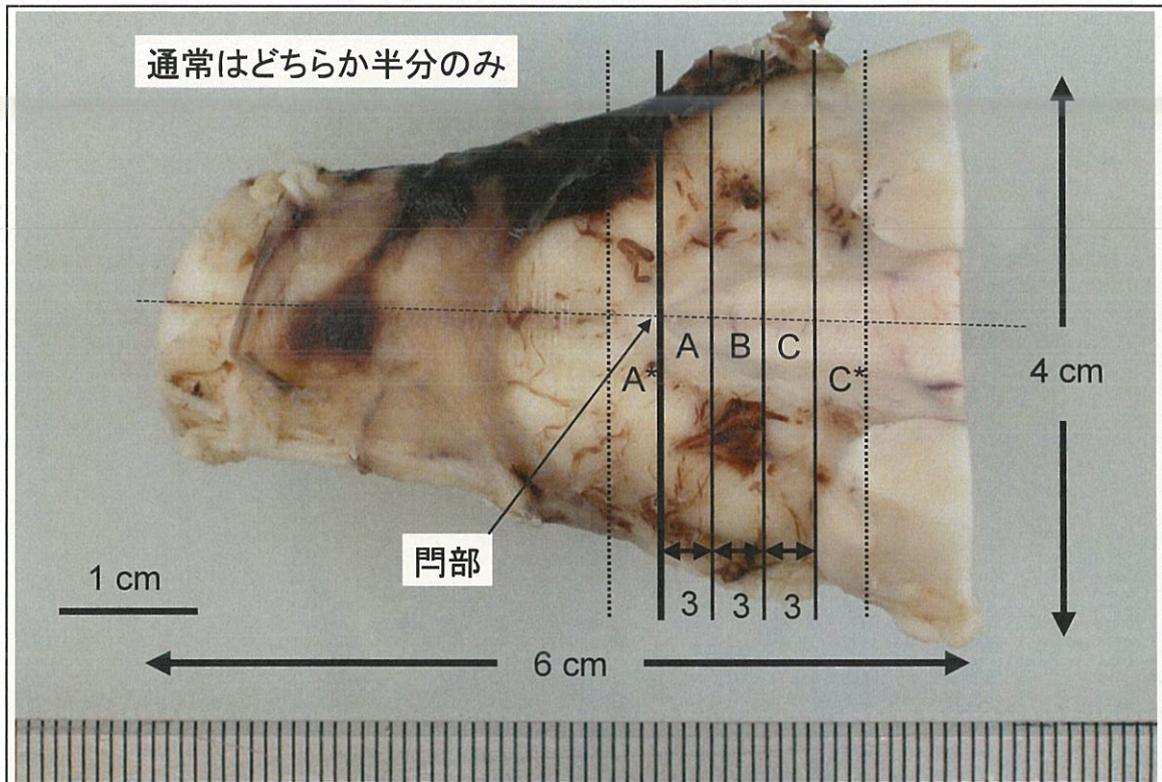


図1 正常ウシの延髄。切り出し場所を示す。通常、かんぬき部(A)、その上部(B と C)と切断する。最低 A-C の3カ所を切り出す。上部 (右側) を薄切する。

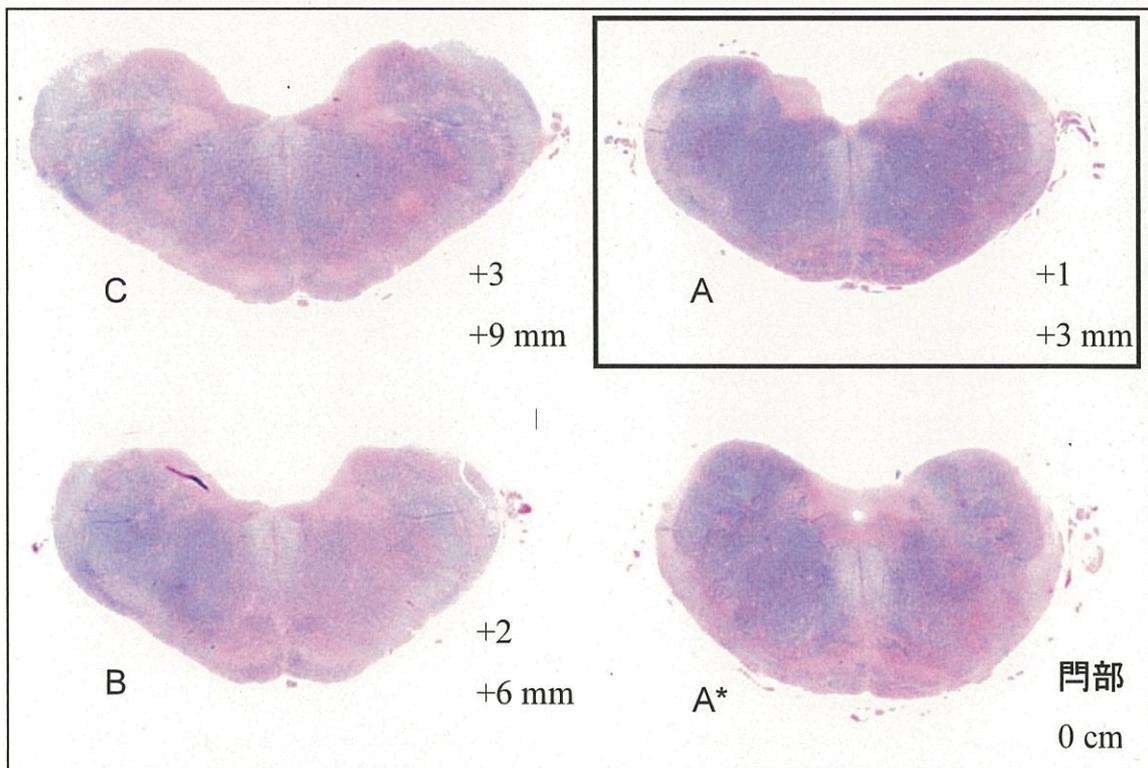


図2 A-C および A* の面の HE 染色標本。右の数字は門部から一つ上(A 部、+1 = +3 mm)が最もよい場所である。この部分の延髄神経核の分布は次の図を参照のこと。

延髄神経核

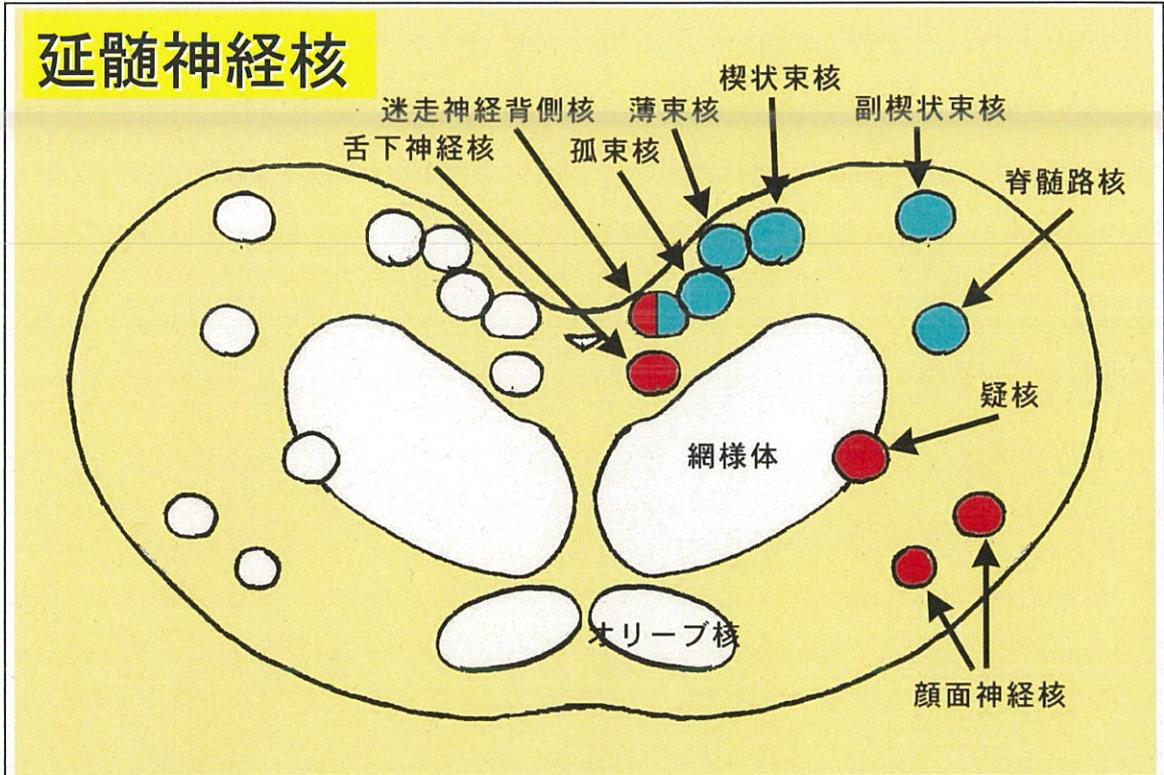


図3 延髄の神経核



図4 実際の標本は延髄長軸で二分されている。門部を確認のうえ(1)、標本を切り出す。切った面(2;ただし別の標本)、3 mm 間隔で切り出し後、頭側面を薄切するように、プラスチックカセットに入れる(3)。順番および薄切面に注意する。

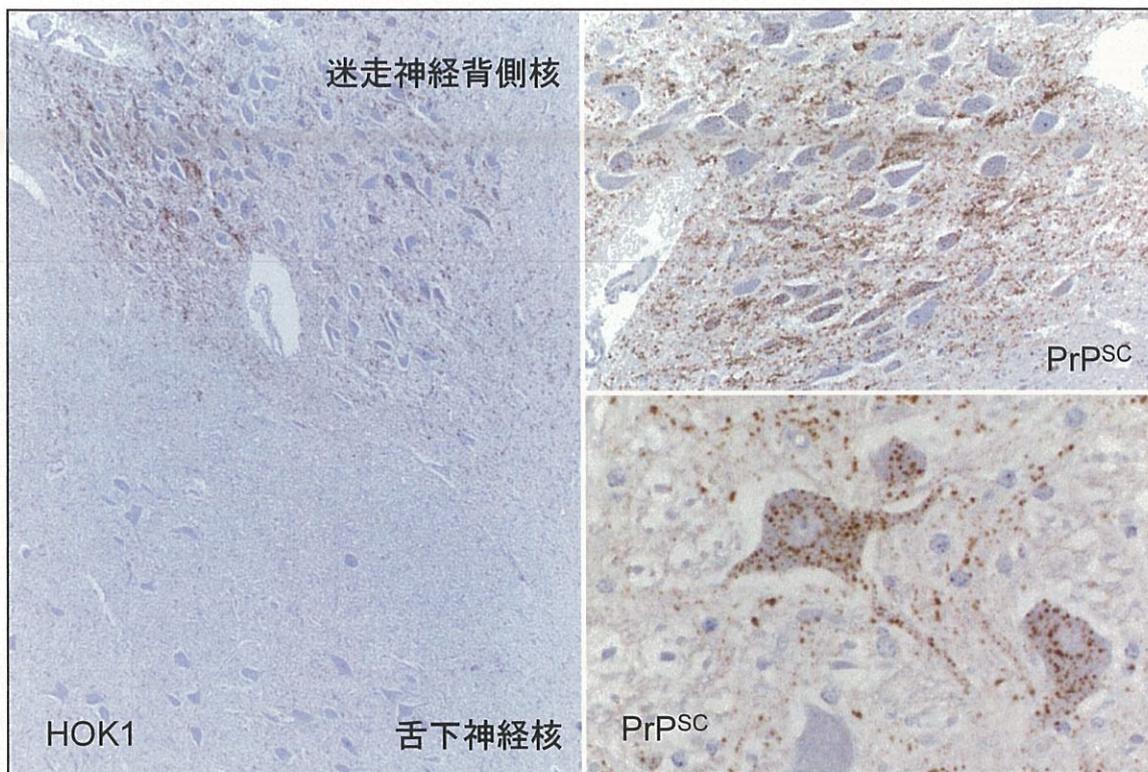


図5 北海道1例目の陽性像。PrP^{SC}陽性所見に注目。顆粒状のプリオンが検出される。

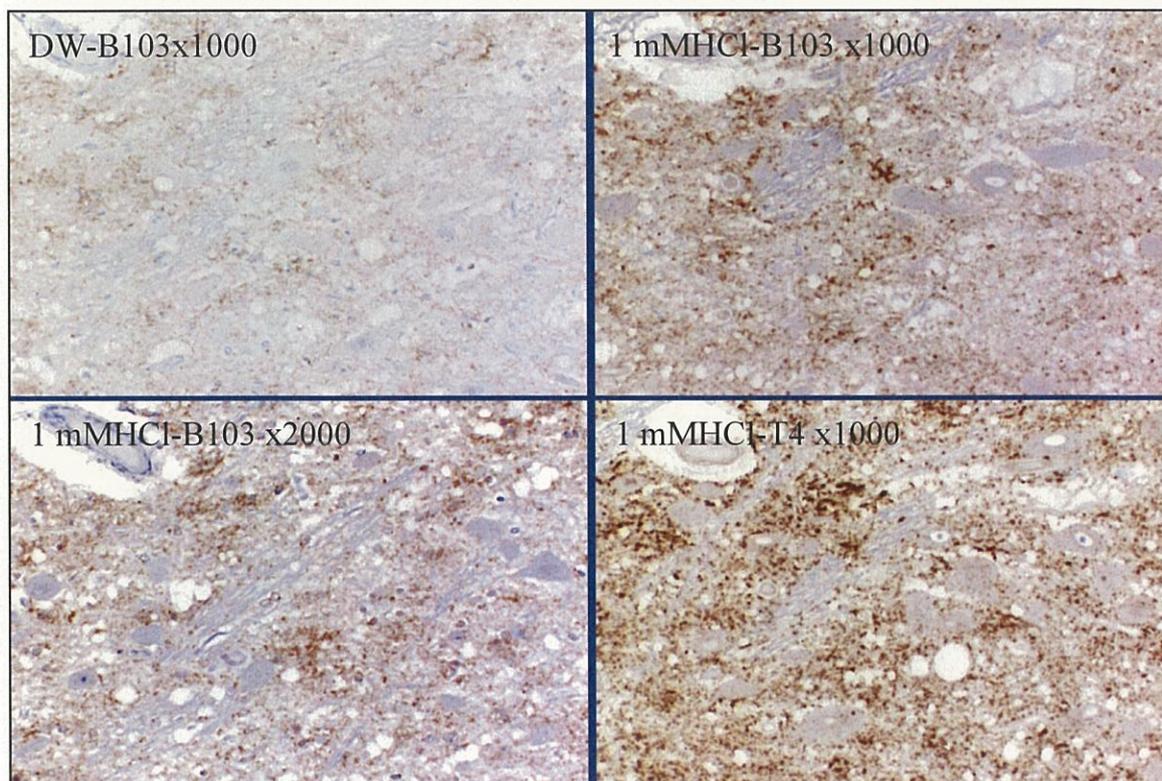


図6 B103による免疫染色と切片の塩酸前処理効果。(埼玉例)

通常は蒸留水を用いた121℃20分のオートクレーブ処理を行う。塩酸処理ではプリオン陽性反応は強くなるが、核に非特異染色が観察される。塩酸処理は必要時に確認目的で行うことがある。

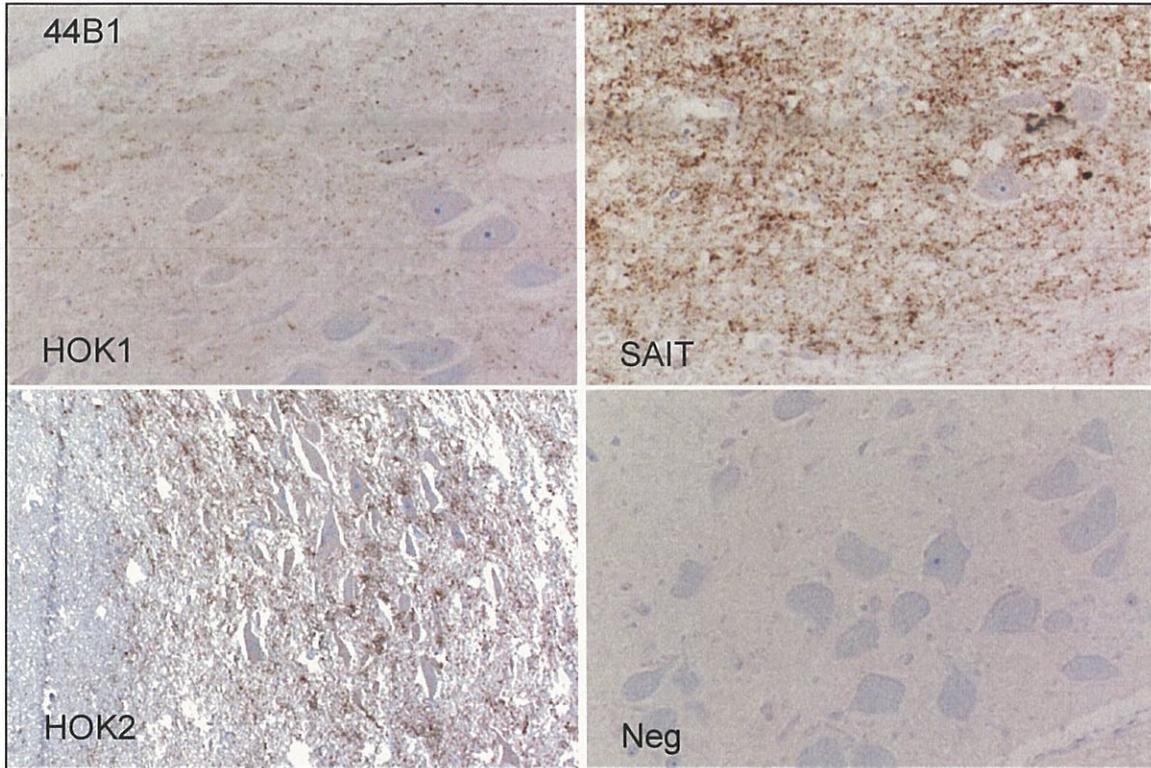


図7 44B1による免疫染色像。ただしHOK2は抗プリオンウサギポリクローナル抗体(T4)による陽性像。SAITは海綿状変化を伴っている。

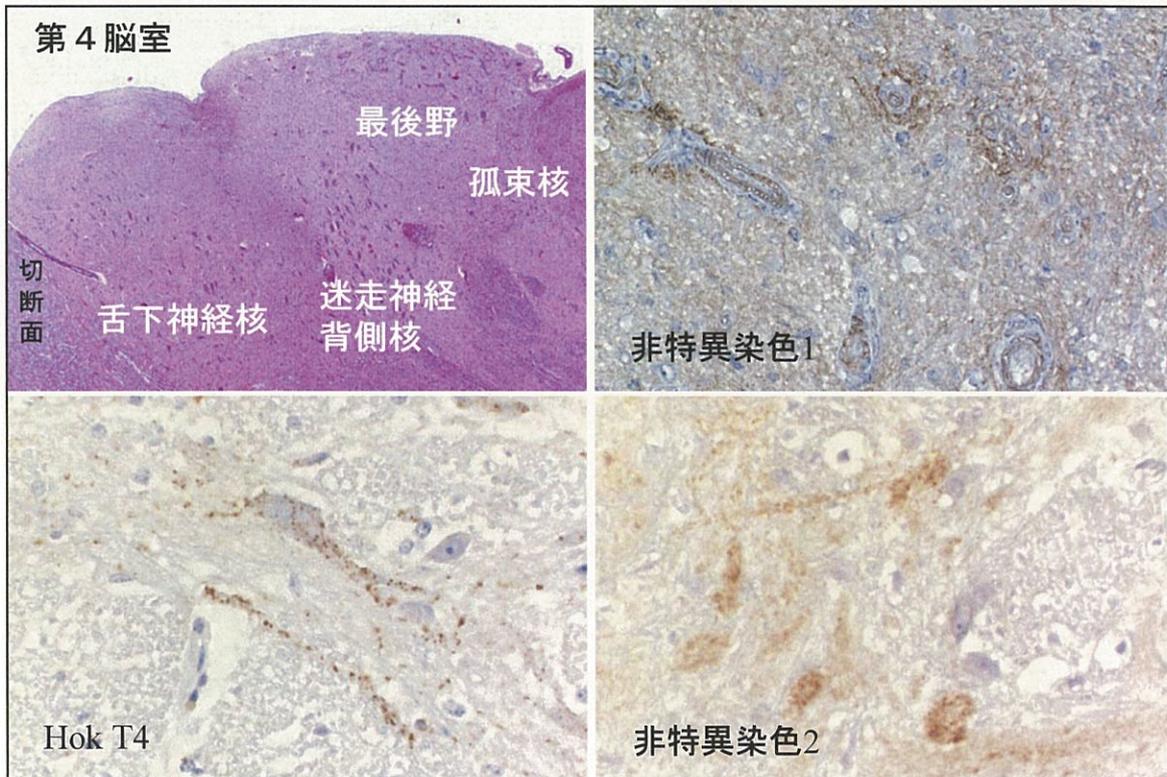


図8 Aの断面には最後野が出てくる。この部分はポリクローナル抗体(T4ないしB103)では小血管周囲に非特異染色像がみられることがある。またときに非特異染色2のような所見がえられるが、その場合、非特異染色2は染色所見がHok T4の陽性所見とは明らかに異なっている。44B1モノクローナル抗体では現在までこのような非特異染色像はえられていない。