

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）
- ・ブロッティング槽：ミニトランスブロットセル（Bio-Rad, 170-3930）
- ・パワーサプライ：パワーパック 200（Bio-Rad, 165-5052）
PowerEase 500 power Supply（Invitrogen EI8600）
- ・メンブレンローラー：メンブレンローラー（アドバンテック, EBA-200）
- ・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：安井機器のオリジナル製品
- ・恒温槽（ウォーターバス）：37 度で使用可能なもの（冷却機能付きが望ましい）
- ・計り：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	5 ml, No. 1964372
・ 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
・ スキムミルク	COOP、明治、雪印など	
・ 牛胎児血清(FBS)	<u>メーカー不問</u>	
・ Immobilon-PVDF	Millipore	No. IPVH00010
・ 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	Amersham Pharmacia	No. RPN2209
・ Anti-rabbit IgG HRP 標識	Amersham Pharmacia	1ml, NA 9340
・ Anti-mouse IgG HRP 標識	Amersham Pharmacia	1ml, NA 9310
・ O-リング付き 2ml チューブ （マルチビーズショッカー用のチューブではない）	アシスト	No. 72.693S

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 μ : 1
- 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
- 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 μ l
β -Mercapthoethanol	800 μ l
1% bromo phenol blue	800 μ l
SDS	1 g
Urea	4.8 g
<hr/>	
Up to 20ml	

4. 乳剤の調製

- a) マルチビーズショッカー(安井器械)を用いる場合
- 1) 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。
 - 2) 200 mg の脳組織をチューブに入れる。
 - 3) TN buffer を 800 μ l 加える。
 - 4) マルチビーズショッカーで 2000rpm, 30 秒振盪する。
 - 5) 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

- 1) 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。
- 2) TN buffer を 800 μ l 加える。
- 3) 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。
- 4) 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。

c) 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

- 1) 500 \pm 40mg の脳組織をホモジナイザーバックに入れる。
- 2) エンファーキット試薬 1 (Enfer Buffer 1 (Bovine)) を 7.5ml 入れる。
- 3) 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。
- 4) 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/mlPK 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-ブタノール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及び抗体反応性の非特異タンパクの消化が促進され、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 分程放置し、沈殿を乾燥させる。
- 11) 100 μ l の 1 x 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 B S E 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。

※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) 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 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} lot 011209, 10mg/ml組織当量) を Sample buffer で 10 倍に希釈したものを原液 (4⁰, 100 ug/10 μ l組織等量) とする。原液(4⁰)を作製時に一度 100°C2min 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 ug/10 μ l)、4⁻²(6.25 ug/10 μ l)、4⁻³(1.6 ug/10 μ l)、4⁻⁴(0.4 ug/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)

- ブロッキング槽: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 分間浸し活性化する。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ブロッキングパッドではさみ、ブロッキ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。
- a)~c) の条件でブロッキングを行う。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

8. 免疫染色

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：5% skim milk, 5% FBS in PBST (0.1% Tween 20)。Skim milk は必ず加温溶解（80°C程度）すること。冷却水中で冷やした後、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挙げるために FBS を加えている）。
- 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, 1% FBS in PBST で希釈。0.1-0.2ug/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 NA9310)：1% skim milk, 1% FBS 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 ウェスタンブロッキ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-ray film を作製する）^(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

【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°C 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 ウェスタンブロット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-ray filmを作製する)^(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 in PBS (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 ブロットモジュール 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:試料調整 (2 時間)

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

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

2 日目:染色 (4 時間)

【例 3】 1 日目:調整 (2 時間) →PAGE (1.5 時間) → WB (2 時間) →染色 (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) むるま湯で色だし後、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℃ 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	デイスボベンチシート	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	シーフード付きマスク	ホギメ [®] イル	FBM-281	50 枚
15	ガウン	ホギメ [®] イル	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	ヘパフィルター付きフード	オリエンタル	Aura-700	
21	ヘパ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、切片を入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+D	-/3D

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。

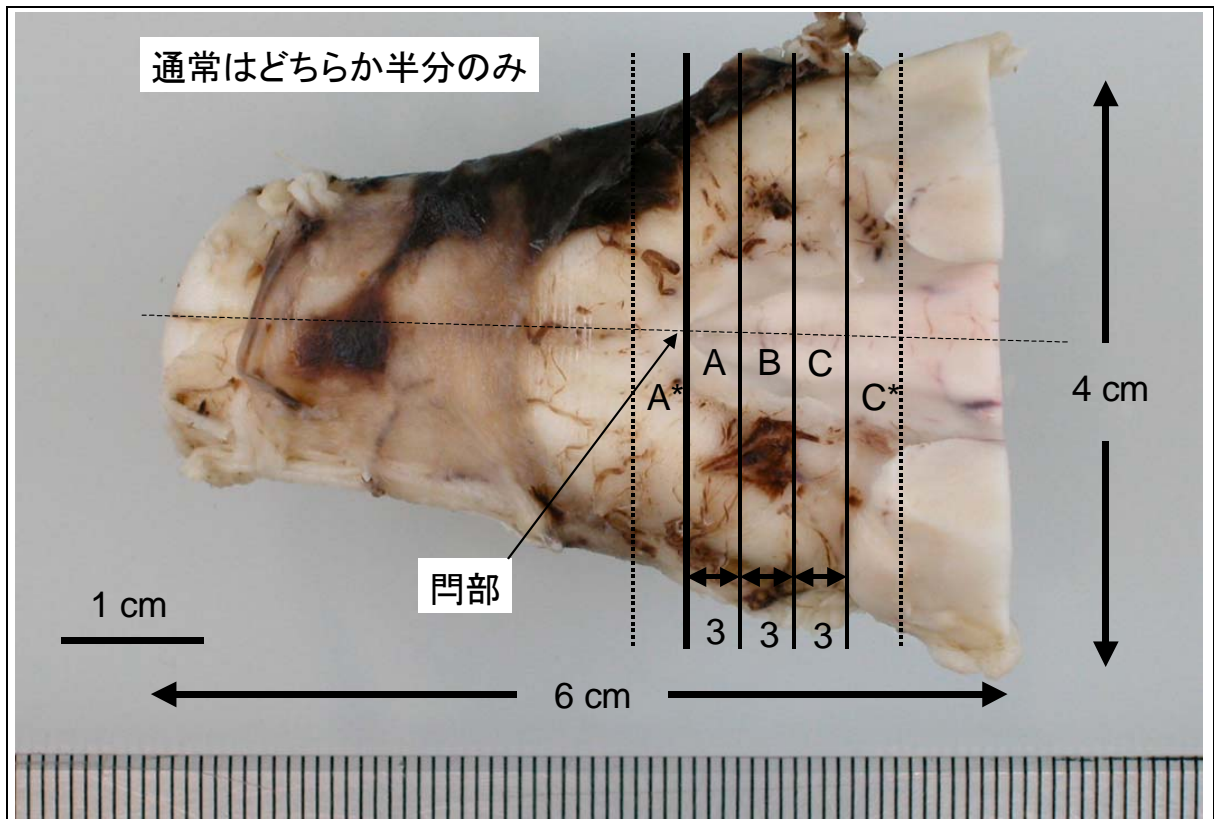


図1 正常ウシの延髄。切り出し場所を示す。通常、かんぬき部(A)、その上部(B と C)と切断する。最低 A-C の3カ所を切り出す。上部 (右側) を薄切する。

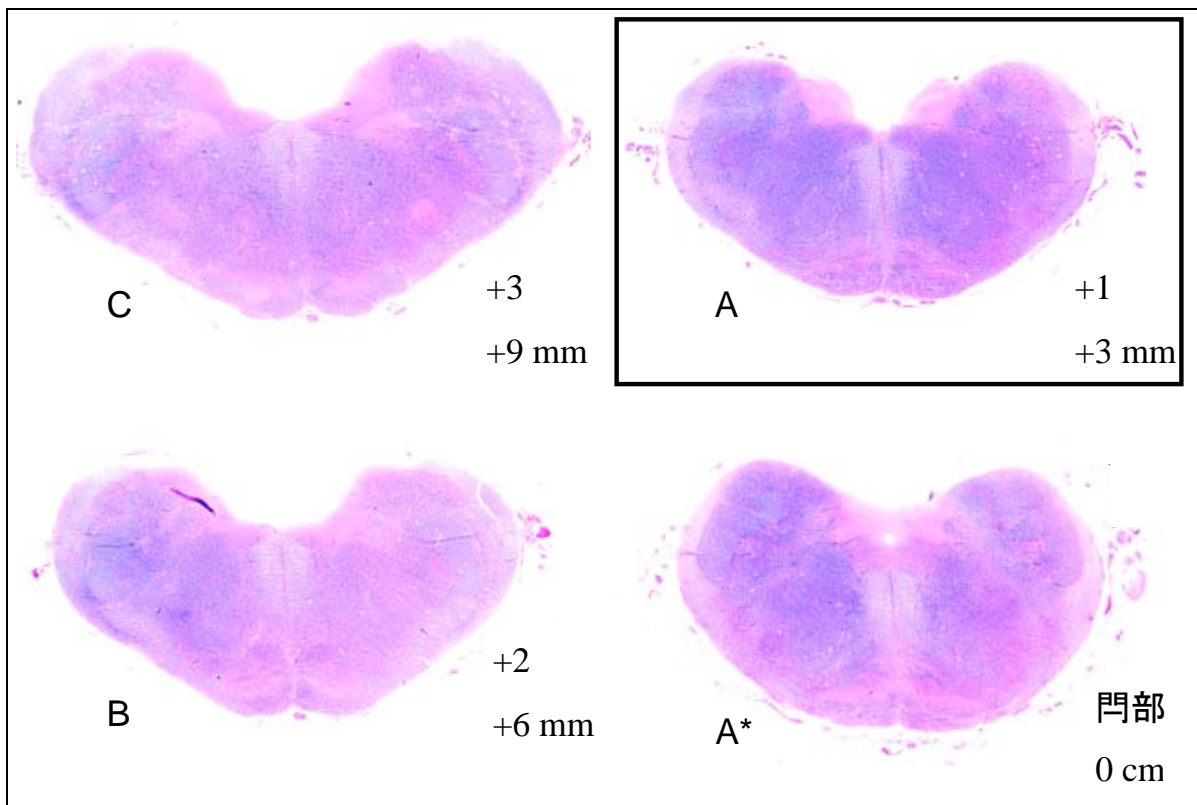


図2 A-CおよびA*の面のHE染色標本。右の数字は門部から一つ上(A部、+1 = +3 mm)が最もよい場所である。この部分の延髄神経核の分布は次の図を参照のこと。

延髄神経核

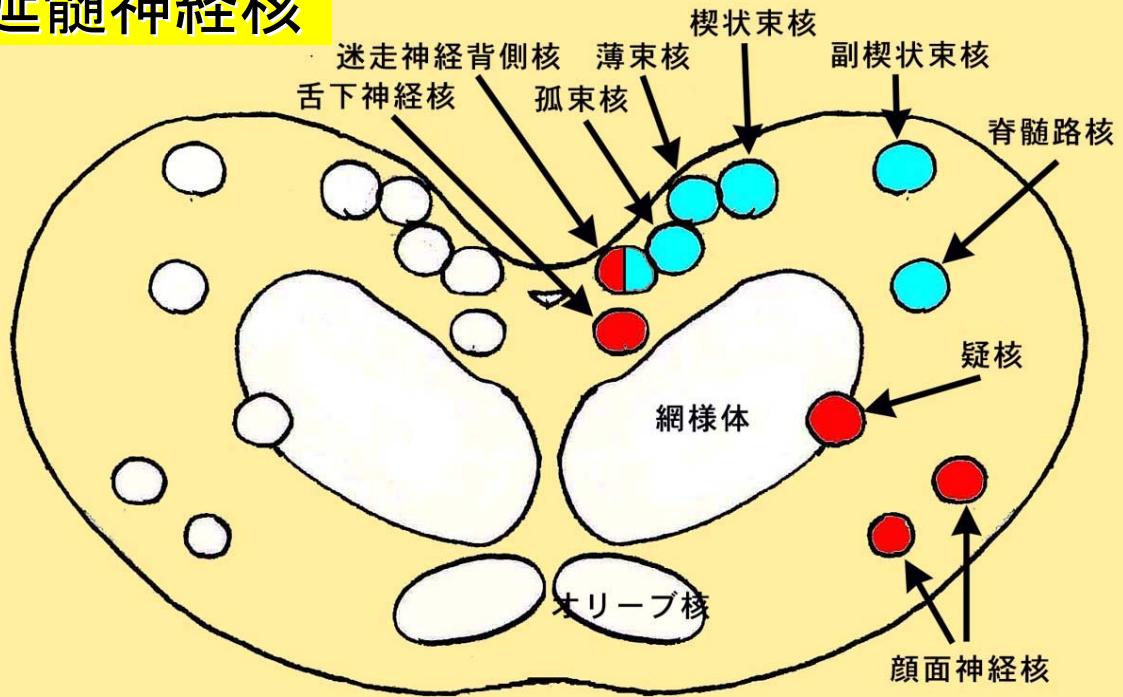


図3 延髄の神経核



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。

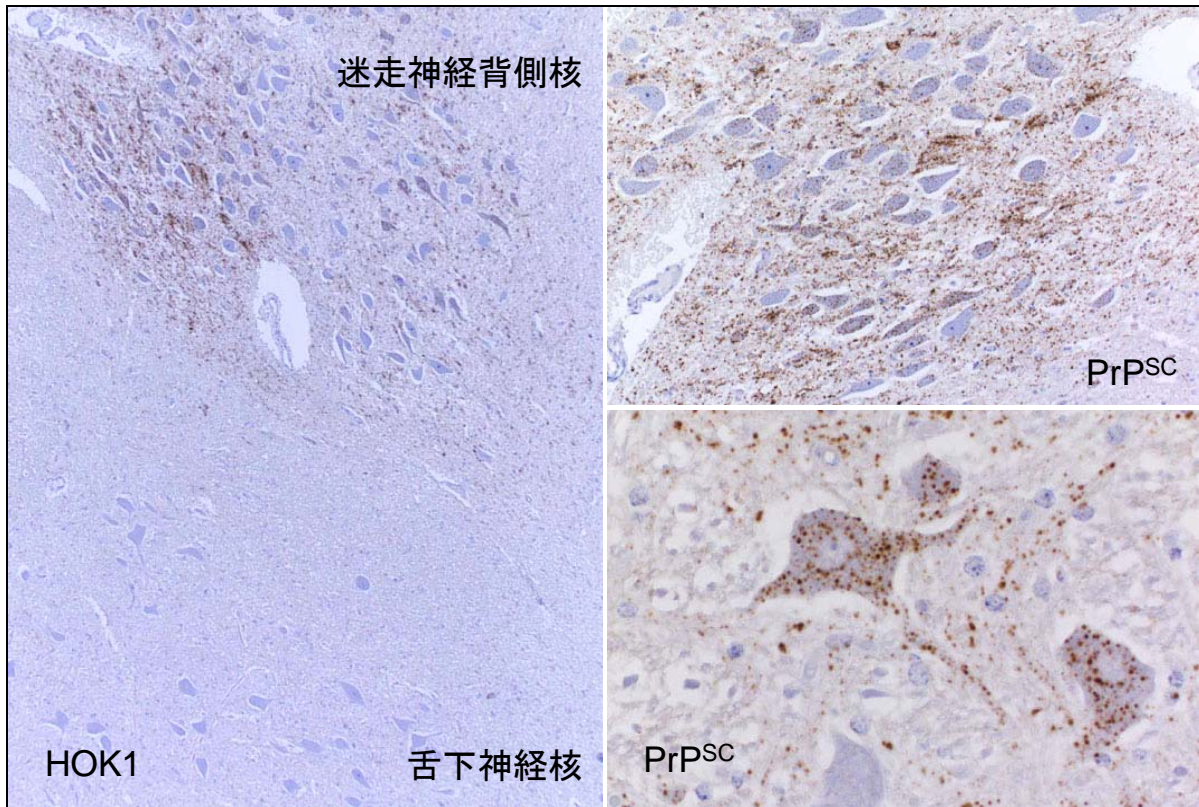


図5 北海道1例目の陽性像。PrP^{SC}陽性所見に注目。顆粒状のプリオンが検出される。

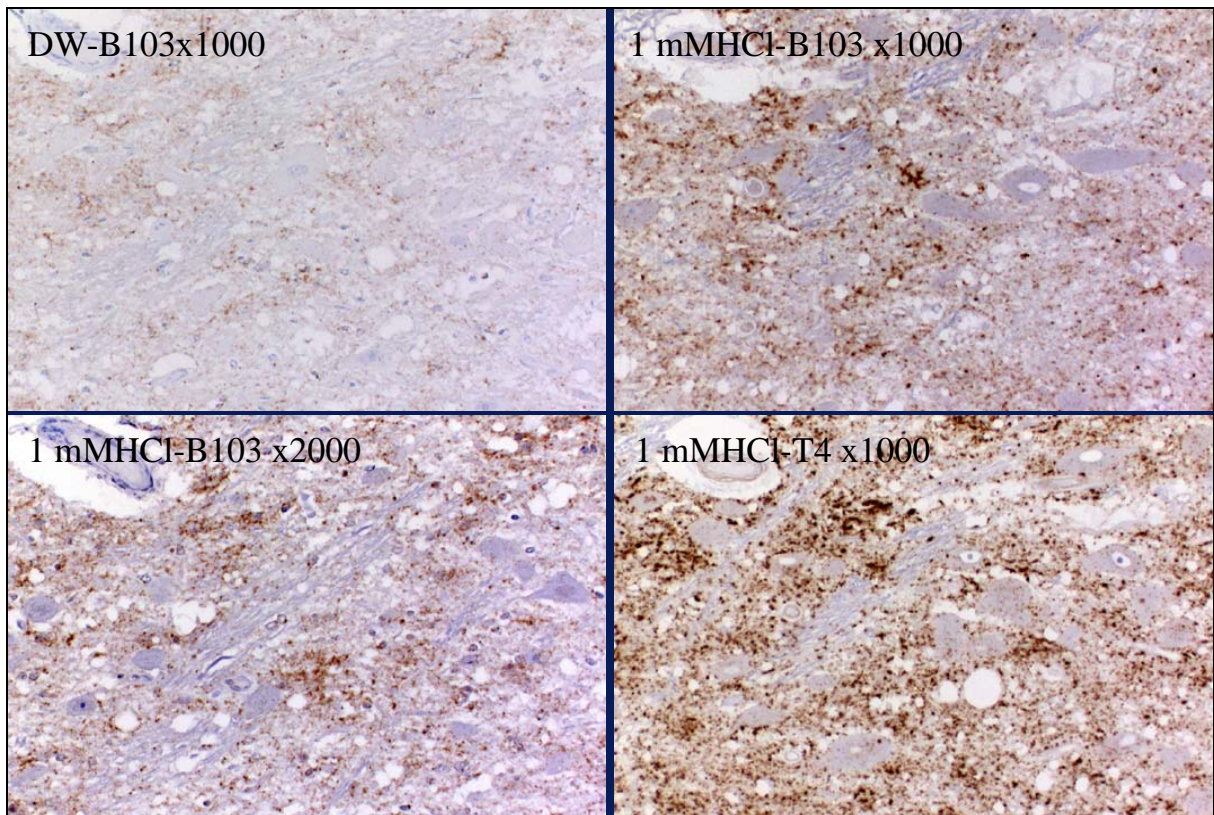


図6 B103による免疫染色と切片の塩酸前処理効果。(埼玉例)
 通常は蒸留水を用いた121°C20分のオートクレーブ処理を行う。塩酸処理ではプリオン陽性反応は強くなるが、核に非特異染色が観察される。塩酸処理は必要時に確認目的で行うことがある。

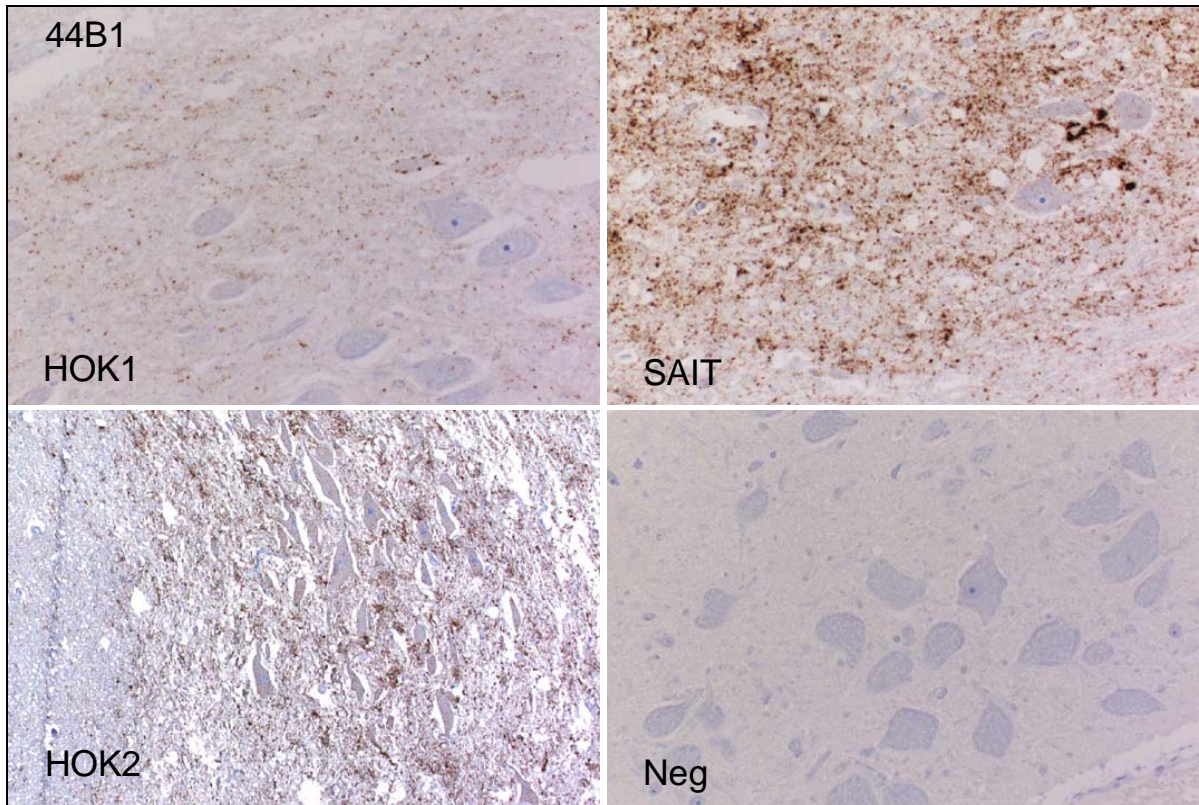


図7 44B1による免疫染色像。ただしHOK2は抗プリオンウサギポリクローナル抗体(T4)による陽性像。SAITは海綿状変化を伴っている。

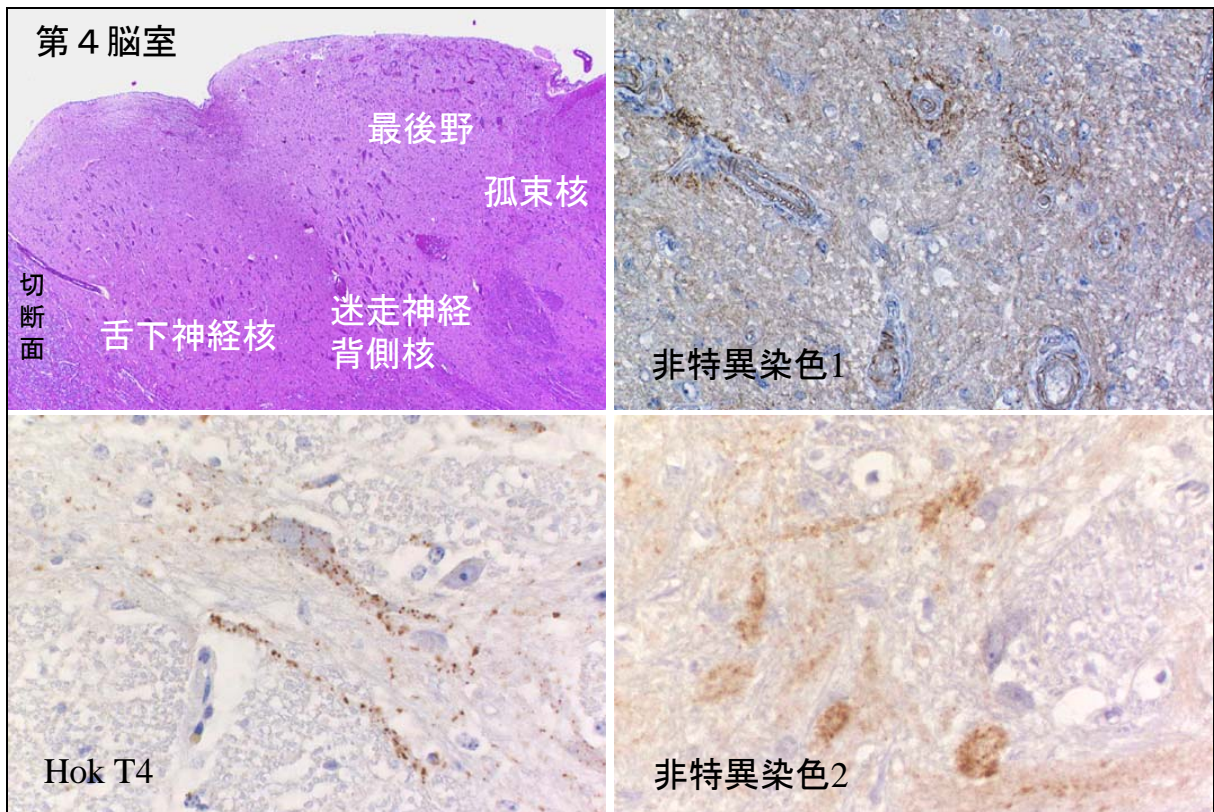


図8 Aの断面には最後野が出てくる。この部分はポリクローナル抗体(T4ないしB103)では小血管周囲に非特異染色像がみられることがある。またときに非特異染色2のような所見がえられるが、その場合、非特異染色2は染色所見がHok T4の陽性所見とは明らかに異なっている。44B1モノクローナル抗体では現在までこのような非特異染色像はえられていない。