

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リング 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
(マルチビーズジョ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℃ (Urea, SDS が析出するが使用時に50℃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
 - 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。
- 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。
- 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/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stromacher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 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。

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°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 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段階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ブロットイングパッドではさみ、ブロットイ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。
- ・ミニトランスブロットセル（Bio-Rad, 170-3930）を用いる場合には、a)~c) の条件でブロットイングを行う。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™ ブロットモジュール（Invitrogen, EI0002）を用いる場合には、25V 定電圧 1 時間 ~ 1 時間 30 分の条件でブロットイングを行う。

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℃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 μg/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 ウェスタンブロットリ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°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リ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 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 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) 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+/>2D	-/>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。