

(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) _____

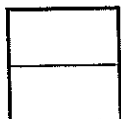
カットオフ値 _____

カットオフ値の-10% _____

検 体 数 _____

(陽性検体数、陰性検体数) _____

	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。

(別紙様式 1 - 1) (記入例)

(試験) 再試験

検査日 平成13年 10月 18日

所属自治体名 ○ ○ 市

所属検査所名 △ △ 食肉衛生検査所

検査員名 (署名) 厚生 太郎

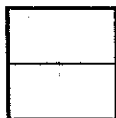
カットオフ値 0.251

カットオフ値の-10% 0.2259

検体数 18

(陰性検体数、陽性検体数) (18, 0)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	陰性コントロール 0.041	bovine-3 0.172	bovine-11 0.104	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B	陰性コントロール 0.040	bovine-4 0.132	bovine-12 0.082	/	/	/	/	/	/	/	/	/
C	陰性コントロール 0.042	bovine-5 0.156	bovine-13 0.101	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D	陰性コントロール 0.041	bovine-6 0.122	bovine-14 0.166	/	/	/	/	/	/	/	/	/
E	陽性コントロール 2.53	bovine-7 0.098	bovine-15 0.145	/	/	/	/	/	/	/	/	/
F	陽性コントロール 2.45	bovine-8 0.087	bovine-16 0.191	/	/	/	/	/	/	/	/	/
G	bovine-1 0.083	bovine-9 0.115	bovine-17 0.072	/	/	/	/	/	/	/	/	/
H	bovine-2 0.106	bovine-10 0.095	bovine-18 0.126	/	/	/	/	/	/	/	/	/



← 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：

牛海綿状脳症確認検査検体送付票

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
					性別	品種	月齢	臨床症状	とさつ年月日	
					飼養者					
出荷者 住所			電話		氏名		住所		電話	
氏名										
					飼養者					
氏名			住所		電話		氏名		住所	電話
氏名										
					飼養者					
氏名			住所		電話		氏名		住所	電話
氏名										
					飼養者					
氏名			住所		電話		氏名		住所	電話
氏名										

検査キットの種類・ロット番号：

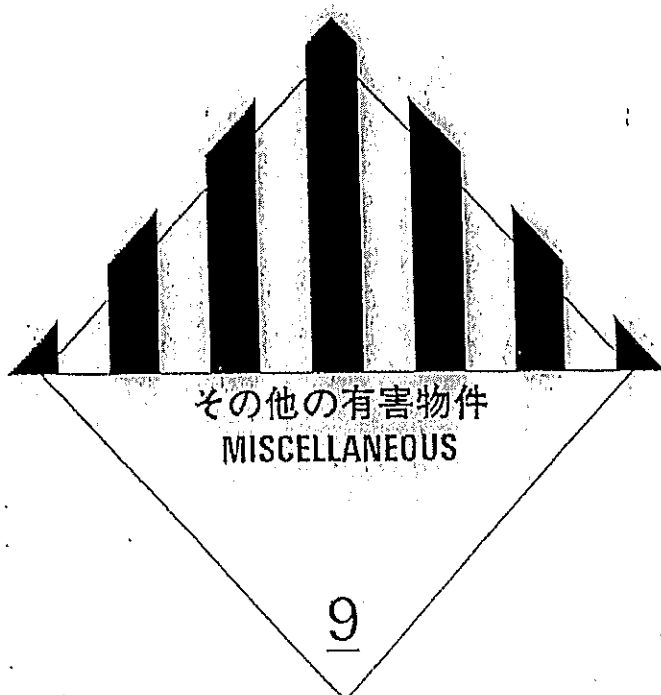
検査機関への検体到着予定日及び時間帯

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		
UN 2 8 1 4 UN 2 9 0 0	人体及び動物に対し伝染性があるウイルスを移しやすい物質 (液体)	(注 1)	ml
UN 2 8 1 4 UN 2 9 0 0	人体及び動物に対し伝染性があるウイルスを移しやすい物質 (固体)	(注 2)	g
UN 1 8 4 5	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		
	UN2814 UN2900	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
✓	UN2814 UN2900	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
✓	UN1845	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。

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²

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³

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。

² 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）

³ 同上

都道府県等における牛海綿状脳症（BSE）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「BSE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BSE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) ウェ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（ウェスタンブロット法）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、ウェスタンブロット法）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。

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)
- ・ブロッキング槽：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	アシスト	No. 72.693S
(マルチビーズシ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 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/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⁽¹⁾。
- 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、ウェ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 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、超音波処理を行う。

c) フレライザ 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（フレライザ 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°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 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 ^(註3)^(註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) ^(註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イ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 \times 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。

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 3mm 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) ぬるま湯で 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°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しやすい。)

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

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%	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	へパフィルター付きフード	オリエンタル	Aura-700	
21	へ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	