

牛海綿状脳症検査実施要領

1 趣旨

本要領は、我が国において牛海綿状脳症（以下「BSE」という。）にり患した牛が確認されたことから、食肉の安全を確保するとともに、国民の不安を解消するため、と畜場法（昭和28年法律第114号。以下「法」という。）に基づきBSEに係る検査を実施し、BSEにり患した牛が食用として流通しないよう措置し、併せて我が国におけるBSEのり患状況の評価に資することを目的とする。

2 BSE検査の必要性

BSE患者が我が国の国産牛で確認され、BSEが反芻獣由来のタンパク飼料成分により広く伝達されること、さらに欧州における疫学的知見及び我が国での発生状況が不明であることも踏まえると、と畜場に搬入される全ての牛についてBSEにり患しているか否かの検査を要すると判断されるので、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 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の提出の際には、「年齢」について月単位で記載すること。また、子牛登記証明書（社団法人全国和牛登録協会発行）、血統登録証明書（社団法人日本ホルスタイン種登録協会発行）又は家畜個体識別システムのデータベースの検索結果の写しなど当該牛の月齢が確認可能な書面を添付することが望ましいこと。

イ BSE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「年齢」欄の記載及び上記(1)のア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)のイ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、牛の歯列の確認を行い、と畜検査申請書に添付された上記3の(1)のアに定める書面を参考に月齢を総合的に判断すること。また、第3切歯が生えている場合には、と畜検査申請書の記載にかかわらず生後30か月以上であると判断すること。
- (2) 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、当該牛がBSE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者に該当。）には、当該牛のとさつ又は解体によりウイルス（異常プリオン）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、その旨を申請者及びと畜場設置者等に通知するとともに、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) BSE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知するとともに、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) スクリーニング検査は月齢を問わず、すべての牛について、原則としてとさつ解体を行った当日に実施すること。
- (2) 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30ヶ月以上の牛。
 - ウ その他の牛。

(3) 検体採取等

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「牛海綿状脳症（BSE）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。

なお、延髄がとさつ時の金属ワイヤーによる中枢神経破壊の際に損傷され、採取位置が確認できない場合は、複数箇所から検体を採取すること。

(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知するとともに、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途通知で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牛海綿状脳症（BSE）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食品局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知するとともに、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、BSE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、BSE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7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的場合

ア 特定部位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、特定部位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、BSEと判断された場合

監視安全課から確定診断の結果、BSE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 特定部位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、特定部位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)のア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、BSEに罹患している牛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) 危険部位は、牛の頭部（舌及び頬肉を除く。）、脊髄及び回腸（盲腸との接続部分から2メートルまでの部分に限る。）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) BSE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BSE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ある場合には、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。
BSE陽性牛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、前週日曜日から土曜日までの検査結果を翌週の月曜日（月曜日が祝日の場合は、休日明けの日）の午後6時までに、食肉検査支援システムを利用して報告すること。
なお、食肉検査支援システムに不具合が生じた場合等については、別紙様式2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、BSEとされたものについては判明次第、スクリーニング検査及び確認検査の結果が陰性のものの総数を毎週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

(別紙様式1)

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

BSE疑いのある牛の発生確認報告書

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	当該牛	種類	性別	♂ ♀	月齢	ヶ月
4	生体検査所見					
5	備 考					
	耳標番号等					

牛海綿状脳症(BSE)のスクリーニング検査結果(週報)

月 日～ 月 日搬入分

自治体名 _____

	症状を呈する牛 ※1				生後30ヶ月齢以上の牛				その他の牛				計			
	陰性	陽性	検査中	計	陰性	陽性	検査中	計	陰性	陽性	検査中	計	陰性	陽性	検査中	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

牛海綿状脳症（BSE）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

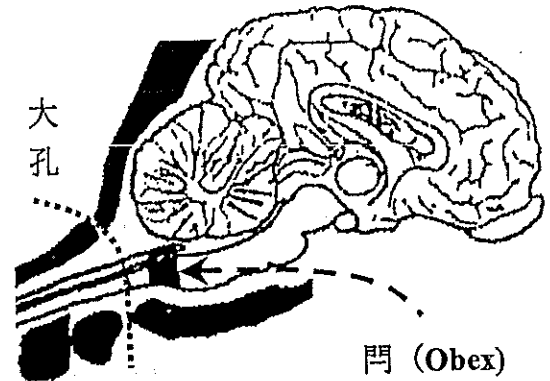
- 作業は区画された専用の実験室内において、原則として安全キャビネット内で行う。
- 作業者は傷口からの感染、飛沫による目及び口からの汚染を防ぐために、ラテックス又はビニール製手袋、マスク、予防衣及び帽子を着用し、必要に応じ防護眼鏡等も使用する。
- 作業着はじめ各種器具器材は可能なかぎりディスポーザブルの製品を使用する。
- 検査材料の取扱いはベンチシート上で行い、飛沫、エアロゾルを発生させないように気をつける。
- 検査材料をこぼした時及び業務終了時には、作業場所の表面を次亜塩素酸ナトリウム溶液で清拭する。
- 使用済みベンチシート、ディスポーザブル器具類はオートクレーブバッグに入れ、132～134℃ 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度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薬匙を差し込んで、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病理組織検査及び免疫組織化学検査材料に、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」又は「フレライザ 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又は別添1-3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）

門（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50 ml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、ウエ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追って連絡することとする。

5. 検体送付に当たっての注意

郵便規則（昭和22年逓信省令第34号）第8条第2号及び第3号に基づき、国連規格容器の適切な包装等を行い、送付すること。

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。

(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。）

「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

- 1) ウシの悶 (Obex) 部位を 350 \pm 40 mg を量り取る。
- 2) 量り取った検体をグライディングチューブに入れる。
- 3) 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 $^{\circ}$ 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。)
- 4) 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 $^{\circ}$ Cで8時間、-20 $^{\circ}$ Cで数週間保存可能である。)
- 5) 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。
- 6) 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 \pm 1 $^{\circ}$ C、10 \pm 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 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 ($18 \sim 22^\circ\text{C}$) 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 $800 \mu\text{l}$ 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 $350 \mu\text{l}$ 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取り除くために、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 $100 \mu\text{l}$ ずつ、各ウェルに分注する。

6) シーリングフィルムで覆い、 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 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 ($18 \sim 22^\circ\text{C}$) 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 $800 \mu\text{l}$ 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 $350 \mu\text{l}$ 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取り除くために、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) $100 \mu\text{l}$ 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 ($18 \sim 22^\circ\text{C}$) 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) $100 \mu\text{l}$ 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 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、 $600\text{nm} \sim 700\text{nm}$ 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 エンファアー BSE テスト」操作法

1. キットの構成

(1) ダイナボット エンファアー BSE テストの構成

試薬パック (2~8℃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℃	該当なし	該当なし
洗浄剤 1	100g 粉末 ×1ボトル	2~30℃	精製水 1L あたり 50g の 洗浄剤 1 を添加し、溶 解する。	2~8℃で6ヶ月
ヤギ血清	150μL×1本	2~8℃	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 100μL×1本	2~8℃	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℃	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℃		
遠心プレート	2プレート	2~30℃	該当なし	該当なし
アッセイプレート	1プレート	2~30℃	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℃	該当なし	該当なし
ブランクコントロール	30mL×1本	2~30℃	該当なし	該当なし

抗体パック (-25~-15℃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℃	該当なし	該当なし
抗プリオン抗体 (ウサギ血清)	濃縮抗体 50μL×1ボトル	-25~-15℃	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℃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℃	該当なし	該当なし
洗浄剤 2	10 倍濃縮液 500mL×1ボト ル	10~30℃	精製水 900mL あたり、 洗浄剤 2 を 100mL 添 加し、混合する。	10~30℃で2週間 2~8℃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 (2750 G 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* (洗浄剤1溶液を使用) ステップ:			洗浄プロトコール2 (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°C 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°C で 2 週間、2~8°C 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こと。

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: 2,750G	5 min 室温	遠心器	インキュベーターの 温度が 34℃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℃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℃	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		Skawasher 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℃	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		Skawasher 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 エルをセットする	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		Skawasher 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		Skawasher 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		