
資料

BSEスクリーニング検査試料の プロテイナーゼK処理に 関する検討結果

斎藤隆行¹, 秋山雅彦², 高橋壯一郎²,
沢谷広志², 今井光信¹

Investigation on Treatment of Materials with ProteinaseK for BSE Screening Test

Takayuki SAITO¹, Masahiko AKIYAMA²,
Soichiro TAKAHASHI²,
Hiroshi SAWAYA² and Mitsunobu IMAI¹

2001年9月10日千葉県白井市の酪農家で飼育されていた乳用牛1頭が、日本で初めての牛海绵状脑症 (bovine spongiform encephalopathy; BSE) 感染牛であることが確認された（最終確認は9月21日英國獣医研究所によりなされた）。これを受け、農林水産省および厚生労働省それぞれにBSE 対策本部が設置され、その対応策が検討された。その中で、食肉処理場に搬入される牛すべてを対象としたBSEスクリーニング検査が、10月18日より全国一斉に開始される運びとなった（平成13年10月16日付け食発第307号）。

BSEスクリーニング検査にはプラテリアBSEキット（Bio-Rad社）を使用している。このプラテリアBSEキットは、BSEを引き起こす原因と考えられている異常型プリオントン蛋白を精製するBSE精製キットと、酵素結合抗体免疫アッセイ（enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）により、精製した異常型プリオントン蛋白を検出するBSE検出キットとに分かれる。

ELISAは非常に感度がよく、陽性のものを陰性と判定することはほとんどないとされている。しかし、正常型プリオントン蛋白と異常型プリオントン蛋白を区別して検出できることや非特異反応によってBSEに感染していないのに陽性と判定されてしまう（偽陽性）ケースがある。したがって、精製過程での正常型プリオントン蛋白を分解するプロテイナーゼK（PK）処理が最も重要となる。そこで、精製過程のPK処理による正常型プリオントン蛋白の分解に関する検討を行った。

プラテリアBSEキットの操作手順は次のとおりである。

1. 検査試料の精製

- (1) ウシ延髄かんぬき部を350±40mg採取する。
- (2) 採取試料をマイクロビーズと均質化液（ブドウ糖50mg/mL）の入ったグライディングチューブに入れ、細胞破碎機にかけ乳剤にする。
- (3) 乳剤を500μLを取り、別に用意した1.5mL容量のマイクロチューブに移す。
- (4) マイクロチューブに、PK希釈液（試薬A；尿素0.12g/mL）で250倍に希釈調整したPK溶液(3.6μL/mL)を500μL加え、よく混和する。
- (5) ヒートブロックに置き、37±1°Cで10±1分間インキュベーションする。
(この操作で、正常型プリオントン蛋白は分解されるが、異常型プリオントン蛋白は分解されない。)
- (6) 試薬B（第三ブタノール）を500μL加え、よく混和する。（PKの反応を止める。）
- (7) 20000gで5分間、または15000gで7分間遠心する。
- (8) 上清を廃棄し、吸水紙の上にマイクロチューブを逆さにして、5分間静置する。
- (9) 溶解液（尿素0.36g/mL）を50μL加え、ヒートブロックに置き、100±1°Cで5±1分間インキュベーションする。（異常型プリオントン蛋白の溶出）
- (10) ボルテックスでよく混和し、希釈液（リン酸カリウム2.7mg/mL、リン酸二カリウム13.96mg/mL）250μL加え、よく混和する。

2. 異常型プリオントン蛋白の検出

- (1) 抗ヒトプリオントン蛋白マウスモノクローナル抗体(0.5μg/ウェル)を固相化したマイクロプレートのA1～D1の4ウェルに陰性コントロール（リン酸緩衝液）を100μL分注する。
- (2) E1およびF1の2ウェルに陽性コントロールを100μL（ヒトプリオントン蛋白合成ペプチド0.05μg相当）分注する。
- (3) G1以降のウェルに精製した試料（1～(10)）を100μL分注する。

1 神奈川県衛生研究所 ウイルス部
〒241-0815 横浜市旭区中尾1-1-1
2 神奈川県食肉衛生検査所
〒259-1215 平塚市寺田縄38-2
(現〒243-0022 厚木市酒井892-1)

- (4) シーリングフィルムでウェルを覆い、37±1°Cで75±15分間インキュベーションする。
- (5) シーリングフィルムをはずし、各ウェル中の溶液を吸引した後、洗浄液（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン塩酸塩12.1mg/mL, 0.01%チメロサール含有）で3回洗浄する。その後、吸水紙の上でマイクロプレートを逆さまにして、軽く叩き、ウェル内に残った洗浄液を除く。
- (6) 洗浄液で10倍に希釈調整した酵素標識抗体（ペルオキシターゼ標識抗ヒトプリオン蛋白マウスモノクロナル抗体 $1\mu\text{g/mL}$ ）を $100\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注する。
- (7) シーリングフィルムでウェルを覆い、2~8°Cで60±5分間インキュベーションする。
- (8) シーリングフィルムをはずし、各ウェル中の溶液を吸引した後、洗浄液で5回洗浄する。その後、吸水紙の上でマイクロプレートを逆さまにして、軽く叩き、ウェル内に残った洗浄液を除く。
- (9) 基質緩衝液（0.01%過酸化水素）と発色液（テトラメチルベンチジンニ塩酸塩2.5mg/mL）を10:1の割合で混合調整した基質発色液（透明であることを確認する）を $100\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注する。
- (10) 暗箱等で遮光し、室温（18~22°C）で30分間反応させる。
- (11) 反応停止液（硫酸0.5mol/L）を $100\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注する。
- (12) 反応停止液添加後30分以内に、主波長450nm、副

波長620nmにおける吸光度を測定する。

3. 判定方法

- (1) 隣性コントロール（4ウェル）の平均吸光度+定数（0.210）をカットオフ値とする。
- (2) 隣性コントロールの吸光度<0.150および陽性コントロールの吸光度≥1.000の条件を満たしていることを確認する。
- (3) 試料の吸光度<カットオフ値のとき、陰性と判定、試料の吸光度≥カットオフ値のとき、陽性と判定する。ただし、陽性を見逃すことがないよう万全を期す意味で、カットオフ値-10%以内の吸光度を示すものまで陽性の対象とする。
- (4) カットオフ値-10%以上の吸光度を示した試料については、残っている乳剤から精製、検出を再度実施する。再検査時のELISAでは、同じ試料について2ウェルを使用する。2ウェルの両方あるいはどちらかの吸光度がカットオフ値-10%以上を示した場合、スクリーニング検査陽性と判定し、確認検査（ウェスタンプロット法および免疫組化学検査）を実施する。

PK処理による正常型プリオン蛋白の分解に関する検討は図1のとおり実施した。

通常のBSEスクリーニング検査を実施した後、陰性であった試料から残った延髄かんぬき部乳剤をプールし、PK処理の条件を変えて、正常型プリオン蛋白の分解を行った。

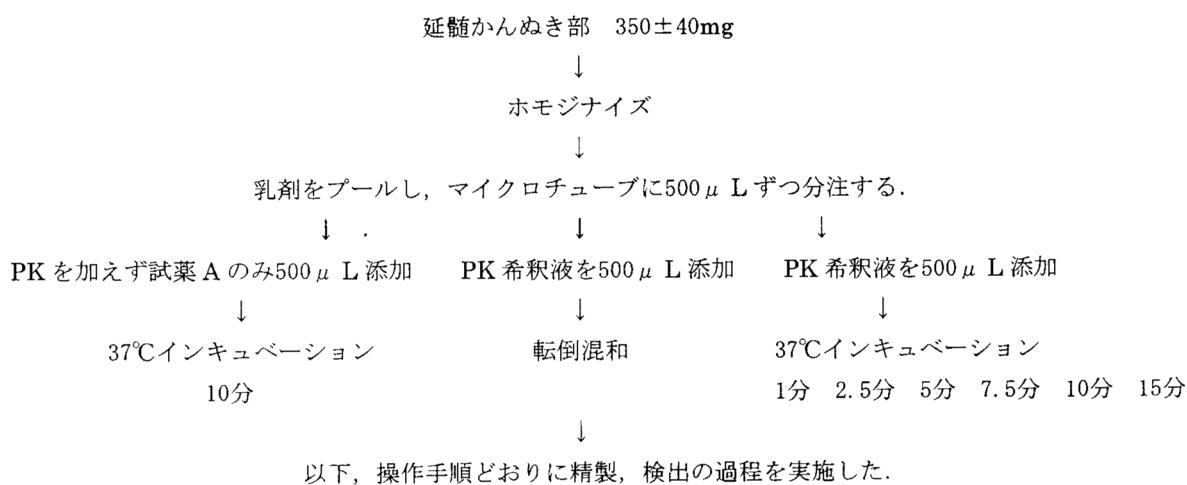


図1 プロティナーゼK(PK)処理による正常型プリオン蛋白の分解に関する検討方法

その結果（表1），延髄かんぬき部をホモジナイズし乳剤とした後，PKを添加せずに正常型プリオントロールの平均吸光度1.857とほぼ同じ値を示した。すなわち、延髄かんぬき部には、陽性コントロールと同等の正常型プリオントロールが含まれていると考えられる。

PKを添加し、転倒混和後37℃のインキュベーションを行わなかった試料の吸光度は、0.193とカットオフ値-10%に非常に近い値を示した。陽性と判定されないものの、正常型プリオントロールの平均吸光度0.025に近い値を示した。

以上のように、ウシ延髄かんぬき部にはプラテリアBSEキットに添付の陽性コントロールと同等の正常型プリオントロールが含まれており、PK処理による正常型プリオントロールの分解が不十分であったときには陽性と判定される可能性がある。標準操作は、PK希釈液添加後37℃で10分間インキュベーションとなっているので、正常型プリオントロールの分解は十分に行われるを考えられるが、延髄をおおっている脳軟膜や血液の混入は極力避けるべきであり、検体の採取およびヒートブロックの温度管理やインキュベーション時間など慎重に行うべきである。

偽陽性例の出現により、再検査や確認検査に時間や労

力を要し、また、酪農家や消費者に対する不安感を持たせることにもなるので、今後、異常型プリオントロールを特異的に検出できる検査法の開発が待たれるところである。

表1 延髄かんぬき部のプロティナーゼK(PK)による正常型プリオントロールの吸光度

PKの添加	インキュベーション	吸光度
無	37℃ 10分	1.798
有	転倒混和	0.193
有	37℃ 1分	0.034
有	37℃ 2.5分	0.041
有	37℃ 5分	0.027
有	37℃ 7.5分	0.028
有	37℃ 10分	0.070
有	37℃ 15分	0.035

陰性コントロールの平均吸光度=0.025

陽性コントロールの平均吸光度=1.857

カットオフ値 = 0.235

カットオフ値-10% = 0.211

(平成14年7月24日受理)