

出國報告 (出國類別： 研習)

庫甲氏症檢驗技術

服務機關：衛生署疾病管制局

姓名職稱：蘇勳璧副主任、劉素真技士

赴派國家：日本國立感染症研究所

出國期間：民國 94 年 11 月 12 日至 11 月 20 日

報告日期：民國 95 年 02 月 21 日

摘 要

傳染性海綿樣腦病變(Transmissible spongiform encephalopathies, TSE)是一種由普利子蛋白(Proteinaceous infection particle, prion)所引起的病症，發生在人身上主要是庫賈氏病(Creutzfeldt-Jacob Disease, CJD)及克魯症(Kuru)，在羊為羊搔癢症(Scrapie)，在牛為狂牛症(Mad Cow Disease)，學名是(Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE)，在鹿為狂鹿症(Chronic Wasting Disease, CWD)，在貂為傳染性貂腦症。

庫賈氏病是在 1920 年代初期被發現的腦部病變，發生率約為每百萬人口 0.5-1 名病例。1996 年四月英國首次於「刺絡針」發表新類型變腫庫甲氏症的十名病例，並表示此病的發生可能與 BSE 有關後，除了引發各國對歐洲牛肉進口的安全性產生疑慮外，同時也使得各國開始重視庫甲氏症之發生情形，世界衛生組織並呼籲世界各國應針對此疾病進行監視。

庫甲氏症之病因既非細菌也非病毒的 prion 蛋白 PrP(prion precursor protein)，其有兩種不同的結構形式 PrPC 和 PrPSC，具感染性的變性蛋白質(PrPSC)，會將神經細胞內正常的蛋白質(PrPC)



轉化成(PrPSC)，而以等比級數的速度累積在神經細胞內在大腦組織堆積，而造成神經細胞死亡所致，使腦組織變成海棉樣。

這種問題蛋白質主要存於受感染動物的腦神經、脊髓和眼睛，因此應避免進食受瘋牛症污染的動物腦部、脊髓及近骨骼位置的肉。患者的大腦，內臟、血液等均具有傳染力。其潛伏期為數年至數十年，無特效藥及疫苗可提供預防；且目前並無法治療此症，甚至要患者病發後，才知道受感染，再加上病人的症狀跟阿滋海默症（Alzheimer's disease）有所重疊，增加了檢查的困難度且活體採取腦組織進行檢驗更有執行上之困難。因此目前大多由臨床專科醫師依據臨床症狀、腦電波及神經病理試驗等來進行鑑定。

傳統之庫甲氏病一般多發生於中老年人，平均發病年齡約六十歲。新變異型則多發病在五十歲以下（平均二十七歲），新變異型庫甲氏病在發病初期會出現記憶力衰退行為異常和步態不穩等類似痴呆症狀，隨著疾病進展，患者的四肢與軀幹會有劇烈抽動，此外視力模糊、肢體無力及麻木感，在末期則是嚴重痴呆。由於在英國被診斷出之新變異型庫甲氏病患者大多是在英國確認狂牛病後十年開始出現的，病患多在一九八〇年代吃過牛肉，因此懷疑是誤食感染狂牛病之肉品而產生之變種疾病，所幸我國農政單位已在第一時間禁止相關產品進入國內，並自八十七年起即主動針對國內牛之進行狂牛病之監測，所幸至今並未發現陽性



病例。

由於新變異型庫甲氏病之潛伏期長，故人類感染庫甲氏病個案究竟有多少目前無法確知，但已知之致病因素有三：(1) 偶發性：發病率極低，根據文獻得知，偶發性的發生率約百萬分之一。(2) 遺傳性：主要來自家族顯性遺傳，PrP 基因發生病變(約 10%-15%) (3) 醫源性：主要是因為各種醫療行為所造成之感染，從一九七四年第一例因眼角膜移植而被感染的案例被報告後，也陸續有因腦部手術、器械污染、腦電極植入、硬腦膜移植、性荷爾蒙刺激素注射....等而感染此病之情形。由於目前台灣並無經由實驗室診斷確診之存活個案，再加上牛海綿狀腦病對本國畜牧業所帶來的衝擊，因此不論是針對食品安全管理或是人類經由醫源性感染此症之監測，皆是目前中央單位主管單位所共同關注之安全問題，為防範此病入侵台灣，確保人民健康與國內畜牧業之永續發展，衛生單位與農政單位亟需通力合作建立此病之診斷與監測系統。



目 錄

	頁 碼
目的	5
過程及內容	6-13
心 得	14
建 議	15-16
附 表	17-22



目 的

為了解日本針對庫甲氏症之確認診斷技術，奉赴前往日本感染症研究所之戶山分室，進行五個工作天之庫甲氏症技術研習及了解，內容包括：實驗室安全、檢體運送安全、西方墨點確認法。



過程及內容

- 一、 前往日本國立感染症研究所位於戶山細胞化學第一室辦理相關報到程序。
- 二、 依規定接受工作前之生物安全相關之訓練課程。
- 三、 研習內容：

- (1) 實驗室安全要求：

由於 prion 是一種正常之蛋白質，存在於神經細胞膜上，正常細胞之 prion 蛋白質（cellular prion protein）由約 254 個胺基酸所組成，於後轉譯過程中，經修飾處理形成 209 個胺基酸，因某些因素造成結構轉變而形成異常變性蛋白質，目前認為異常變性蛋白質會將神經細胞內之正常細胞之 prion 蛋白質轉化成異常變性蛋白質，而以等比級數的速度累積在神經細胞內，終使腦組織變成海綿樣。

目前已知異常變性蛋白質對熱、紫外線、輻射照射及消毒劑均有很強的抵抗性，以一般之常用物理或化學方法並無法將其破壞，且其傳染的途徑包括食入、皮膚或黏膜的接觸、有意或無意的植入（器官移植）....等，目前雖無證據顯示此種變性蛋白質會



經由空氣吸入而感染，但在實驗室操作檢體會產生 $<5\mu\text{m}$ 之極小懸浮微粒時（如：研磨、離心、震盪...等），這些含有病原之極小懸浮微粒極易藉由空氣流動而飄移至四處，所以在實驗室處理此病原時應視同會藉由空氣傳染，應使用完全密閉之離心設備（如附圖一、二），做好應有的防護措施。

實驗室相關要求如下：

1. 實驗室操作人員均應經過生物安全訓練。
2. 非經實驗室負責人許可不得任意進出實驗室。
3. 嚴禁在實驗室內吸煙或飲食。
4. 處理檢體與實驗進行均應穿著防護衣物，包括頭罩、眼罩、口罩、連身工作服、手套....等，且應使用符合生物安全等級二級專用之無菌操作櫃。
5. 檢驗過程中應勤加更換手套，不可重複使用。
6. 實驗相關之消耗品應以不回收為原則，盡可能使用拋棄式耗材（附圖三）。
7. 所有防護衣物均不得穿離實驗室之外。
8. 廢棄物應集中放置於標誌有感染性廢棄物塑膠袋中以 1500°C 之高溫焚毀。
9. 可高溫高壓處理之器械或容器應以 1N NaOH 浸泡兩小



時，再以高溫高壓滅菌(132°C；4.5hrs)。

10.不可高溫高壓處理之器械或容器應以 1N NaOH 浸泡，且每小時更換液體一次，共計更換三次。

11.不可使用 NaOH 處理之物品，則改用 4M guanidinium HCl 處理。

12.有感染疑慮之廢液，應加入 NaOH 處理，並使液體最終濃度為 1N 後再滅菌處理。

13.地板應經常使用漂白水清潔。

此次前往之日方實驗室人員強調，處理 prion 之實驗室至少應達到生物安全等級二級之標準，且此一空間應僅供作此單一病原體操作及使用，所有廢棄物及污染物均需於此一空間進行除污後才可攜出，以確保實驗工作同仁安全。

(2) 安全運輸容器

參考商品如附圖四、五。

(3) 西方墨點檢測方法

設備：

XCell SureLock MiniCell with XCell Blot Module (Invitrogen EI0002)

PowerEase 500, 100/120VAC (Invitrogen EI8600); power supply



Bioruptor (COSMO BIO, Japan No.4697751); for sonication
Multi-beads shocker (Yasui Kikai MB400U)

(No MC-01212PP); for homogenization of brain tissue

Thermomixer comfort (Eppendorf 5355 000.046); for
incubation/agitation and mixing

Centrifugator, \geq X 15,000rpm

試劑及其他：

Collagenase	100 mg	Wako	No. 038-10531
Pefablock		500 mg	Roche No. 1585916
Proteinase K, PCR grade		5 ml	Roche No. 1964372
DNase I		100 mg	Roche No. 104159
N-Lauroylsarcosine (Sarkosyl)		100 g	Sigma No. L-5125
Zwittergent 3-14		5 g	Calbiochem No. 693017
Sodium dodecyl sulfate (SDS)		500 g	Sigma No. L-4509
2-mercaptoethanol		100 ml	Sigma No. M-6250
Urea (Ultrapure)		500 g	Wako No. 17-00615
2-Butanol		500 ml	Wako No. 20-11215
Tween 20		500 ml	Wako No. 67-11515
Skim milk			
Fetal Bovine Serum			
NuPage 12% BT Gel, 12well			Invitrogen No. P0342BOX
NuPage Antioxidant			Invitrogen No. NP0005
NuPage MOPS SDS Running Buffer (20x)			Invitrogen No. NP0001-02
SeeBlue Pre-Stained Standard			Invitrogen No. LC5625
PVDF Membrane and FilterPaper			Invitrogen No. LC2005
NuPage Transfer Buffer (20x)			Invitrogen No. NP0006-1



X ray film	FujiFilm
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Pharmacia No. RPN2209
Anti-mouse IgG HRP labeled 1 m	Amersham Pharmacia No. NA9310
2ml tube with O-ring, sterilized	Assist No.72.693S
Gel loading tip	Funakoshi No.SPRT-1381
Zirconia beads (YTZ ball 1-mm)	Nikkato,Co, Tokyo

試藥準備

TN buffer; 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

Detergent buffer; 4% Zwittergent 3-14, 1% Sarkosyl, in TN-buffer

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

dispense and stored at -20°C

Pefablock ; 0.1M in DDW dispense and store at -20°C

Collagenase; 20 mg/ml in DDW dispense and store at -20°C

DNase I

Dissolved in a concentration of 10 mg/ml with 50% glycerol,

10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂. store at -20°C

檢體緩衝液配置：

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	
1 M Tris-HCl (pH6.8)	1.25 ml
Glycerol	1 ml
0.5 M EDTA (pH8.0)	120 μ l
β -mercapthoethanol	800 μ l
1% bromo phenol blue	800 μ l
SDS 1 g	
Urea 4.8 g	

Fill up to 20 ml

步驟

1. 秤取約 200mg 之腦組織
2. 放入 2 cc 離心管中加入 zirconia beads
3. 加入 800ul 的 TN Buffer 至離心管中
4. 設定 Multi-beads shocker:2000rpm / 5min 將組織研磨成均質狀
5. 加入 250ul 之 Detergent Buffer 和 2-BuOH 25ul 至步驟五中混勻
6. 加入 12.5ul (20mg/ml) 之 collagenase 混勻
7. 置於 37°C 孵育箱三十分鐘
8. 加入 20ul (1mg/ml) 的 ProteinaseK
9. 再置於 37°C 孵育箱三十分鐘
10. 加入 10ul 的 0.1M 之 Pefablock 後混合均勻
11. 加入 20ul 之 10mg/ml DnaseI 混勻



12. 室溫下靜置五分鐘
13. 加入 Butanol-Methanol Solution 250ul 混勻
14. 於 20°C 下離心 15,000rpm / 10 分鐘
15. 去除上清液並風乾沉澱物
16. 加入 1X 之檢體緩衝液進行均質化
17. 進行 100°C 煮沸五分鐘
18. 加入檢體及對照組各 20ul 跑電泳 (200 伏特 / 六十分鐘), 進行轉漬 (190 伏特 / 四十五分鐘); 膠片放置位置圖如附圖六。
19. 進行抗體反應: 使用 Blocking; 5% Skim milk*, 5% FCS in PBS-T(0.1% Tween 20), 室溫震盪孵育 45 分鐘
20. 加入一抗(0.2-0.5 μ g/ml)於 1% Skim milk, 1% FCS, PBS-T
21. 室溫孵育 40 分鐘
22. 以 PBS-T 清洗五次每次各 20 分鐘
23. 加入二抗(1/2,500)於 1% Skim milk, 1% FBS, PBS-T
24. 室溫孵育 40 分鐘
25. 以 PBS-T 清洗五次每次各 20 分鐘
26. 加入 ECL Western Blotting Detection Reagen 2 cc 置膜上混勻
27. 膜上水分吸乾以保先膜覆蓋帶至攝影室照相(兩分鐘至三十分鐘不等持續觀察反應強弱)



28.沖片底片，進行結果觀察。

結果：

若是腦組織中存有不正常之 PrPsc，則因對蛋白酶有抗性，以至於經蛋白酶處理後仍無法被完全消化，故陽性病例可見到三條分子量不同且較大片段的蛋白質，但其分子量大小比未經蛋白酶處理的來的小些。



心 得

- 一、 由於庫甲氏症之西方墨點檢驗，目前並無成熟之商用檢驗試劑可供常規使用，日方針對此一檢驗項目係以 in house 方式，由獨立使用實驗室之專責人員負責執行，再由病理部專家輔以細胞免疫染色法及分子生物法檢測進行實驗診斷之綜合研判，除須具有經驗之操作者執行外，更須一個專業團隊間的密切合作，始能產出一份具有公信力之確認案例報告。
- 二、 此次研習前個人對此疾病之所知有限，而僅五個工作天之研習行程實顯緊迫，但仍十分感謝日方教導人員提供的所有協助，讓此次研習過程雖無法快速累積實驗經驗，但針對實驗安全及確認檢驗能有概括性的了解仍屬獲益良多，也對該所指導研究人員即使退休在即仍能保持充分的研究熱忱，不僅感到印象深刻，並由衷的感到欽佩。



建 議

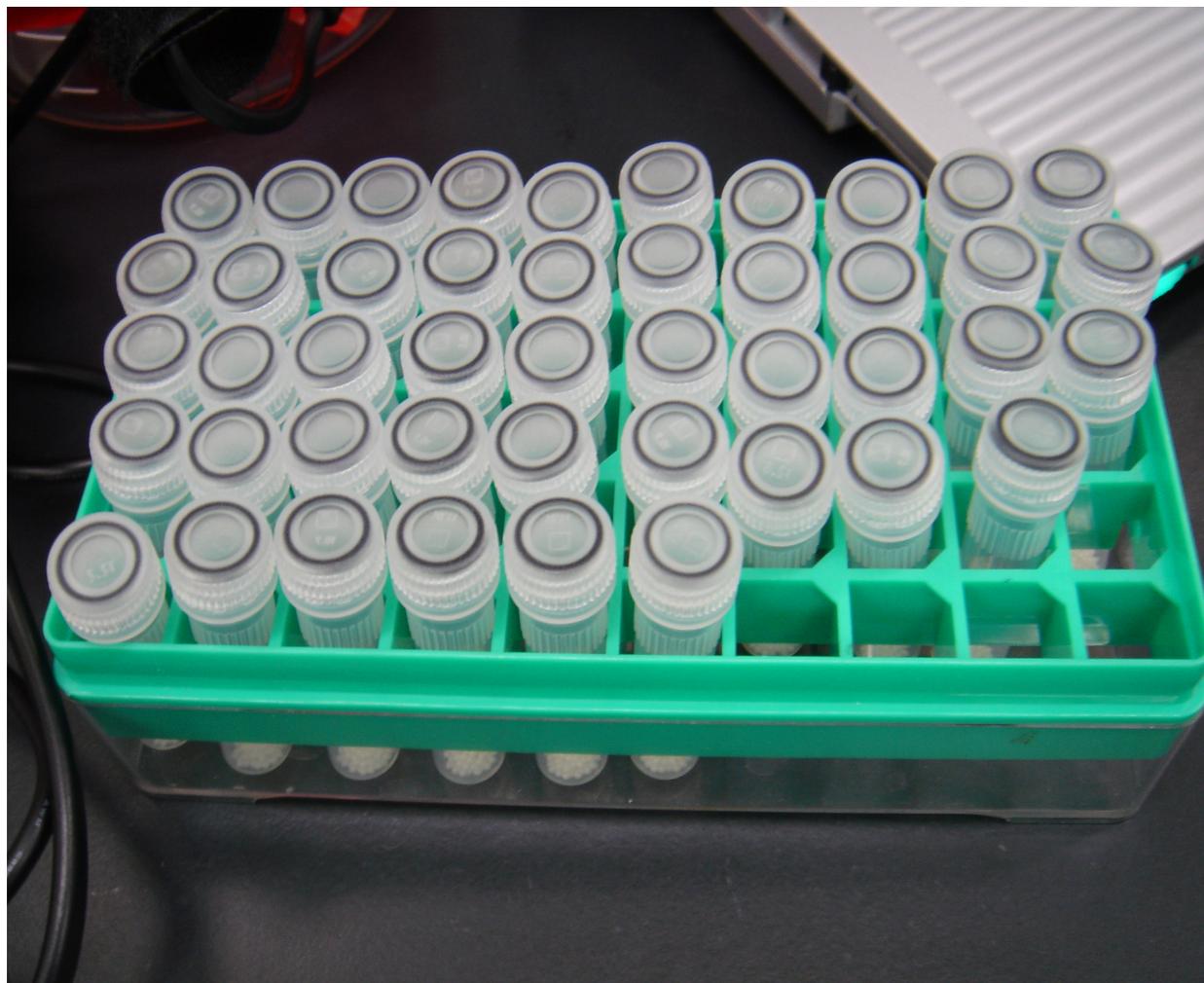
- 一、由於此疾病係屬人處共通傳染病，故完善之庫甲氏症防治有賴衛生與農政單位之通力合作，目前行政院農業委員會已於八十六年八月六日依照國際動物衛生法典規定，以八六農牧字第八六一三三八八五號公告禁止國內反芻動物肉骨粉回飼反芻動物。目前對 BSE 之牛羊畜產品輸入之管制政策，亦與美國、澳大利亞、日本等國一致，且淡水家畜衛生試驗所近年亦已完成符合國際標準規範之 P3 等級之專職狂牛症實驗室，且持續進行國內牛隻 BSE 之監測。
- 二、由於只要不食用特定風險物質(腦、神經組織、扁桃腺、小腸等)，就可以降低得到新變種庫甲氏症的風險，因此審慎的進行進口牛肉之評估，與長期進行疑似個案的臨床監測，針對出國旅遊之旅客進行此疾病之加強衛教是有必要的，將有助於釐清與進一步瞭解此病在台灣可能發生的風險機率並保障肉品消費安全。
- 三、庫甲氏症之人醫診斷部分，由於取得人體活體腦組織檢體困難，再加上國內個案數少，且尚無商用檢驗套組試劑可進行篩檢與確認，而目前中心亦未設有符合國際標準之專用獨立空間可供操作，雖經五個工作天之短



期技術研習，但受限於時間，再加上 in house 之西方墨點檢測法較耗時，故僅能就實驗流程部分進行了解，無法有充裕的時間進行完整操作，因此建議採取與農政單位技術合作方式進行國內各案此項病原體之初步檢驗，如經檢驗出陽性個案再尋求國際管道進行後續確診工作，以提升檢驗結果之公信力。



圖一、離心所使用之密閉式容器（含 O-ring）



圖二、密閉式離心機



圖三、可棄式口罩結合護眼功能之簡便耗材



圖四、安全運輸容器-1

STP-100

Infectious Substance Shipper

Saf-T-Pak STP-100 is a Packaging system which is suitable for safe, legal transport of any Infectious Substance by any mode.

The package bears certification markings for national and international shipment.

Conforms to ICAO Packing Instruction 602, Infectious Substances.

Conforms to United Nations Recommendations.

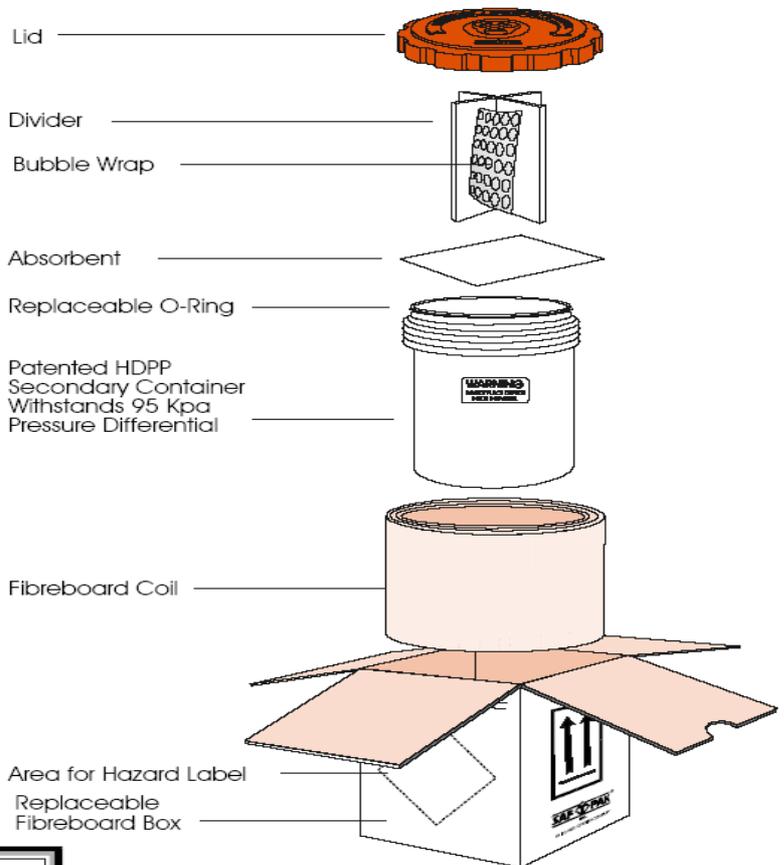
Conforms to CFR 49.

Conforms to Transport Canada TC-125-1A

The secondary container is made of polypropylene and may be autoclaved.

TC-125-1A/8-2

UN 4G CLASS 6.2/97
CAN/8-2 SAF-T-PAK



圖五、安全運輸容器-2

STP-300

Insulated Packaging

Saf-T-Pak STP-300 is an Outer Packaging which is specially designed to contain the Saf-T-Pak STP-100 packed with Dry Ice or Freezer Paks.

Saf-T-Pak STP-300 may also be used independantly for a wide variety of containers. However, in that mode STP-300 does not conform to required specifications for the transport of Infectious Substances.

This package is Internationally recognized by commercial carriers (air and surface).

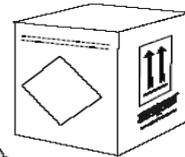
Assembly items can be replaced from refurbishment kits.

The approved mode of packing must be strictly adhered to in order to comply with appropriate

Polystyrene Lid



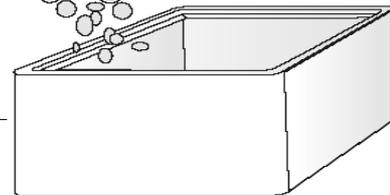
STP-100
(Separate specifications upon request)



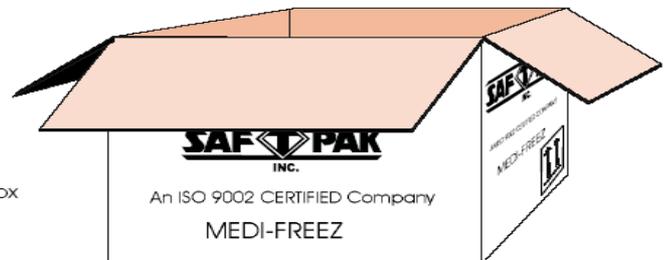
Dry Ice
Wet Ice
or
Gel Paks



Polystyrene Freezer



Reusable
Fibreboard Box



圖六、電泳轉漬裝置膠片位置圖

