

図1 正常ウシの延髄。切り出し場所を示す。通常、かんぬき部(A)、その上部(BとC)と切断する。最低A-Cの3カ所を切り出す。上部(右側)を薄切する。

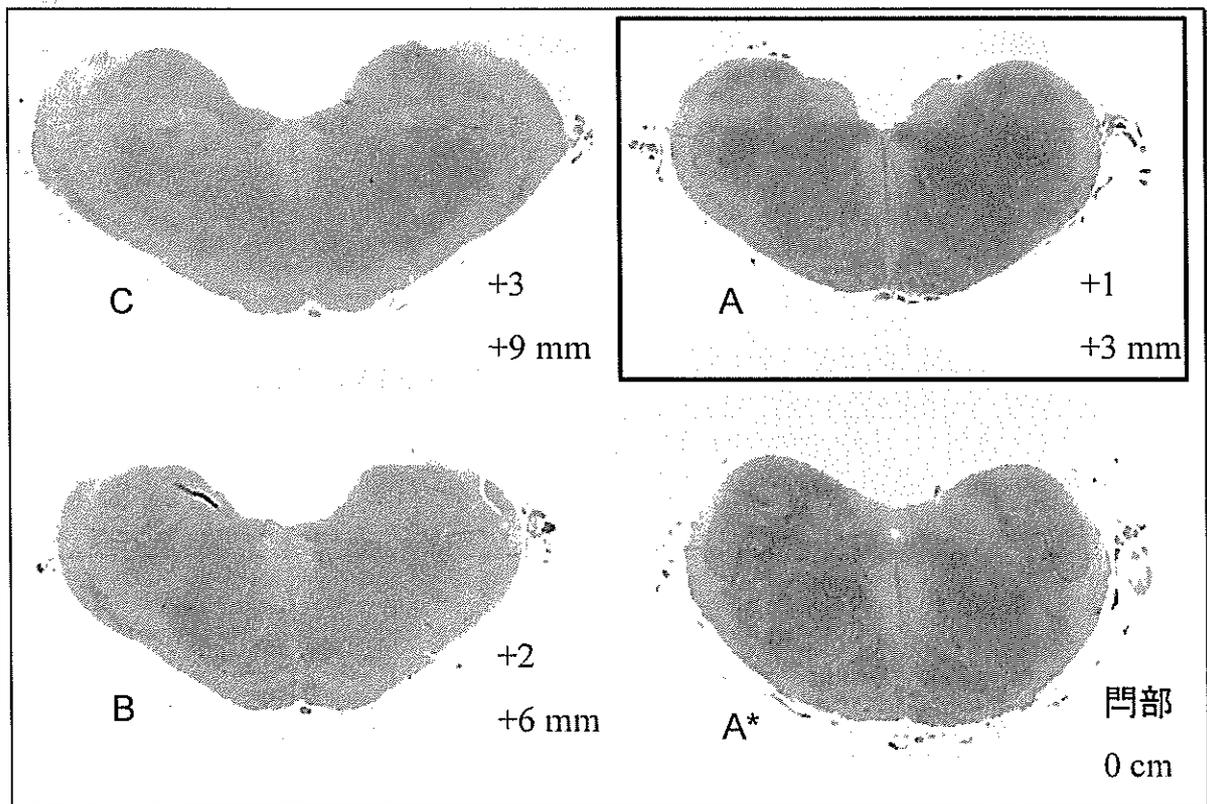


図2 A-CおよびA*の面のHE染色標本。右の数字は門部から一つ上(A部、+1 = +3 mm)が最もよい場所である。この部分の延髄神経核の分布は次の図を参照のこと。

延髄神経核

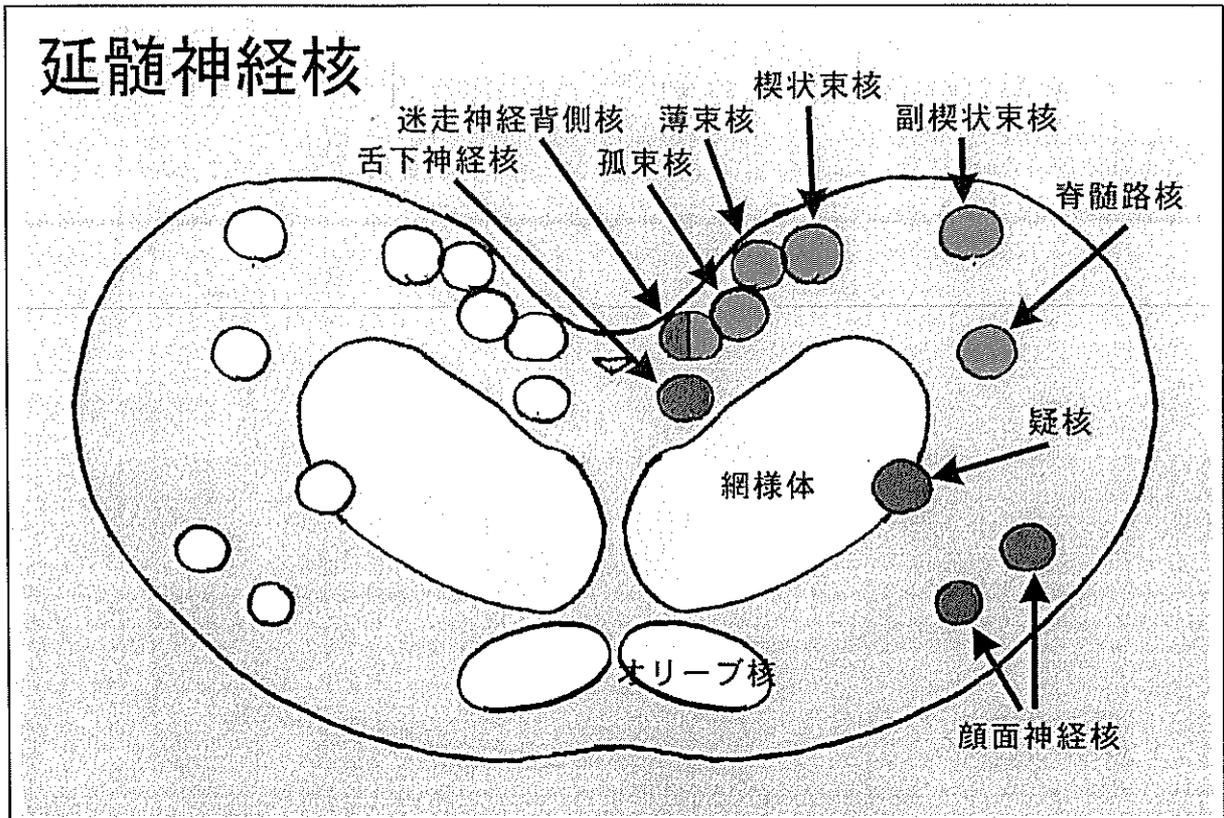


図3 延髄の神経核

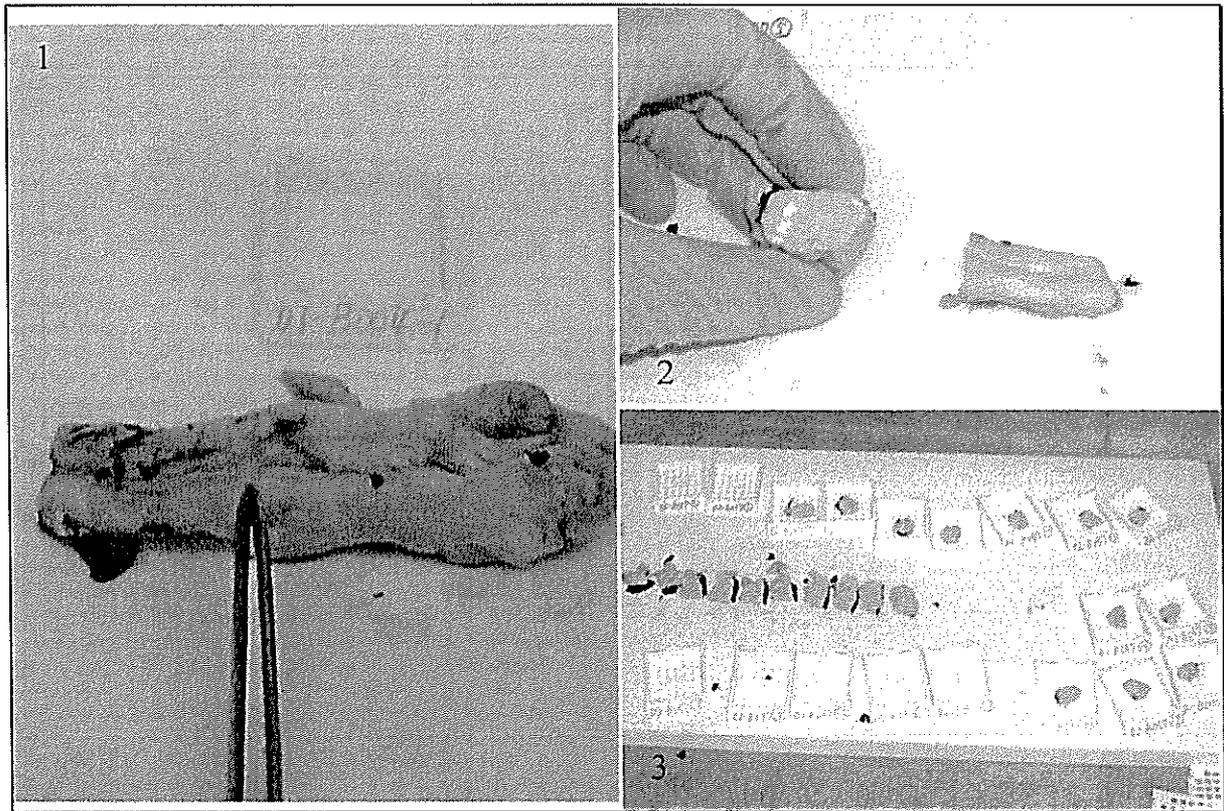


図4 実際の標本は延髄長軸で二分されている。門部を確認のうえ(1)、標本を切り出す。切った面(2;ただし別の標本)、3 mm 間隔で切り出し後、頭側面を薄切するように、プラスチックカセットに入れる(3)。順番および薄切面に注意する。

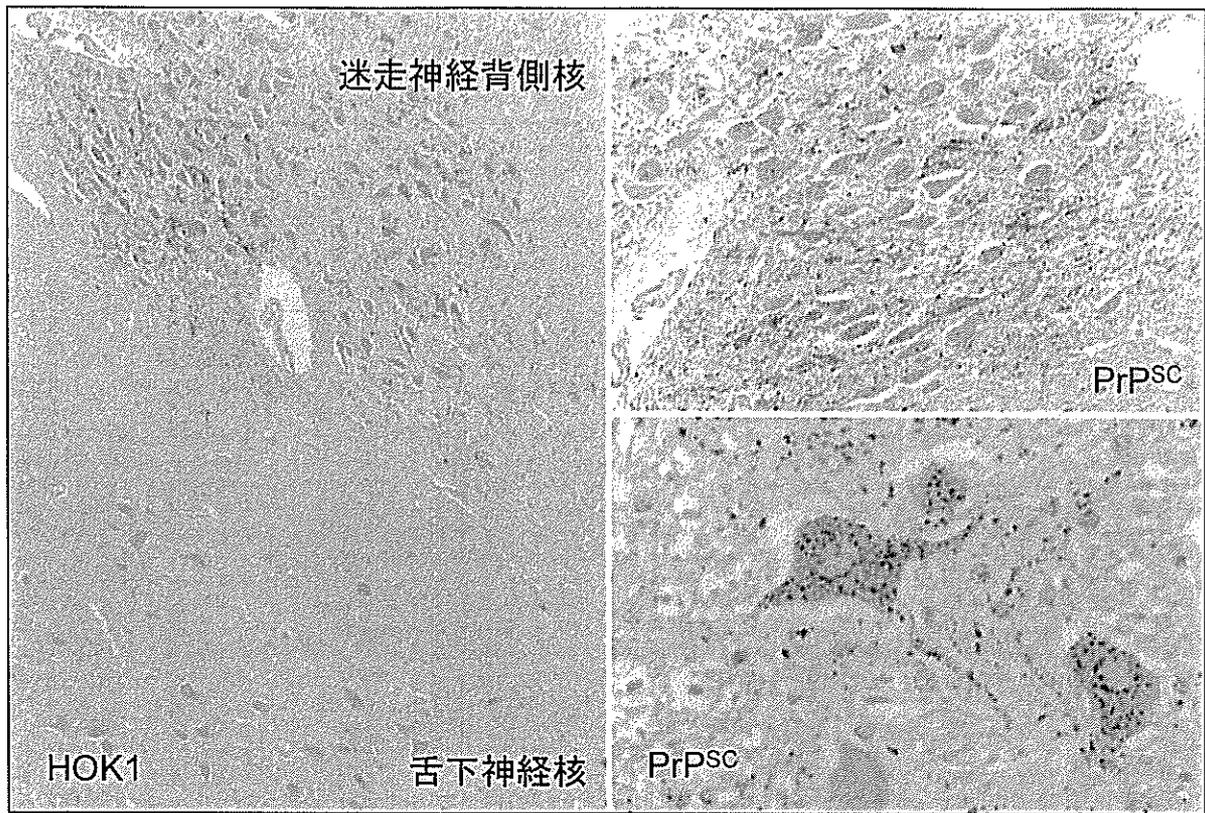


図5 北海道1例目の陽性像。PrP^{Sc}陽性所見に注目。顆粒状のプリオンが検出される。

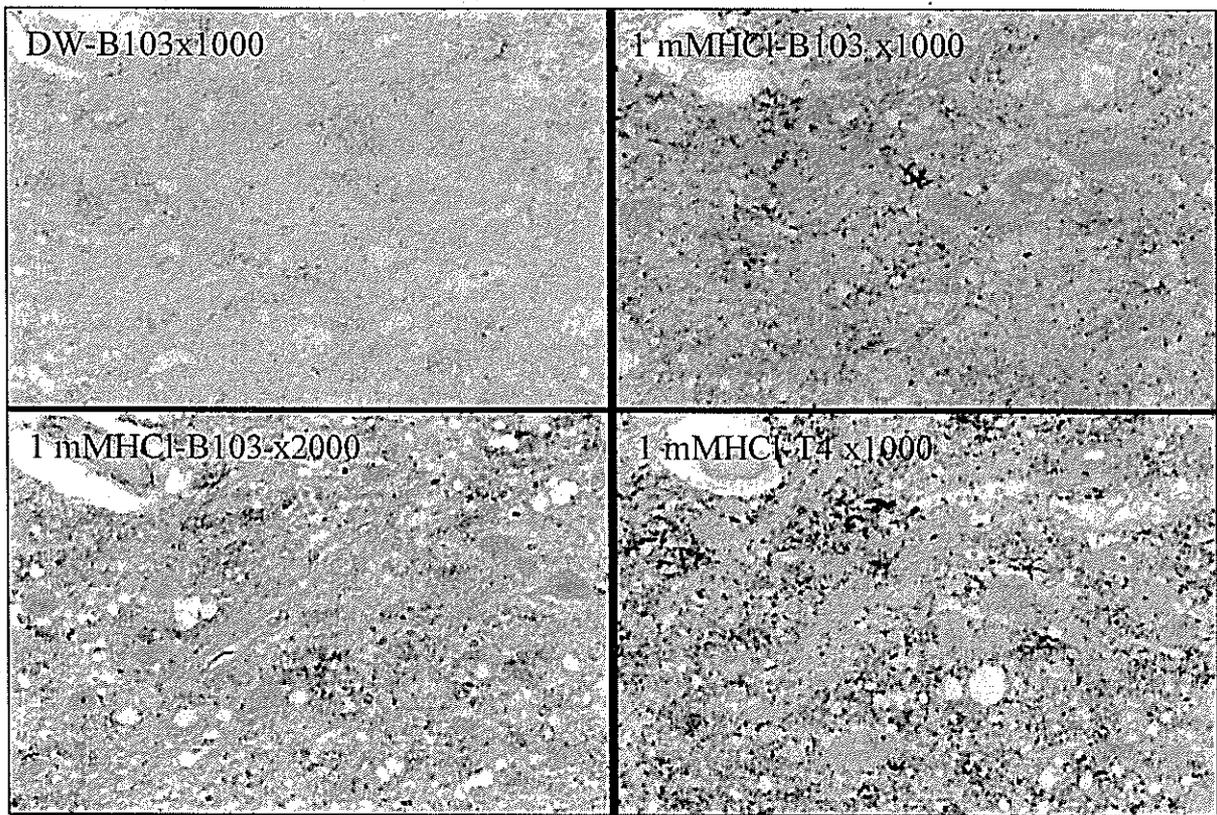


図6 B103による免疫染色と切片の塩酸前処理効果。(埼玉例)

通常は蒸留水を用いた121°C20分のオートクレーブ処理を行う。塩酸処理ではプリオン陽性反応は強くなるが、核に非特異染色が観察される。塩酸処理は必要時に確認目的で行うことがある。

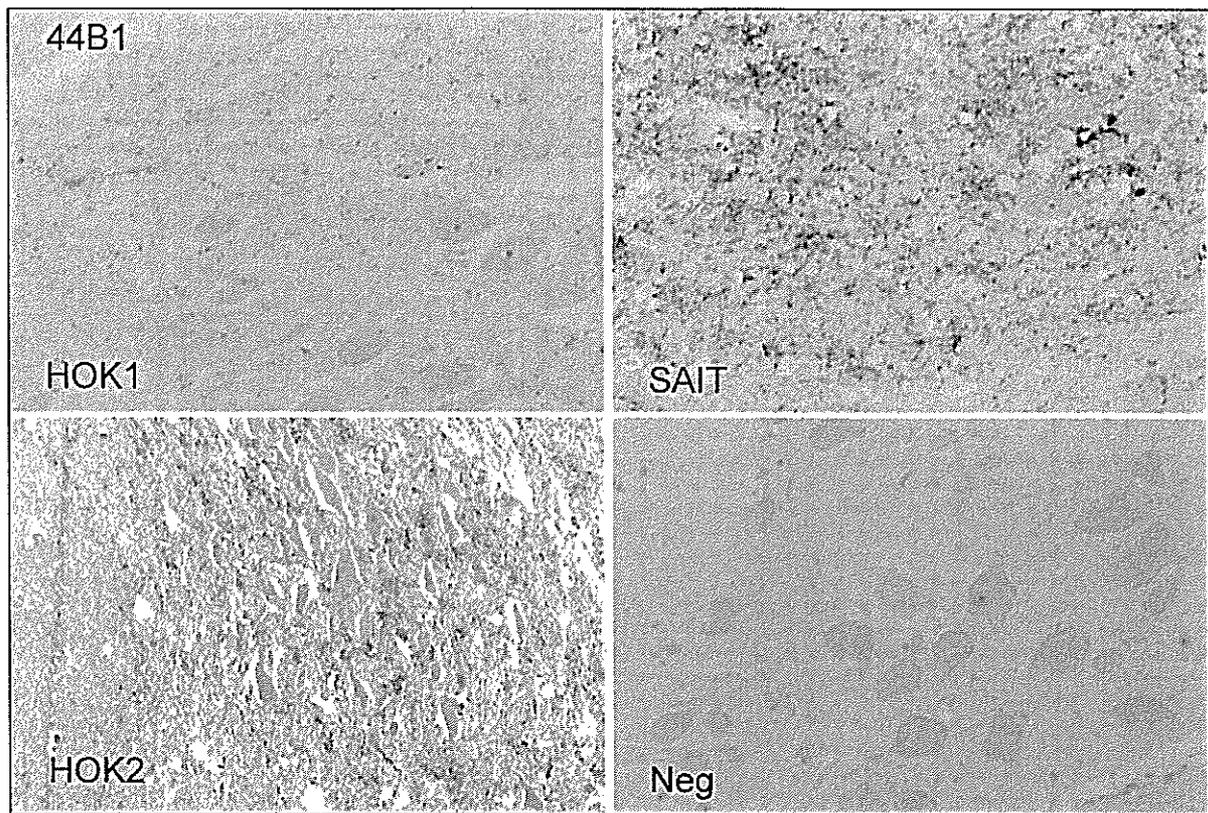


図7 44B1による免疫染色像。ただしHOK2は抗プリオンウサギポリクローナル抗体(T4)による陽性像。SAITは海綿状変化を伴っている。

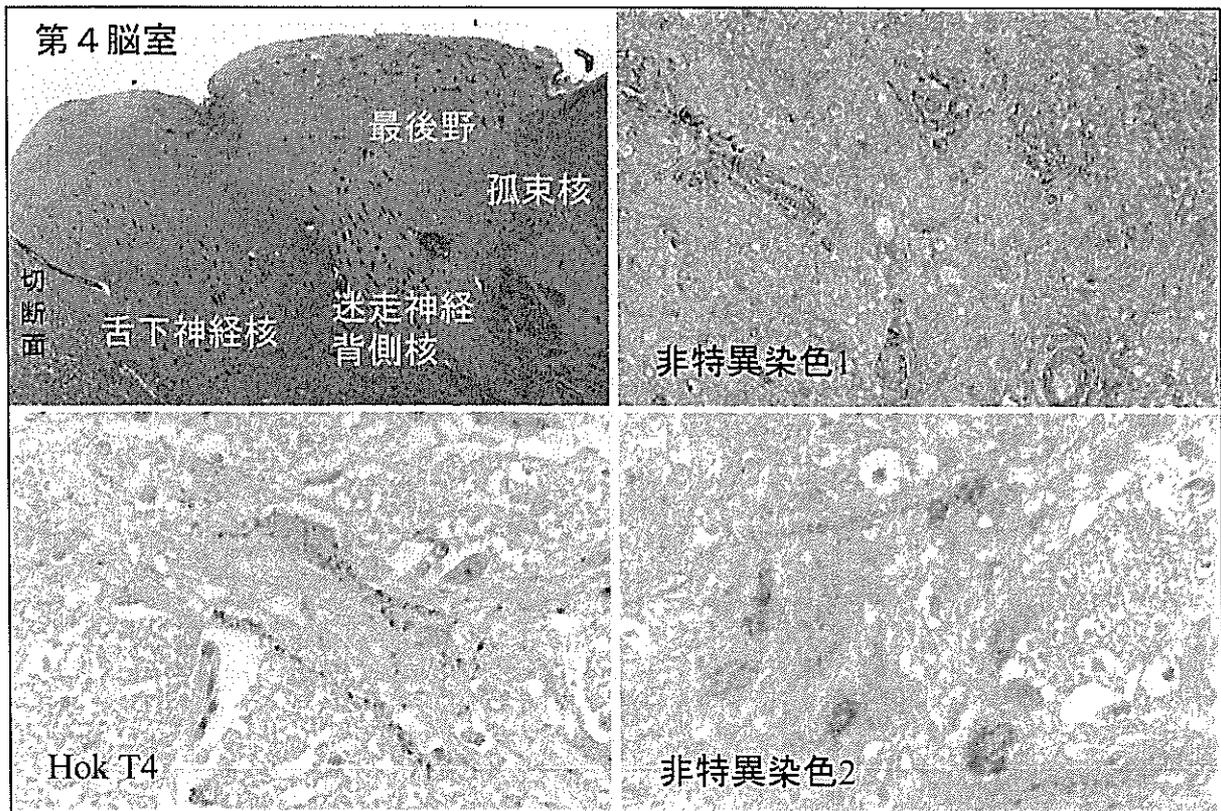


図8 Aの断面には最後野が出てくる。この部分はポリクローナル抗体(T4ないしB103)では小血管周囲に非特異染色像がみられることがある。またときに非特異染色2のような所見がえられるが、その場合、非特異染色2は染色所見がHok T4の陽性所見とは明らかに異なっている。44B1モノクローナル抗体では現在までこのような非特異染色像はえられていない。

(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パットに、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+ /2+D	- /3+D

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。