

図5 プリオン蛋白遺伝子 codon 180 に点変異を有する遺伝性 CJD 患者の MRI
 T1 強調 MRI (a) では浮腫上に腫大した大脳皮質が低信号に、T2 強調 MRI (b)、FLAIR MRI (c) では高信号に描出されている。拡散強調 MRI (d) では高信号がより明瞭である。いずれの撮影法でも後頭葉内側面には信号異常は認めない。臨床症状と比較して画像所見が華々しいのも特徴である。

ず視床や下オリーブ核の著明な萎縮が特徴である。このタイプでは拡散強調 MRI で信号異常を呈さずに、SPECT または FDG-PET で視床の血流また糖代謝低下が特徴である (図 4)³⁰⁾。

遺伝性 CJD でも特徴的な MRI 所見を呈するものがある。codon 180 変異例は進行が緩徐で高次機能障害または認知症症状のみを呈し、通常家族歴も有しない。そのため遺伝子診断なしでは診断は困難でしばしば変性疾患と鑑別が困難である。MRI 所見が特徴的で診断に非常に

有用である。広範な大脳皮質は浮腫状に腫大し、T1 強調 MRI では低信号に、T2 強調 MRI、FLAIR MRI、拡散強調 MRI では高信号に描出され、基底核病変が目立たない。臨床症状と不釣り合いに画像所見が華々しいのも特徴である (図 5)⁷⁾。

codon 232 変異例は MM1 型孤発性 CJD に酷似する急速進行型とミオクローヌスは非典型的で脳波で PSD も出現しない緩徐進行型に分けられるが、3 例の報告ではあるが、緩徐進行型

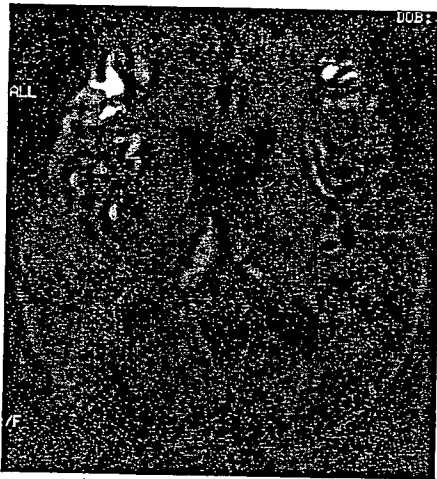


図6 プリオン蛋白遺伝子 codon 232 に点変異を有する遺伝性 CJD 患者の拡散強調 MRI
緩徐進行型では大脳皮質の高信号とともに両側視床内側面に高信号を認めるのが特徴である。

では拡散強調 MRI で視床内側部の高信号が共通した所見であった (図 6)。

4. PSD を呈さない自験例

表 3 に示すのは脳波で PSD が認められなかった自験 9 例の髄液, 拡散強調 MRI 所見をまとめたものである。髄液 NSE, 14-3-3 蛋白, tau 蛋白, 拡散強調 MRI の陽性率は (NSE > 25 ng/ml, tau > 1,300 pg/ml が陽性) それぞれ 5/8, 6/9, 5/6, 8/9 であった。急速に認知症が進行し, 全身性ミオクロームス出現し, 脳波で PSD を呈する使用例と比較すると NSE, 14-3-

表 3 PSD を呈さない緩徐進行例の遺伝子型, 髄液中の脳特殊蛋白, 拡散強調 MRI 所見

age/sex	PRNP	NSE	14-3-3	tau	DWI
75F	VV2	48	+	2,140	+
76M	V180I	19.5	+	7,140	+
69M	VV2	110	+		+
82F	V180I	32.1	+	1,472	+
79M	V180I	13	-		+
59M	V180I	22	-		+
59M	MM2-T	15.4	-	262	-
73F	MV	56.2	+	4,735	+
70F	M232R		+	2,027	+

3 蛋白の陽性率が低かったが, NSE, tau 蛋白の実測値も低かった。

おわりに

これまで提唱されている診断基準は¹⁾, MM1 型孤発性 CJD および類似の症候を呈するタイプの診断にはよく当てはまるが, PSD を呈さない非典型例には必ずしも当てはまらない場合もあることを念頭に置く必要がある。MM1 型以外の非典型例の特徴を理解する必要がある。遺伝性といっても必ずしも家族歴を有するとは限らない, ということも知っておくべきである。このためプリオン蛋白遺伝子検査は孤発性, 遺伝性を問わずプリオン病の診断には重要である。また拡散強調 MRI は臨床所見, 髄液所見と合わせてその結果を考慮すれば CJD の早期診断に非常に有用な検査である。

文 献

- 1) Will RG, et al: A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347(9006): 921-925, 1996.
- 2) Brown P, et al: Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. The waning of an era. *Neurology* 67: 389-393, 2006.
- 3) Parchi P, et al: Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46: 224-233, 1999.
- 4) Steinhoff BJ, et al: Diagnostic value of periodic complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 56: 702-708, 2004.
- 5) Zerr I, et al: Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 43: 32-40, 1998.
- 6) Shiga Y, et al: Diffusion weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 63: 443-449, 2004.

- 7) Jin K, et al: Clinical features of Creutzfeldt-Jakob disease V180I mutation. *Neurology* 62: 502-503, 2004.
- 8) Shiga Y, et al: Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution. *J Neurol*, 2007. (in press)
- 9) Will RG, et al: Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 47: 575-582, 2000.
- 10) Yamada M: The first Japanese case of variant Creutzfeldt-Jakob disease showing periodic electroencephalogram. *Lancet* 367(9513): 874, 2006.
- 11) Zeidler M, et al: WHO manual for strengthening diagnosis and surveillance of Creutzfeldt-Jakob disease, WHO, Geneva, 1998.
- 12) Sanchez-Juan P, et al: CSF tests in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 67: 637-643, 2006.
- 13) Zerr I, Poser S: Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD: With special emphasis on laboratory tests. *APMIS* 110: 88-98, 2002.
- 14) Lemstra AW, et al: 14-3-3 testing in diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease: a prospective study in 112 patients. *Neurology* 55: 514-516, 2000.
- 15) Huang N, et al: 14-3-3 protein in the CSF of patients with rapidly progressive dementia. *Neurology* 61: 354-357, 2003.
- 16) Saiz A, et al: Detection of 14-3-3 brain protein in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Ann Neurol* 46: 774-777, 1999.
- 17) Bersano A, et al: Detection of 14-3-3 protein in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 67: 2211-2216, 2006.
- 18) Shiga Y, et al: 14-3-3 protein levels and isoform patterns in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease patients in the progressive and terminal stages. *J Clin Neurosci* 13: 661-665, 2006.
- 19) Jin K, et al: CSF tau protein: a new prognostic marker for Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 67: 1470-1472, 2006.
- 20) Baxter HC, et al: Immunolocalisation of 14-3-3 isoforms in normal and scrapie-infected murine brain. *Neuroscience* 109: 5-14, 2002.
- 21) Van Everbroeck BR, et al: 14-3-3 γ -isoform detection distinguishes sporadic Creutzfeldt-Jakob disease from other dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 100-102, 2005.
- 22) Wakabayashi H, et al: Increased concentrations of 14-3-3 ϵ , γ and ζ isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. *Clin Chim Acta* 312: 97-105, 2001.
- 23) Takahashi H, et al: Increased levels of ϵ and γ isoforms of 14-3-3 proteins in cerebrospinal fluid in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 983-985, 1999.
- 24) Wiltfang J, et al: Isoform pattern of 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurochem* 73: 2485-2490, 1999.
- 25) Zeidler M, et al: Magnetic resonance imaging is not a sensitive for Creutzfeldt-Jakob disease. *Br Med J* 312: 844, 1996.
- 26) Finkenstaedt M, et al: MR imaging of Creutzfeldt-Jakob disease. *Radiology* 199: 793-798, 1996.
- 27) Bahn MM, et al: Brain magnetic resonance diffusion abnormalities in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 54: 1411-1415, 1997.
- 28) Zeidler M, et al: The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 355(9213): 1412-1418, 2000.
- 29) Fukushima R, et al: MRI characteristics of sporadic CJD with valine homozygosity at codon 129 of the prion protein gene and PrPSc type 2 in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 485-487, 2004.
- 30) Kranianski A, et al: Clinical findings and diagnostic tests in the MV2 subtype of sporadic CJD. *Brain* 129: 2288-2296, 2006.
- 31) Hamaguchi T, et al: Clinical diagnosis of MM2-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 64: 643-648, 2005.

【炎症・感染】

プリオン病の病理解剖と標本作製の留意点

佐々木健介*
岩城 徹*

はじめに

プリオン病の病理解剖でまず問題となるのはその感染性である。確定診断のためには感染力価の高い中枢神経系の病理解剖が必要であるが、プリオン(蛋白質感染粒子)は通常の滅菌・消毒法では失活しない。このため、剖検時に「汚染を広げない」ことが重要である。感染予防と汚染拡大防止の工夫を徹底すれば、一般解剖の設備環境で十分に対応しうる。しかし、プリオン病の病理解剖の施行率は14%にとどまり、疫学調査や病態解明のためには未だ十分とは言えない¹⁾。このため、厚生労働省の「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」では、サーベイランスの一環としてプリオン病の病理解剖に関わる費用の一部を補助する支援を行っており、こうしたサポートも活用しながら剖検率を高めていくための努力をしなければならない。

本稿ではまず、プリオン病の病理診断の要点と病理学的解析における問題点を概観して、病理標本採取時に念頭に置くべきポイントを列挙する。さらに、本学におけるプリオン病の病理解剖と標本作製の実際の手順を示して、感染防止のための工夫を考察する。

I. プリオン病の病理診断と解析

1. 診断のための留意点

プリオン病の確定診断のためには、中枢神経系の病理解剖(または生検)で特徴的な病理所見を確認することが必須である²⁾。Creutzfeldt-Jakob病(CJD)の進行症例では全脳性に萎縮が高度であるのに対して、海馬が比較的保たれるのが特徴的である(図1A)。HE染色で灰白質領域に海綿状変化または粗鬆化、神経細

胞脱落と高度のグリオシスを認め(図1B)、抗プリオン蛋白抗体を用いた免疫染色法で主に灰白質領域に異常なプリオン蛋白の細顆粒状の沈着が検出される(図1C)。さらに、ウェスタン・ブロット法でプロテアーゼ抵抗性の異常プリオン蛋白を検出する(図1D)。異常プリオン蛋白が微量で免疫染色法では検出できない場合でも、ウェスタン・ブロット法で異常プリオン蛋白を濃縮することにより検出できることがある。また、後述の異常プリオン蛋白タイプ分類を行う目的からも、ホルマリン固定標本だけでなく、剖検時に前頭極など一カ所でも未固定の凍結標本を採取しておくことが望ましい。

凍結保存用のチューブは、ディスポのメスの刃が入る程度の口径があれば(Sarstadt社の7mLテストチューブなど)、凍結後のサンプリングに便利である。ヒストパックなどのビニール製品の袋に半脳や脳スライスをそのまま入れて凍結するやり方は、バイオハザードの観点から標本採取時にメスを使いにくく、一度融解させてしまうと部位の同定も困難となる。我々の経験では、半脳をスライスして凍結するのではなく、剖検時に未固定標本を切り分けて1本ずつチューブに保存しておくほうが、その後の操作がより安全で容易である。

プリオン病の臨床病理に影響を及ぼす因子として、プリオン蛋白遺伝子コドン129番の多型(メチオニンまたはバリン)があり^{3,4)}、遺伝性プリオン病の変異の有無と併せて、臨床医より遺伝子解析の情報を得おくことも重要である。また、感染性CJDの鑑別のため、硬膜移植歴の有無(医源性CJD)や海外渡航歴、輸血歴の有無(変異型CJD)も聴取しておく。

●ポイント：確定診断のためには、脳組織のHE染色のほか、免疫染色およびウェスタン・ブロット法により異常プリオン蛋白を検出する。脳をホルマリン固定するほか、新鮮標本を剖検時に切り分けて凍結チューブに保存する。プリオン蛋白遺伝子変異、129

*九州大学大学院医学研究院神経病理学

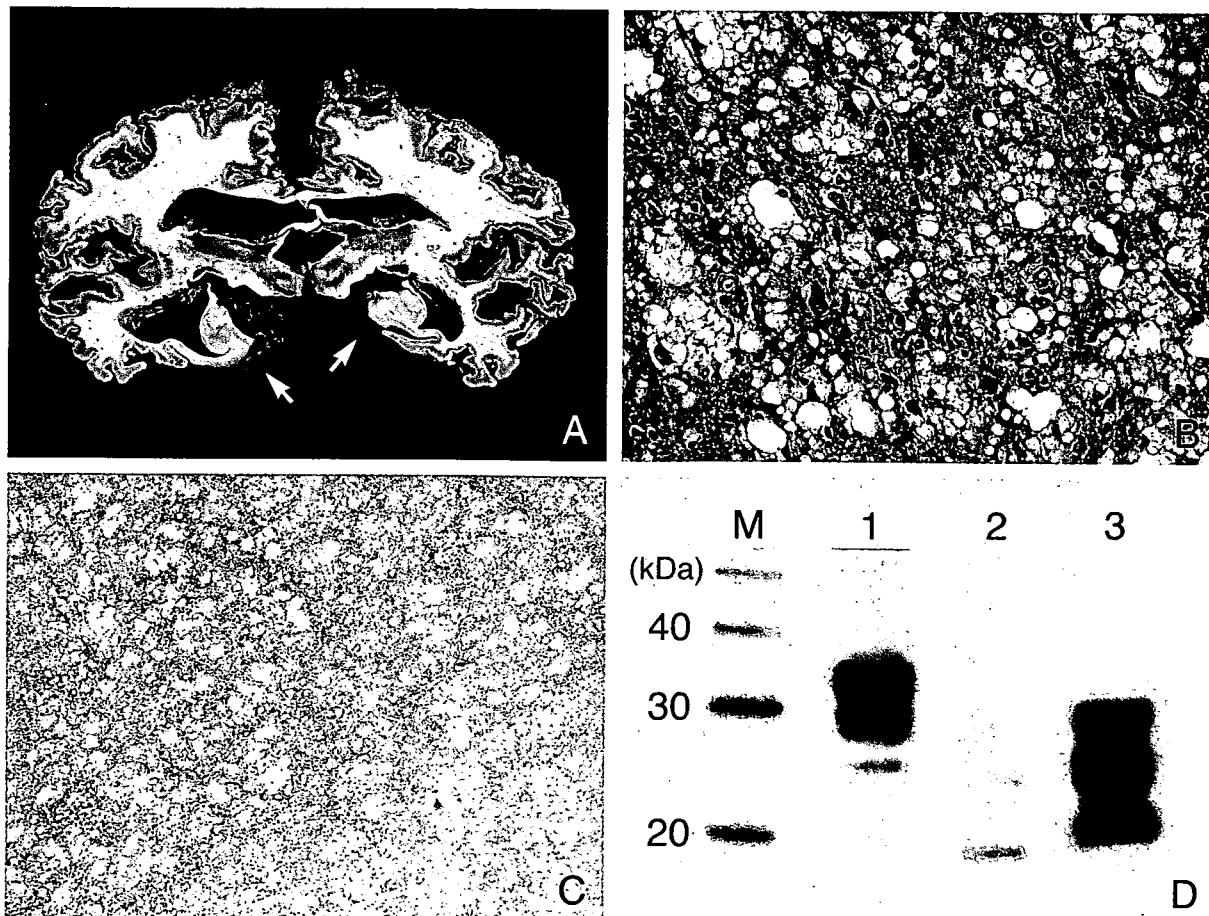


図1 Creutzfeldt-Jakob病 A:肉眼所見。海馬は比較的保たれる(矢印)が、大脳新皮質をはじめ灰白質は著明に萎縮して着色を認める。B:組織所見。神経細胞の数が減少し、反対にグリア細胞の増殖が際立つ。アストロサイトの突起が目立ち典型的な海綿状変化(空胞形成)がみられる。C:プリオン蛋白染色。シナプス型沈着を認める。D:ウェスタン・ブロット法。プロテアーゼ処理をしていないサンプル(レーン1)に比べ、プロテアーゼ処理後(レーン2, 3)は異常型プリオン蛋白の一部のフラグメントが分解されずに残り、バンドが分子量の小さい下方にシフトしている。なお、糖鎖結合のない一番下のバンドが19 kDaに相当するレーン2は type 2、21 kDaに相当するレーン3は type 1と呼ばれる。M:分子量マーカー。

番多型の有無、硬膜移植歴、海外渡航歴、輸血歴などの病歴聴取も重要。

2. 病理解析のための留意点

プリオン病でも特に早期例では、部位により病理変化の程度に差がみられることがあり、臨床症状で左右差を示すことも少なくない。プリオン病の病変部位は拡散強調MRIで高信号を呈することが多いので⁵⁾、画像所見を参照しながら、複数の部位からサンプルを採取しておくことと詳細な解析を行うことができる。また、近年、ペントサポリサルフェートの側脳室内投与による治療の試みがなされている⁶⁾が、薬剤の分布や効果を判定するためには、多くの領域で左右両側から標本を採取することが必要である。

プリオン蛋白遺伝子多型だけでなく、ウェスタン・ブロット法で確認される異常プリオン蛋白の生化学的性質の違いによるタイプ分類(type 1またはtype 2: 図1D)によっても、臨床経過や病理像が異なる⁷⁾。また、同一症例でも部位によってタイプが異なる場合があり、各々の部位での病理所見の違いを反映している可能性がある。病態の解析のためには、部位ごとに免疫染色法とウェスタン・ブロット法を行い、異常プリオン蛋白の沈着パターンや生化学的性質の違いをつき合わせて検討することが有用である。

そのため我々は、剖検時に複数の部位から脳の新鮮標本を採取して凍結保存し(前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、小脳皮質と、正中断で脳梁を切断した後、内

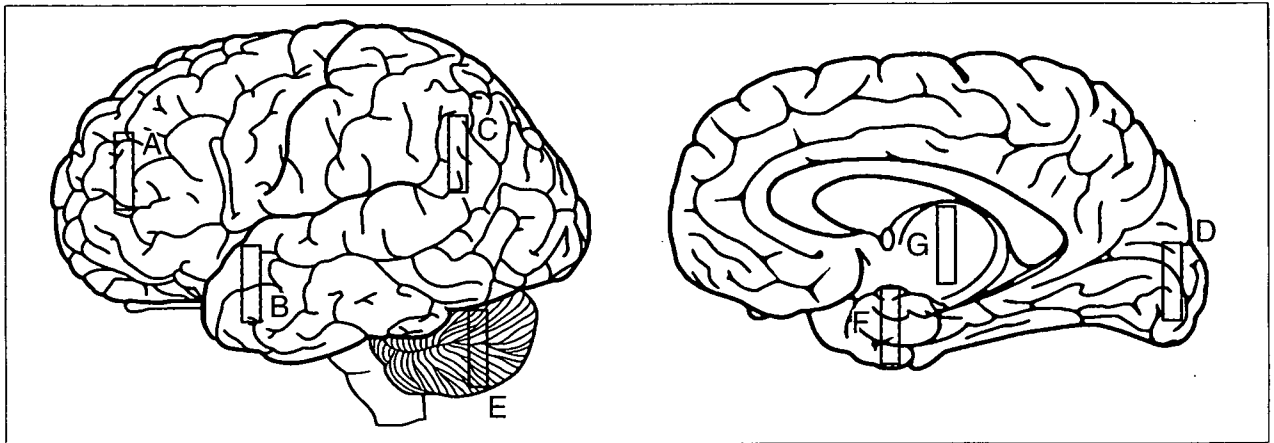


図2 凍結標本採取部位 A：前頭葉(中前頭回)、B：側頭葉(上中側頭回)、C：頭頂葉(下頭頂小葉)、D：後頭葉(鳥距溝領域)、E：小脳、F：扁桃体、G：視床。

表1 汚染除去の方法(文献8より抜粋)

	焼却	最も完全な方法.
完全な滅菌法	蟻酸	90%以上の濃度の蟻酸に室温で1時間浸漬.ホルマリン固定後の切り出しブロック標本はこの方法で感染性を失活する
	SDS溶液	1~3% sodium dodecyl sulfate (SDS)溶液に浸漬した状態で煮沸, 100°C 5分.解剖器具はこの方法で感染性を除去する.
	オートクレーブ	できるだけ高温で処理. 132°C 1時間など.
不完全ながら有効な処理 (感染性を0.1%以下にするもの)	水酸化ナトリウム溶液	1Nの濃度で2時間. ベンチや安全キャビネット内に霧吹きで撒布するなどして利用.
	次亜塩素酸ナトリウム溶液	1~5%の濃度で2時間.

側面から海馬・扁桃体と視床をそれぞれ左右から採取する(図2), 異常プリオン蛋白の生化学的解析を行い, 10~20%ホルマリン液固定後, 凍結標本採取部位の近傍の断面を出して対応する部位のブロックを作製し, 組織学的解析を行っている。

●ポイント: 可能な限り, 複数の領域を左右両側から, 凍結標本と固定標本の両方をサンプルする。我々の教室でプリオン病の診断, 病理解析のコンサルテーションを引き受けている(TEL 092-642-5537, FAX 092-642-5540)。

II. 感染性除去の方法

プリオンは通常のオートクレーブや, 紫外線照射によっても感染性は失活しない。有効な感染性除去の方法を表1に示す。一番確実な方法は焼却である。したがって, ガウンやメスなどの消耗品は可能な限りディ

スポの製品を用いる。我々の施設では, 鋏や鉗子などの金属器具はプリオン病解剖専用として区別して, 使用後は2% sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液で10分間煮沸後, オートクレーブ処理して保管している。開頭用のギブスカッターは解剖時, 本体にビニールをかぶせて汚染を防ぐ。使用後は替刃をSDS処理して廃棄し, 汚染部分は3%次亜塩素酸溶液で清拭する。剖検台や床はビニールシートで保護しているが, 念のため解剖終了後に3%次亜塩素酸溶液で清拭して2時間後に水洗している。SDSも次亜塩素酸も金属腐食作用があるので, そのまま放置せずに水洗しておくことが必要である。

●ポイント: できるだけディスポの器具を使う。再利用する器具はプリオン病専用にして, 2% SDS 溶液で10分間煮沸して滅菌する。剖検台や床は3%次亜塩素酸溶液で汚染除去する。

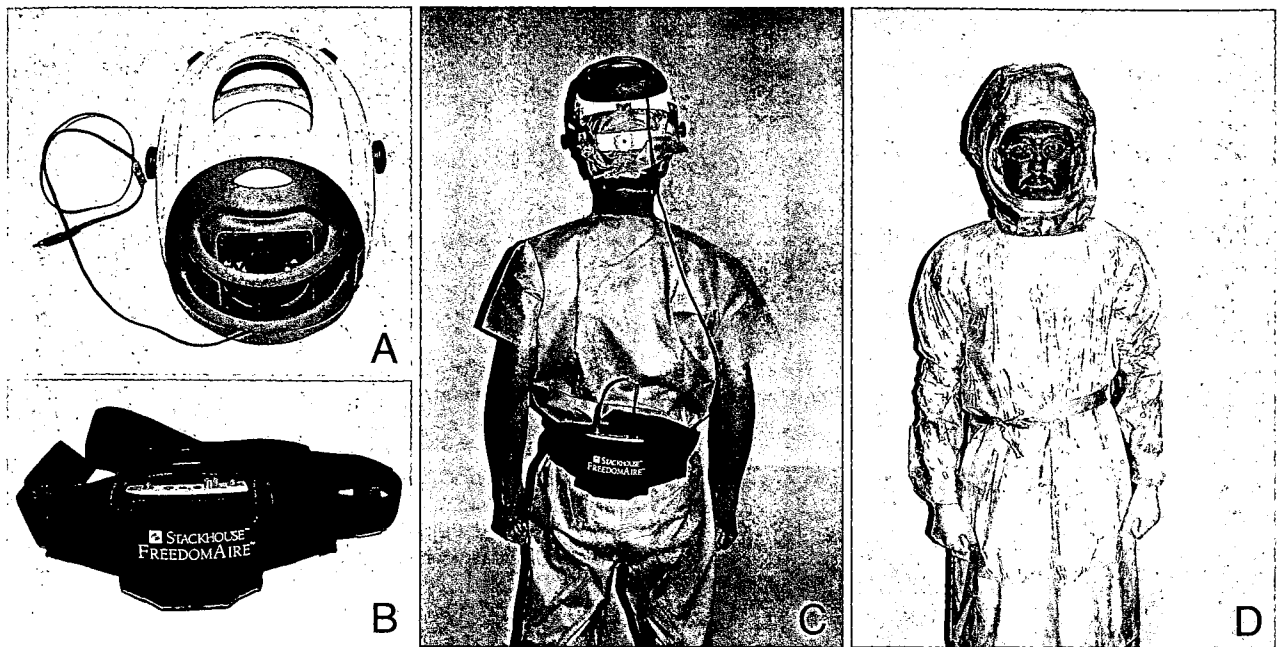


図3 感染防護服 A:換気装置, B:充電式バッテリー, C:術着の上に換気装置とバッテリーを装着, D:さらにフルフェイスマスクとガウンを着用。マスクと換気装置はベルクロテープにより位置合わせされる。換気装置によりマスク内面の曇りを防ぐことができる。

Ⅲ. 当大学におけるプリオン病病理解剖の実際

1. 剖検の手順

術者(2人)はディスポーザブル・ガウンを着用した後、換気装置付きのフルフェイスマスクを装着する(フリーダムエアシステム, Stackhouse社, 図3)。サポート1名はディスポーザブル・ガウン着用で清潔を保ったまま、記録, 必要な器具等の補充, 未固定サンプルの凍結チューブへの受け取りなどを行う。

剖検室の床(コンクリート張り)に3%次亜塩素酸溶液を撒布して, ビニールシートを立ち回り区域と剖検台全体に二重に敷いておく(図4A)。枕や計量秤もビニールで厳重に覆っておく。次亜塩素酸溶液をあらかじめ撒いておくと感染性の拡大防止が確実になると, ビニールシートがめくれ上がるのを防ぐ効果がある。

剖検は乾式で行い, 血液などは全て吸収紙に吸い取らせて医療廃棄物用密閉容器に廃棄し, 焼却処分する。安価な高分子吸収剤入りのペット用シートなどを用いるとよい。開胸開腹して一般臓器を全て検索しているが, 下部消化管は回盲部の一部のみ開いてサン

ルを採取している。その他の臓器もマクロ所見を観察した後パラフィンブロック作製に必要なサイズに切り出してホルマリン液で固定し, 残りは全て遺体に戻して火葬する。

開頭時のギブスカッター使用で脳組織や髄液を含んだ粉塵が飛散するので, 我々はアルミ製の三面レンジフードに頸部を通す穴をあけて頭部を囲い, ビニールシートをかぶせて防護している(図4B)。脊椎剖出のための椎弓切断時は胸腹腔全体にビニールシートをかぶせて粉塵飛散を防ぐ。開頭は最後に行い, 高感染性臓器からの汚染を最小限にする。

術者は脳を剖出後, 新鮮標本を採取して, サポーターが把持するサンプルチューブに慎重に移してフリーザーで保存する。残りの脳脊髄や一般臓器をなるべく小型の密閉容器にてホルマリン液に浸漬固定する。容器の内側は汚染されているが「外側は絶対に清潔」を保つよう細心の配慮をされたい。容器には目立つように赤テープを貼り, バイオハザードを喚起している。

解剖終了後は遺体の体表を3%次亜塩素酸溶液で清拭し, 感染性の低下を図る。バイオハザードのため遺体の着衣は行わず, そのままディスポ型搬送用遺体袋

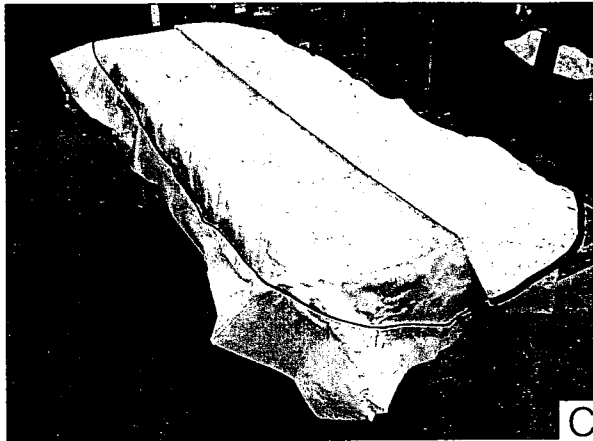
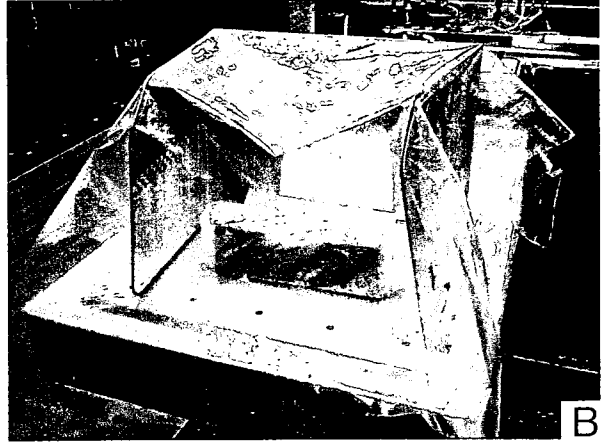
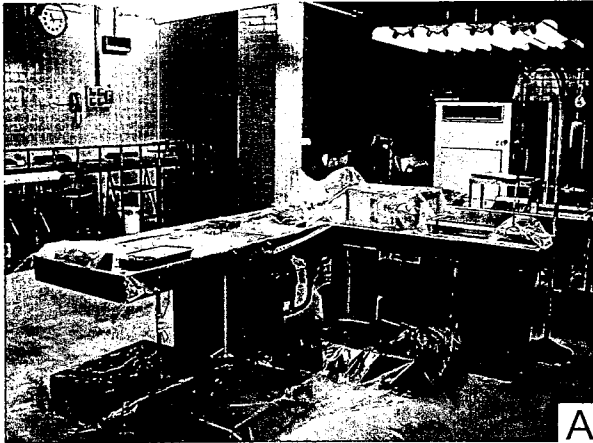


図4 汚染拡大防止の工夫 A: 剖検台と床をビニールシートで嚴重に覆う。B: 開頭時、三面レンジフードを加工したものにビニールシートをかぶせて頭部全体を囲う。C: 遺体安置袋。三辺がジッパーで開くので袋の外側を清潔に保ったまま遺体を安置しやすい。

(ディザスタバッグエコノ，泉工医科貿易株式会社)に安置する。この袋は三辺がジッパーで大きく開口するため、袋の外側を汚染させずに遺体を容易に収容できる(図4C)。ここまでを術者が行えば、あとはサポーターや葬儀社のスタッフが入棺、搬出を行うことができる。これらの手順を徹底すれば、一般解剖の設備でも十分にバイオハザード対応が可能である。

遺族には、袋のジッパーは閉じたままで、遺体との直接の接触は控えていただくようお願いする。

●ポイント：解剖は乾式で行い、血液は吸収紙に吸い取らせて焼却処分する。開頭は最後に、ギプスカッターを使うときはビニールシートで覆って粉塵飛散防止に配慮する。遺体は術者が搬送袋に安置して、遺族にも遺体に直接触れないようお願いする。

2. 脳切り出しの手順

プリオンはホルマリン固定後も感染性があり、切り出し時にも汚染拡大を防止する必要がある。作業台や写真撮影台の上にはビニールシートをかぶせ、バット

やカッティングボードもビニール袋で嚴重にくるんでおく。臓器はペーパータオル等を敷いた上で割を入れ、ビニールを傷つけないように気を配る。

脳は凍結材料を採取した近傍の断面が出るようにスライスして、隣り合わせの部位を切り出しカセットに入れる。一般臓器も含めて必要なブロックを全て切り出した後、カセットごと98%蟻酸溶液に2時間浸漬してプリオンの感染性を失活させる。この時、組織がカセットの内壁に張り付いていると蟻酸が浸透できないので、切り出した標本はあまり厚くしないほうがよい。蟻酸処理後、一晚水洗してティッシュ・プロセッサでパラフィン包埋する。

ホルマリンなどの廃液は、密閉式の医療用廃棄タンクに入れて、高分子吸収剤(サンフレッシュ、三洋化成工業)に吸水させゲル化した後廃棄する。使用したバケツやビニールシートは全て医療廃棄物として焼却処分する。汚染区域と清潔区域をしっかりと区別して汚染拡大を防止することで、一般の切り出し室でもバイ

オハザードに対応できる。

●ポイント：プリオンの感染性はホルマリン固定後も失活しない。標本は98%蟻酸に2時間浸漬して失活させる。廃液は全て高分子吸収剤などに吸水させゲル化して焼却処分する。

3. 組織標本作製の手順

蟻酸処理した標本は感染性が実質的に失活したのものとして取り扱い、その後のティッシュ・プロセッサやマイクロームなどの装置は全て通常の病理標本と共用している。蟻酸処理により標本の硬度が増すので、パラフィンブロックの薄切はやや困難である。プリオン蛋白染色では塩酸を用いたオートクレーブ処置で抗原賦活化を行うので、我々の施設では7 μ m厚の切片をシラン・コーティングしたスライドガラスに伸展、乾燥させている。脳組織を含むパラフィン層は全て集めて医療廃棄物として焼却処分する。マイクロームの替刃のみプリオン病専用として交換、廃棄する。

組織染色はルーチンでHE染色とKlüver-Barrera染色(髄鞘染色)を行っている。脱パラフィン後のキシレン/エタノール、染色液、脱水も通常の病理標本と共用している。

なお、英国国立CJDサーベイランス・ユニットでは、蟻酸処理後のパラフィンブロックもレベル2対応のバイオハザード室内で取り扱い、染色標本の作製、封入後スライド表面全体を蟻酸処理し、感染性を念入りに除去してはじめて、一般の検鏡室に持ち出せることとなっている。費用と人手さえあって、そこまで徹底できればもちろん万全である。

●ポイント：蟻酸処理後の標本は、感染性が失活したのものとして取り扱うことができる。念のため、パラフィン層は全て焼却処分し、マイクロームの替刃を交換する。

IV. 参 考

1. プリオン蛋白免疫染色

ヒトの病理標本の場合、一次抗体はSignet社の3F4(mouse monoclonal抗体、希釈率1:500)を用いて解析、診断しているが、IBL社のAnti-Human Prion Protein(C)抗体(rabbit polyclonal、希釈率1:200)も良好な結果が得られる。抗原賦活のために強力な前処置が必要で、我々は1~3mM塩酸で121 $^{\circ}$ C、10分間のオートクレーブ処理⁹⁾を行っている。背景のノイズが上がりやすいので、ブロッキング試薬としては5%正常ヤギ血清(NGS)よりも5%スキムミルク/

0.05% Tween 20 in Tris buffered saline (TTBS)を用いると結果が良好であることが多い。

これらの抗体を用いた免疫染色では正常型プリオン蛋白は通常検出されない。ブランク型の異常プリオン蛋白沈着は容易に染色されるが、シナプス型の微細顆粒状の沈着は比較的染色性が弱い傾向があるので、染色パターンに応じて発色時間を長めに設定するなどの工夫を要する。

強力な前処置により、組織がスライドガラスから剥がれやすい。その場合、オートクレーブの塩酸濃度を低くすることで改善が得られるが、一方で異常プリオン蛋白の染色性は弱くなる。なお、塩酸の代わりに界面活性剤を含むバッファ(0.1% Triton X-100/50 mM Tris buffer, pH7.6)でオートクレーブ(121 $^{\circ}$ C、20分間)すると、組織のダメージを最小限にして塩酸オートクレーブと同等かそれ以上のシグナル/ノイズ比が得られることがある¹⁰⁾。

●ポイント：塩酸オートクレーブまたは界面活性剤オートクレーブの抗原賦活処理により、異常なプリオン蛋白沈着が染色されるようになり、正常型プリオン蛋白は染色されない。

2. ウェスタン・ブロット法

未固定の凍結標本を扱う時が、最も感染の危険が高いため細心の注意が必要である。サンプル調製はバイオハザード対応の実験室で安全キャビネットの中で行う。脳ホモジネートの調製は、ビーズ破碎装置(Micro Smash MS-100, トミー精工)を用いて密閉チューブ内で振盪破碎するのが安全であり、ペッセルを用いる場合はサンプルがあふれないように十分に注意する。

プロテアーゼ抵抗性異常プリオン蛋白の検出のために、10%脳ホモジネートに対してプロテイナーゼK(PK)を50 μ g/mL加えて(ホモジネート190 μ Lに対して1mg/mLのPKストックを10 μ L加える)、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートし、正常型プリオン蛋白を完全に分解する。PK処理後、プロテアーゼインヒビター(1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)または1mM PefaBloc SC, Pentapharm社)を加えて蛋白分解を失活させる。PKの活性はサンプルのpHによって影響を受けるため、十分な緩衝作用を働かせ、pHを一定に保つことが必要である。このため、脳組織をホモジナイズするための溶解液には、高濃度のTris緩衝液を添加している(100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, pH7.6)¹¹⁾。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

のためにサンプル・バッファー (SDS 最終濃度: 2%) を添加して, 100°C で10分間加熱処理する。この操作は汚染除去のためのSDS処理に準じるので, プリオンは完全に失活しており, 以降の操作は一般実験室で行っている。泳動後のメンブレンへの転写の際, プリオン蛋白は他の蛋白よりも転写効率が悪い傾向がある。そのため, トランスファー・バッファーにSDSを十分量添加する, 転写電圧を高める, 転写時間を長くするなどの条件設定が必要な場合がある。使用後の廃液は, 10 N水酸化ナトリウム溶液をあらかじめ入れておいたタンクに貯留し, 水酸化ナトリウム最終濃度が1 Nとなった時点で一晩放置して廃棄している。

●ポイント: 未固定材料を扱う時はバイオハザードに十分気をつける。サンプルをSDS加熱処理した後は, 感染性が失活したものとして取り扱い可能である。廃液を水酸化ナトリウム溶液処理するとさらに安全である。

文 献

- 1) 渡邊 至, 中村好一: 本邦におけるプリオン病の疫学像. 神経内科 2005, 63 : 424-428
- 2) 佐々木健介: CJDの病理学的評価基準. Clinical Neuroscience 2006, 24 : 327-330
- 3) Palmer, M.S., Dryden, A.J., Hughes, T. et al. : Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Nature 1991,

352 : 340-342

- 4) Doh-ura, K., Kitamoto, T., Sakaki, Y. et al. : CJD discrepancy. Nature 1991, 353 : 801-802
- 5) Shiga, Y., Miyazawa, K., Sato, S. et al. : Diffusion-weighted MRI abnormalities as an early diagnostic marker for Creutzfeldt-Jakob disease. Neurology 2004, 63 : 443-449
- 6) 坪井義夫, 山田達夫, 堂浦克美: プリオン病の治療. ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与. 神経内科 2005, 63 : 441-445
- 7) Parchi, P., Giese, A., Capellari, S. et al. : Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. Ann Neurol 1999, 46 : 224-233
- 8) 厚生労働省遅発性ウイルス感染調査研究班: クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル(改訂版), 厚生労働省, 東京, 2002, 48-49
- 9) Kitamoto, T., Shin, R.W., Doh-ura, K. et al. : Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Am J Pathol 1992, 140 : 1285-1294
- 10) Sasaki, K., Doh-ura, K., Ironside, J. et al. : Clusterin expression in follicular dendritic cells associated with prion protein accumulation. J Pathol 2006, 209 : 484-491
- 11) Notari, S., Capellari, S., Giese, A. et al. : Effects of different experimental conditions on the PrPSc core generated by protease digestion : implications for strain typing and molecular classification of CJD. J Biol Chem 2004, 279 : 16797-16804