

家畜保健衛生所における  
in situ hybridizationの有用性の検討

県北家畜保健衛生所

石塚 駿

# 家畜保健衛生所における病理検査

## 病理組織学的診断

**顕微鏡下**で全身臓器の異常を評価し、**疾病の診断**を行う。

医学及び獣医学で専門医の資格が存在するほど

**専門性が高い業務**を病理担当者が専属で行う。

- 1 解剖
- 2 切り出し
- 3 脱水・脱脂等
- 4 ブロック作製
- 5 薄切
- 6 染色・封入
- 7 鏡検
- 8 組織診断

# 家畜保健衛生所における病理検査

## 6 染色・封入



### 一般染色

ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色  
細胞・組織構造の全体像把握を目的  
最も基本的な染色法

### 特殊染色

特定の物質を化学反応によって染色  
目的物質によって多数の染色法存在

### 免疫組織化学染色（IHC）

抗原抗体反応を用いて蛋白質を特定  
IHC用抗体が必要

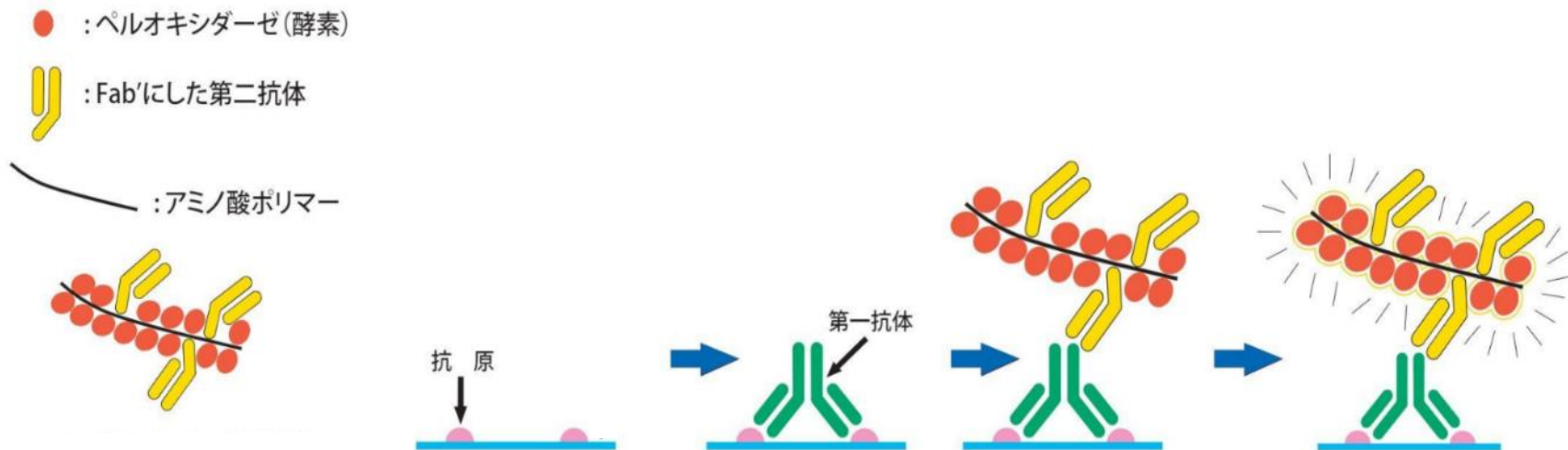


7 鏡検

8 組織診断

# 免疫組織化学染色

(Immunohistochemistry : IHC)



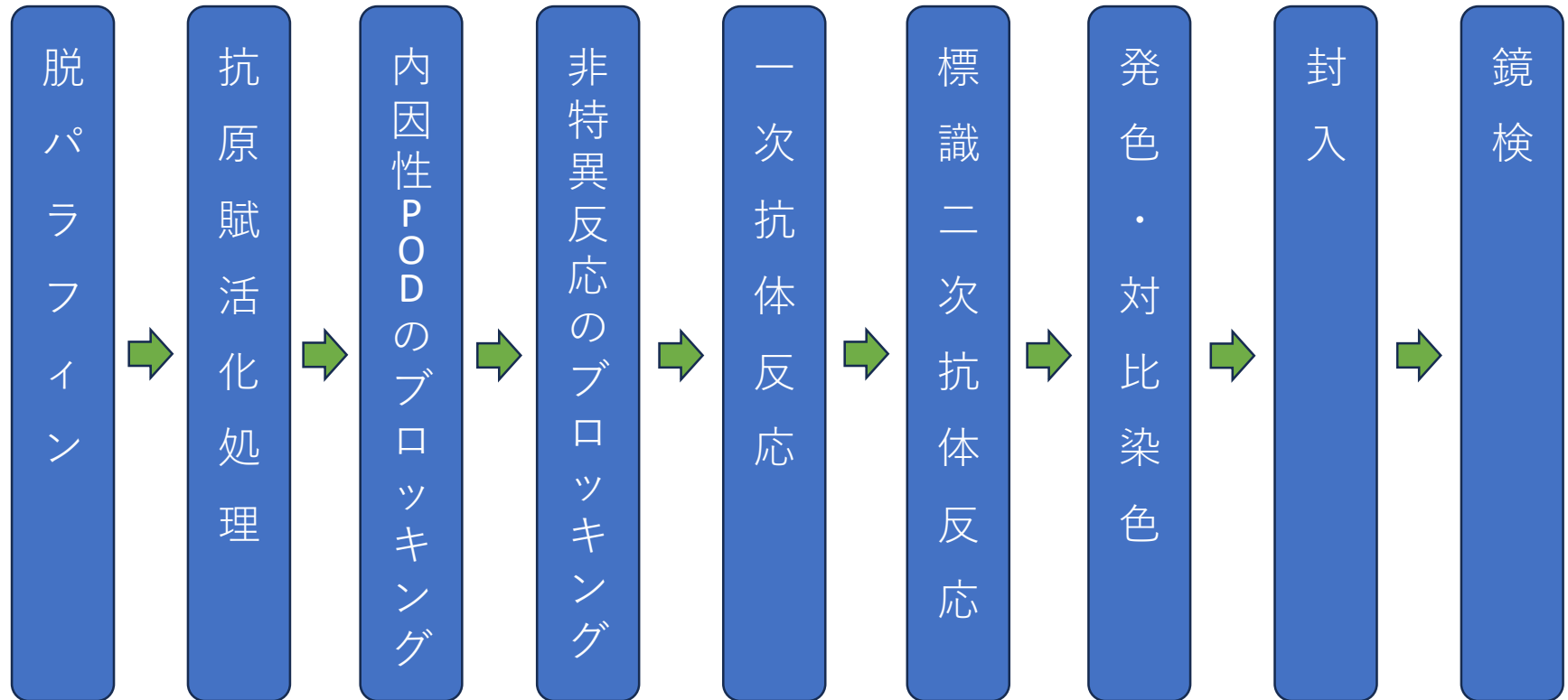
特異抗体を用いて抗原の組織内局在を検出

→PCRと異なりコンタミネーションを否定できる

# 免疫組織化学染色

(Immunohistochemistry : IHC)

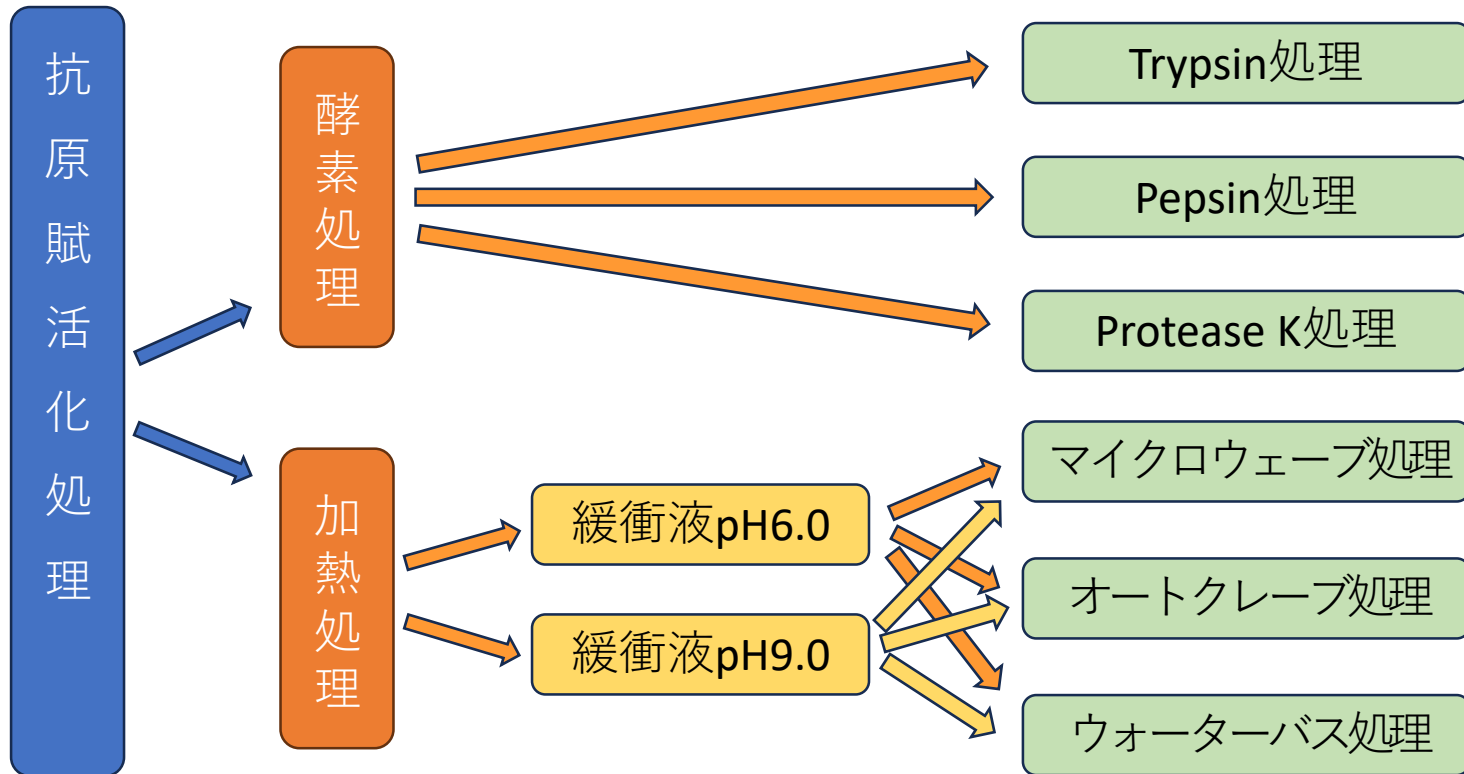
## ・ 操作の流れ



# 免疫組織化学染色

## (Immunohistochemistry : IHC)

検討事項



一次抗体反応



希釈濃度



反応温度・時間

# 免疫組織化学染色（IHC）の問題点

- ・ 新規抗体や既報が無い動物種での使用に際して条件検討事項が多岐にわたる  
→担当者が数年ごとに変わる家保では、新規抗体導入の障壁
- ・ 近年ではIHC用抗体が入手出来ない疾病の診断も増加



in situ hybridizationを導入し、  
家保にて運用可能か検証

# in situ hybridization (ISH)

- ・ 組織切片上で核酸-核酸ハイブリダイゼーションによって特定の核酸の局在部位を検出
- ・ IHC : 特異抗体  
ISH : 目的の核酸と相補的配列を持つ特異プローブ  
→塩基配列が判明していれば作成可能

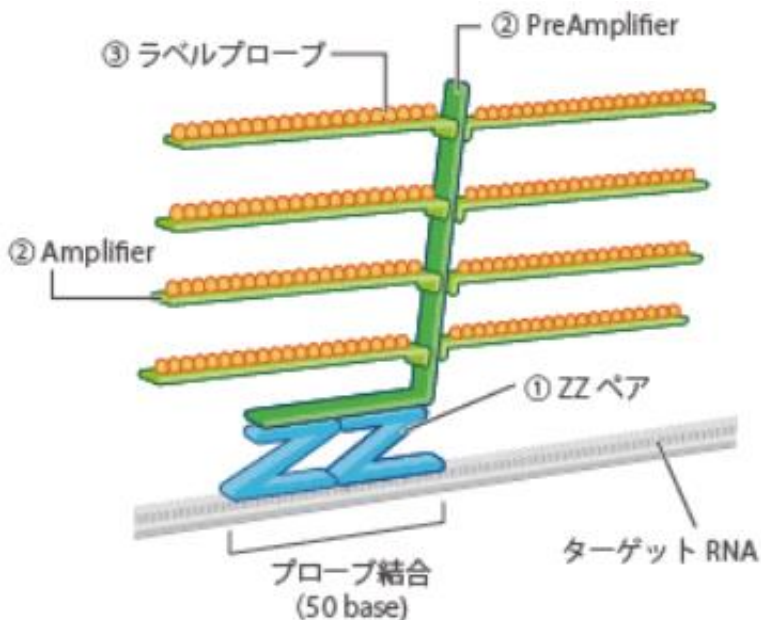


RNAscope (ACD社) を導入



# RNAscope (ACD社)

- ・ サンプル中のmRNAを検出するISHキット
- ・ 器具や試薬の滅菌不要
- ・ 抗原賦活化方法：付属の緩衝液によるボイル
- ・ プローブ濃度：調整済プローブを購入
- ・ 反応時間：プロトコールにて全て指定
- 操作手順が全て同一で、条件検討不要



- ・ ターゲットRNA上に、ZZプローブが結合
- ・ ZZプローブ上部にPreAmplifier結合
- ・ PreAmplifierにAmplifier結合
- ・ Amplifierにラベルプローブ結合
- ・ ラベルプローブを発色法により検出
- ・ プローブ作成はメーカーに塩基配列を提出し、作成可否を問い合わせる。最低300塩基必要。依頼配列が長いほど作成可能性高い。

# RNAscope (ACD社)

## ◎ 検証したプローブ

- ・ 豚熱ウイルス
- ・ 馬ヘルペスウイルス1型
- ・ 非定型豚ペスチウイルス
- ・ 兎出血病ウイルス
- ・ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

# ◎豚熱ウイルス (CSFV)

CSF全長 約15,000bp

全長を4領域に分け、  
それぞれロングPCRで増幅

領域1

領域2

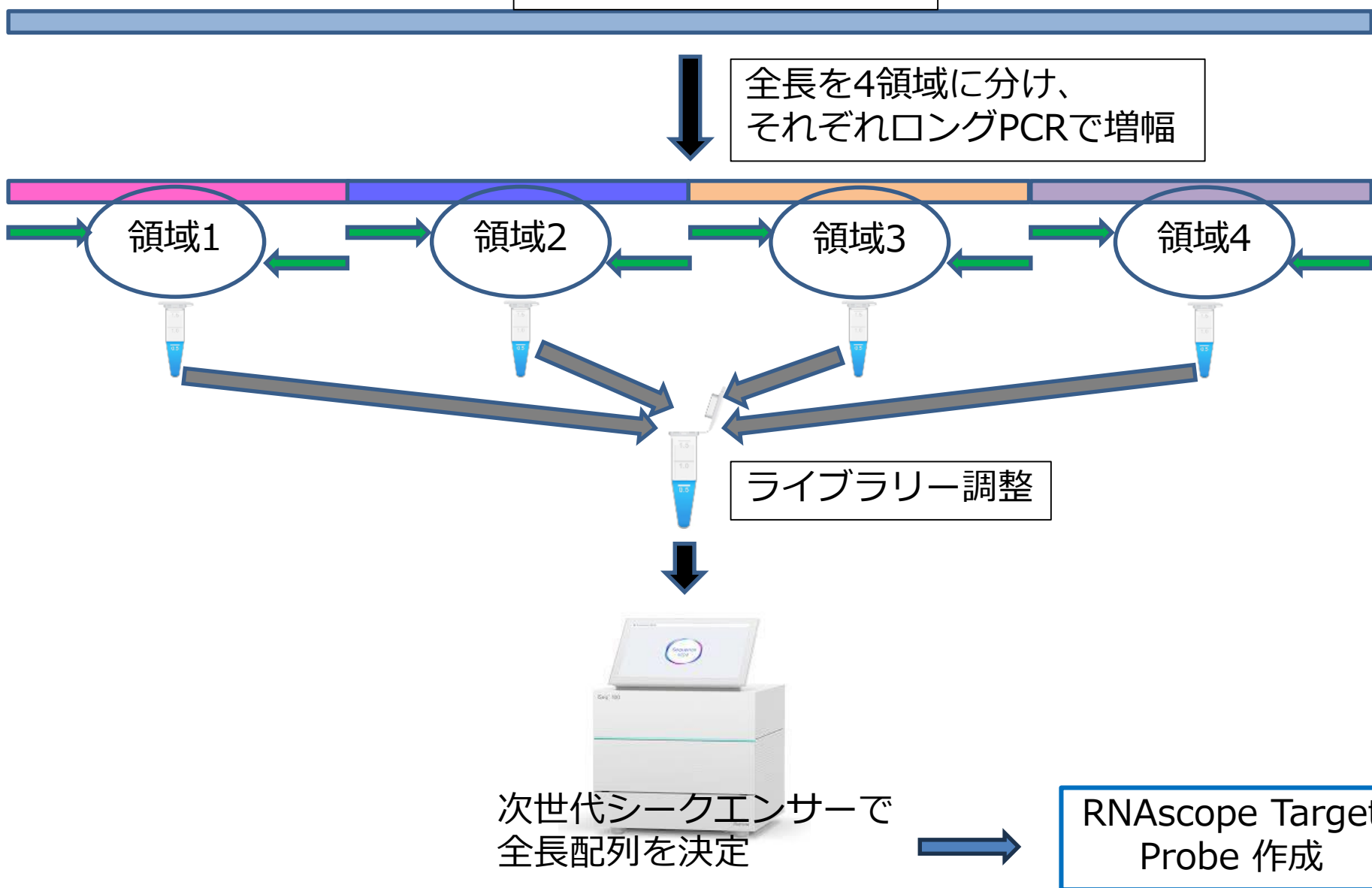
領域3

領域4

ライブラリー調整

次世代シーケンサーで  
全長配列を決定

RNAscope Target  
Probe 作成



# RNAscope (ACD社)

## ◎ 豚熱ウイルス (CSFV)

- ISH : 次世代シーケンスで全長配列決定後、プローブ作成  
→ Probe : CSFV-pp-C1
- IHC : マウス抗CSFVモノクローナル抗体 (APHA Scientific)

## • 検査材料

### ① 豚熱患畜

40日齢豚

CSFのPCR : 脾臓・腎臓・扁桃→**陽性**

### ② 豚熱患畜

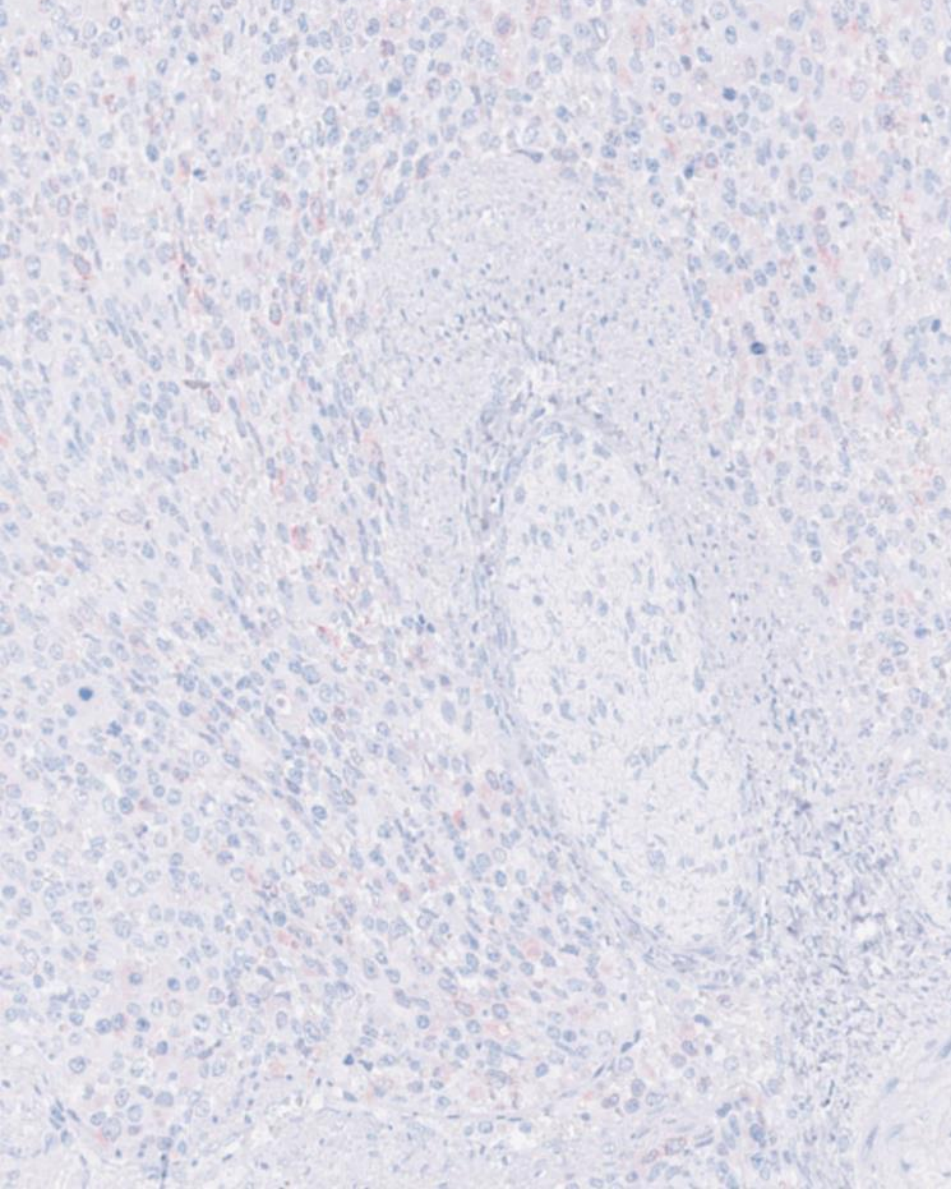
116日齢豚

CSFのPCR : 脾臓・扁桃→**陽性**

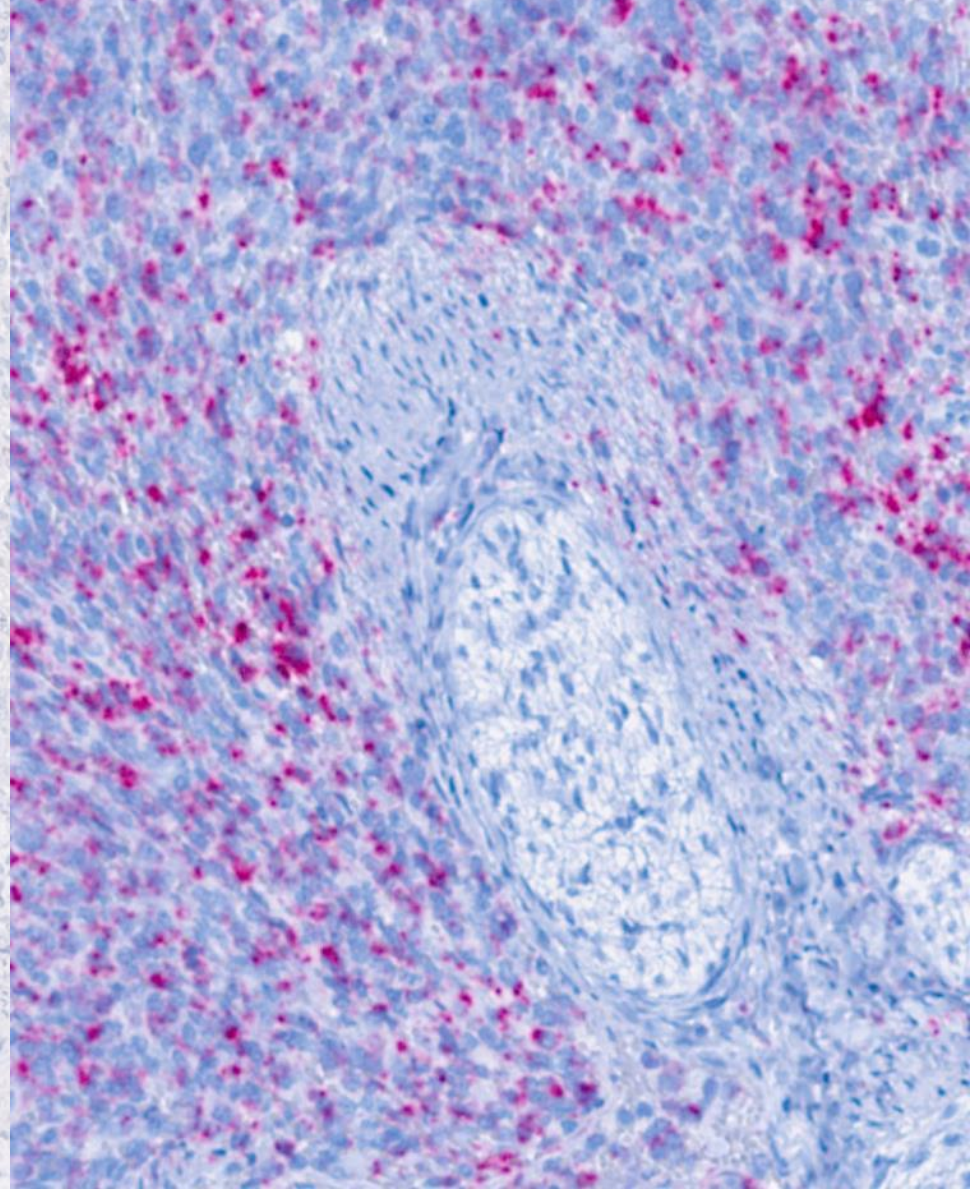


◎ 豚熱ウイルス (CSFV)

① 豚熱患畜  
脾臓 IHC



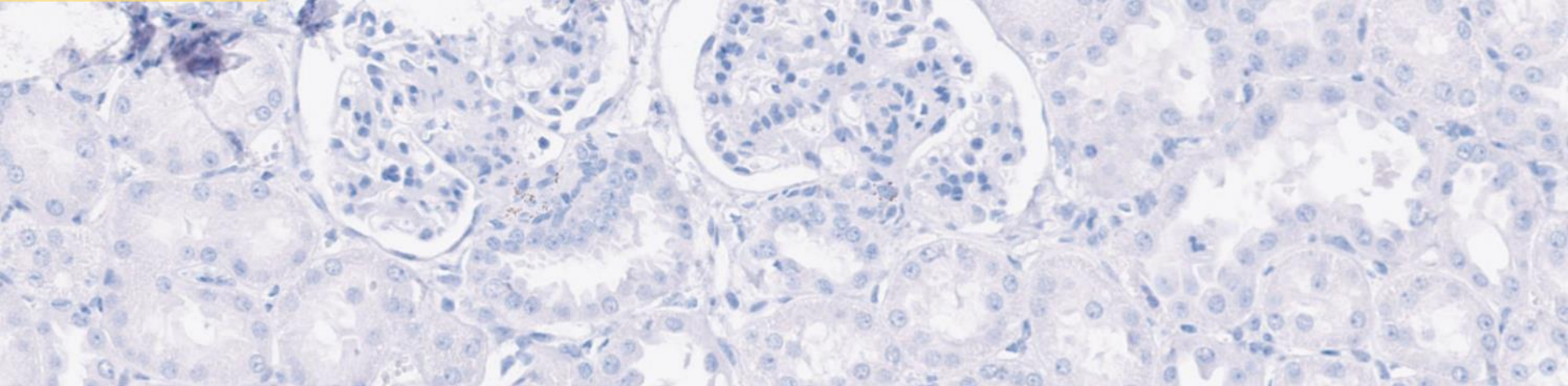
① 豚熱患畜  
脾臓 ISH



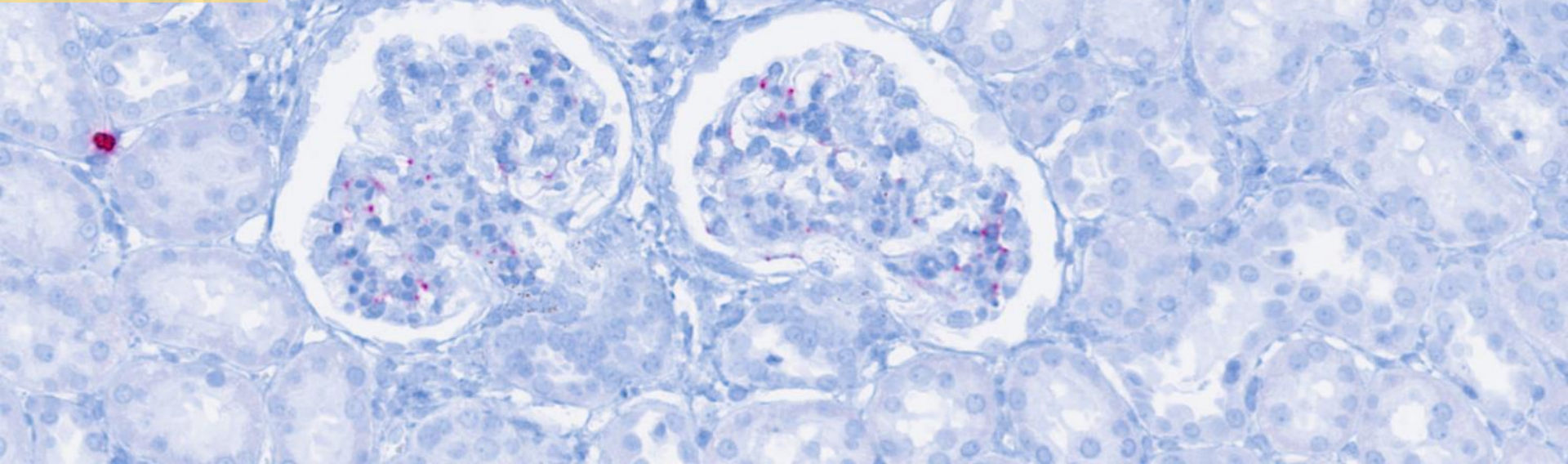


◎ 豚熱ウイルス (CSFV)

② 豚熱患畜  
腎臓 IHC



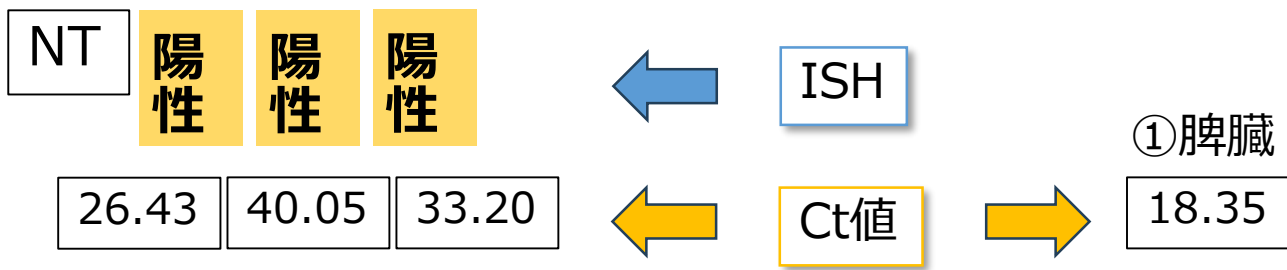
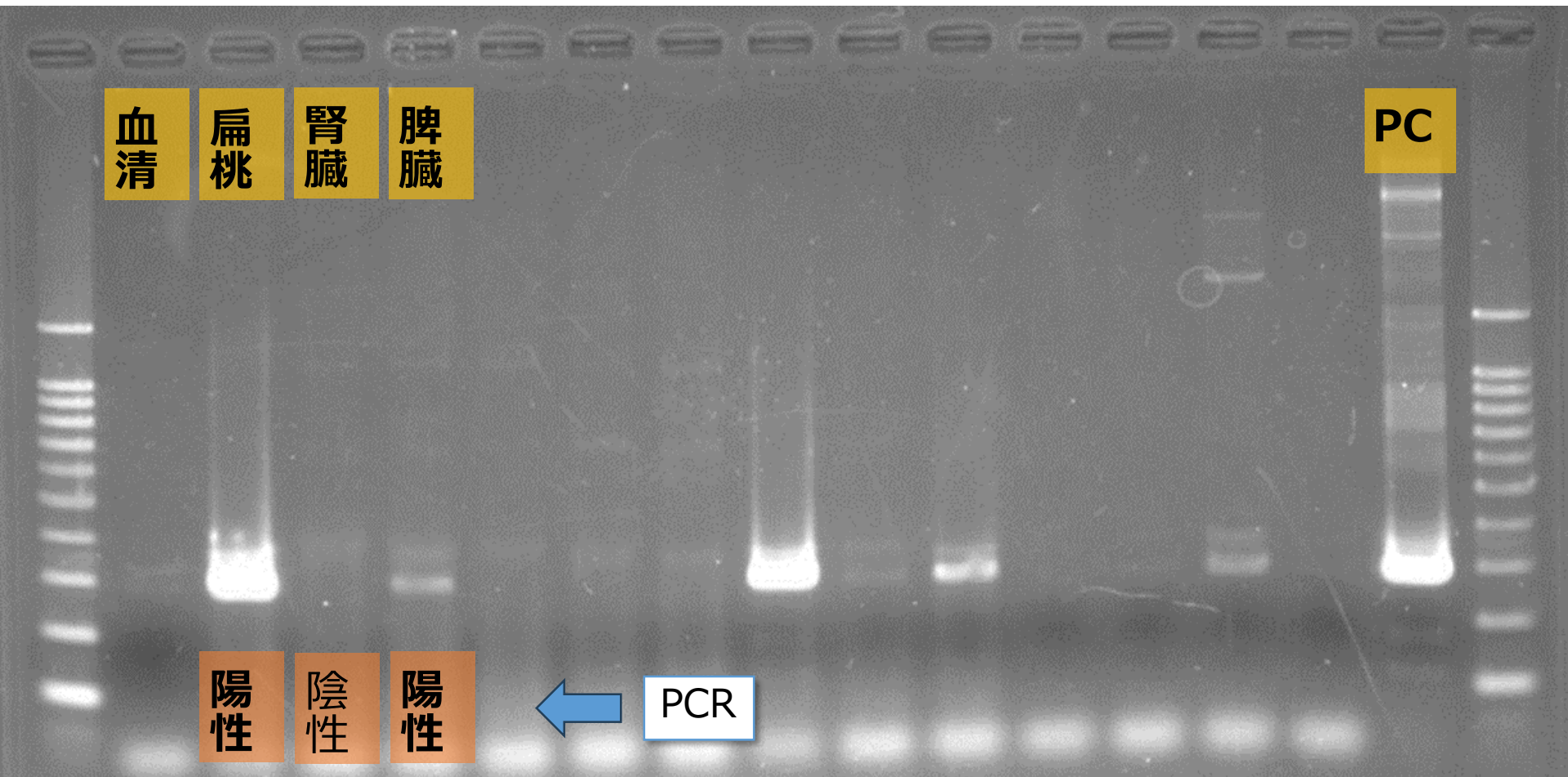
② 豚熱患畜  
腎臓 ISH





# ◎ 豚熱ウイルス (CSFV)

## ② 豚熱患畜



# RNAscope (ACD社)

## ◎馬ヘルペスウイルス1型 (EHV1)

妊娠馬の流産を引き起こす馬鼻肺炎の原因ウイルス

- ISH : 次世代シーケンスで全長配列決定後、プローブ作成  
→Probe : EHV1-ORF33
- IHC : マウス抗馬ヘルペスウイルス1型抗体 (動衛研)

## • 検査材料

胎齢284日の馬 (サラブレッド種) 流産胎児

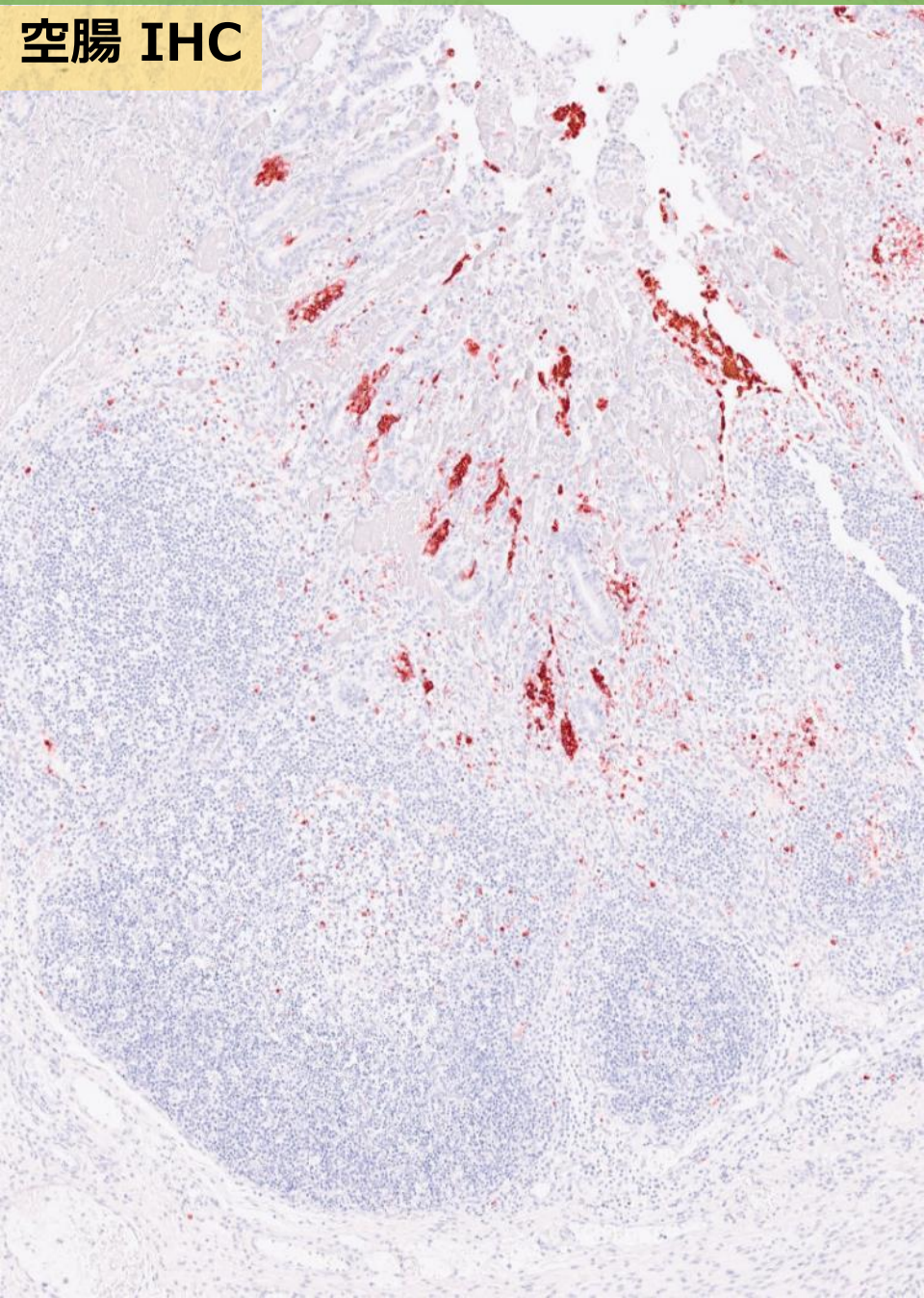
EHV1のPCR : 肝臓・脾臓・腎臓・心臓・肺・脳・胸腺→**陽性**

ウイルス分離 : 肝臓・脾臓・腎臓・肺・胸腺→**EHV1分離**

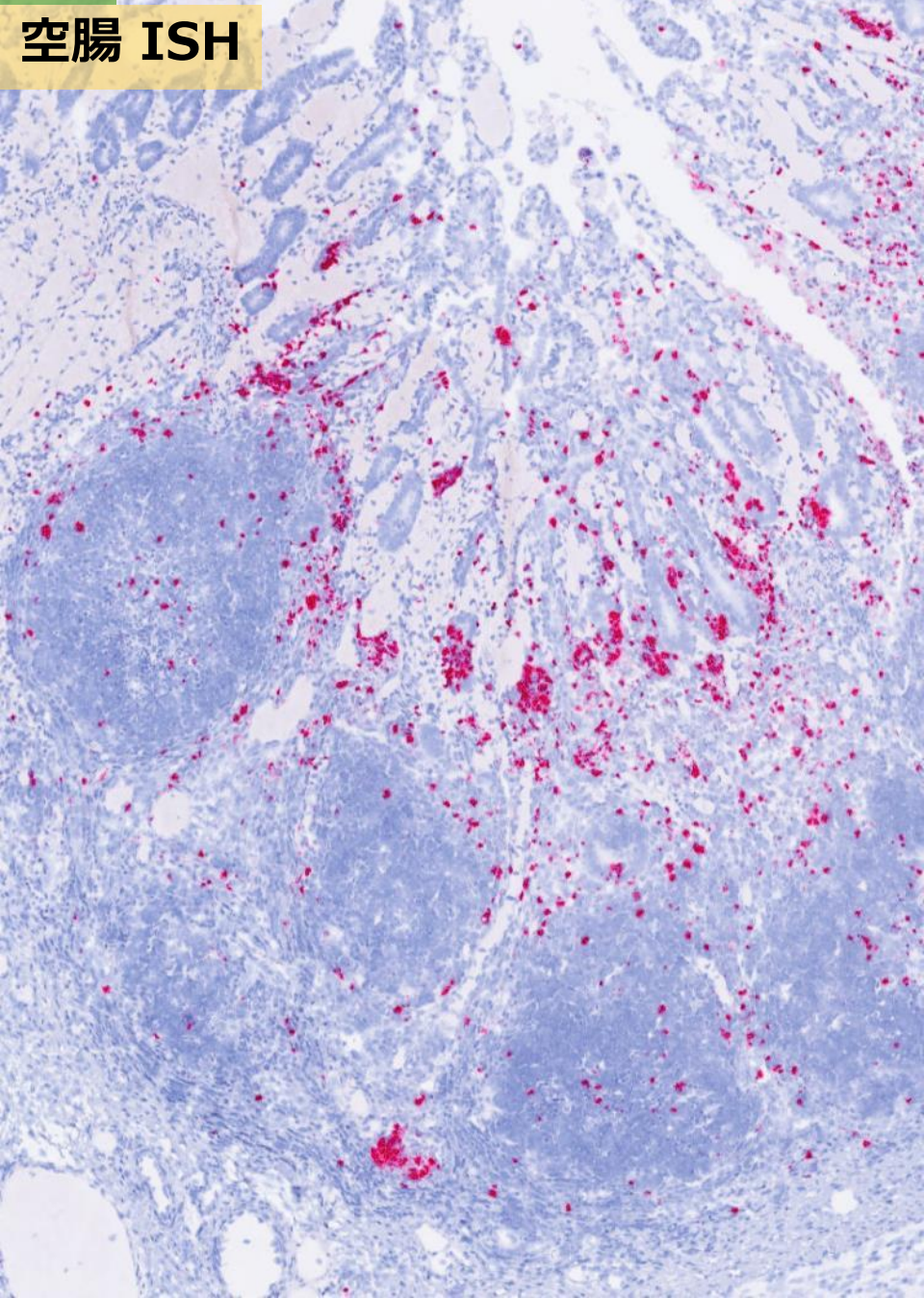


©馬ヘルペスウイルス1型 (EHV1)

空腸 IHC



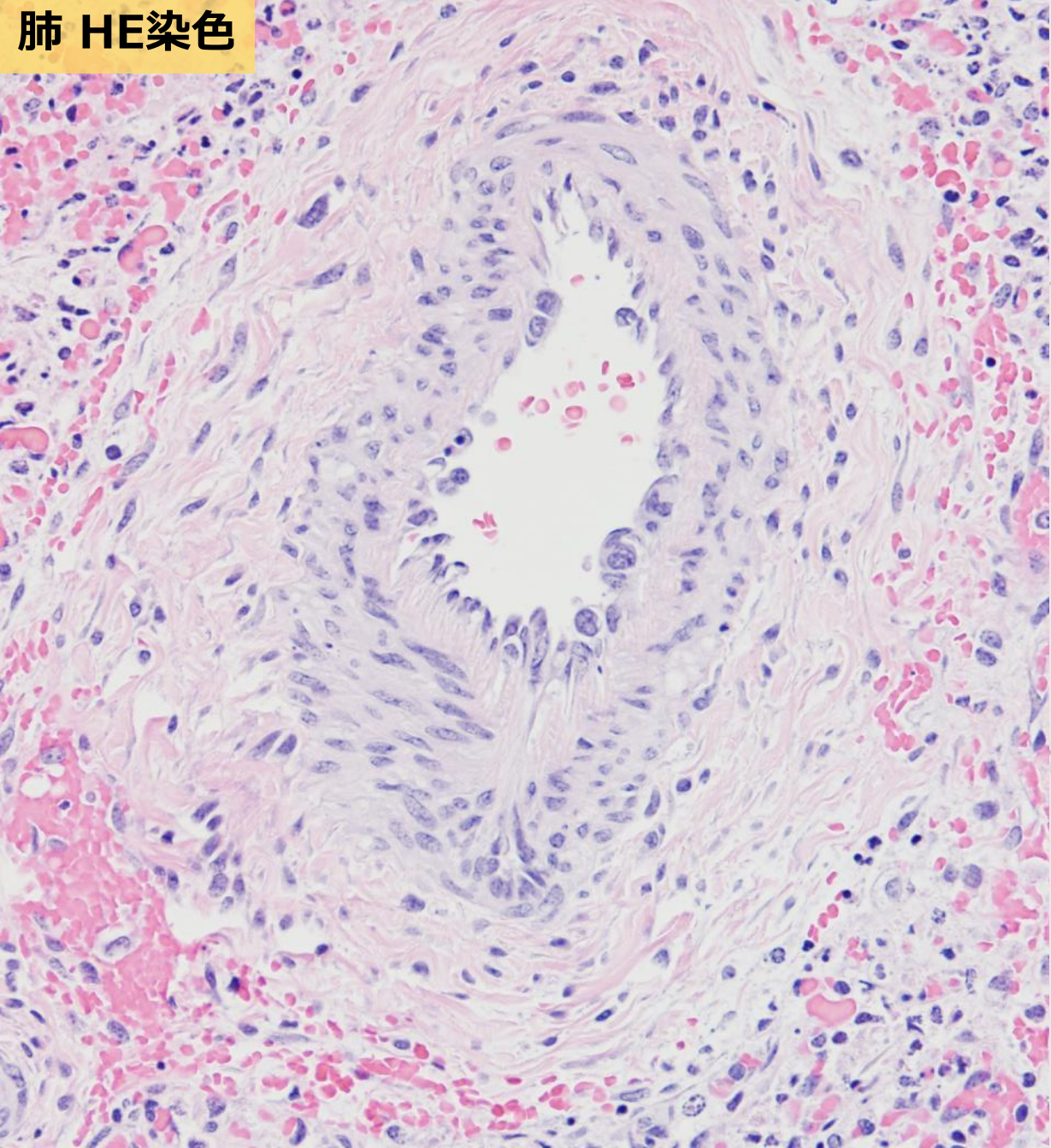
空腸 ISH



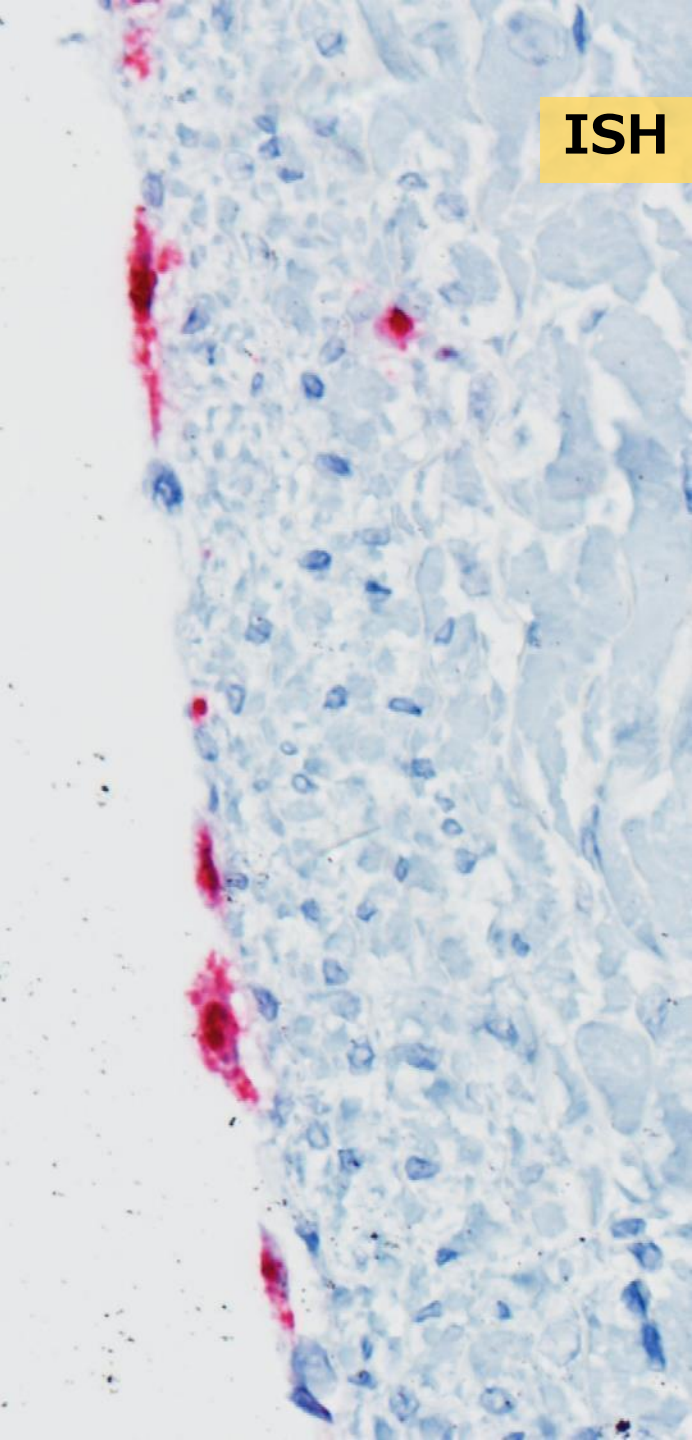


©馬ヘルペスウイルス1型 (EHV1)

肺 HE染色



ISH

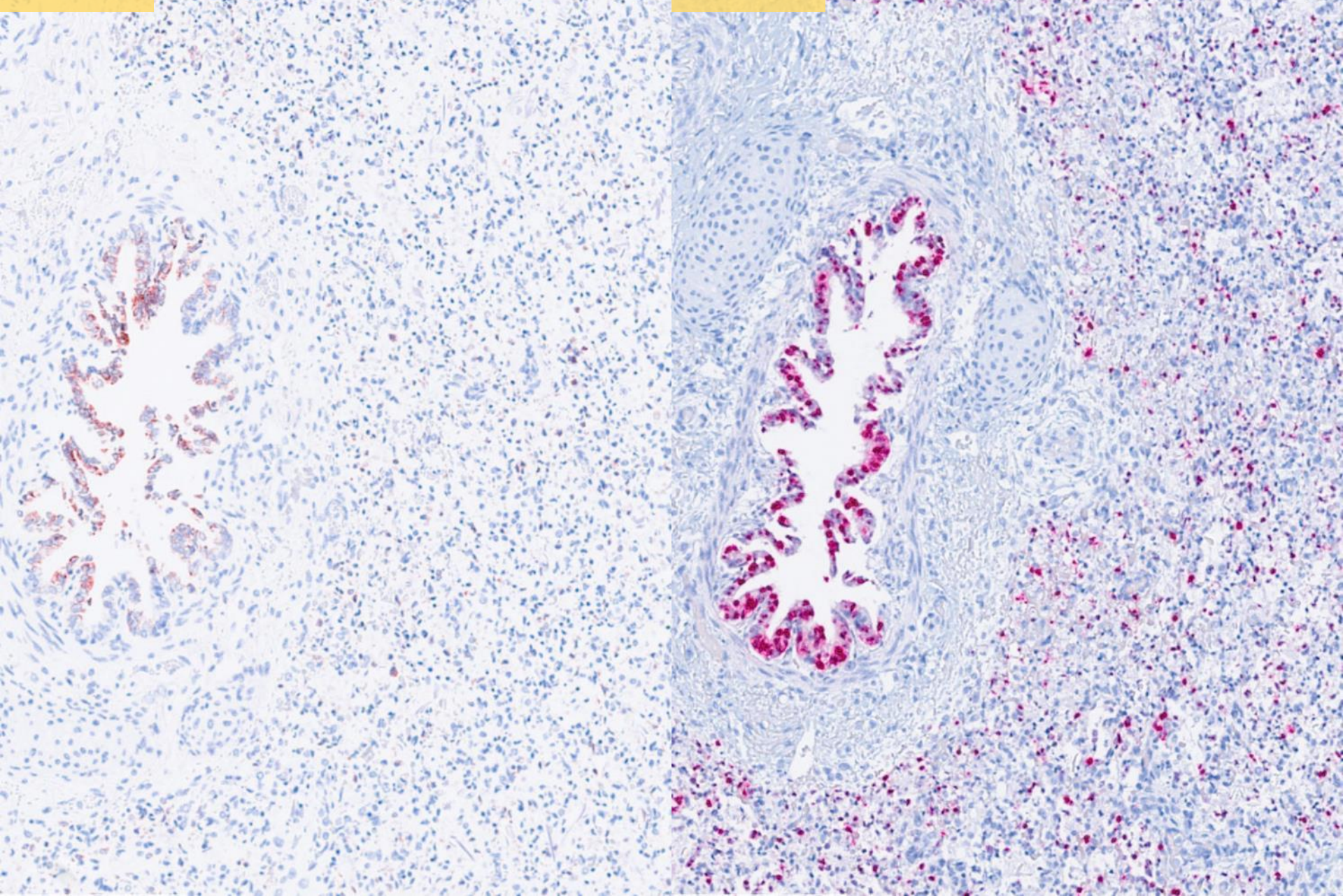




©馬ヘルペスウイルス1型 (EHV1)

肺 IHC

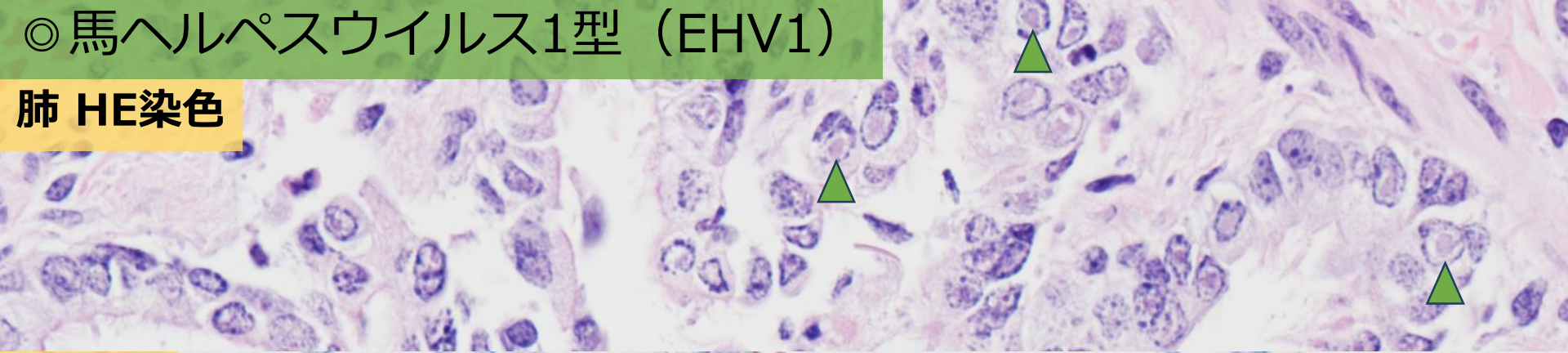
肺 ISH



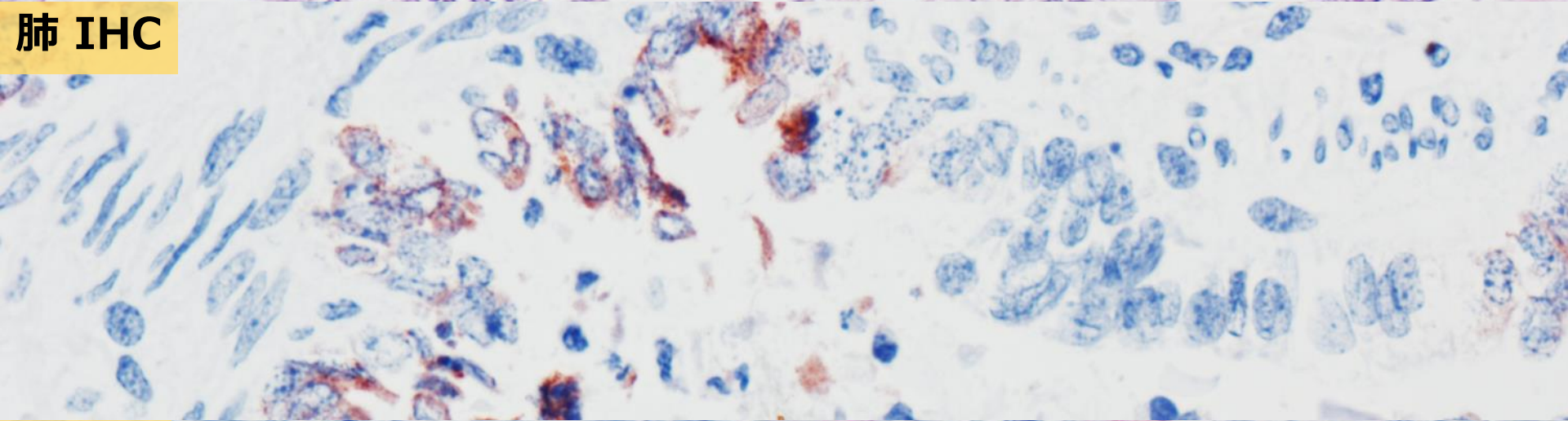


◎馬ヘルペスウイルス1型 (EHV1)

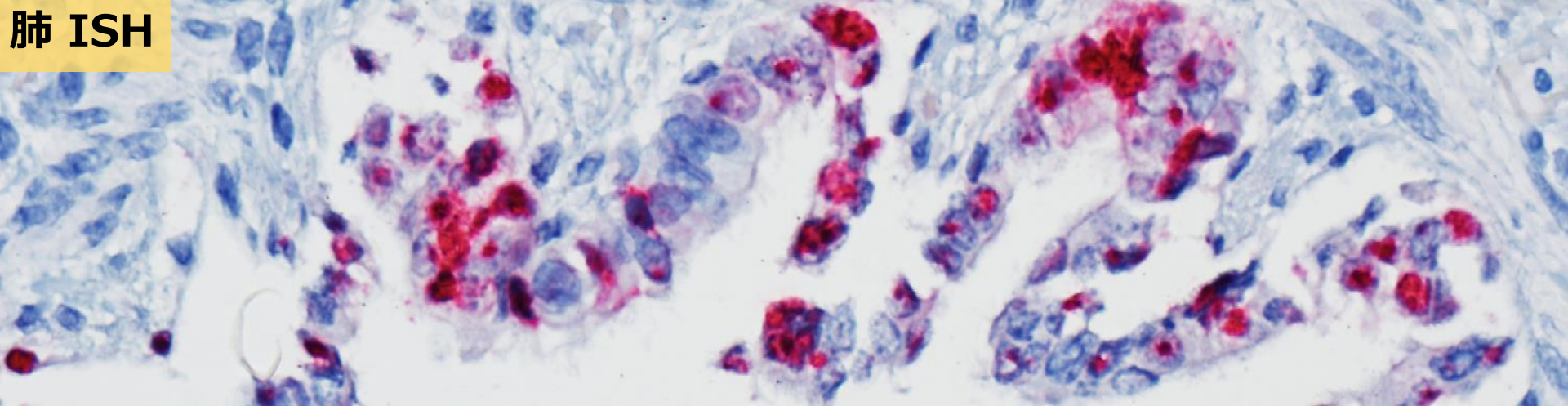
肺 HE染色



肺 IHC



肺 ISH



# RNAscope (ACD社)

◎馬ヘルペスウイルス1型 (EHV1)

臓器	肝臓	脾臓	腎臓	心臓	肺	胸腺	筋肉	大脳
IHC	-	++	-	NT	++	+++	NT	NT
ISH	+	+++	++	+	+++	+++	+	+

臓器	小脳	脳幹	脊髄	胃	十二指腸	空腸	回腸	結腸
IHC	NT	NT	-	NT	NT	++	NT	NT
ISH	+	+	+	+	+	++	+++	++

感度 : ISH > IHC

# RNAscope (ACD社)

## ◎非定型豚ペスチウイルス (APPV)

近年、豚の先天性振戦 (ダンス病) の原因の1つとされる  
IHC用抗体が無い

- ISH : シークエンス実施後、最も近縁な株にてプローブ作成  
→Probe : APPV-NS2-NS3

## • 検査材料

2日齢豚

APPVのPCR : 脾臓・腎臓・扁桃・脳・脊髄・血清→**陽性**





# RNAscope (ACD社)

## ◎ 兎出血病ウイルス (RHDV)

兎出血病：全身諸臓器の出血、肝臓壊死を特徴とする  
急性かつ致死性の疾患

国内でIHC用抗体の入手困難

- ISH：シークエンス実施後、最も近縁な株にてプローブ作成  
→Probe：V-RHDV2-pp-C1

## • 検査材料

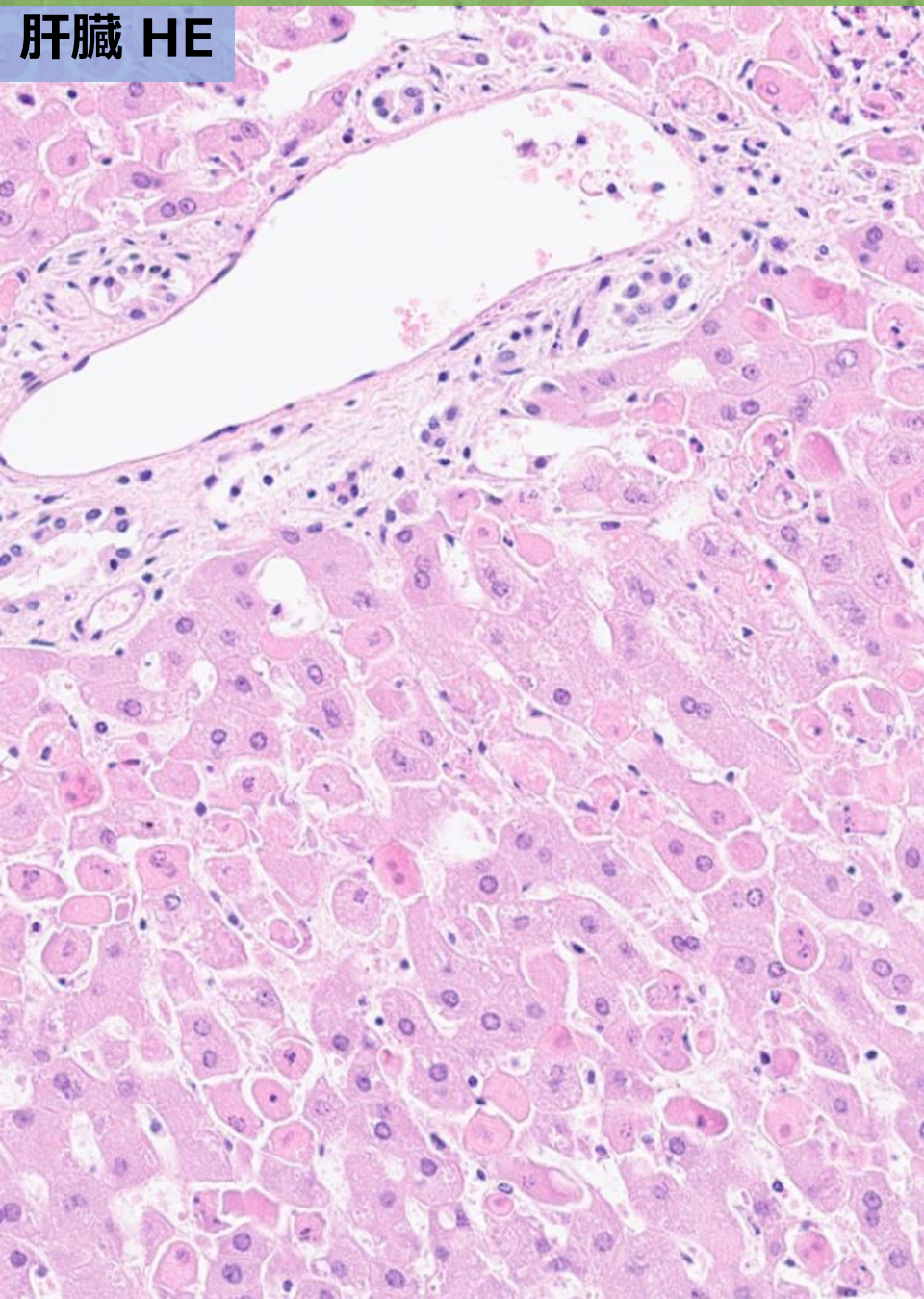
ウサギ (品種等不明)

RHDVのPCR：肝臓→**陽性**

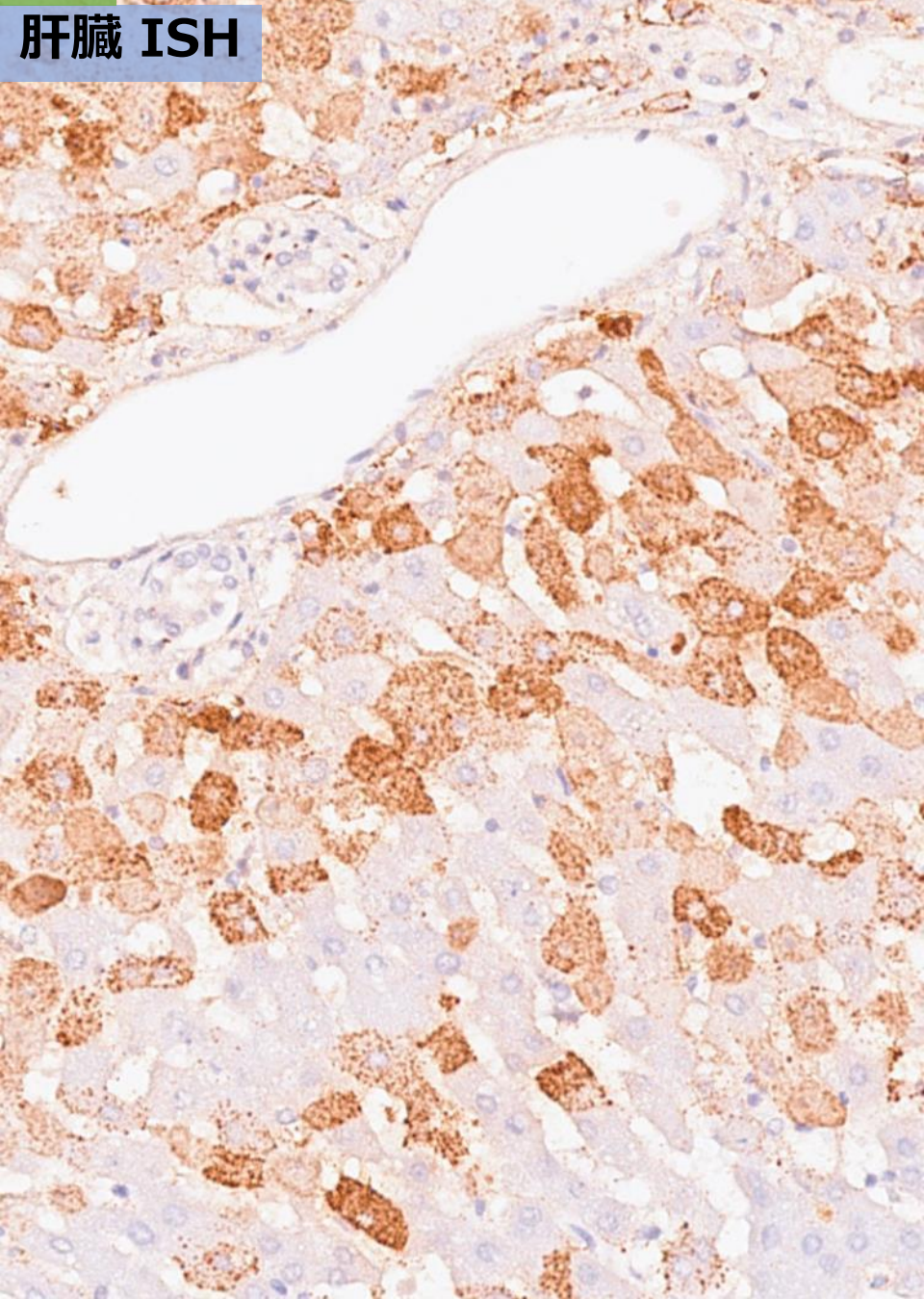


© 兔出血病ウイルス (RHDV)

肝臓 HE



肝臓 ISH



# RNAscope (ACD社)

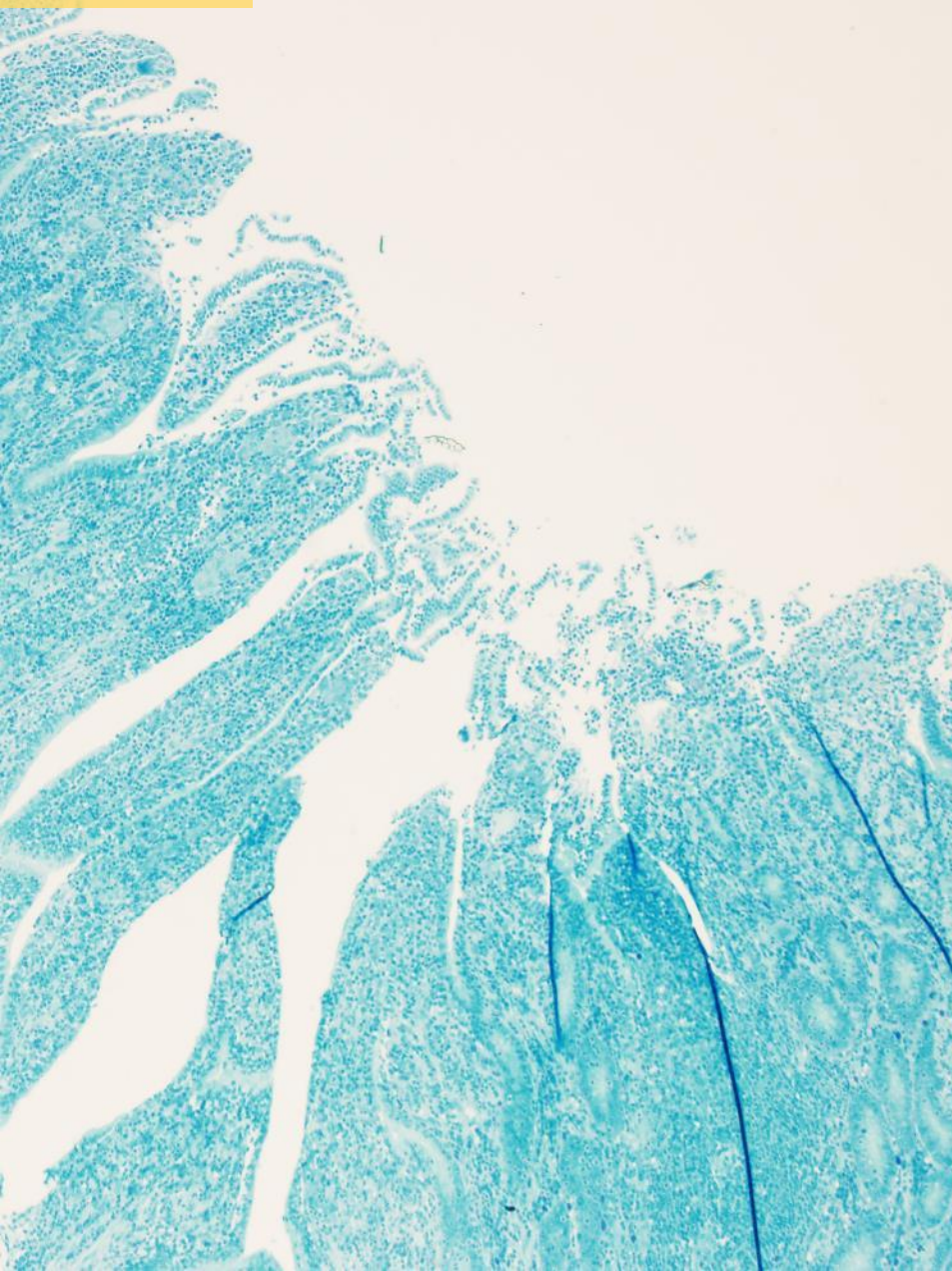
◎ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

- ISH：既存のプローブを購入  
→Probe：B-M.paratuberculosis-16S
- 特殊染色：Ziehl-Neelsen染色 (ZN)
- 検査材料  
64ヶ月齢乳牛  
ヨ一ネ病患畜

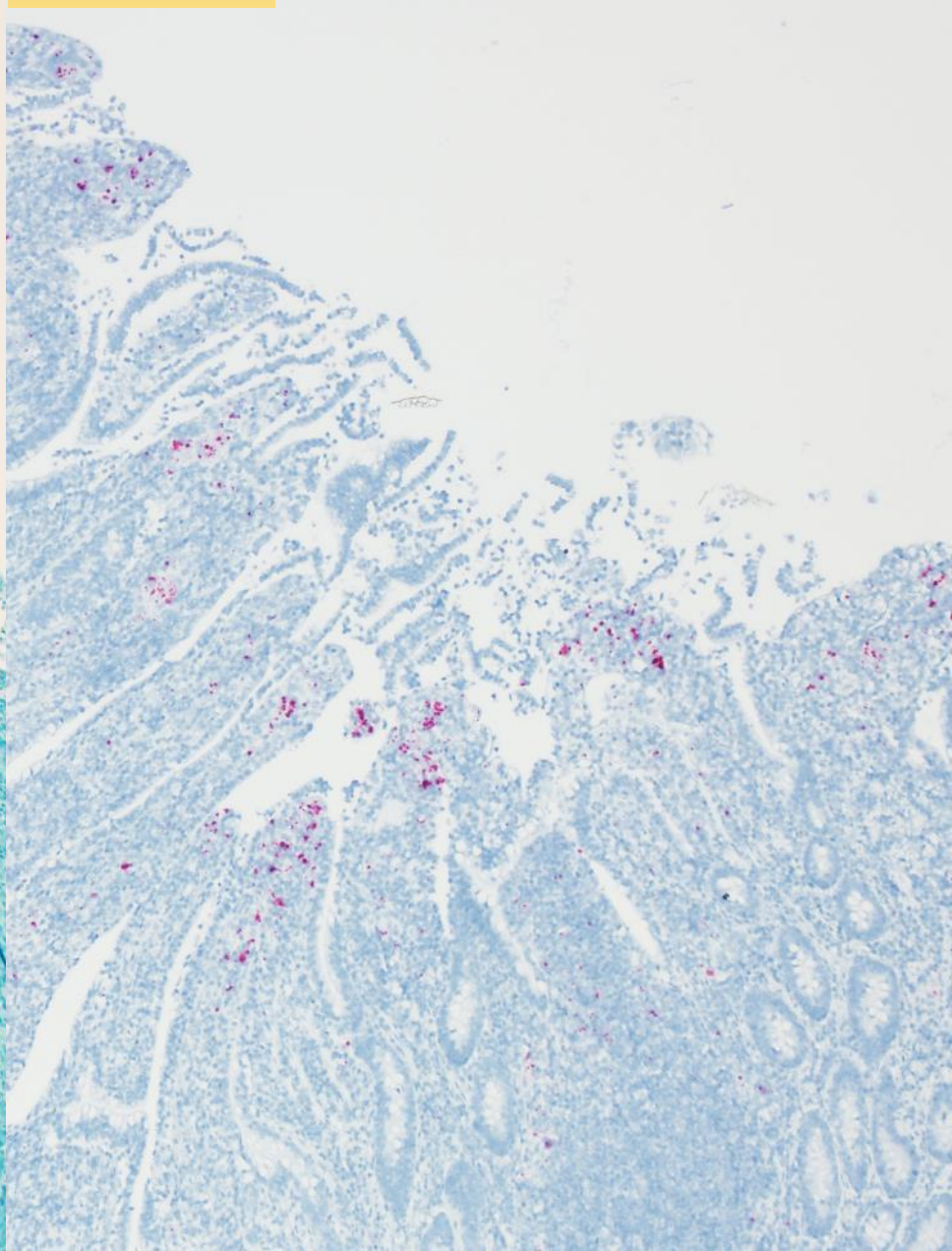


© *M. paratuberculosis*

回腸 ZN



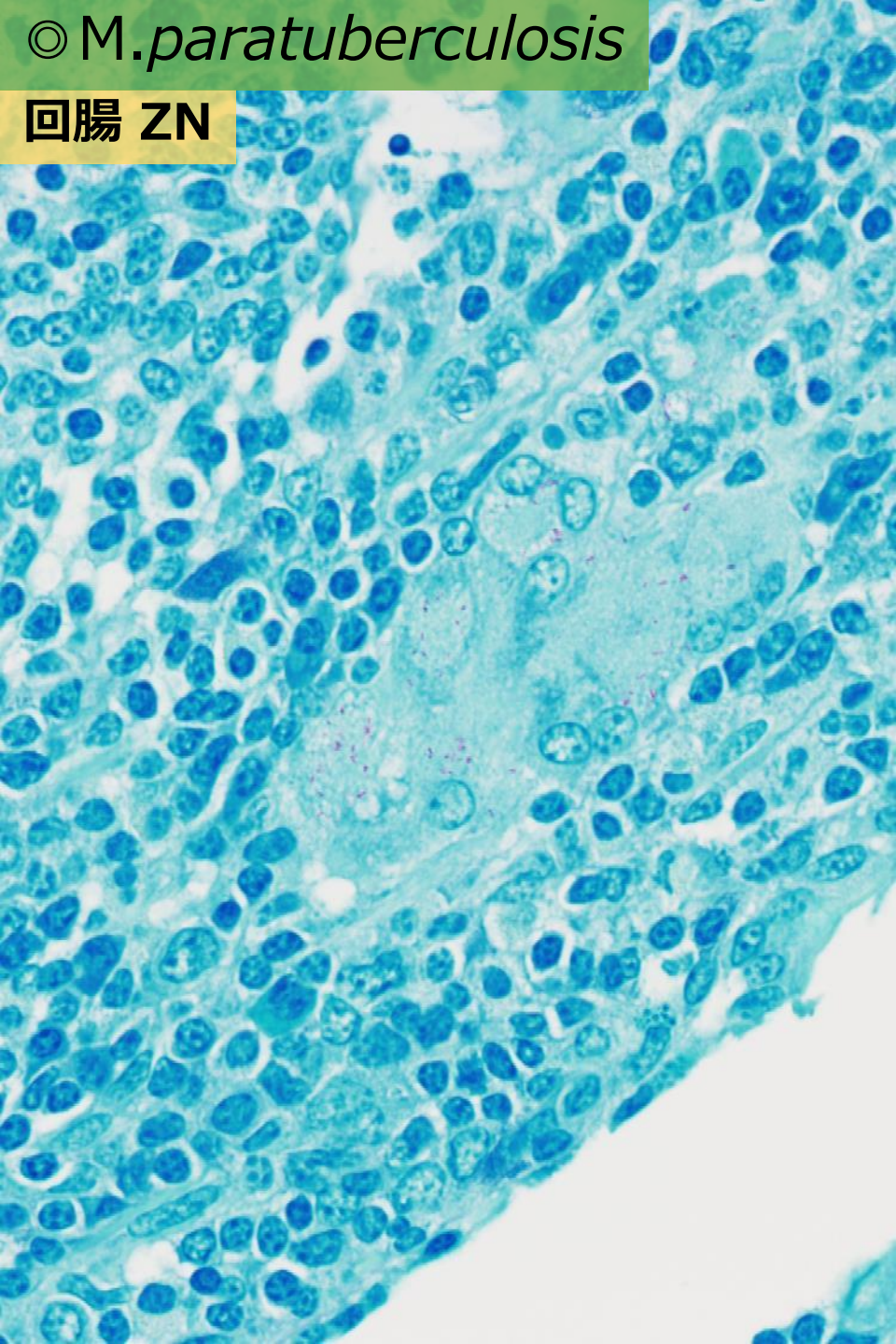
回腸 ISH



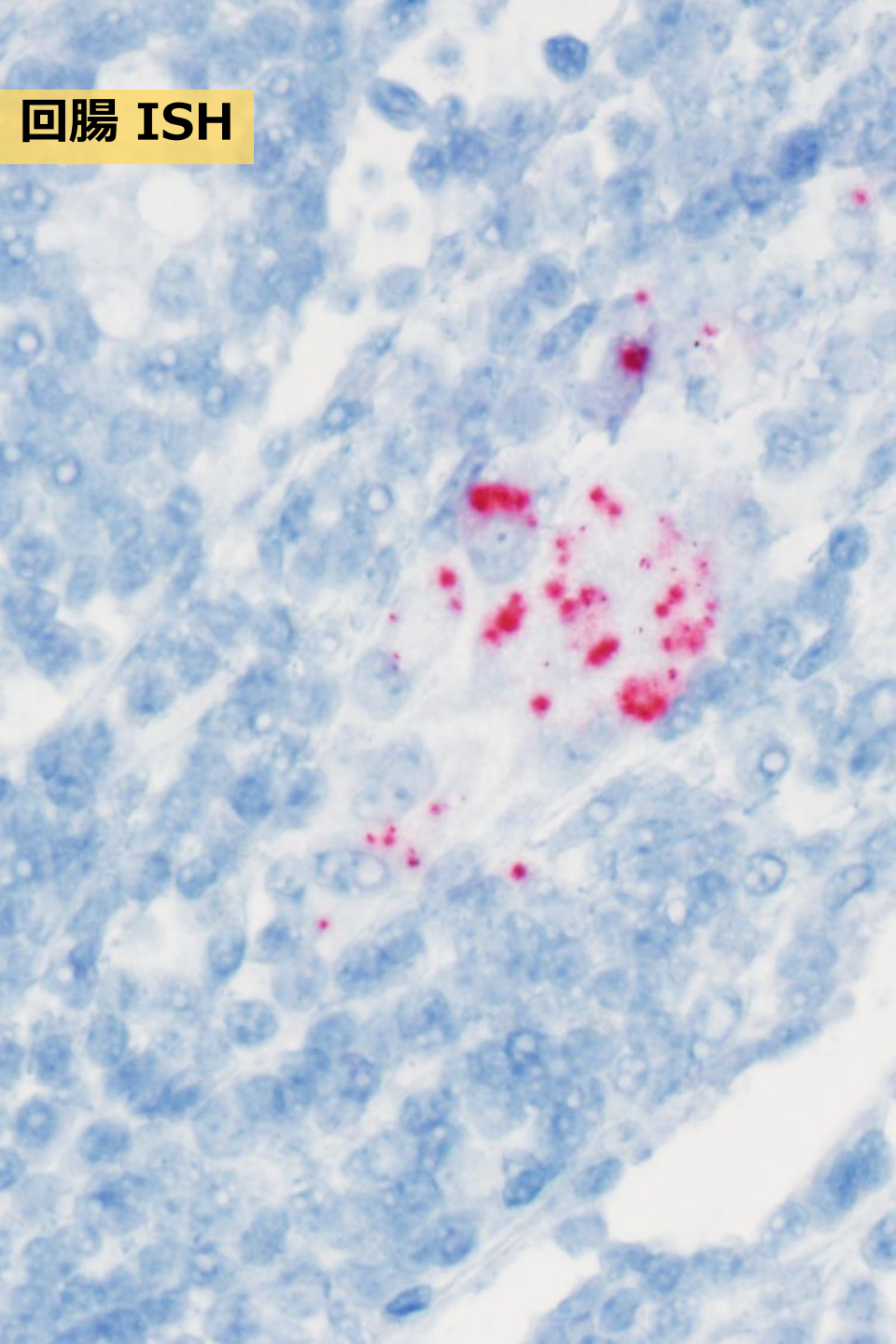


© *M. paratuberculosis*

回腸 ZN



回腸 ISH



# 検証結果

## ◎検証プローブ

- ・豚熱ウイルス
- ・馬ヘルペスウイルス1型
- ・非定型豚ペスチウイルス
- ・兔出血病ウイルス
- ・*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*



検証した5病原体全てで有用性確認  
豚熱・馬鼻肺炎の2疾病では、免疫染色より  
高感度であることを確認

→新規プローブを積極的に導入していく

# まとめ

	IHC	ISH
検出物	蛋白質	核酸
感度	低	高
新規疾病対応	難	易
コスト	低	高
検査時間	短	長

IHC・ISH両者に長所短所がある



◎ ISHがIHCの全てを取って代われるわけではない

→ ISHとIHCの併用によって質の高い病理検査実施