

## 第VII章 腎生検検体の処理法.....両角國男

腎臓病理学は一般的な病理診断と異なり光学顕微鏡標本のみでは診断確定しないことが多い領域である。光顕に加え、免疫組織検査（免疫蛍光抗体法、酵素抗体法、ISH;*in-situ* hybridization, など）と超微形態検査（電子顕微鏡, 免疫電顕, など）で評価する必要がある。腎生検を行う対象疾患は多岐にわたり、通常の病理学的診断手法では診断確定できない疾患も多い。特殊染色や免疫病理検索、電顕での超微形態評価が必要となる疾患では積極的に診断確定のため精力的に検査する必要がある。したがって、腎生検で採取された組織片から最大限に有効な情報を把握できるよう処理することが最も重要である。

観血的検査である腎生検では、一般的には、針生検で組織片を採取するため円柱形の細い切片が採取されることになる。腎生検検査に伴う出血などの危険を最小限に抑えるためには採取組織片数は少ないほうが望ましいが、正確な診断には十分な組織量が有利なことも事実である。尿や血液などから得られる情報で腎疾患の正確な診断や詳細な病態評価ができることが理想である。しかし、現時点においては腎生検で得られる情報量は多く、他の診断手法では代替できないことが多いため、腎疾患診断の最終確定手段となることが多い。さらに、腎生検で得られる情報は、治療方針や予後推定にも有用である。腎生検にて採取される小さな組織片をどのように処理することが最も有効であるかを吟味することは重要である。もし、分量の組織片の採取できなかつたときには、どのように優先順位を選択するかも大切なことである。最大の情報を引き出すためにはどんなことに留意すればよいのか、診断しやすい標本の条件やそのための準備などうすればよいのか、腎生検の行われる状況と採取された組織片の状況に応じてどのような検体処理を行うか、について概説する。

### 1. 採取組織切片の大きさと各種検査用検体の分配

腎生検組織診断の有用な腎疾患は皮質部に主病変があることが多く、採取組織の評価を十分に行うことがきわめて重要である。針生検でも開放性腎生検での楔状切除組織片でも、採取組織量は少

なくて十分な診断のできることを望ましい。針生検を例にとれば、採取組織片は、1本から3本程度の施設が多い。光学顕微鏡、免疫蛍光法、電子顕微鏡の各検査用に十分な組織片が採取されていることもあれば、少ない組織片から最大の情報を引き出すように工夫が必要なこともある。図1-aに示すように針生検組織が2本以上採取され、十分な皮質が含まれていることが確認できれば、蛍光抗体用の組織は3mm以上の大きめの切片を確保したい。また、電子顕微鏡用の小組織も2個以上は確保したい。標本内に含まれる糸球体や細動脈、小動脈の数が多いほど診断精度は向上する。針生検での採取組織が1本の場合には、採取部分に皮質が含まれることと、光顕組織診断に必要な最低限の組織を残すことができることを確認して、図1-bに示すように、1.5mmの小組織片を両端から2個切り出し、各々蛍光抗体法用凍結組織と電子顕微鏡用固定液に移す。採取組織がとても小さなきときには、皮質側から各々1個の蛍光抗体用と電顕用組織片を確保するように努める。一般的に、腎生検組織診断結果が正しくその腎疾患を反映するためには完全に荒廃していない糸球体（荒廃糸球体においては荒廃過程の推定できる糸球体）が最低何個必要なのだろうか？ IgA腎症については10個以上の糸球体が望ましいとされている<sup>1)</sup>。移植腎病理に関する国際診断基準（Banff分類）では、7個以上の糸球体と複数の細動脈が含まれる生検を信頼性のある試料としている<sup>2)</sup>。腎生検は腎臓のどの部位から組織を採取しても同じ情報が得られることを前提としている。しかし、腎疾患

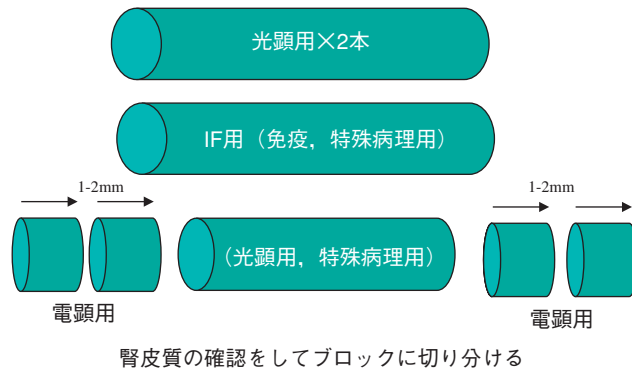


図1a 2本以上の組織切片採取が望ましい  
光学顕微鏡，免疫蛍光法，電子顕微鏡の各検査  
用に十分な組織片の採取が必要である。

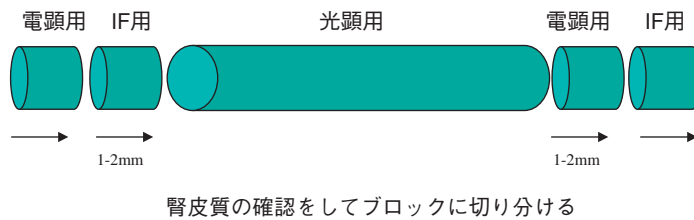


図1b 1本の組織切片採取の場合の処理法

によっては病変の出現部位に偏りがみられることもある。特に、病変分布が巣状になる疾患（巣状糸球体硬化症，膠原病性腎症，移植腎など）では，採取された組織が全体像を的確に代表しているかを吟味する必要がある。巣状糸球体硬化症の初期病変が皮髄境界部に出現しやすいことなどはその例として重要である。

## 2. 腎生検組織診断目的と検体処理

### 2-1. 光学顕微鏡用標本

#### 2-1-1 迅速診断用組織処理か永久標本か？

腎生検組織の検体処理は検査目的に応じて異なっている。

#### 2-1-2 迅速診断用組織処理

光学顕微鏡用標本には，新鮮凍結切片を用いた迅速診断用組織標本とパラフィンや樹脂に包埋した永久標本がある。迅速診断用組織標本は，外科領域では術中迅速診断として汎用されている。30分以内に診断確定する必要性がない腎生検領域では一般的ではない。しかし，稀ではあるが腎生検でも迅速切片作成が必要な場合がある。心停止後に提供された献腎移植例で，死戦期が長くDIC腎が生じた可能性がある時や，腎を摘出し灌流状況が不良で，貴重な提供腎が無機能腎になる可能性があるか否かを決定する必要がある。手術中，移

植腎への血流を再開直後は，良好な血流であったのが急速に減少し移植腎に虚血や血栓性変化が出現した時には，速やかな病理検査が必要となる。特に，献腎移植の提供腎が移植可能か，移植を断念すべきかの評価においては，組織採取後1時間以内に診断をくだす必要があり，凍結切片での迅速診断用に組織処理する必要がある。この評価により貴重な提供腎をあきらめることなく，無機能腎となる移植手術を避けることができるのは大変に重要なことである。

熟練技師が作成した標本でも，迅速診断用標本は永久標本と比較すると標本の質が低く微細な病変の評価が困難で，対応できる染色もHE（ヘマトキシリン・エオジン）やPAS染色などに限られ，詳細な吟味ができないため，診断の正確性に疑問が残る。腎生検で採取した組織片から永久標本として観察できるまでに5日から1週間以上の日数を必要とする施設などでは迅速切片が必要との事情もあるようである。しかし，貴重な腎生検組織片を安易に迅速診断用に処理することは避け，迅速診断を行う対象は厳しく吟味し，絞り込むことが重要である。迅速切片を作成しなくても，腎生検から半日以内に永久標本を作製できる方法もあるので，超特急処理の必要な病態か否かを熟慮しなければならない。

### 3. 迅速(30分)ではないが大至急(1日以内) 診断する必要のある際どうするか

急激に腎機能低下が進行する症例において、急速進行性糸球体腎炎か、その他の疾患かの鑑別を速やかに行い、治療を開始したいときがある。また、腎移植後の急性拒絶反応か免疫抑制薬腎毒性かの鑑別を腎生検で速やかに行うことはきわめて重要である。こうした状況では、迅速診断用標本作製し評価するより、腎生検後 8 時間から遅くとも 24 時間以内に永久切片を作成することが重要である。腎生検を行っている各施設での腎生検組織の光顕標本作成まで、免疫病理標本、電子顕微鏡標本完成までの所要時間を把握しておくことが必要となる。多くの病理検査室では腎生検後 2 日から 7 日程度で光顕標本が準備されることが多いのではないだろうか。しかし、大至急病理診断したいときにはどうすればよいのか。

光学顕微鏡用標本ができるまでの過程は、固定、包埋過程(脱水、パラフィン浸透、パラフィンブロック作成)、薄切、染色、封入からなる。大至急(1日以内)での光顕組織標本作製までの過程では、固定と包埋に費やす時間をいかに短縮できるかが重要である。水銀を含んだホルマリン固定液を使用した時代には 1 時間程度での固定が可能であった。しかし、水銀などの有毒成分が固定液に使用されなくなった現在、多くの施設は緩衝ホルマリン液などを使用していることが多い。緩衝ホルマリン液の固定作用は比較的弱い、腎生検の採取標本は、細く小さいため比較的短時間でも十分な固定ができるとされる。しかし、固定不良は質の悪い標本となり、正確な診断に苦慮することになる。貴重な生検組織片から不十分な情報しか得られない事態は避けるべきである。固定時間を短縮しても十分な固定を行うにはマイクロウェーブ処理するとよい<sup>3)</sup>。緩衝ホルマリン液での固定に通常は 8 時間以上かけるが、マイクロウェーブを使用することで 1 時間程度まで短縮可能となる。その後の過程を要領よく進めることで、生検組織採取後 8 時間程度と生検当日の顕微鏡観察も可能となる。一方、永久標本を 24 時間以内で作製するのであれば、マイクロウェーブを使用しなくともよい。14G の針生検組織片は、緩衝ホルマ

リン液にて 4 時間の固定を行えば標本の質に悪影響なく作成できる。ホルマリンにアルコールなどの成分を加え固定力を強化することで短時間固定は可能となる。各施設で使用している固定液の特性に精通し、使用目的にかなう固定液を選択することが重要である。

### 4. 良質な光顕組織標本作成のために

一般的には 10% または 20% 緩衝ホルマリン液を固定に使用する。腎臓病理専門医は緩衝ホルマリン液を推奨している。一方、腎臓内科医が診断を行う施設では、緩衝ホルマリン液以外の固定液が使用されていることも多い。例えば、Masson trichrome 染色に適した Dubosq Brazil 固定液を使用する施設もある。Bouin, Gendre, カルノフスキーなどホルマリンにアルコールや酸を添加した多くの固定液が腎生検に適したものとして使用されている。各施設では、基底膜染色性の良さや免疫複合体の染色性を重視するなど、各々の目的に応じて固定液が選択されている。この際注意すべきこととして、光顕用パラフィン組織を用い酵素抗体法などの免疫組織染色を行う際に、その固定液では支障がないかについて検討しておく必要がある。固定液によっては免疫組織に不適切なものもある。良質な光顕標本に加え免疫病理診断に対応できることから緩衝ホルマリン液やマスクドホルマリン液は汎用性に優れる。腎生検に用いられることのある固定液としての条件と各固定液の特徴を要約し表 1 に示す。

十分に固定されパラフィン包埋されたブロックを用い、腎生検診断用切片には 3 ミクロンを標準として薄切する。特に PAM 染色に用いる切片は薄く切れていることが重要である。できるだけ薄切した切片の厚さをそろえ、薄切順を分かるようにしておくことと連続切片での観察が必要な際に有用である。図 2a.b.c に示すように切片の厚さにより糸球体は全く異なった印象の病変を示す。適切に薄切された切片(図 2-a)では、腎生検診断に不可欠な、管内増殖やメサンギウム増殖病変の有無と程度、毛細血管腔の開き、基底膜肥厚、基質の状態、免疫沈着物の状態などを把握しやすい。一方、厚い切片(図 2-b)では組織から受ける印象

表1 光学顕微鏡用固定液

光顕組織用固定液の選択する際の条件
固定力
固定時間
組織への浸透性
固定液のpH
固定液の浸透圧
非アルコール系・アルコール系・酸含有などの特性
染色性（基底膜，沈着物，細胞，など）
免疫組織化学への応用性
光顕用代表的固定液（目的に応じ慣れた固定液を使用することが望ましい）
ホルマリン系：緩衝ホルマリン（10%，20%） ：マスクドホルマリン，未処理ホルマリン， アルコール，酸など含有： Dubouque Brazil, Bouin Gendre, カルノフスキー，その他
水銀含有：Susa（環境汚染で中止され現在は使 用されない）
その他：パラホルムアルデヒド
各固定液の特徴
緩衝ホルマリン：バランスは良い 固定力が弱い（固定時間と染色性に問題） 免疫組織化学に応用可 緩衝ホルマリンとマスクドホルマリンとの 形態には差がある
アルコール系・酸含有固定液 赤血球が染まらない（溶血） 脂質の融出が強い 基底膜や免疫沈着物の染色性に優れる

が異なっている。さらに、極めて厚い切片（図2-c）では、本来は存在しないのに管内やメサンギウムの細胞増多があるように見え、毛細血管腔が開いていないように見える。逆に、極めて薄すぎる切片では、基底膜の詳細な状態や細胞質内変化などが良くわからないこともある。腎生検組織を正しく評価するには適切に薄切され、染色性のよい標本が不可欠である。

光顕用組織染色として、HE、PAS、PAM、Masson trichromeの4種類を染色することが望ましい。腎疾患では、腎臓の組織を構成する各因子と病変として出現する変化を明確に区分することが重要なため、標準的な4染色法に一工夫加えることが診断精度の向上に有用である。例えば、図3に示すMasson trichromeに弾性板染色を加えたelastica-MassonやPAM-Masson染色などはきわ

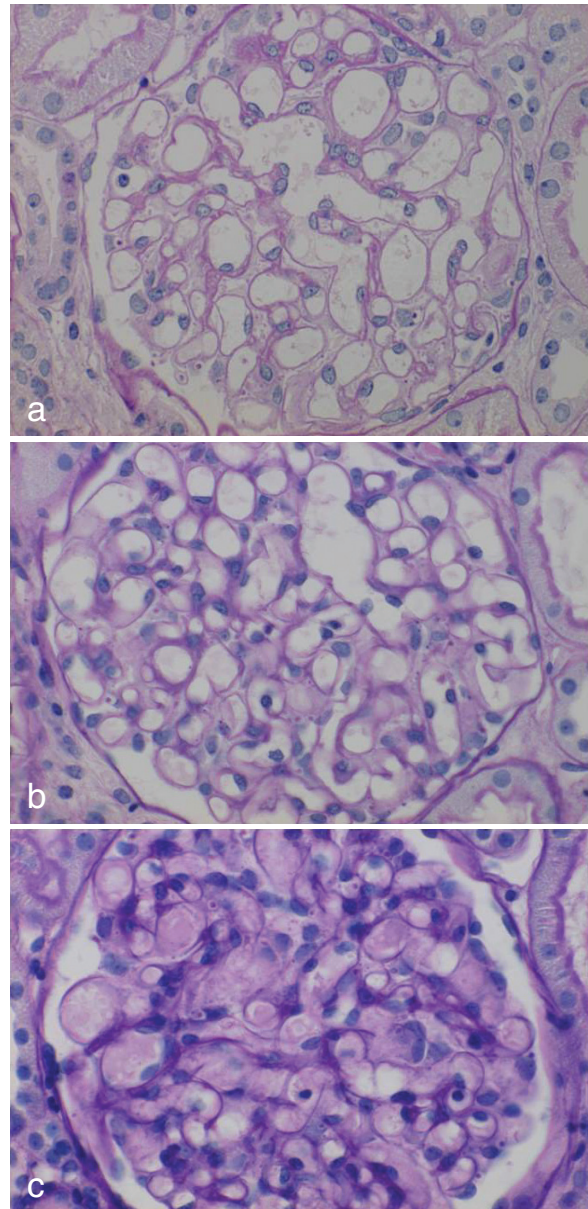


図2 切片の厚さにより糸球体は全く異なった印象の病変を示す。

a：適切に薄切された切片

腎生検診断に不可欠な、管内増殖やメサンギウム増殖病変の有無と程度、毛細血管腔の開き、基底膜肥厚、基質の状態、免疫沈着物の状態などを把握しやすい。

b：厚い切片

c：極めて厚い切片

めて診断に役立つ。こうした染色については熟練を要するため病理検査室との緊密な連携にて向上させることが重要である。PAM染色は、Jones染色を日本で改良したもので、腎生検組織診断にき

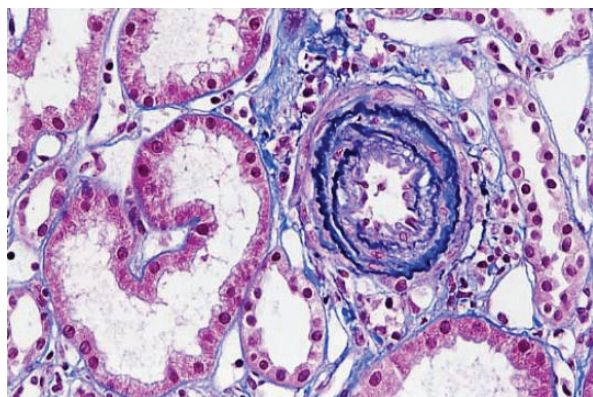


図3 Masson trichromeに弾性板染色を加えた elastica-Masson はきわめて診断に役立つ。

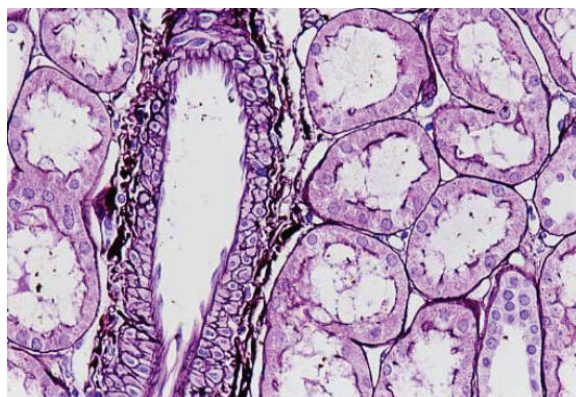


図4 PAM 染色

わめて有用な染色として日本では高く評価され、汎用されている。しかし、PAM染色の最適な染色状況を恒常的に維持することは難しい。PAM染色の染色条件を評価するには小葉間動脈から輸入細動脈の血管平滑筋細胞膜がきちんと連続して染色され、各々の細胞周囲にPAM陽性の籠目構造を示すことが良い指標になる(図4)。

腎生検診断には、何枚の切片が必要かも重要である。4種類の染色につき1枚で十分であろうか?腎病変は巣状に分布する疾患も多いため、切片数は多いほど正確な診断に繋がる確率は高くなる。しかし、採取した組織片をすべて染色することは無駄であるのみならず、特殊な検査を行う可能性を捨てることになる。移植腎病理診断の国際基準(Banff分類)では、7枚、HEとPASの各3枚とMassonの1枚を最低必要としている<sup>2)</sup>。切片数に関する標準はないが、4種類の染色あたり各2枚の計8切片は必要であろう。実際、腎移植の拒絶反応を診断する目的で、8切片とdeeper sectionを作成して32切片で比較したが、明らかに切片数の多い群で重要な拒絶反応所見を確認する機会が増えた<sup>4)</sup>。標本作成上も診断上も、手間と効率の問題はあるが、正確な診断からは切片数は多いほうが望ましい。

臨床情報と光顕所見が大きく解離することがある。特に、腎生検を複数回行った症例の腎生検において、きわめて強い間質線維化、尿細管萎縮、糸球体荒廃が目立ち臨床像と一致しないことがあ

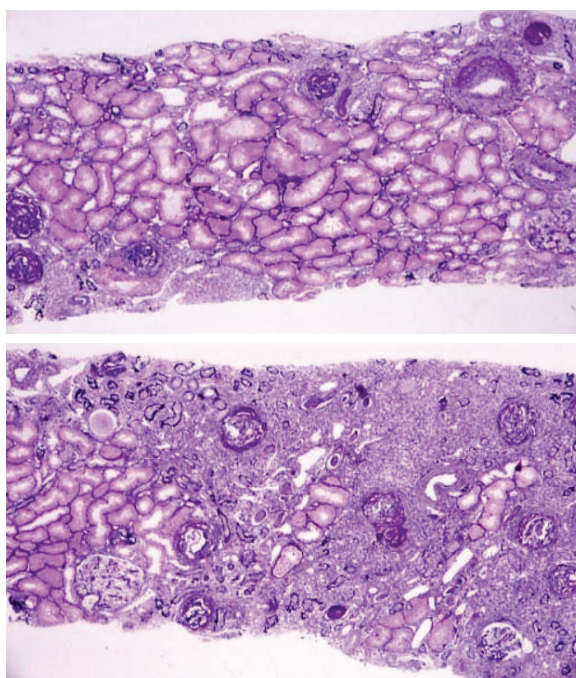


図5 同一症例でも違う組織片では全く異なった病変を示すこともある

る。また、複数の針生検を行った際に、各々の組織病変がまったく一致せず、びまん性腎疾患を前提とした腎生検に疑問をうけるほどのこともある。図5に示すように採取した2本の組織片では全く異なった病変を示すこともある。こうした際には、前回の腎生検時に生じた外傷性腎障害の組織所見であることなどを疑う必要がある。古い腎生検での外傷性傷害に特徴的な組織所見はなく、非特異的な荒廃像である。周辺組織病変とあまりに異質な荒廃所見や間質線維化が目立つ複数回で

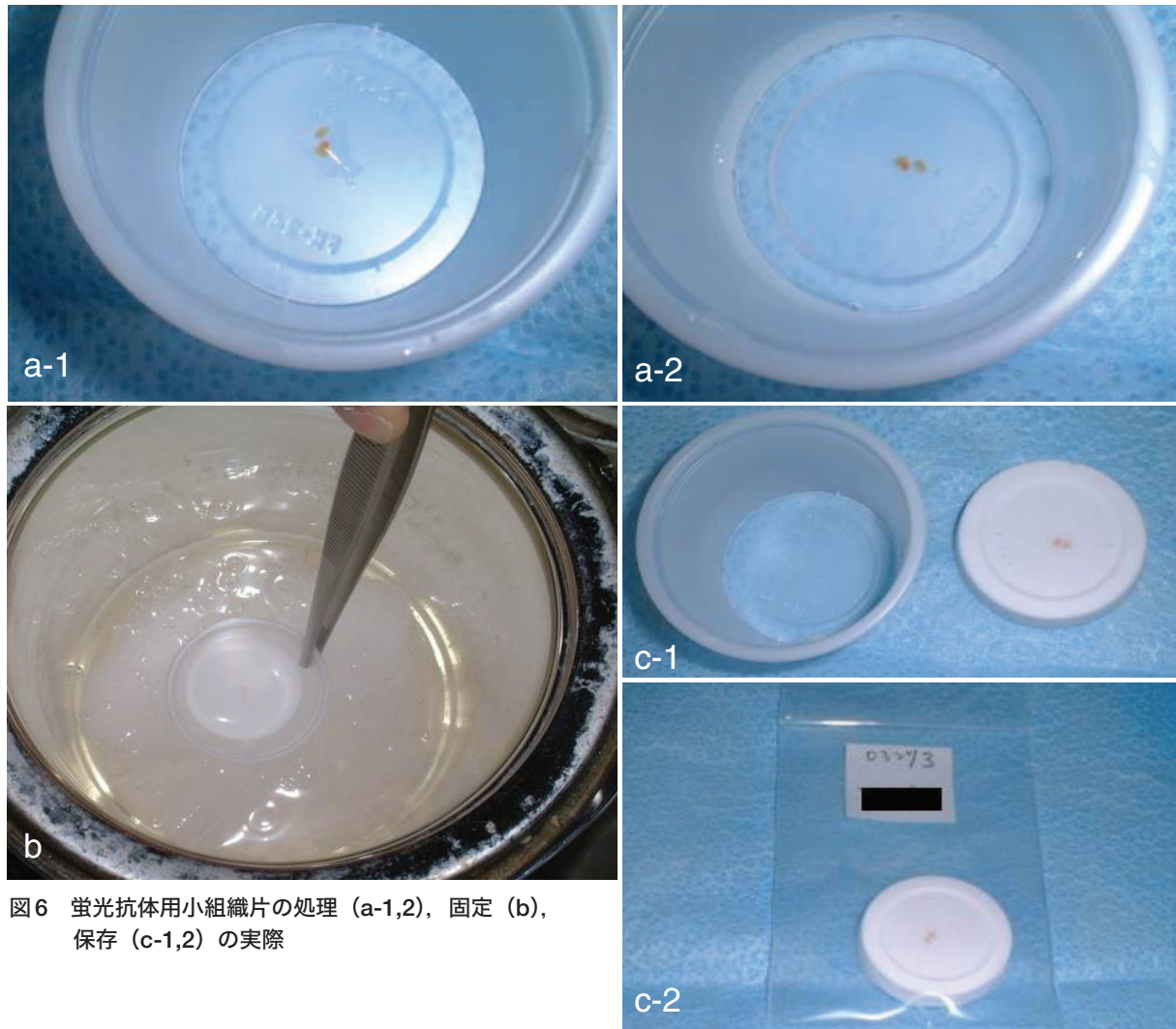


図6 蛍光抗体用小組織片の処理 (a-1,2), 固定 (b), 保存 (c-1,2) の実際

の腎生検では注意が必要である。腎生検前のエコー検査などにて生検予定部の腎表面に陥凹など気になる変化を観察した際には穿刺部位を変更するか対側腎での生検を考慮する必要がある。

## 5. 免疫組織化学診断

### 5-1. 蛍光抗体法

腎生検での免疫組織診断法の基本は蛍光抗体法である。診断精度の高さと再現性のよさ、検査の簡便性において蛍光抗体法に勝る方法はない。蛍光抗体法用組織は新鮮凍結切片を用いることで安定した結果を得ることができる。組織処理の段階で注意すべきことは、液体窒素でも、ドライアイスに有機溶媒（アルコール、アセトン、ヘキサン、イソペンタンなど）を使用する際でも、生検組織

が有機溶媒に直接触れないよう間接的に速やかに凍結させることである。われわれは、浅く平坦な底面を持つ薄いプラスチック容器を準備し、その中央にTissue-Tekを少量入れ、その中に組織片を置き、十分に親和させた後に、Tissue-Tekを加え、5mm程度の高さにする（図6a-1,2）。エタノール+ドライアイス液に直接触れないように気をつけ浸漬し（図6b）、Tissue-Tekを完全に凍結させた後に、プラスチック容器から組織片を含む凍結した円板状のTissue-Tekをはずし、乾燥しないよう密封できる袋に収めた（図6c-1,2）後はDeep freezer内の $-70^{\circ}\text{C}$ に保存し、早急に標本作成を行う。標本作成時、クリオスタットにて薄切した切片を未処理で蛍光抗体用スライドグラスに乗せることもあるが、氷アセトンにて固定する施設も

多い。腎生検組織診断で行われる蛍光抗体直接法での免疫グロブリンや補体を染色する方法は確立しているため問題はない。間接法（サンドウィッチ法）により検査を行う際には条件設定を十分に吟味する必要がある。蛍光顕微鏡にて観察しても退色のほとんどない封入剤を使用することで、繰り返し観察することができる。免疫組織化学検査は偽陰性となりやすいため、新しく開始する蛋白質・抗原などの染色に際しては、陽性コントロール組織が入手可能であれば同時染色を行うことが重要である。

表 2-a,b に免疫組織病理の解析法(表 2-a)と免疫病理検査が診断に不可欠な腎疾患と病態解析に有用な抗原(表 2-b)を示した。

### 5-2. 酵素抗体法

酵素抗体法はパラフィン切片を用いて行うため、光顕標本と所見を対比できる大きな利点がある。免疫沈着物に関する感度においては蛍光抗体法に劣るが、部位診断における優位性は捨てがたい。蛍光抗体用切片に観察したい糸球体がないときなど、酵素抗体により免疫病理検査を行うことができる。酵素抗体法の感度を上昇させるために多くの増感法が開発されている。従来は、PAP 法や ABC 法が用いられてきたが、近年は外科病理診断で用いられている感度の良い LSAB 法を使用することが多い。感度が良い反面、非特異的陽性像を呈することが多くなるため条件設定が重要となる。抗原賦活法として前述のマイクロウエーブやオートクレーブ法が優れた効果を示すようになり、酵素抗体による免疫病理診断は大きな力を持つようになった。生検材料は可溶性蛋白をある程度除去可能となるため、固定前に PBS にて洗浄することが望まれる。現在では、酵素抗体によりかなり詳細な免疫病理診断が可能となった。酵素抗体にて、免疫病理診断を行う際、留意すべきことは、免疫沈着に関し、granular と linear の区分別ができないことがあること、IgM や C1q に非特異的陽性が起きやすい、易熱性の補体の検出感度が低くなることである。蛍光抗体と酵素抗体を同一生検にて行い、両者の特徴を知っておくことも重要である。

表 2-a 免疫組織学的検査法

<b>基本染色法</b>
蛍光抗体法(=基本, 直接法, 間接法, 二重染色も可能)
酵素抗体法(光顕所見と対比可能, 二重染色も可能)
問題点: 沈着パターンの Granular/Linear の区別が難しい
IgM, C1q 非特異的陽性
補体の染色が不安定
偽陽性になりやすい
<b>特殊検査法</b>
免疫電顕
ISH
In situ PCR
FISH

表 2-b 免疫組織検査が診断確定に重要な腎疾患と病態解明に有用な抗原

<b>糸球体:</b>
免疫複合体型腎炎
抗基底膜抗体型腎炎
Pauci-immune 型腎炎
Alport 症候群(Type IV collagen $\alpha$ 2,-3,-4,-5)
Light chain, Fibronectin, amyloid A, $\alpha$ -SMA
<b>間質・尿管・その他</b>
HLA class II DR, ICAM-1,
CD4, CD8, CD20, CD68, UCHL-1, CD31,
Vimentin, THP, S100,
C4d, SV40, CMV, Osteopontin, MCP-1,
bcl-2,
PCNA, Ki-67, IK-6, TGF- $\beta$ , tenascin

さらに、酵素抗体法の延長上に免疫電顕は位置する。超微形態にて免疫学的評価する必要がある時、免疫電顕を行うことができるシステムを整備することが望ましい。酵素抗体法の検出感度を高くし、免疫電顕を行うには、固定液にも工夫が必要となる。PLP 固定液やパラホルム固定液が有用である。

### 5-3. 電子顕微鏡

電子顕微鏡所見がないと診断の確定できない腎疾患は多い。表 3 に、電子顕微鏡にて診断の確定する疾患を示す。しかし、電子顕微鏡観察までには、固定からエポキシ樹脂包埋までの過程、超薄切、染色、電子顕微鏡観察、写真撮影、現像と手間と熟練した技術が必要である。したがって多数の腎

生検を行う施設などを除くと自施設内で電子顕微鏡診断をできないことも多い。臨床検査の外注業者に電顕標本作製と診断を依頼すると、保険診療の電子顕微鏡診断点数の2倍以上費用がかさむ問題がある。しかし、電子顕微鏡情報なしでは診断できない腎臓病は多いため、積極的に電子顕微鏡観察を行うべきである。光顕所見、蛍光抗体所見より診断確定に電子顕微鏡観察がどの程度必要かを検討できる経験が重要である。

## 6. 特殊な腎生検組織診断と留意事項

腎臓のウイルス感染症診断では *in-situ* hybridization がきわめて有用である。CMV 以外にも多くのウイルス診断が可能である。最近では、腎生検組織を用いた分子病理診断も可能となってきた。腎生検組織上での m-RNA を RTPCR にて診断することもできるし、定量も可能となりつつある。腎生検にて採取された組織片から腎疾患を正確に診断し、病態を明らかにし、予後を予測し治療方針を決定することはきわめて重要なことである。

## 7. 腎生検と倫理について

現在の臨床医学において、個人情報の保護はきわめて重いものとして位置づけられている。

なかでも、遺伝子情報、DNA 情報の取り扱いには十二分な配慮が必要とされている。腎生検を受けた患者自身の承諾を得ないで、研究目的にその腎生検組織を利用することは、倫理上問題があるとされている。また、腎生検組織からは DNA 抽出も可能である。個人情報として DNA 情報は大切なものであり、本人の承諾なしに行うことは倫理的に許されない。

腎生検を用いた優れた臨床研究の結果、各種疾患の診断・治療に重要な情報が還元されてきた。今後も、腎生検材料を用いた研究より、腎疾患の成因・診断・治療に大きな福音となる成果が期待

表3 電子顕微鏡診断が診断確定に重要な腎疾患

糸球体上皮細胞病変：
MCNS, FGS, Fabry disease, monoclonal gammopathy(crystalloid)
糸球体基底膜病変：
各種糸球体腎炎, Alport 症候群, Thin BMD BMDDD, Nail-Patella syndrome, HUS/TTP など
免疫沈着, 細線維構造：
各種糸球体腎炎, Light chain deposition disease Amyloidosis, Collageno-fibrotic glomerulopathy, Cryoglobulin nephropathy, Immunotactoid glomerulopathy, Fibrillary glomerulopathy, LCAT nephropathy など
Myelin body, 結晶構造, その他：
Fabry disease, ゲンタマイシン腎症, ミトコンドリア脳筋症など

されている。

腎生検材料を使用した研究内容が、倫理上問題となる可能性のある際は、学内・院内倫理委員会での評価が必要である。これからは、腎生検と倫理についても配慮し、腎生検組織処理を行っていく必要がある。

## 文 献

- 1) 富野康日巳, IgA 腎症診療指針—第2版, 日本腎会誌 2002;44:487-493.
- 2) Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993;44:411-422.
- 3) 井藤久雄, 伊藤公訓, 安井 弥, 他. 移植腎病理組織診断における microwave 固定法の応用. *移植* 1991;26:246-252.
- 4) Morozumi K, Oikawa T, Fukuda M, et al. Recent progress and topics in the pathology of renal allograft ; new approaches to pathological diagnosis of rejection and the validation of international standardization of renal allograft pathology (Banff scheme). *Renal Allograft Pathology*. NIHON-IGAKUGAN. Edited by Takahashi K, Saito K. 1-18.1997