

特集：腎病理の進歩

## 腎病理診断における免疫染色の展開

上田 善彦

### はじめに

腎疾患の診断における免疫組織学的検索(主に蛍光抗体法)は、顕微鏡、電顕とともに必要不可欠なものであることは当然のごとく認知されている。腎疾患における免疫組織学的検索は、1960年代に FITC 標識抗体による検索が始まり飛躍的に進歩してきた。また、日本では木下康民先生によって1954年に腎生検が初めて行われて以来、剖検例ではなく、生検例において顕微鏡・蛍光・電顕による腎疾患の総合的な検索が可能となってきた。腎疾患には免疫学的形成機序を示す疾患が多く、本稿では、腎生検から診断までの過程で、免疫組織学的な検索が現在どのように日常診断に活用されているかを紹介し、また、ルーテイン以外に診断用としても使用されている抗体などについても併せて記載する。

### 顕微鏡特殊染色と免疫染色

顕微鏡の染色は免疫染色に比して簡便・安価であり、顕微鏡から免疫複合体などの所見が推測できるものもあり、顕微鏡の染色をきれいに施行することは診断過程の第一歩である。例えば periodic acid Schiff(PAS)染色では、正常検体では糸球体基底膜(GBM)、尿細管基底膜(TBM)、メサンギウム基質が陽性を示し、Tamm-Horsfall(T-H)蛋白も陽性として確認でき、Masson 染色では膠原線維を青染、蛋白を赤染するが、腎間質の線維化は青染として見られ、血管のフィブリノイド壊死や硝子化、糸球体内皮下のワイヤーループ病変などは赤染として認める。また、PAM 染色は GBM とメサンギウム基質を黒染するが、膜性腎症でスパイク形成(免疫複合体は陰性)を示すなど、いずれも免疫染色所見や電顕所見を顕微鏡から推測させる所見として認められる。ま

た、アミロイド染色では、Congo red 染色(または Direct fast scarlet 染色)は簡便な方法であり、免疫染色なしでも証明が可能となり、また、過マンガン酸カリ処理により2次性アミロイドーシスの鑑別が可能である。さらに、顕微鏡染色と免疫染色を重染色することにより、より多くの情報を得ることが可能となる(図1)。

### 免疫染色の材料と方法

#### 1. 凍結標本を用いた蛍光抗体法

最も一般的な方法である。FITC 標識による直接法が簡単であり、感度も良い。近年は蛍光色素の消褪しにくい封入剤も使用されており、また、共焦点レーザー顕微鏡やデジタルカメラの使用による撮影の短縮が可能になっている。染色法は誌面の関係で成書<sup>1)</sup>を参考願いたい。

#### 2. パラフィン切片を用いた方法

当初、蛍光抗体間接法が行われていたが、感度が弱く、1980年代より酵素抗体法が普及し始め、固定法(20%中性緩衝ホルマリンなど)の工夫や抗原の賦活化(抗体により酵素処理やマイクロウェーブなどを使用)(図2)を加えることなどにより凍結標本の結果に近づいている。当初は PAP 法<sup>2)</sup>や ABC 法であり、近年は LSAB 法となり、現在はポリマー法<sup>3)</sup>をわれわれは使用している<sup>4)</sup>。

#### 3. 質の高い標本の作製

重要な点は、標本の質である。凍結法(液体窒素の使用やアルコール・アセトン使用など)、凍結に要した時間、抗体の質(特異性の高い)、抗体の倍率(希釈系列による濃度の決定)などを検討し、非特異蛍光のない質の高い標本作製が基本である。質の悪い標本は診断にはマイナスでさえある(図3)。

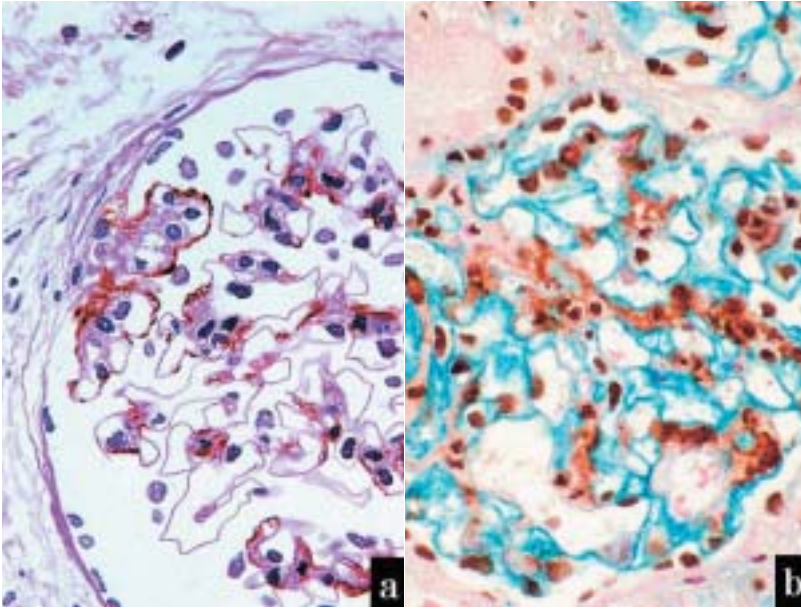


図 1 IgA 腎症における免疫染色と特殊染色の重染

- a : PAS 染色により、メサンギウムと IgA 沈着の部位が明瞭となる。(IgA 免疫染色+PAS 染色)
- b : メサンギウムに IgA 沈着を認め、コロイド鉄染色陽性により荷電保持が確認された。(IgA 免疫染色+コロイド鉄染色)

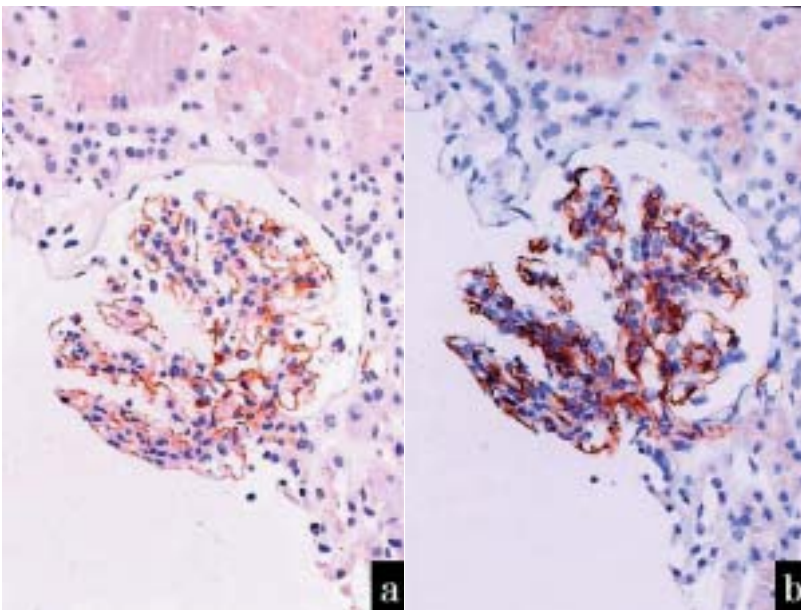


図 2 抗原の賦活化(IgA 腎症)

- マイクロウエーブなし(a)に比して、マイクロウエーブを加える(b)とより抗原の賦活化を得ることが可能となる。

### 免疫染色の判定

教科書的であり、生検診断を行っている方にはお馴染みであるが、判定法を以下に示す。

標本の質も重要であるが、誤判定により診断の方向性が違ってくるため、正確に判定することも大変重要である。陽性の程度(強さ)は、5段階とするテキストもあるが、腎病理学会では(-), (+/-), (+), (++)の4段階を基本としている。

#### 1. 染色の様式

- a. 顆粒状：疎密・大小顆粒状沈着を示す(図 3b)
- b. 線状：GBM を中心に線状沈着を示す(図 3c)

#### 2. 分布

- a. びまん性ないし巣状：全体の 80%(ループス腎炎では 50%)を超えるか否か。
- b. 全節性ないし分節性：個々の糸球体の 2/3 係蹄以上(ループス腎炎では 50%)を超えるか否か。

#### 3. 部位

- a. Peripheral (GBM) pattern：糸球体毛細管係蹄に沈着

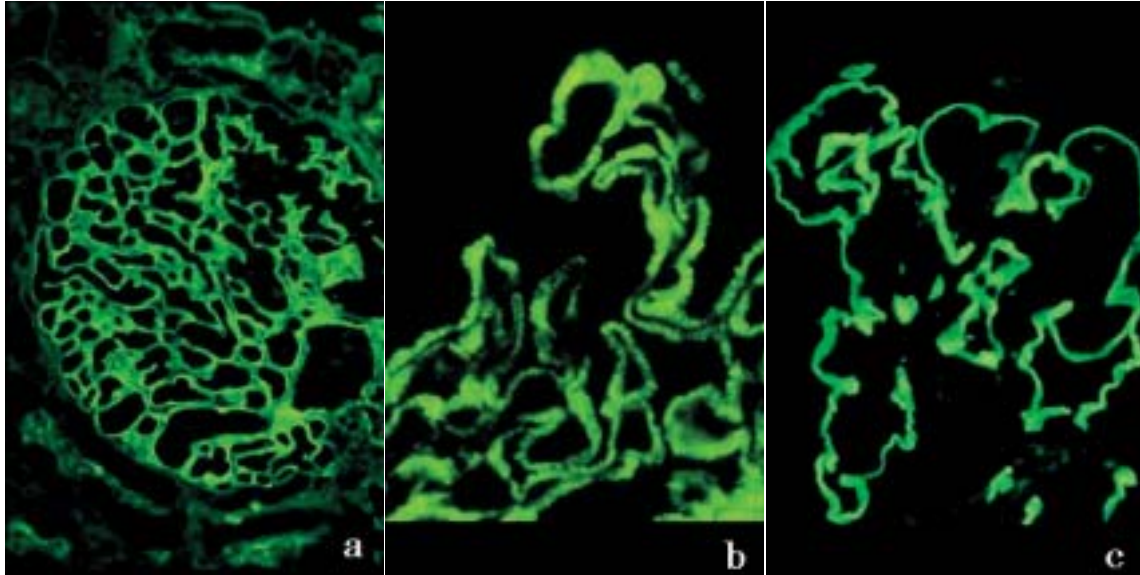


図 3 免

- a : 不良検体。凍結状態が悪く、陽性的のように見えるが、判定困難な例
- b : GBM に顆粒状陽性を示す。(ループス腎炎V型, 抗 IgG 染色)
- c : GBM に線状に陽性を示す。(抗基底膜抗体型腎炎, 抗 IgG 染色)

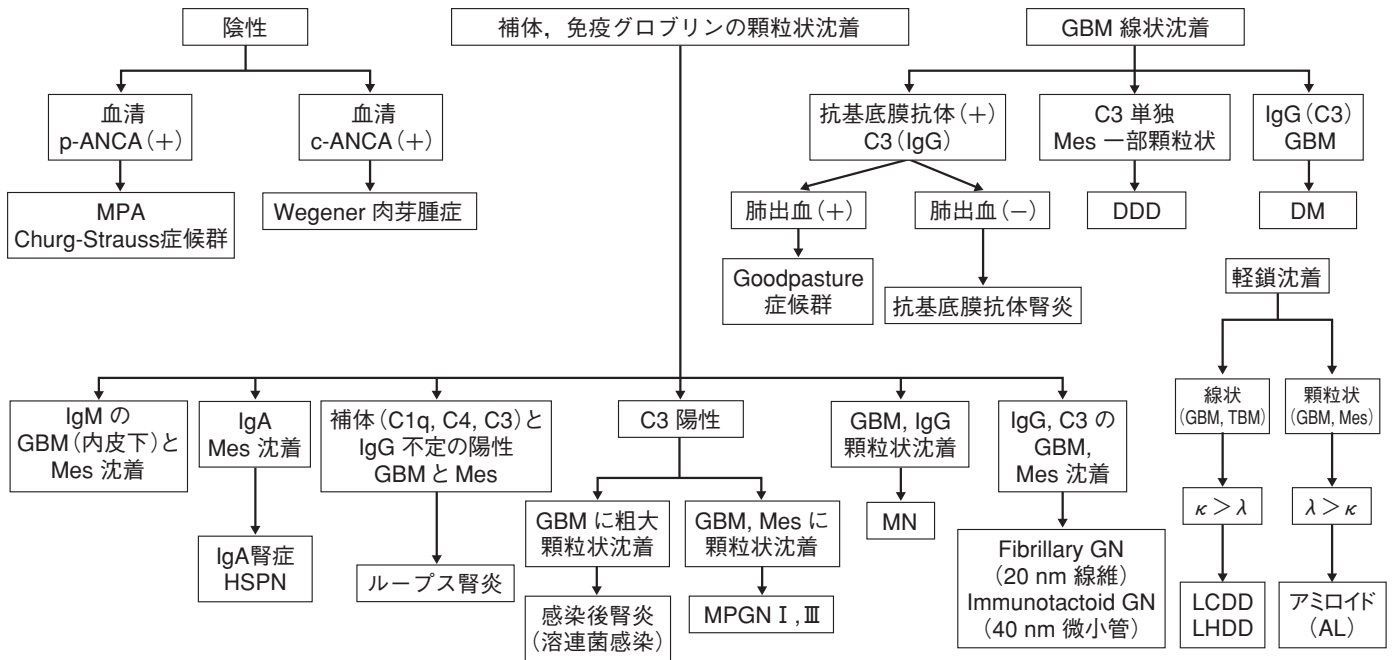


図 4 免疫染色の沈着様式による鑑別

Mes : メサンギウム, GBM : 糸球体基底膜, TBM : 尿細管基底膜, DDD : dense deposit disease, DM : 糖尿病, LCDD : 軽鎖沈着症, LHDD : 軽鎖重鎖沈着症, HSPN : Henoch-Schönlein 紫斑病性腎炎, MN : 膜性腎症, MPGN : 膜性増殖性糸球体腎炎

を示すもの

ウム領域の両方に沈着を示すもの

b. メサンギウム pattern : メサンギウム領域に沈着を示すもの

c. Peripheral & メサンギウム pattern : GBM とメサンギ

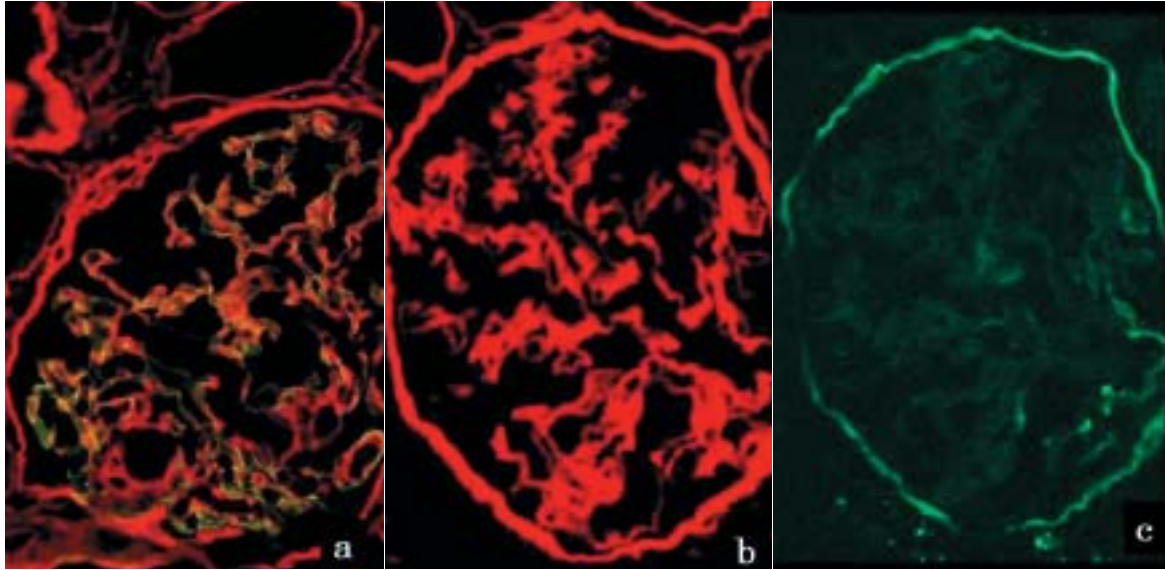


図 5 糸球体内コラーゲンの免疫染色

- a : IV型コラーゲン  $\alpha 2$  鎖と  $\alpha 5$  鎖の二重染色。正常な例 ( $\alpha 2$  : Texas-red 標識,  $\alpha 5$  : FITC 標識)  
 b :  $\alpha 2$  陽性(アルポート症候群例)  
 c :  $\alpha 5$  陰性(アルポート症候群)

表 免疫染色に使用できる有用抗体

### 1. 糸球体

上皮細胞(足突起) : synaptopodin, WT-1, CD10  
 上皮細胞(ポウマン嚢) : Leu7, サイトケラチン(CK)8, 18  
 糸球体基底膜 : IV型コラーゲン  
 内皮細胞 : CD31, CD34, VIII因子, endothelin, など  
 メサンギウム細胞 : Thy 1.1  
 成長因子 : 血小板由来成長因子(PDGF), 上皮増殖因子(EGF), インスリン様増殖因子(IGF), 組織成長因子(TGF- $\beta$ ), など  
 形質転換(メサンギウム細胞) :  $\alpha$ -SMA  
 サイトカイン : TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, など

### 2. 間質・尿細管

細胞浸潤 : CD20, 79 $\alpha$ (B-cell), CD3, 4, 8(T-cell), CD68 (macrophage), CD56(NK cell)  
 近位尿細管 : CD15(LeuM1), CD10, CK7, CD15, レクチン(PHA-E, など)  
 遠位尿細管 : EMA, T-H 蛋白, レクチン(PNA, など)  
 横紋筋構成蛋白 : ミオグロビン  
 サイトカイン : osteopontin, monocyte chemoattractant 蛋白(MCP-1), TNF- $\alpha$ , など

### 3. その他

ポリオーマウイルス : SV40  
 EB ウイルス : LMP-1  
 アミロイドーシス : Amyloid A, P  
 アポトーシス : bcl-2  
 細胞増殖 : proliferating cell nuclear antigen(PCNA)  
 線維化の指標 : HSP47(colligin), tenascin, TGF- $\beta$  など  
 尿路上皮 : 34 $\beta$ E12

### 日常の腎生検診断で使用される抗体

免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM), 補体(C1q, C3c, C3d, C4, とときに C4d)と fibrinogen が一般的である。免疫グロブリンと補体の沈着部位と様式からの鑑別を図 4 に示す。

また、管内病変や泡沫細胞を認める際には CD68, 軽鎖沈着症(LCDD)などが考えられる際には軽鎖( $\kappa$ ,  $\lambda$ ), 急性液性拒絶移植腎では C4d などの染色を適宜行う。さらに診断に役に立つ抗体(表)としては、逆流性腎症での抗 T-H 蛋白, 移植後リンパ増殖性疾患(posttransplant lympho-proliferative disorder : PTL)の際には, 抗 CD3(T-cell), 抗 CD20(B-cell), EBER-1(PTLD, EB ウイルス感染)などが有用である。また, ポリオーマウイルス感染では抗 SV40 の染色が有効であり, アミロイドーシスでは, 抗アミロイド A(AA 型アミロイド)や抗アミロイド P などが有効である。また, 以前は電顕で GBM の網状変化や層状化, 不規則な肥厚や菲薄化を示し, 純形態的な診断は困難であったアルポート症候群も, IV型コラーゲン  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  の染色により陰性ないしモザイク判定の際には遺伝子検索なしで診断が可能となる(図 5)<sup>5~7)</sup>。その他, 腎疾患ヒト病変の診断に有用な抗体を表に示した。

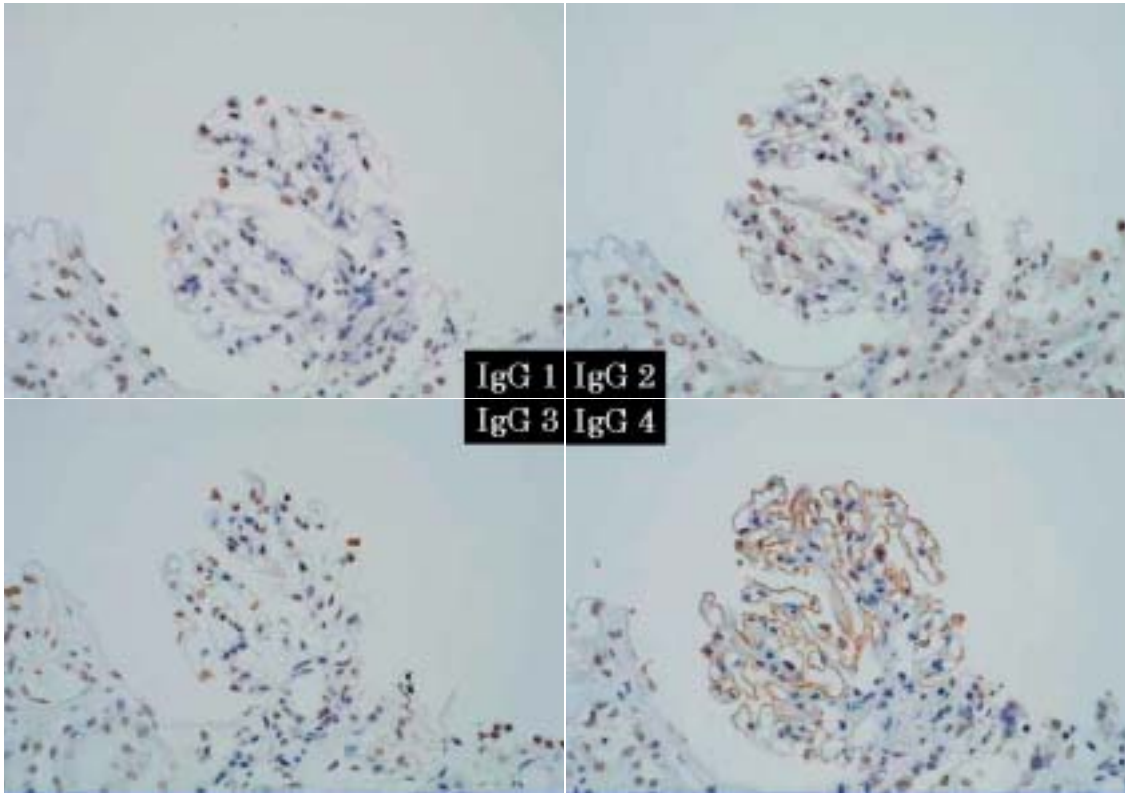


図 6 IgG サブクラス染色  
特発性膜性腎炎の例で、IgG 4 のみ GBM に陽性を示す(パラフィン切片，酵素抗体法)。

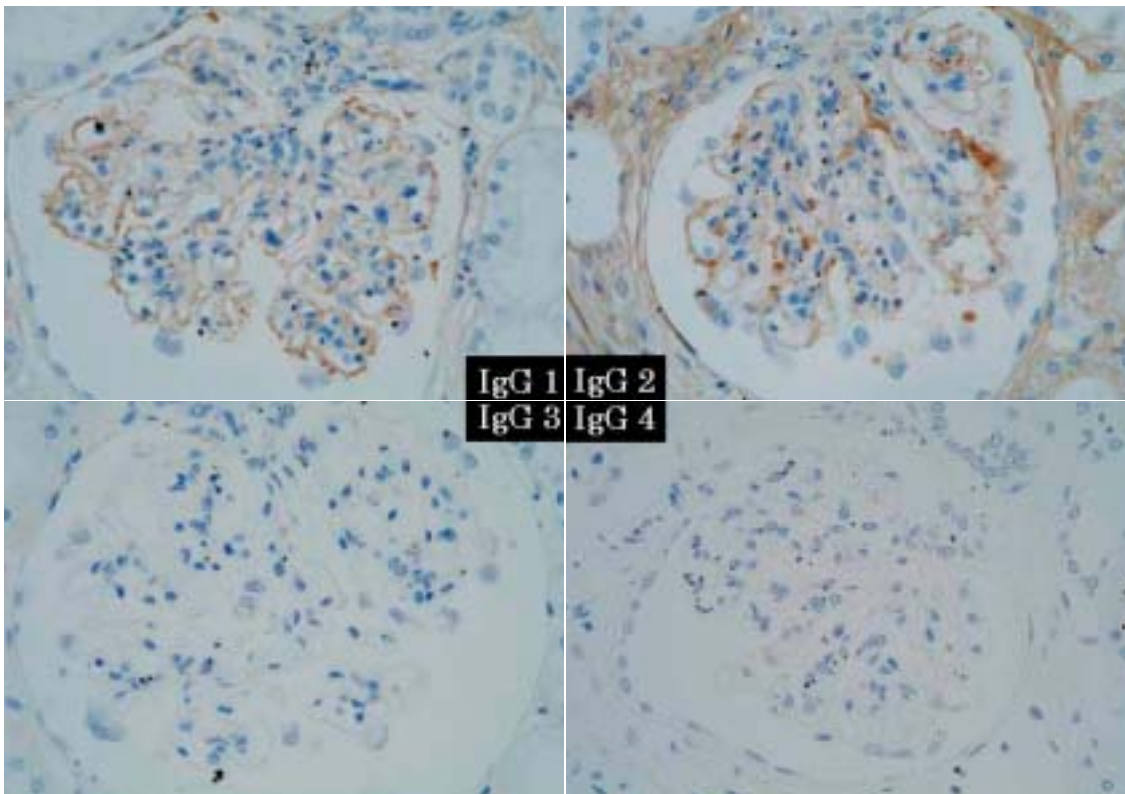


図 7 IgG サブクラス染色  
癌関連膜性腎炎の例で IgG 1, IgG 2 が GBM を中心に顆粒状に陽性を示す(パラフィン切片，酵素抗体法)。

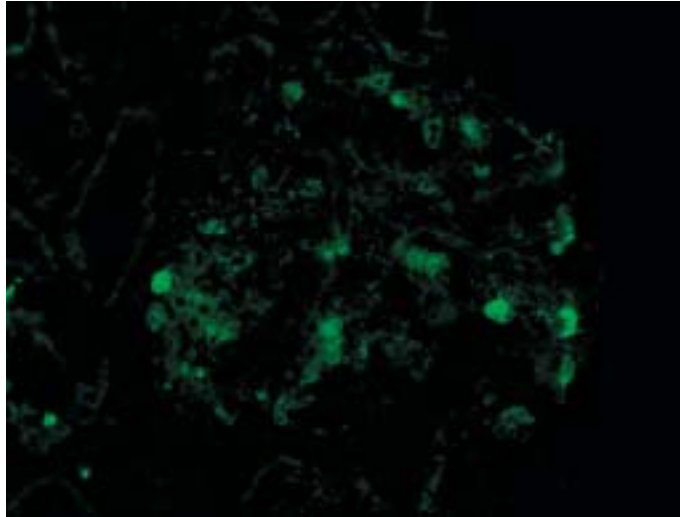


図 8 NAP1r 染色

メサンギウム、浸潤細胞と一部係蹄に NAP1r の陽性像を認める。  
(防衛医科大学 尾田高志先生提供)

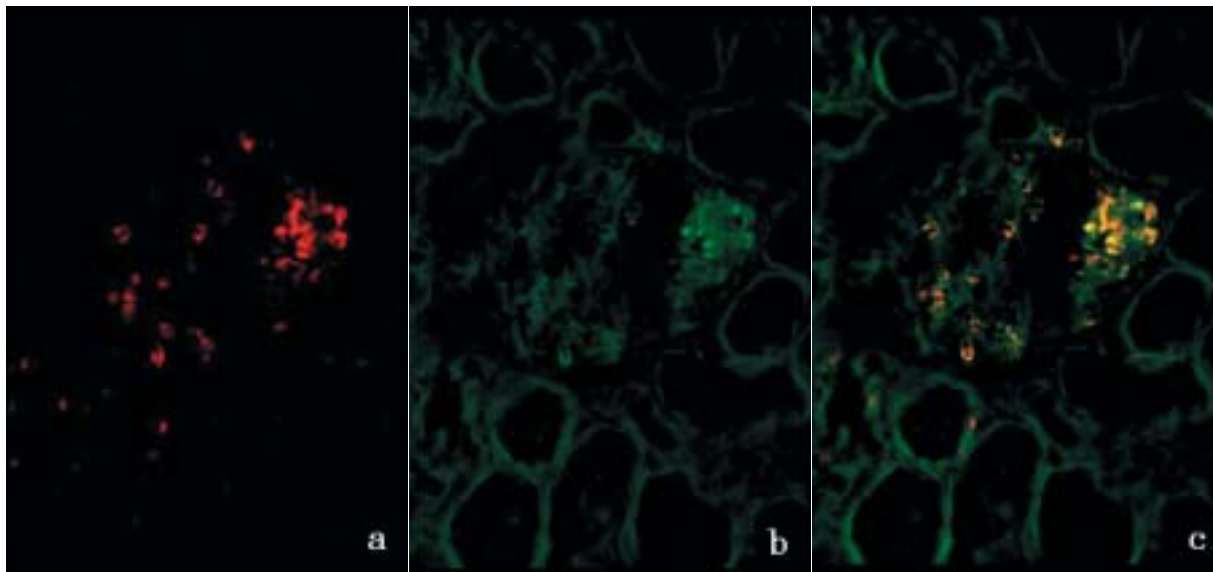


図 9 NAP1r と SPEB の染色

a : NAP1r (Alexa Fluor 594 標識) の陽性像, b : SPEB (FITC) の陽性像, c : 二重染色により陽性部位がほぼ一致していることを示す。  
(防衛医科大学 尾田高志先生提供, 文献 12 参照)

## 注目の抗体

### 1. IgG サブクラス染色 (図 6, 7)

近年、膜性腎炎における特発性と 2 次性の鑑別に IgG サブクラスが用いられるようになり<sup>8,9)</sup>、診断の一助として臨床での治療に反映されている。IgG サブクラスに関する論文では、凍結切片を用いた蛍光抗体法によるものが多く、(±)判定が目立ち必ずしも確立されてはいない。パラフィ

ン標本を用いた酵素抗体法は蛍光抗体法に比較して若干感度は低いですが、精度の高い標本では(±)の判定が少なく、陽性・陰性の判定が比較的容易であり、十分鑑別が可能で、診断には有効と筆者は考えている。特発性膜性腎炎では IgG 4 (≫ IgG 1)、肝炎関連腎症 (HCV, HBV) では IgG 2、ループス腎炎 V (IV) 型は IgG 2 > IgG 3、慢性関節リウマチ (薬剤性) は IgG 2、癌関連は IgG 1, IgG 2 という結果がみられ、特発性膜性腎炎と 2 次性膜性腎炎は比較的鑑別可能と考

える。

また、IgG 4 関連硬化性疾患として、自己免疫性膵炎、唾液腺炎やリンパ節炎などととも注目されている IgG 4 関連腎症では、高 IgG 血症と IgG 4 高値を特徴とし、組織学的には間質の種々の程度の線維化と間質内に形質細胞、リンパ球、好酸球浸潤を示し、IgG 4 陽性形質細胞を多数認める。本疾患の詳細は本特集の山口裕先生の総説を参照願いたい。

## 2. NAP1r および SPEB 染色

急性糸球体腎炎は、先行感染として連鎖球菌、肺炎球菌、ブドウ球菌など多彩な原因菌が報告されているが、やはり大多数は、A 群溶連菌であるのは周知の事実である。溶連菌感染による急性糸球体腎炎は、腎生検で hump などの特徴的所見を認めるものもあるが、実際に溶連菌感染の確認は得られないことが多々みられる。近年、腎炎惹起性抗原として吉澤らが溶連菌菌体内成分から溶連菌感染後急性糸球体腎炎 (APSGN) 患者 IgG と反応性の強い分画として抽出・精製した nephritis-associated plasmin receptor (NAP1r)<sup>10,11)</sup> と溶連菌の菌体外抗原である streptococcal pyrogenic exotoxin B (SPEB) の 2 つが注目されており、溶連菌感染後症例では NAP1r 陽性 (図 8) を示し、両者は二重染色でほぼ一致した分布を示しており (図 9)<sup>12)</sup>、NAP1r と SPEB は plasmin 結合能を有し、両者と plasmin の複合体形成による腎炎発症機序の可能性が高く、溶連菌感染 (APSGN) を証明する有用な検査と言える。現在は蛍光抗体直接法による検査のみであるが、パラフィン切片による検査が可能になることが望まれている。

## 3. 抗 C4d 抗体染色

2001 年の Banff 会議にて抗体関連型拒絶反応の診断基準のなかに、傍尿細管毛細血管 (peritubular capillary : PTC) への C4d のびまん性沈着が示され、抗体関連型拒絶反応の診断には必要不可欠なものであり、現在ではすべての移植腎生検に C4d 染色をすべきとされている。正常腎において C4d はメサンギウムと血管極に認められることが多く、通常は PTC に陽性は認めない。

ABO 血液不適合腎移植では、抗体関連型拒絶反応以外での C4d 陽性も多くみられ、病態の正確な判断が重要となる<sup>13)</sup>。

やはり質の高い標本作製の維持が最も重要な点と考える。

また、遺伝子検索などの進歩により、より精度の高い染色法や診断に有用な抗体が今後ますます簡便に利用されることが期待される。

## 文 献

1. 上田善彦. 腎生検病理診断標準化への指針. 日本腎臓学会・腎病理標準化委員会編. 東京: 東京医学社, 2005: 107-115.
2. 上田善彦, 石飛文雄, 前田順子. 糸球体基底膜およびメサンギウムの病理形態学的研究—PAP 法を中心として—. 日腎会誌 1985; 27: 393-408.
3. 川井健司, 芹澤昭彦, 堤 寛, 長村義之. 病理と臨床(臨時増刊号)2000; 18: 38-43.
4. 小川弥生, 上田善彦. 腎生検病理診断標準化への指針. 日本腎臓学会・腎病理標準化委員会編. 第 2 版. 東京: 東京医学社 (in press).
5. Kagawa M, Kishiro Y, Naito I, Nemoto T, Nakanishi H, Nini-miya Y, Sado Y. Epitope-defined monoclonal antibodies against type-IV collagen for diagnosis of Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1238-1241.
6. 内藤一郎, 佐渡義一. アルポート症候群研究用モノクローナル抗体を用いたアルポート症候群の免疫組織診断. 腎臓病の最新医療. 先端医療シリーズ 13・腎臓病, 東京: 先端医療技術研究所, 2001: 315-316.
7. 佐渡義一. 皮膚生検と腎生検の IV 型コラーゲン染色でどこまでアルポート症候群は診断できるか. 重井医学年報. 2004; 1-11.
8. Haas M. IgG subclass deposits in glomeruli of lupus and non-lupus membranous nephropathies. *Am J Kidney Dis* 1994; 23: 358-364.
9. 今井裕一, 三浦直人. 膜性腎症. 腎臓病診断と治療の最前線. 東京: 先端医療技術研究所. 2005: 104-107.
10. Yoshizawa N, Yamakami K, Fujino M, Oda T, Tamura T, Matsumoto K, Sugisaki T, Boyle MDP. Nephritis-associated plasmin receptor and acute poststreptococcal glomerulonephritis: Characterization of the antigen and associated immune response. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1785-1793.
11. Oda T, Yamakami K, Omasu F, Suzuki S, Miura S, Suzuki T, Yoshizawa N. Glomerular plasmin-like activity in relation to nephritis-associated plasmin receptor in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 247-254.
12. Rodrigues-Iturbe B, Musser JM. The current state of poststreptococcal glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1855-1864.
13. 堀家敬司, 及川 理, 両角國男. C4d 移植腎臨床病理アトラス. 東京: 東京医学社, 2005: 62-72.

## おわりに

免疫染色は、腎生検診断には必要不可欠なものであるが、