

腎生検の病理診断は光学顕微鏡（光顕）、蛍光抗体法（蛍光）、電子顕微鏡（電顕）の3つからなり、正しく所見をとるうえで適切に作製された標本が必須であることは論を俟たない。標本作製の詳細は他書に譲り、本項では光顕、蛍光、電顕の標本、所見を正しく評価するうえで筆者が日頃より意識している点や背景となる考え方を、特に染色法の観点から重点的に述べ、優れた腎生検標本を理解する一助となることを期待する。

a. 光顕染色

1) 標本の厚さ

糸球体はメサンギウム領域を軸として、その周囲を取り巻く毛細血管が複雑に入り組んだ構造をとっている。少し標本が厚いだけであたかも細胞成分が増殖しているかのような印象を受け、糸球体構築の把握が難しく感じられる。後述する各染色も標本の厚さと密に関連し、切片が厚くなるにつれて色調も濃くなり、診断に一層の困難を覚える。標本が適切な薄さで作製されている一つの目安として、糸球体毛細血管基底膜が細い1本の線としてみえていれば理想的である（図1）。厚い標本では早期膜性腎症の微細な spike などの細かい所見は“力負け”してしまい、所見がとりづらくなる。腎生検検体とともに一緒に採れてきた筋や皮膚があるとミクロトームの刃の軌道が微妙に狂い、薄い標本の作製に支障をきたすことがある。



図1 適切な薄さの標本（PAM 染色）
糸球体基底膜は1本の線としてみえ、尿細管基底膜の最も薄い部分とほぼ同程度の厚さである（×400）。

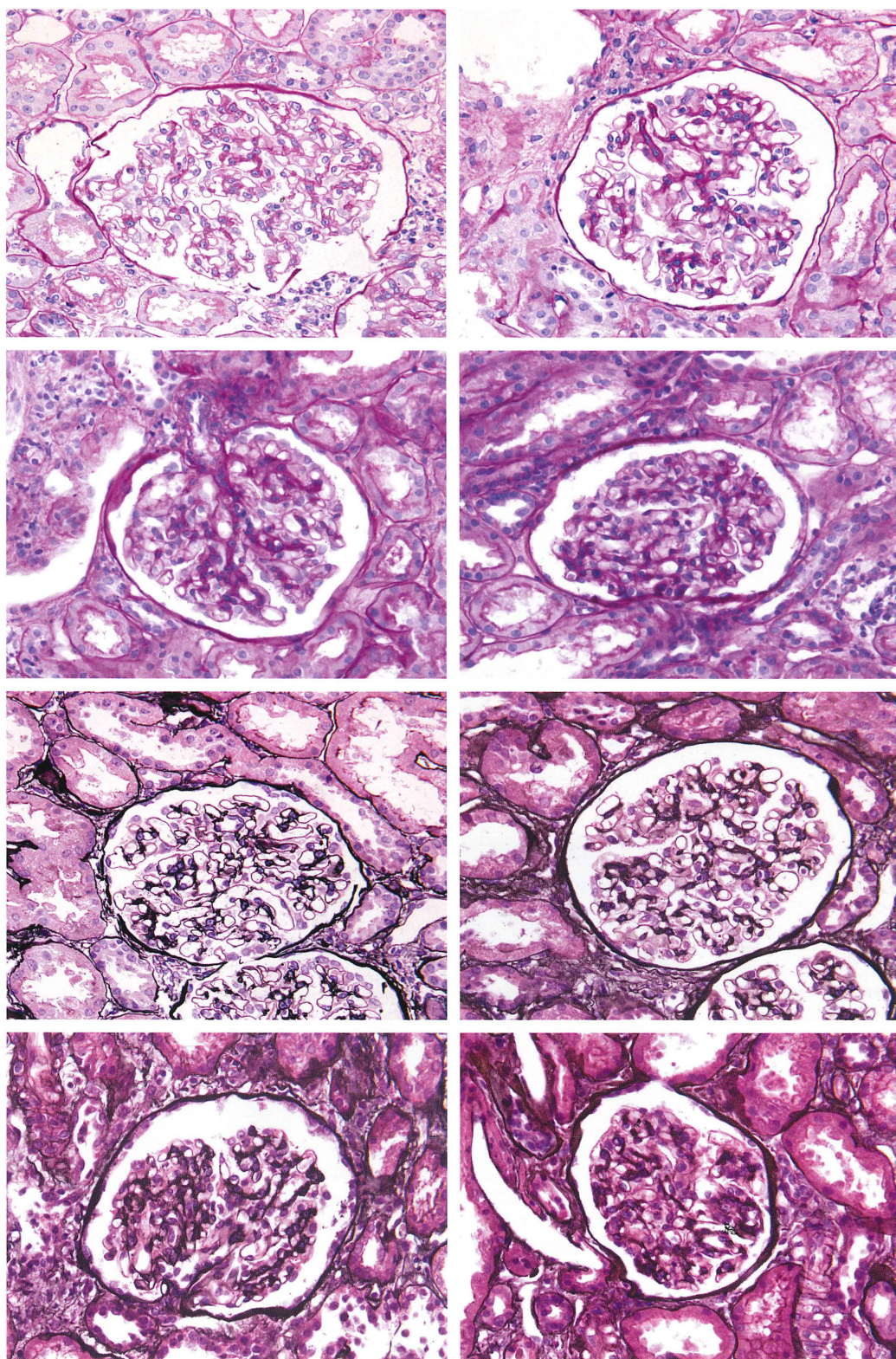


図2 PAS 染色と PAM 染色の厚さ別の標本

PAS 染色 1 段目左：1 μ m, 1 段目右：2 μ m, 2 段目左：3 μ m, 2 段目右：4 μ m ($\times 400$)

PAM 染色 3 段目左：1 μ m, 3 段目右：2 μ m, 4 段目左：3 μ m, 4 段目右：4 μ m ($\times 400$)

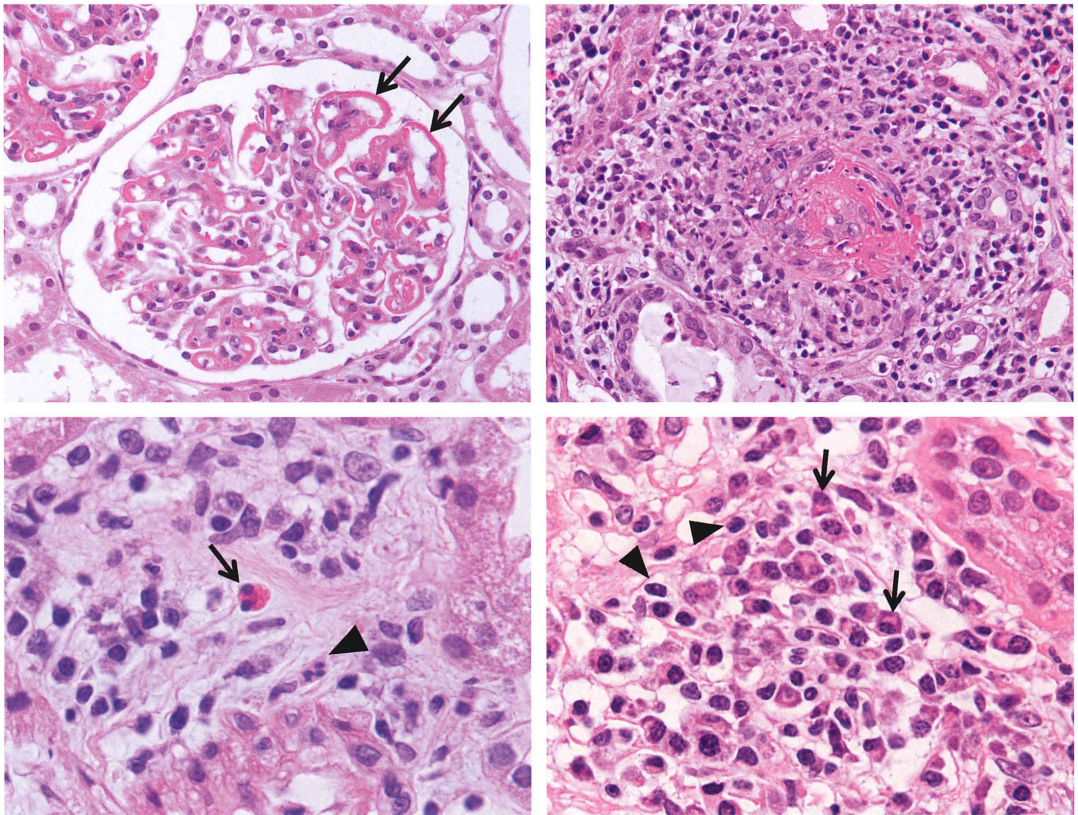


図3 HE染色

上段左：ループス腎炎の wire loop lesion. 糸球体基底膜は肥厚した赤い線としてみえる（矢印）（ $\times 400$ ）。

上段右：ANCA 関連血管炎のフィブリノイド壊死。中央部分に血管があり、フィブリン形成（赤色）と周囲に広がる多数の炎症細胞浸潤を認める（ $\times 400$ ）。

下段左：好酸球（矢印）と好中球（矢頭）。好酸球は鮮やかな赤い顆粒が豊富であるが、好中球の細胞質は淡い染色性である（ $\times 1,000$ ）。

下段右：形質細胞（矢印）とリンパ球（矢頭）。形質細胞は偏在する核を有し、核周囲は明るくみえる（ $\times 1,000$ ）。

同一腎生検検体を 1, 2, 3, 4 μm の厚さで薄切、標本作製し糸球体を観察すると、1 μm 厚で十分に薄い検体であり、糸球体を詳細に観察できる（図2）。2 μm では斜めに切れた基底膜が一部で出現し始めているが、まだ評価可能な範囲内といえる。3 μm および 4 μm ではメサンギウム領域や血管壁、細胞の核が積み重なることにより、糸球体構造の詳細な観察は困難である。

PAS 染色、PAM 染色いずれでも切片が厚くなるに従い色調も濃くなるため、さまざまな細胞、間質成分が積み重なって見えることに加えて、濃い染色性もみづらさの要因と考えられる。

2) 染色法

i) HE 染色

すべての組織で基本となる染色であり、腎生検においても糸球体、尿管、間質、血管のそれぞれについて病変の概略を把握するのに役立つ。核は青紫色、細胞質ならびに細胞外基質は淡赤色に染め出され、多量の免疫複合体（例：ループス腎炎の wire loop lesion）、フィブリン、赤血球は鮮やかな赤色としてみえる（図3：上段左・右）。炎症細胞の種類を判別するのもに適しており、核形態像、顆粒の有無や細胞質の色調が鑑別点となる（図3：下段左・右）。

難点は細胞と細胞外基質をみわけるのが難しい点であり、これを補うために後述するその他の染色で詳細に観察する。

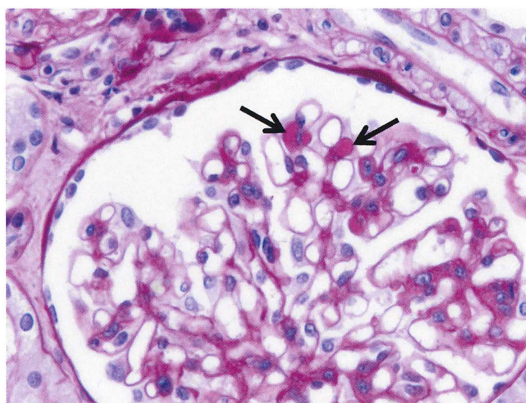


図 4 PAS 染色

メサンギウム領域に接する PAS 好性の免疫複合体 (矢印) (×400)。

ii) PAS 染色

組織中の多糖類に反応して赤紫色に染色する。基底膜や糸球体メサンギウム基質は糖蛋白質を含む多くの多糖類に富むため明瞭に染め出され、糸球体構成細胞の位置関係を容易に把握できる。メサンギウム細胞の増殖やメサンギウム基質の増加、管内細胞増多の程度、癒着や上皮細胞増殖の有無など多彩な糸球体病変の観察に優れる (図 2: 1 段目左)。IgA 腎症やループス腎炎などでは免疫複合体が PAS 好性物質としてしばしば認識でき、たとえばメサンギウム領域近傍にあるものは半球状物質として確認できる (図 4)。

一方、PAS 染色で観察が難しいものもいくつかあり、小石灰化は HE 染色、赤血球円柱は HE 染色や Masson-Trichrome 染色のほうが優れる。

iii) PAM 染色

通常、後染色として HE 染色を行うことが多く、正式には PASM-HE (periodic acid silver methenamin-HE) 染色と呼ばれる。HE 染色で得られる情報に加え、銀染色により基底膜、膠原線維が黒～黒褐色で染色される。過固定検体では銀染色がやや不良で褐色となる。

spike 形成 (膜性腎症) や糸球体基底膜二重化 (膜性増殖性腎炎)、糸球体基底膜の多層化 (Alport 症候群)、細網線維増生 (間質の線維化)、基底膜断裂部分でのフィブリノイド壊死など、基底膜あるいは膠原線維の関与した病変の観察に特に威力を発揮する (図 5: 上段左・右, 中段左)。糸球体と尿細管の基底膜はほぼ同程度の厚さであり、両者を比較することで糸球体基底膜の菲薄化を予測することもある程度可能である (図 5: 中段右, 下段)。

iv) Masson-Trichrome 染色

免疫複合体やミトコンドリア、赤血球、フィブリンは赤染され、膠原線維や基底膜は青く染色される。アニリン青色素の代わりにライトグリーン色素を使用すると (本書では“変法”と記載)、基底膜を含む結合組織成分は淡緑色に染まる。間質線維化の評価に加え、免疫複合体やフィブリノイド壊死の有無の把握などに有用である (図 6: 上段左・右)。次項で解説する Elastica 染色と組み合わせて Elastica Masson-Trichrome (EMT) 染色として使われることも多い。

myeloma cast は PAS 染色性に乏しいが Masson-Trichrome 染色では鮮やかな赤に染まり、容易に確認できる (図 6: 下段左)。ミトコンドリア異常症では腫大した異常ミトコンドリアが蓄積し、特に髓質集合管で赤く腫大した上皮細胞として容易に認識でき (granular swollen epithelial cell), 診断上有用な所見である ¹⁾ (図 6: 下段右)。

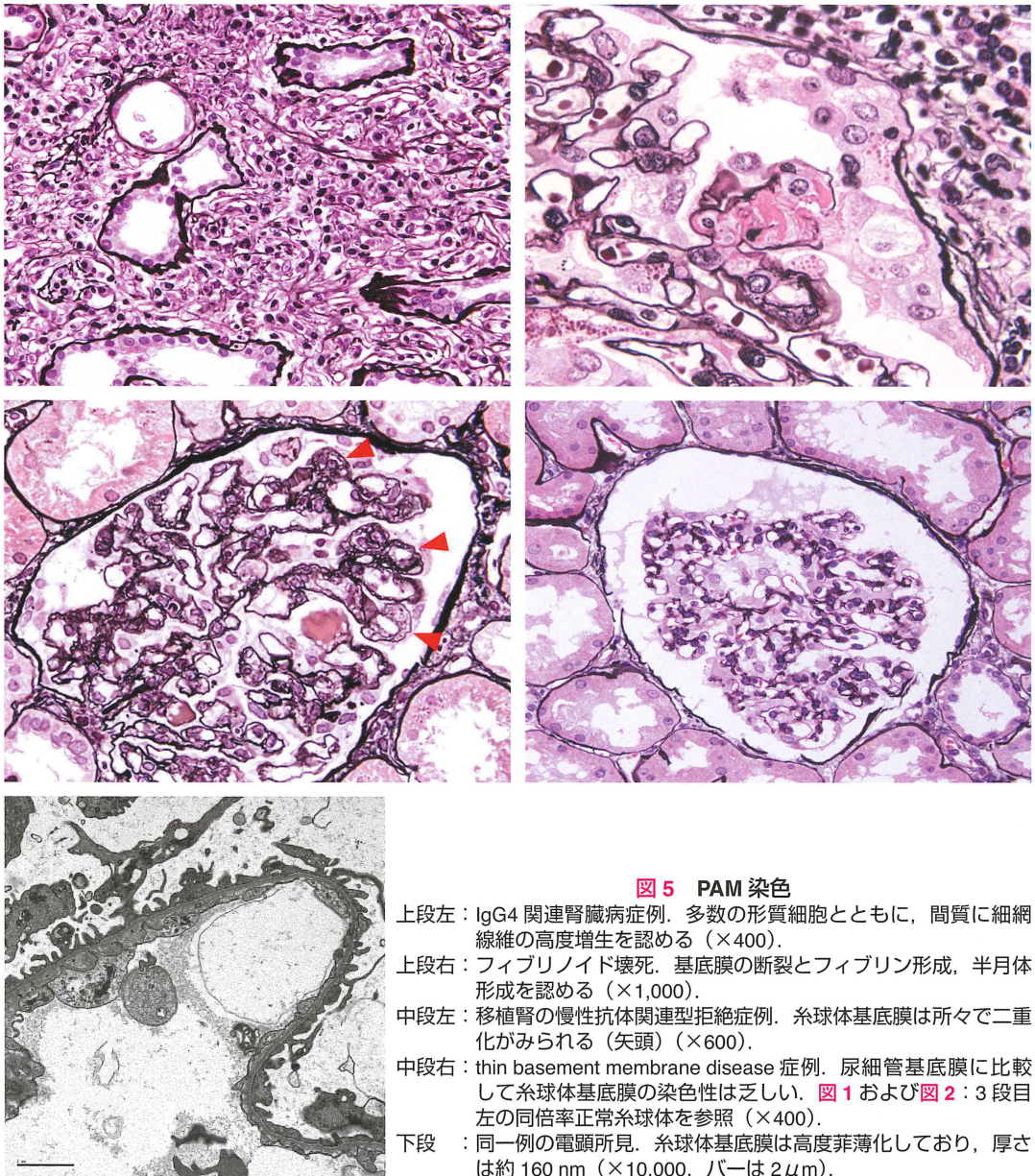


図5 PAM 染色

- 上段左：IgG4 関連腎臓病病例。多数の形質細胞とともに、間質に細網線維の高度増生を認める（ $\times 400$ ）。
- 上段右：フィブリノイド壊死。基底膜の断裂とフィブリン形成、半月体形成を認める（ $\times 1,000$ ）。
- 中段左：移植腎の慢性抗体関連型拒絶病例。糸球体基底膜は所々で二重化がみられる（矢頭）（ $\times 600$ ）。
- 中段右：thin basement membrane disease 病例。尿細管基底膜に比較して糸球体基底膜の染色性は乏しい。図1および図2：3段目左の同倍率正常糸球体を参照（ $\times 400$ ）。
- 下段：同一例の電顕所見。糸球体基底膜は高度菲薄化しており、厚さは約 160 nm（ $\times 10,000$ ，バーは $2\mu\text{m}$ ）。

v) Elastica 染色

弾性線維染色を含む染色方法としては、EMT 染色と Elastica van-Gieson (EVG) 染色の2つがあり、いずれも動脈硬化程度の判定に有用である（図7：左・右）。EMT 染色は血管病変に加えて前項で解説したようにさまざまな腎病変の評価が可能である。一方、EVG 染色でも糸球体、尿細管間質の観察は可能ではあるが、動脈硬化の評価ほどには威力を発揮しない。

一枚の標本から得られる情報量は EMT 染色のほうが多いのに加え、EVG 染色では弾性線維を残して染色性は比較的早期に褪せるという難点があることから、EMT 染色のほうを用いている施設は多いと思われる。

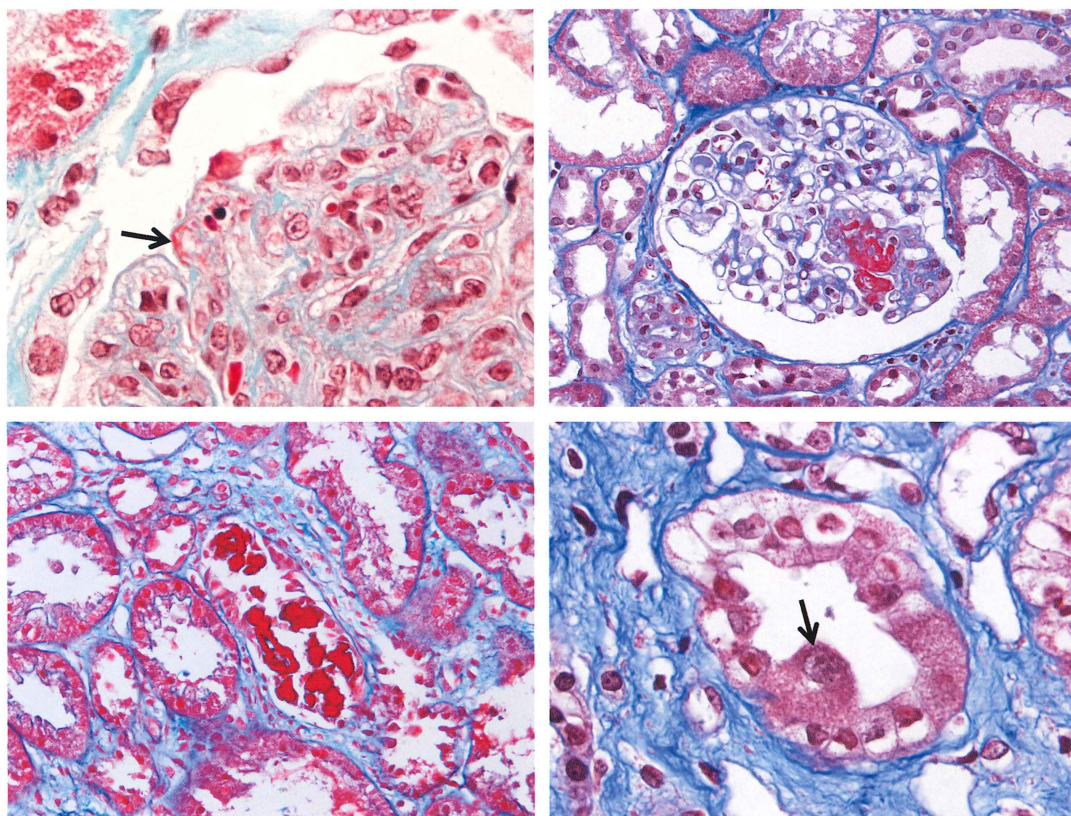


図6 Masson-Trichrome 染色

上段左：糸球体基底膜に沿って沈着物を認める（矢印）。アニリン青色素の代わりにライトグリーン色素を使用しているため、結合組織成分は緑色である（Goldner 変法）（ $\times 1,000$ ）。

上段右：糸球体内に赤染するフィブリン形成を認める（ $\times 400$ ）。

下段左：myeloma cast. 尿細管内に赤染する円柱形成がみられる（ $\times 400$ ）。

下段右：髓質集合管に赤く腫大した尿細管上皮細胞を認める（矢印）。遺伝子検索の結果、ミトコンドリアの遺伝子変異（3243A \rightarrow G）が明らかになった（ $\times 1,000$ ）。

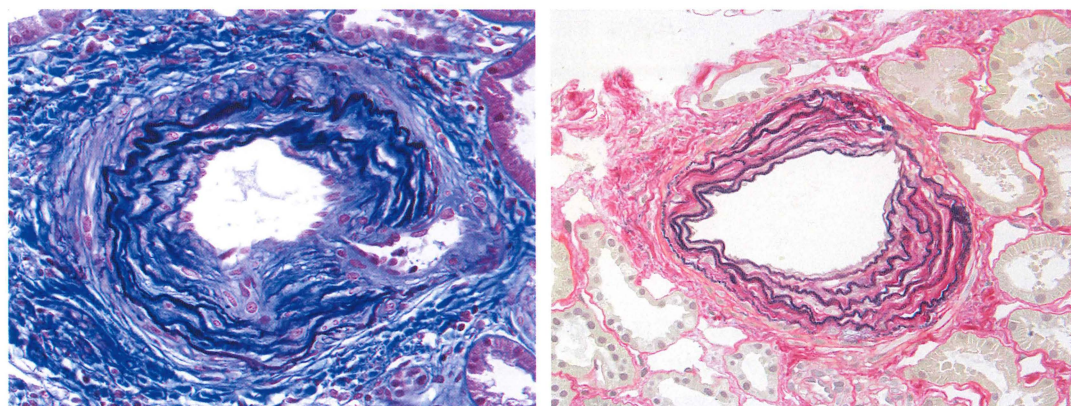


図7 Elastica Masson-Trichrome 染色（左）と Elastica van-Gieson 染色（右）

いずれも弾性線維の層状肥厚が明瞭である（ $\times 400$ ）。

表1 神戸大学医学部附属病院病理診断科で用いている蛍光用抗体一覧

一次抗体	希釈倍率	メーカー	品番
IgG	×400	MP Biomedicals	55144
IgA	×200	MP Biomedicals	55077
IgM	×100	MP Biomedicals	55153
C1q	×50	MP Biomedicals	55166
C3c	×200	MP Biomedicals	55167
C4c	×200	MP Biomedicals	55168
fibrinogen	×200	MP Biomedicals	55169
C4d	×200	QUIDEL	A213
IgG1	×200	Invitrogen	05-3300
IgG2	×200	Invitrogen	05-3500
IgG3	×200	Invitrogen	05-3600
IgG4	×200	Invitrogen	05-3800
type IV collagen $\alpha 2/5$	原倍	重井医学研究所	CFT-15325
κ	×100	Southern Biothech	923002
λ	×100	Southern Biothech	918002

表2 蛍光免疫染色のプロトコル

1. 直接法

- ①アセトン固定 5分
- ②PBS 洗浄 5分×2回
- ③標識モノクローナル抗体 1時間 室温（湿潤箱内）
- ④PBS 洗浄 5分×3回
- ⑤封入

2. 間接法

- ①アセトン固定 5分
- ②PBS 洗浄 5分×2回
- ③一次抗体 1時間 室温（湿潤箱内）
- ④PBS 洗浄 5分×3回
- ⑤標識二次抗体 1時間 室温（湿潤箱内）
- ⑥PBS 洗浄 5分×3回
- ⑦封入

注）使用試薬

PBS：三菱化学メディエンス インスタント磷酸緩衝液 5（20倍濃縮液）50 mL pH 7.4 を蒸留水で 1 L にメスアップ

アセトン：和光純薬 和光一級 アセトン 013-00356 500 mL

b. 蛍光免疫染色

神戸大学医学部附属病院病理診断科では蛍光用検体は厚さを $1\mu\text{m}$ に設定して薄切している。蛍光染色に用いている抗体一覧およびプロトコルを表1, 2に示す。IgG サブクラスの検討は膜性腎症例に対して行っており、特発性か二次性かの参考情報としている。特発性膜性腎症では IgG4 単独もしくは IgG1<<IgG4 の分布になり、他は陰性である。二次性の場合は原因疾患によって異なり、癌に関連したものでは IgG1, 2, 4²⁾、関節リウマチの治療薬であるブシラミンによるものでは IgG2, 3, 4³⁾、ループス腎炎（V 型）では IgG1, 2⁴⁾ の陽性頻度が高い。

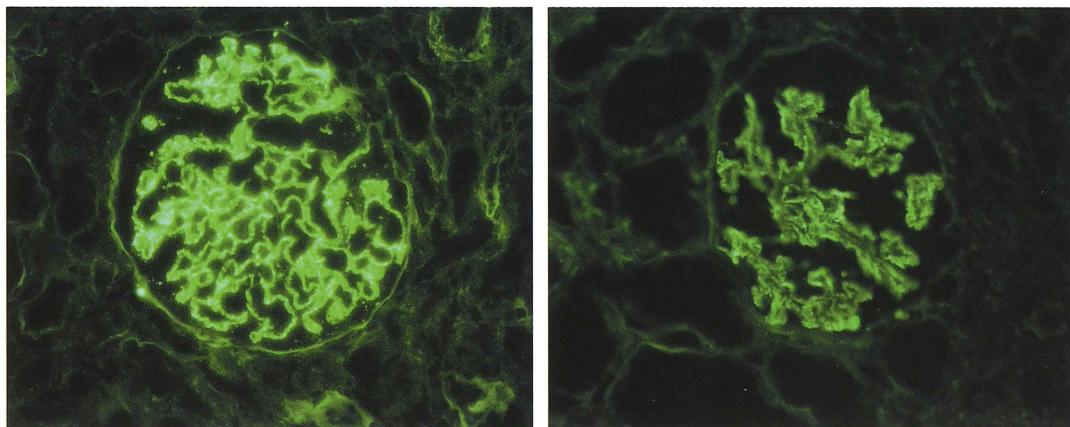


図8 膜性腎症のIgG 蛍光染色

1 μ m (左) ならびに3 μ m (右) の厚さで薄切した検体を示す。右では焦点が一部で合っていない。

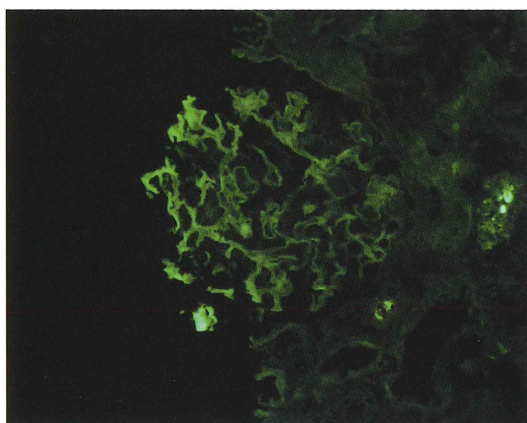


図9 IgA 蛍光染色

検体辺縁部の糸球体に非特異的なIgA 陽性像が認められる。

免疫複合体の沈着量が多い場合、抗体の希釈濃度が高いと過度の蛍光輝度によりメサンギウム領域か基底膜領域かの区別がつきにくくなるため、抗体濃度をやや抑えて露光時間で適宜調節し撮影すると鮮明な画像になる。光顕標本と同様、厚い切片は正確な評価を阻害する大きな要因となるため、蛍光検体でも薄い切片が求められる(図8)。検体の辺縁部にある糸球体では非特異的な陽性像がみられることがときどきあり、結果の解釈には注意を要する(図9)。

c. 電顕試料の染色

腎生検の病理診断に用いられる電顕は通常、透過型電子顕微鏡(transmission electron microscope:TEM)であり、光顕標本と同じように試料の固定、脱水、包埋(パラフィンの代わりにエポキシ樹脂を使用)、薄切、染色の過程からなる(表3)。当科では現在、鉛染色液として佐藤法を用いている。電顕標本を観察する際の注意点として、膠原線維は染色されにくいことは銘記しておくべきである。電顕診断に際して、この点は普段あまり意義を持たないが、collagenofibrotic

表3 神戸大学医学部附属病院病理診断科で行っている電顕標本作製のタイムフロー**Day 1**

- ①前固定（グルタルアルデヒド固定液 2時間以上, 4℃), 洗浄
- ②後固定（1%四酸化オスミウム固定 2時間, 4℃), 洗浄
- ③脱水（50, 70, 80, 90, 95, 99%, 純エタノール）
- ④エポキシ樹脂浸透（Day 2 まで）

Day 2-4

- ⑤エポキシ樹脂包埋, 重合（35℃ 8時間, 45℃ 8時間, 60℃ 48時間）

Day 5-6

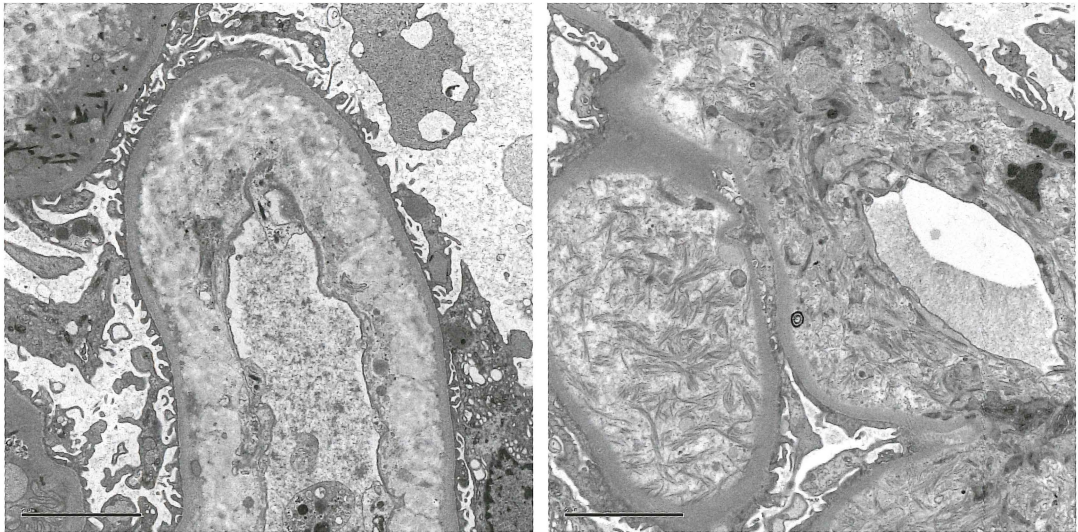
- ⑥一次トリミング, 準超薄切片作製
- ⑦トルイジンブルー染色, 準超薄切片の観察（糸球体の確認）
- ⑧二次トリミング
- ⑨超薄切

Day 7

- ⑩電子染色（酢酸ウラン, クエン酸鉛）

Day 8

- ⑪写真撮影

**図10** collagenofibrotic glomerulopathy 症例の電顕写真

左：膠原線維染色なし，右：膠原線維染色あり

左では type III collagen が染まらずに抜けてみえるが，右では毛羽状の線維物が確認できる（×6,000）。

glomerulopathy で糸球体に沈着する type III collagen は電子染色に対しあまり染色されず，淡く抜けてしまう．このため，タンニン酸染色やウーロン茶抽出物染色により膠原線維を染色し，特徴的な屈曲構造を持つ線維を認識することが必要となる（図10）．当科では取扱いの簡便なウーロン茶抽出物染色を行っている．免疫複合体を TEM で観察すると濃い灰色の塊として認識され，これは（electron）dense deposit（EDD）と呼ばれるが，「dense」とはどういうことを意味しているのだろうか．

TEM では厚さ 100 nm 未満の薄片化した観察試料に電子線を当て，透過してきた電子が蛍光板もしくは CCD カメラの素子に反応し，結像したものを観察する．透過する電子線の割合が高いと明るくなり，逆に散乱するものが多いと暗く写る．生体を構成する元素は水素や炭素，酸素，窒素

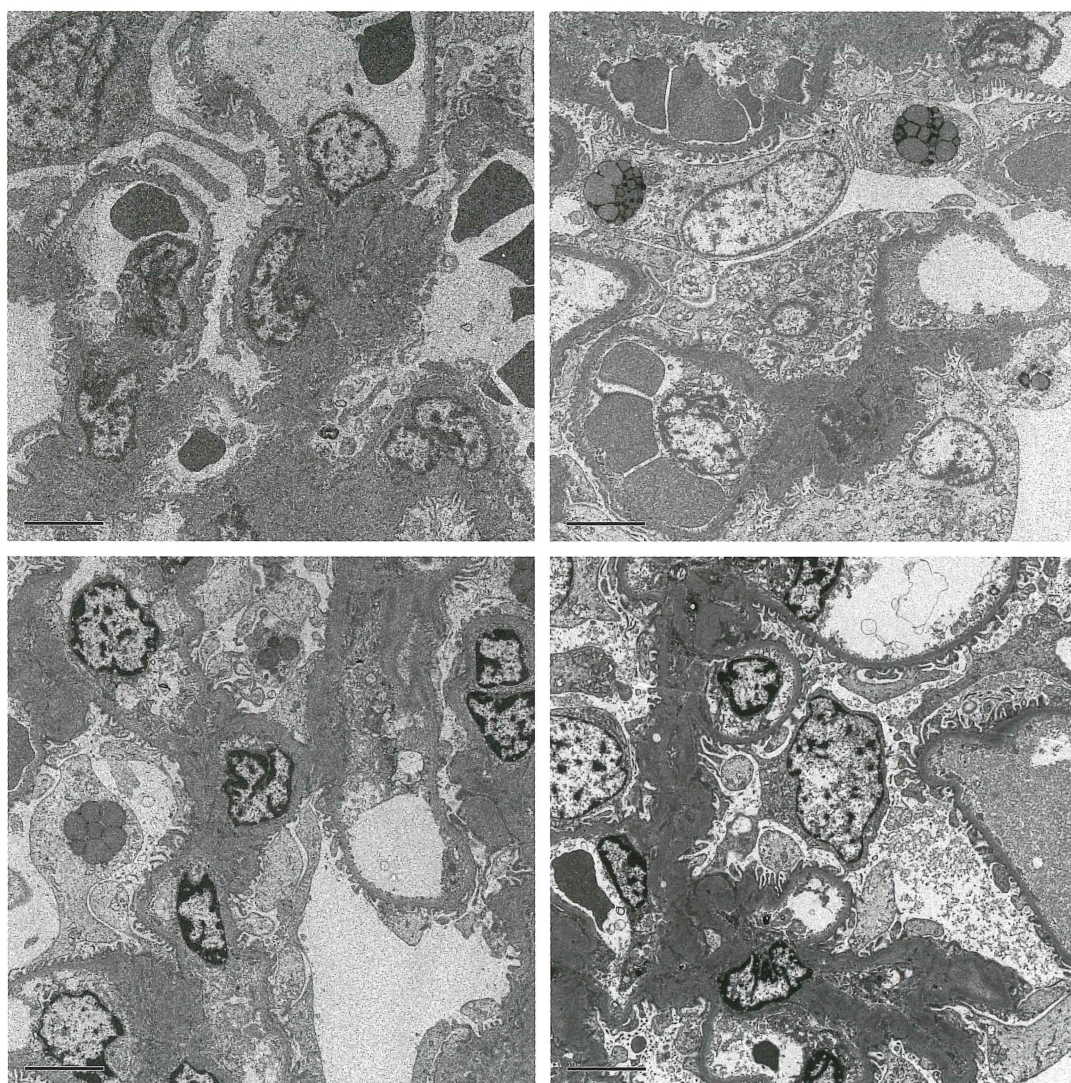


図11 電子染色の例

上段左：電子染色なし，上段右：鉛染色のみ，下段左：ウラン染色のみ，下段右：鉛＋酢酸ウラン染色，で撮影．電子染色なしでもある程度は輪郭がわかるが，画像が粗く診断に適さない．鉛染色，ウラン染色のみでもまだ粗く，画像は不鮮明である．鉛＋酢酸ウランでコントラストが鮮明になる（ $\times 4,000$ ，バーは $5\mu\text{m}$ ）．

などの軽元素が大半であり，そのまま電子を当ててもほとんど散乱されずに透過してしまうばかりでコントラストがつきにくい．後固定で使用する四酸化オスmiumでも電子密度の濃淡がある程度得られるが，さらに鮮明なコントラストをつけるために行うのが電子染色であり，室温中で4%酢酸ウラン溶液，Reynolds 鉛染色液にそれぞれ浸漬し染色する（図11）．酢酸ウランは核質，リボソーム，鉛はリボ蛋白，グリコーゲン顆粒などに結合し⁵⁾，これら重金属に結合した細胞膜あるいは細胞基質成分を多く含む部分では電子線は散乱し影となり，結合に乏しい部分ではそのまま透過するので明るく見え，両者のコントラストがついてみやすくなる（図12）．免疫複合体にはこれら重金属が多数付着し，濃い（dense）影として認識される．

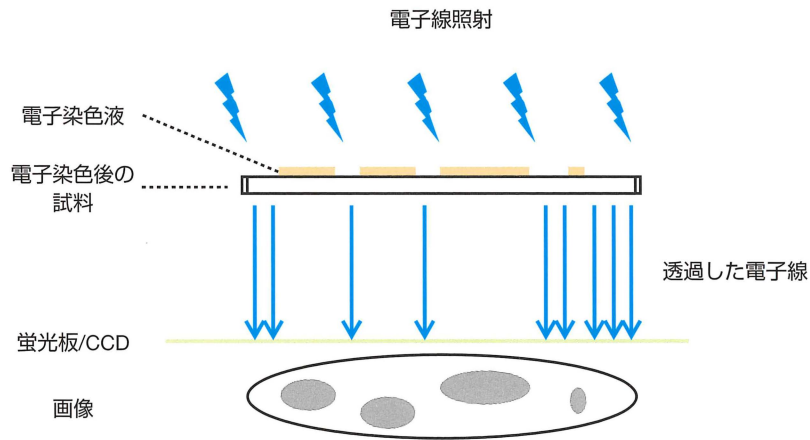


図 12 透過型電子顕微鏡の原理

どの検査法もそれだけですべての病変が評価できるわけではなく、観察すべきポイントはそれぞれ異なる。光顕、蛍光、電顕標本作製ならびに染色法の特徴を踏まえ、腎組織をさまざまな角度からみる習慣を身につけることが、病態をより深く理解する第一歩である。

謝辞

本稿を執筆するにあたり、神戸大学医学部附属病院病理診断科病理技師の皆様には光顕、蛍光ならびに電顕標本作製について貴重なご意見をいただきました。この場をお借りして深謝致します。

文献

- 1) Kobayashi A et al : Granular swollen epithelial cells : a histologic and diagnostic marker for mitochondrial nephropathy. Am J Surg Pathol **34** : 262-270, 2010
- 2) Ohtani H et al : Distribution of glomerular IgG subclass deposits in malignancy-associated membranous nephropathy. Nephrol Dial Transplant **19** : 574-579, 2004
- 3) Nagahama K et al : Bucillamine induces membranous glomerulonephritis. Am J Kidney Dis **39** : 706-712, 2002
- 4) Kuroki A et al : Glomerular and serum IgG subclasses in diffuse lupus nephritis, membranous lupus nephritis, and idiopathic membranous nephropathy. Int Med **41** : 936-942, 2002
- 5) 吉濱 勲 : 電子染色. よくわかる電子顕微鏡技術, 医学・生物学電子顕微鏡技術研究会 (編), 朝倉書店, 東京, p82, 1992