

病理診断における蛍光免疫染色の活用

洛和会音羽病院 病理診断科

安井 寛・西村 啓介

洛和会音羽病院 臨床検査部

穴吹 昌枝・岩元 静香

【要旨】

免疫染色蛍光抗体法は、ルーチン業務として施行されている酵素抗体法に比較して、定量性に優れる、明瞭な二重染色が可能、などの利点を有している。腎糸球体病変や皮膚炎症性疾患の診断において、蛍光免疫染色は不可欠な診断ツールとなっているが、その利点を生かすことにより、病理診断のより多様な局面に応用可能である。本稿では、最近当科において、蛍光抗体法を利用することにより、詳細な病態解析が可能となった2症例について提示する。

Key words : Immunohistochemistry, immunofluorescence, pathological diagnosis.

【緒言】

免疫組織化学は、特異的な抗原抗体反応を応用して、目的とする抗原物質の局在を組織標本の上で可視化する方法である。今日では、病理診断において不可欠な染色法の一つとなっており、当院の病理検査室でもほぼ毎日施行されている。特に腫瘍の病理診断において、HE染色による形態診断とともに、腫瘍特異的な分子（主に蛋白質）の同定が、しばしば大きな意味を持つ。また、細胞増殖能や、成長因子やホルモン受容体などといった癌関連蛋白の動態を、免疫組織化学を用いて評価することが、遺伝子解析とともに、治療法選択や予後判定の上で、ますます重要になってきている。

免疫組織化学には、大きく分けて蛍光抗体法と酵素抗体法があり、それぞれ固有の利点を持つ。蛍光抗体法では、まず第一に、抗原量と蛍光強度との相関が比較的良いと考えられる。つまり、蛍光抗体法は定量性に優れている。第二に、二重染色の施行とその評価が容易である。まず、同一標本上の異なる抗原に対し、それぞれに対応する一次抗体を結合させる。次いで、それぞれの一時抗体に対し、励

起と蛍光のスペクトラムの異なる蛍光色素を標識した二次抗体を結合させる。このようにして作成された蛍光染色標本に対し、二種類の蛍光フィルターを通して観察するか、それらのシグナル（赤〈red〉・緑〈green〉単色のシグナル）を合成したRGB画像として観察することにより、組織や細胞における複数の抗原の局在の違いを比較・検討することができる。

洛和会音羽病院 病理診断科では、平成25年1月より蛍光顕微鏡を導入し、腎生検における蛍光免疫染色を院内で施行するとともに、病理診断の新たな可能性を拓くために、蛍光抗体法の利点を利用した様々な試みを行ってきた。本稿では、そのような試みを行った症例のうち、特に印象深い二例を選んで臨床経過・病理診断を含めて提示する。

【症例1】

一例目は、混合性結合組織病（MCTD）に合併した膜性腎症（MN）の64歳女性である。MNが特発性か二次性かの判定に、蛍光免疫染色によるIgGサブクラスの半定量的評価が有効であった。

MNは糸球体基底膜の上皮下に免疫複合体が沈着することにより糸球体基底膜（GBM）の蛋白質透過性が亢進する疾患で、成人のネフローゼ症候群の20～30%を占める¹⁾。特発性および種々の原因による二次性が存在するが、最近、特発性MNの原因となる抗原物質が、主として、足細胞の膜表面に局在するphospholipase A2 receptor であることが判明した²⁾。これがGBMに接する足細胞の細胞膜表面で、IgG4分画に属するIgG抗体と免疫複合体を形成する。一方、二次性MNの場合、GBMに沈着するIgGのなかで、IgG4分画は比較的微量である。これらの知見により、特発性および二次性MNの鑑別のためにIgGサブクラスの半定量的評価が重要視されるようになってきた。当科においても、現在この方法をMNの診断に役立っている。

症例は64歳女性で、全身浮腫を主訴として来院された。現病歴として、15歳頃からレイノー症状を、55歳頃からは口腔内と眼球の乾燥を自覚していた。入院3カ月前の検尿で蛋白尿を指摘された。入院2週間前から全身浮腫を自覚し、近医を受診したところ尿蛋白と低蛋白・アルブミン血症が認められた。以上の経過よりネフローゼ症候群が疑われ、当院腎臓内科に紹介・入院となった。

入院時、両下腿にpitting edema、手指にソーセージ様腫脹を認めた。検尿では尿蛋白が3+、尿潜血が2+であった。血算では白血球3,400/μl、赤血球412万/μl、ヘモグロビン11.4 g/dl、ヘマトクリット37.8%、血小板22.7万/μlと、軽度の貧血以外に著変を認めなかった。血液生化学では総蛋白5.3g/dl、アルブミン1.9g/dl、総コレステロール383mg/dlであった。免疫血清学では、抗SS-A/Ro抗体が142U/ml、抗SS-B/La抗体が15.1U/ml、U1RNP抗体が500U/ml以上と、それぞれ高値を示した。また、サクソテスト0.5g、シルマー試験2mm/4mmと低値であり、下口唇小唾液腺生検にてリンパ球・形質細胞浸潤と腺房萎縮を認めた。

上記の所見より、シェーグレン症候群、混合性結合組織病（MCTD）およびネフローゼ症候群と診断された。

ネフローゼ症候群の原因精査のため、腎生検が施行された。その病理所見を以下に述べる。皮質・髓質比は10:0と、全て皮質から採取されていた。糸球体は91個含まれ、そのうち2個が全節性硬化に陥っていた。その他の糸球体には、ほぼ全てに軽度のメサンギウム基質増加、足細胞の腫大を認めた。またボウマン嚢径が200～250 μmに及ぶ糸球体が

多数見られ、糸球体肥大傾向を呈していた。尿細管・間質や血管系の構造は、近位尿細管に硝子滴変性を認める以外には良く保たれ、間質線維化は極く軽度であった。蛍光抗体法では、係蹄壁と傍メサンギウムにIgG・C3の顆粒状沈着を認めた。以上より、病型診断は膜性腎症（MN）と考えられた。病因診断として、背景にMCTDがあり、IgG・C3の沈着パターンが係蹄壁からメサンギウムに及んでいたことから、二次性MNの可能性が考えられた。それを支持する所見を得るために、蛍光免疫染色によるIgGサブクラスの半定量的評価を試みた。その結果、蛍光輝度はIgG1が最も強く、次いでIgG2で、IgG3とIgG4の蛍光強度はいずれも微弱であった（図1）。対象として、2例の原発性MNにおいて同様の染色を施行したところ、いずれもIgG4の蛍光強度が際立っており、本症例との染色性の差は歴然としていた。これらの所見より、MCTDに基づく二次性膜性腎症と診断した。

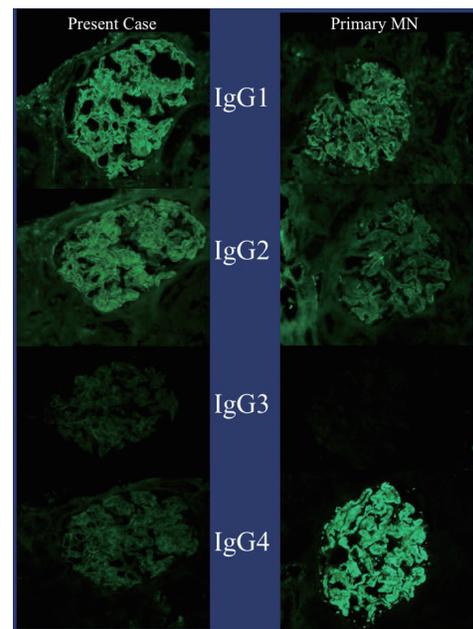


図1 蛍光免疫染色によるIgGサブクラスの半定量的評価

本症例（左側）では、蛍光輝度はIgG1が最も強く、次いでIgG2で、IgG3とIgG4の蛍光強度はいずれも微弱である。原発性MN症例（右側）では、IgG4の蛍光強度が際立っている。

【症例2】

二例目は、蛍光二重染色が病態解析に有効であった節外性濾胞辺縁帯リンパ腫の60歳女性である。

節外性濾胞辺縁帯リンパ腫は、胃をはじめとする消化管や肺・唾液腺・眼付属腺に好発する、比較的低悪性度のB細胞型リンパ腫である。粘膜関連リンパ組織（MALT）から発生する事からMALTリンパ腫とも称される^{3) 4)}。組織学的には、centrocyte-like、monocytoid、または small lymphocyte-likeと形容される小型Bリンパ球が、リンパ濾胞辺縁帯から連続して単調な増殖を示す。複数の腫瘍性リンパ球が集簇して腺管上皮内に浸潤し、腺管形態の変容を引き起こしてlymphoepithelial lesion（LEL）を形成するのが特徴とされる。本症例では、胃MALTリンパ腫において、腫瘍性Bリンパ球と腺管上皮細胞が共局在（colocalization）してLELを形成する像を、蛍光二重染色を用いて明瞭に示すことが出来た。

症例は60歳女性で、人間ドック受診を目的に来院された。上部消化管内視鏡検査を施行したところ、胃体部後壁に、径14×14mmの隆起性病変を認めた。周囲との境界ほぼ明瞭で、中心部に陥凹を伴い、辺縁にやや不整が見られた。生検では、小型リンパ球の密な浸潤を伴う胃底腺粘膜が採取され、リンパ球の侵入を伴って変形した腺管、即ちLELが認められた。MALTリンパ腫を念頭において免疫染色（酵

素抗体法）を施行したところ、浸潤するリンパ球はCD20が陽性、CD3・CD5・CD10・cyclin D1が陰性で、MALT リンパ腫として矛盾しない結果であった。生検の約2カ月後に、診断を兼ねた治療法として内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）が施行された。組織学的に、構造の良く保たれた胃底腺粘膜を背景として、径12mmの比較的境界明瞭なリンパ増殖性病変が認められた（図2A）。病変内には腫大した多数のリンパ濾胞が見られ、リンパ濾胞の辺縁帯から周囲に拡がる様に、小型リンパ球が粘膜下層から粘膜に単調な増殖を示していた（図2B）。免疫染色（酵素抗体法）では、病変部にはCD20陽性のBリンパ球が密在し、CD3陽性のTリンパ球は比較的疎に散在性に分布していた（図2C、D）。また、サイトケラチン（上皮マーカー）の免疫染色（酵素抗体法）により、病変部粘膜深層において、変形してLELを形成する腺管上皮が明瞭に描出された。以上の所見はMALTリンパ腫に特徴的であったが、これだけで反応性リンパ過形成を確実に除外するのは困難と考えられた。診断確定のためには、増殖するBリンパ球が同一のクローン由来（モノクローナル）であることを遺伝学的に証明する必要がある。しかし、本例ではフローサイトメトリーや遺伝子診断用の

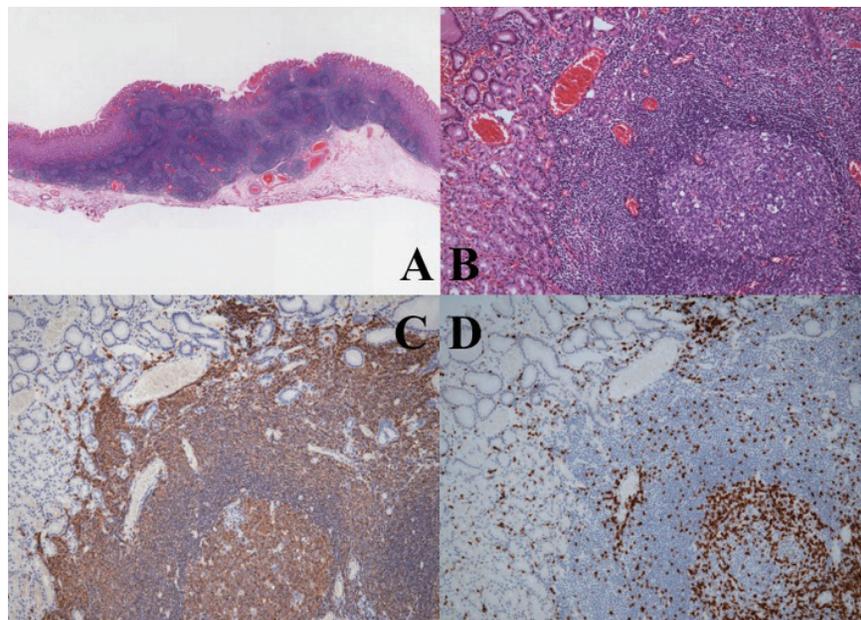


図2 症例2の胃リンパ増殖性病変

ルーベ像では比較的境界明瞭な隆起性病変が認められる（A）。病変内には腫大した多数のリンパ濾胞が見られ、リンパ濾胞の辺縁帯から周囲に拡がる様に、小型リンパ球が粘膜下層から粘膜に単調な増殖を示す（B）。免疫染色（酵素抗体法）では、病変部にはCD20陽性のBリンパ球が密在（C）、CD3陽性のTリンパ球は比較的疎に散在性に分布する（D）。

検体が採取されなかったため、厳密な診断確定は困難であった。そこで、病理組織学的手法の範囲内で、可能な限り確定診断に近づける事を試みた。その一つが、LELの形成に与るリンパ球が単一の免疫形質を示すことの証明である。LEL病巣において、赤色蛍光を呈する腺管上皮の内部に、緑色蛍光を呈するBリンパ球の集簇が明瞭に認められた(図3A)。一方、Tリンパ球を同様の方法で観察したところ、LEL病巣の外部にのみ散在性に見出された(図3B)。即ち、励起・吸収スペクトラムの異なる蛍光色素で標識した二種類の二次抗体を用いた染色(蛍光抗体二重染色法)により、LEL内部のリンパ球の全てがBリンパ球であることをはっきりと示す事が出来た。

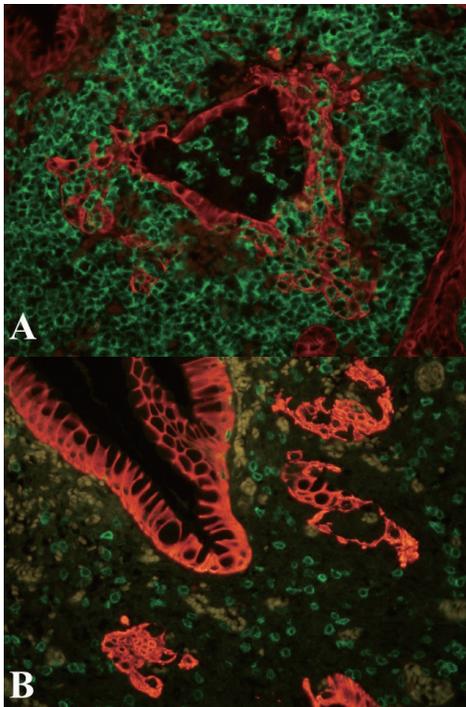


図3 症例の胃リンパ増殖性病変におけるLEL病巣の蛍光染色

赤色蛍光を呈する腺管上皮の内部に、緑色蛍光を呈するBリンパ球の集簇が明瞭に認められた(A)。一方、Tリンパ球はLEL病巣の外部にのみ散在性に見出された(B)。

【考察・結語】

本稿では、病理診断における蛍光抗体法の、ルーチン以外の活用法を提示した。即ち、優れた定量性、二重染色の容易さといった、基本的な利点を生かして、様々な局面において従来法より精度の高い病理診断が可能になる。

緒言で述べた様に、免疫組織化学は、特異的な抗原抗体反応を利用して、組織標本の上で目的とする抗原の局在を可視化する方法であるが、核酸の特異的結合、即ち hybridization を用いて、ウイルスやヒトのゲノムDNA における特異的配列の局在を可視化する方法は、in situ hybridization (ISH) と呼ばれ、そのなかで、蛍光色素を用いたものはFISHと呼ばれる。病理診断用の検体を用いたFISHは、癌の遺伝子異常、特に染色体レベルの異常を鋭敏に検出する方法として重用される⁵⁾。今後は蛍光抗体法にFISHも含めた活用を視野にいれ、病理診断の更なる向上と深化を目指している。

【文 献】

- 1) Distribution of glomerular IgG subclass deposits in patients with membranous nephropathy and anti-U1 ribonucleoprotein antibody. Omokawa A et al, Nephrol Dial Transplant, 27 : 1937-1941, 2012.
- 2) M-Type Phospholipase A2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy. Laurence HB et al, N Engl J Med 361 : 11-21, 2009.
- 3) Gastrointestinal malignant lymphoma : a pathologic study of 37 cases in a single Japanese institution. Terada T. Am J Blood Res 2 (3) : 194-200, 2012.
- 4) Gastrointestinal lymphomas : Morphology, immunophenotype and molecular features. Bautista-Quachl MA et al., J Gastrointest Oncol 3 (3) : 209-225, 2012.
- 5) Multitarget FISH Analysis in the Diagnosis of Lung Cancer. Bubendorf L et al., Am J Clin Pathol 123 : 516-523, 2005.