

## ホルマリン固定パラフィン切片を用いた 糸球体腎炎における免疫複合体の検出

昭和大学藤が丘病院 病院病理科 鈴木孝夫 池田勝秀 光谷俊幸  
昭和大学横浜市北部病院 病理部 太田善樹

### 【はじめに】

糸球体腎炎の病理診断は、針生検により採取された検体を光学顕微鏡標本用（ホルマリン固定）、蛍光抗体法用（OCT凍結包埋）、電子顕微鏡標本用（グルタルアルデヒド固定）に分割し、それらの検査所見を総合的に判断して行われる。糸球体腎炎における免疫複合体の検出は、通常凍結切片を作製し FITC 標識蛍光抗体法により行われている。しかし、稀に糸球体硬化などにより目的とする糸球体が存在しない場合があり、その際はやむを得ずホルマリン固定パラフィン切片を用いて検出する。

### 【ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫複合体検出】

糸球体腎炎における免疫複合体は、生体内において既に凝集・変性した状態で糸球体に沈着しており、加えてホルマリンはタンパク質を架橋固定するため立体障害を生じ、抗原性が複雑に変性・masking されているので、ホルマリン固定パラフィン切片を用いて免疫複合体を検出するには、タンパク分解酵素による抗原賦活化の前処理が必須である。

タンパク分解酵素としては、protease が推奨される。通常の抗原検出では室温 5～30 分間程度の前処置で十分なことが多いが、糸球体腎炎の免疫複合体を検出する場合は、組織がボロボロになる少し手前くらい強力で抗原を露出させる必要がある。（sigma 社製 protease type XXIV だと 0.05～0.1%，ニチレイバイオサイエンス社製 protease なら原液のまま、室温で 2 時間処理する）

引き続き、最適倍率に希釈された一次抗体を反応させ、酵素抗体法（ポリマー法；ニチレイバイオサイエンス社製シンプルステイン MAX-PO）で検出すればよい。（図 1）

### 【Alexa Fluor 488 標識蛍光抗体法による糸球体腎炎の免疫複合体検出】

腎糸球体の免疫複合体の検出は、酵素抗体法でも可能であるが、コントラストなどの点を考慮すると蛍光抗体法の方が適している。近年、Alexa Fluor という蛍光色素（Alexa Fluor 488, 546 …：invitrogen 社製）が開発され、蛍光強度が高く（輝度が高い）、また光安定性も高い（退色しづらい）ことから、様々な方面で利用されるようになって来た。この Alexa Fluor 標識法を腎生検に用いることで免疫複合体を高感度に検出することが出来る。（図 1）

ホルマリン固定パラフィン切片を用いた免疫複合体の検出（酵素抗体法および Alexa Fluor 488 標識蛍光抗体法）の実用例を掲載する。（IgA 腎症：図 2～5，膜性腎症：図 6～11）

### 【おわりに】

腎生検における免疫複合体検出は、抗原性の保持および迅速性という点から一般的に凍結切片を用いた蛍光抗体法により行われるが、ホルマリン固定パラフィン切片でも十分検出可能であり、第 2 選択肢として有用である。ホルマリン固定材料の場合、タンパク分解酵素による前処理が必要であるなど多少煩雑であるものの、連続切片を作製すれば H&E 染色やその他の特殊染色標本（PAS, マッソン・トリクローム, PAM など）と同一の糸球体で所見を取ることができ、またホルマリン固定されているので凍結切片に比べ組織形態の保持や抗原の局在性が良いなどの利点もある。特に高感度・高コントラストで蛍光減衰の少ない Alexa Fluor 488 標識蛍光抗体法は、糸球体腎炎における免疫複合体検出法として大変有用である。

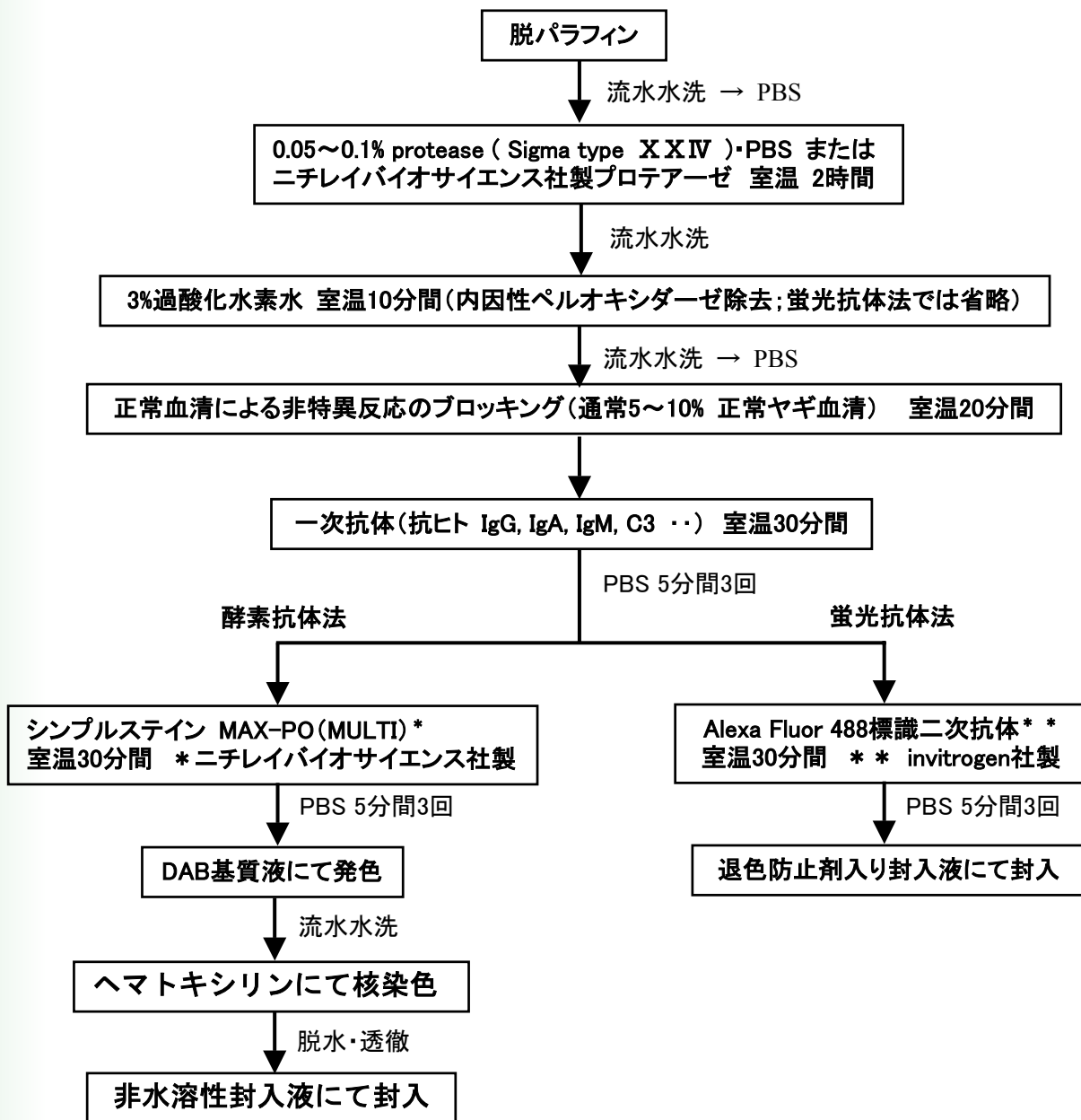


図1. ホルマリン固定パラフィン切片を用いた糸球体腎炎における免疫複合体の検出法

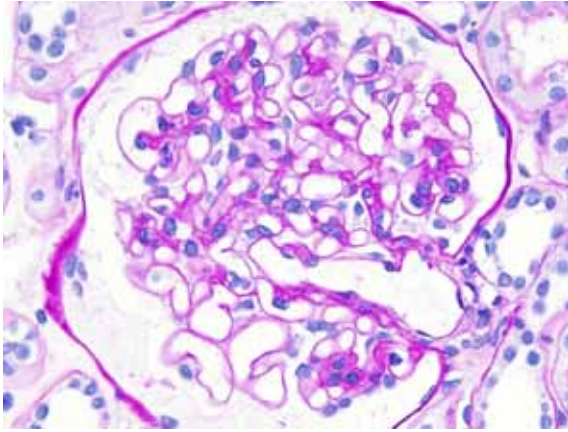


図2. IgA 腎症 (PAS 染色)  
メサンギウム基質の増加を認める.

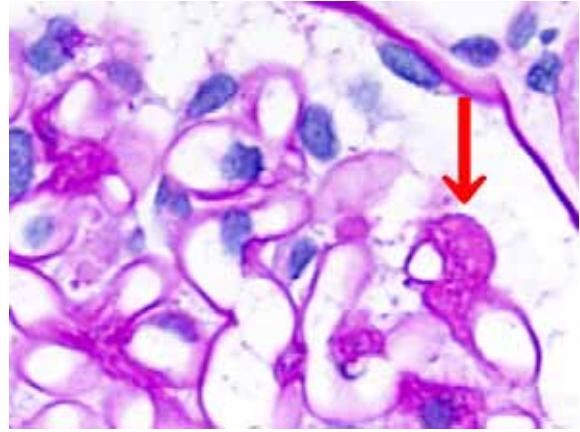


図3. IgA 腎症 (PAS 染色, 強拡大)  
半球状沈着物を認める.

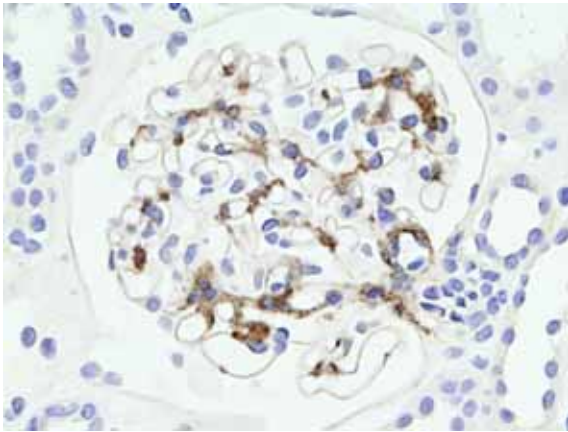


図4. IgA 腎症 (シンプルステイン MAX-PO  
による酵素抗体法 ; IgA)  
メサンギウム領域に IgA の沈着を認める.

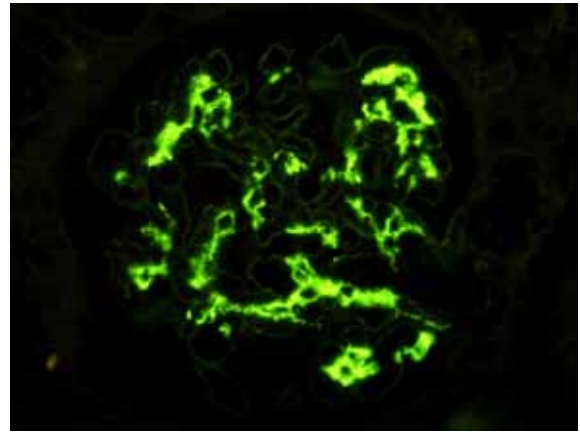


図5. IgA 腎症 (Alexa Fluor 488  
標識蛍光抗体法 ; IgA)  
メサンギウム領域に IgA の沈着を認める.



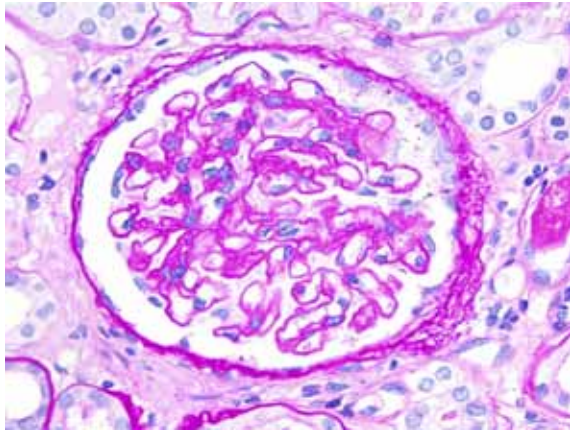


図 6. 膜性腎症 (PAS 染色)  
糸球体基底膜がびまん性肥厚している。

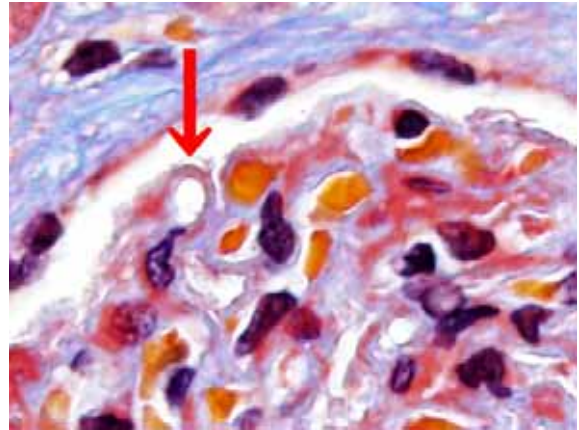


図 7. 膜性腎症 (マッソン・トリクローム染色, 強拡大)  
糸球体基底膜に赤染する沈着物を認める。

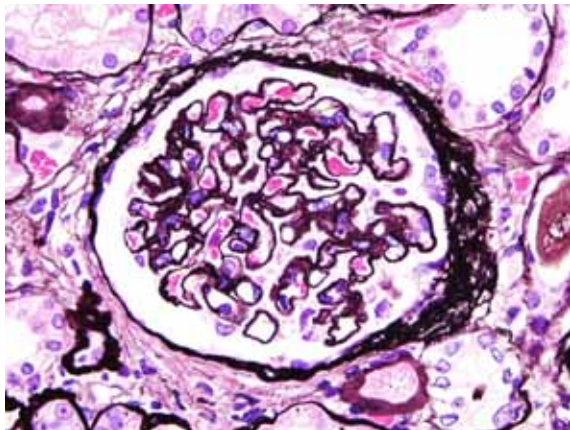


図 8. 膜性腎症 (PAM 染色)  
糸球体基底膜がびまん性肥厚している。

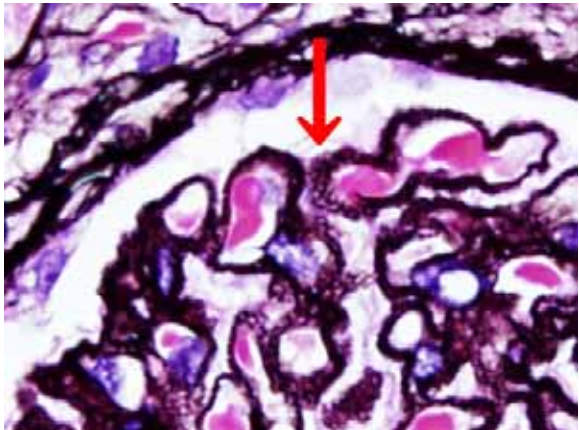


図 9. 膜性腎症 (PAM 染色, 強拡大)  
糸球体基底膜にスパイク様変化を認める。

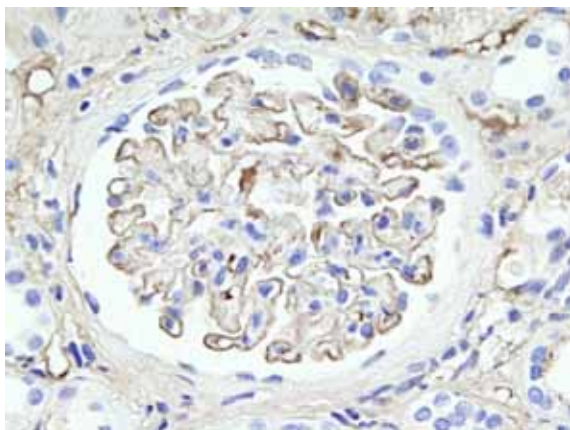


図 10. 膜性腎症 (シンプルステインMAX-PO  
による酵素抗体法 ; IgG)  
糸球体基底膜に IgG がびまん性に沈着している。

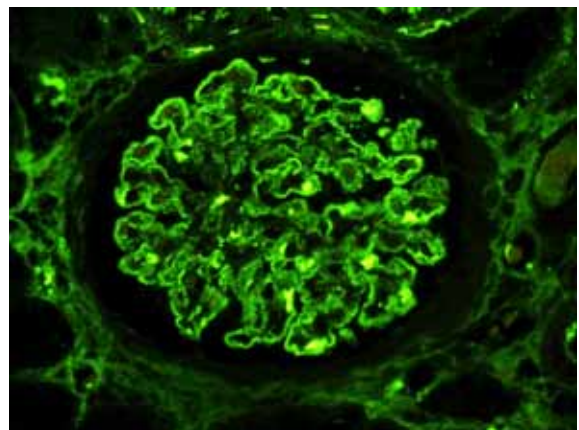


図 11. 膜性腎症 (Alexa Fluor 488  
標識蛍光抗体法 ; IgG)  
糸球体基底膜に IgG がびまん性顆粒状に沈着している。