

成人および小児膜性腎症における M-type ホスホリパーゼ A2 受容体の免疫組織学的検出

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター病理検査室
堀田 茂

はじめに

膜性腎症は、糸球体基底膜上皮下に形成される免疫複合体により糸球体上皮障害が惹起される糸球体腎炎である。本邦においては、成人ネフローゼ症候群の原因では膜性腎症が一番多く約35%を占め、小児では少なく1%~7%と報告されている。発症年齢は、成人では40歳以上、小児では7歳~12歳が多い。

最近まで、特発性膜性腎症が膜性腎症全体の70%~80%を占め、IgGのサブクラスではIgG1・IgG4が優位で、特にIgG4が優位に沈着する事が知られていた(図1)。残りの20%~30%は続発性で、自己免疫疾患や感染症、薬剤性、悪性腫瘍に合併し、IgGのサブクラスではIgG4が優位に沈着する症例は少ない。小児の特発性膜性腎症では、IgG1・IgG3が優位に沈着する症例が多い事が報告されている(図3)。

2009年に、成人の特発性膜性腎症の約70%で、ヒト糸球体上皮細胞中に存在するM-type ホスホリパーゼA2受容体(PLA2R1)に対する自己抗体が血中に認められる事がBeckらにより報告された⁽¹⁾。糸球体の免疫複合体中にも抗原として確認されることから、特発性膜性腎症の主要な抗原であると推定されている。また、血清中の抗PLA2R1自己抗体の大部分は、糸球体免疫沈着物中のPLA2R1と優位なIgG4と同様である事が報告されている⁽²⁾。腎生検のパラフィン標本を用いた免疫染色の検討で、PLA2R1陽性特発性膜性腎症は、IgG4抗体が優位であり⁽³⁾、小児腎では陽性率が低いことが報告されている⁽⁴⁾。

PLA2R1は、分子量185KDのI型膜タンパク質で、糸球体上皮細胞、肺、好中球などに発現している。機能としては、不明な点が多いが、最近では細胞の老化や腫瘍化との関連性が報告されている。

最近、新たな抗原としてトロンボスポンジン1型ドメイン含有7A(THSD7A)が同定された⁽⁵⁾。この抗原は、特発性膜性腎症の約10%に認められると報告されている。

本邦でも、特発性膜性腎症に関する腎生検での免疫組織学的解析で、PLA2R1は52.7%、THSD7Aは9.1%で陽性が確認されている⁽⁶⁾。

我々は、現在凍結切片を用いた蛍光抗体法で、PLA2R1およびTHSD7Aの染色性を検討している。今回は、当施設における染色方法を紹介する。

染色方法

糸球体腎炎における免疫複合体の検出は、通常凍結切片を用いた蛍光抗体法で行われる。PLA2R1 や THSD7A の検出も、凍結切片を用いた間接蛍光抗体法が、感度や特異性・検査の簡便性において最も優れた方法である (図 1,2,3)。また、PLA2R1 抗体は、メーカーやロットにより染色性に差があり、IgG との二重蛍光抗体法を用いることで、特異性が上り正確に確認することができる (図 4)。

蛍光抗体法用の組織に糸球体が入っていないときには、パラフィン切片による検出も可能である。

パラフィン切片を用いた PLA2R1 および THSD7A の検出は、蛍光抗体法および酵素抗体法どちらでも染色可能である (図 5,6)。パラフィン切片では、熱による前処理が必要で多少煩雑であり、また IgG と PLA2R1 および THSD7A を二重染色することができないため、一次抗体の種類によっては注意を要する。常に、陽性および陰性のコントロール切片を同時に用いて染色することが重要である。

特発性膜性腎症と続発性膜性腎症の鑑別のために、PLA2R1 および THSD7A の免疫染色は必要不可欠である。今後は、PLA2R1 および THSD7A の血中抗体価の測定が一般的になると、腎生検前に特発性膜性腎症の診断や治療効果の予測が可能になり、免疫染色による診断は少なくなると思われる。

凍結標本による PLA2R 1 の蛍光染色

二重染色 (間接蛍光抗体・直接蛍光抗体法)

腎生検組織として 2 μ m の新鮮凍結切片を用いた。

1 PBS	5 分 3 回
2 一次抗体 抗ヒト PLA2R 1・THSD7A ウサギポリクローナル抗体	室温 1 時間
3 PBS	5 分 3 回
4 二次抗体 Alexa Fluor488 標識抗ウサギ IgG ロバポリクローナル抗体	室温 1 時間
5 PBS	5 分 3 回
6 正常ヤギ血清	室温 10 分
7 ローダミン標識抗ヒト IgG ヤギポリクローナル抗体	室温 1 時間
8 PBS	5 分 3 回
9 封入、蛍光顕微鏡にて観察し画像を保存	

凍結標本による IgG サブクラスの蛍光染色

1 PBS	5 分 3 回
2 FITC 標識抗ヒト IgG1~IgG4 ヒツジ IgG ポリクローナル抗体	室温 1 時間
3 PBS	5 分 3 回
4 封入、蛍光顕微鏡にて観察し画像を保存	

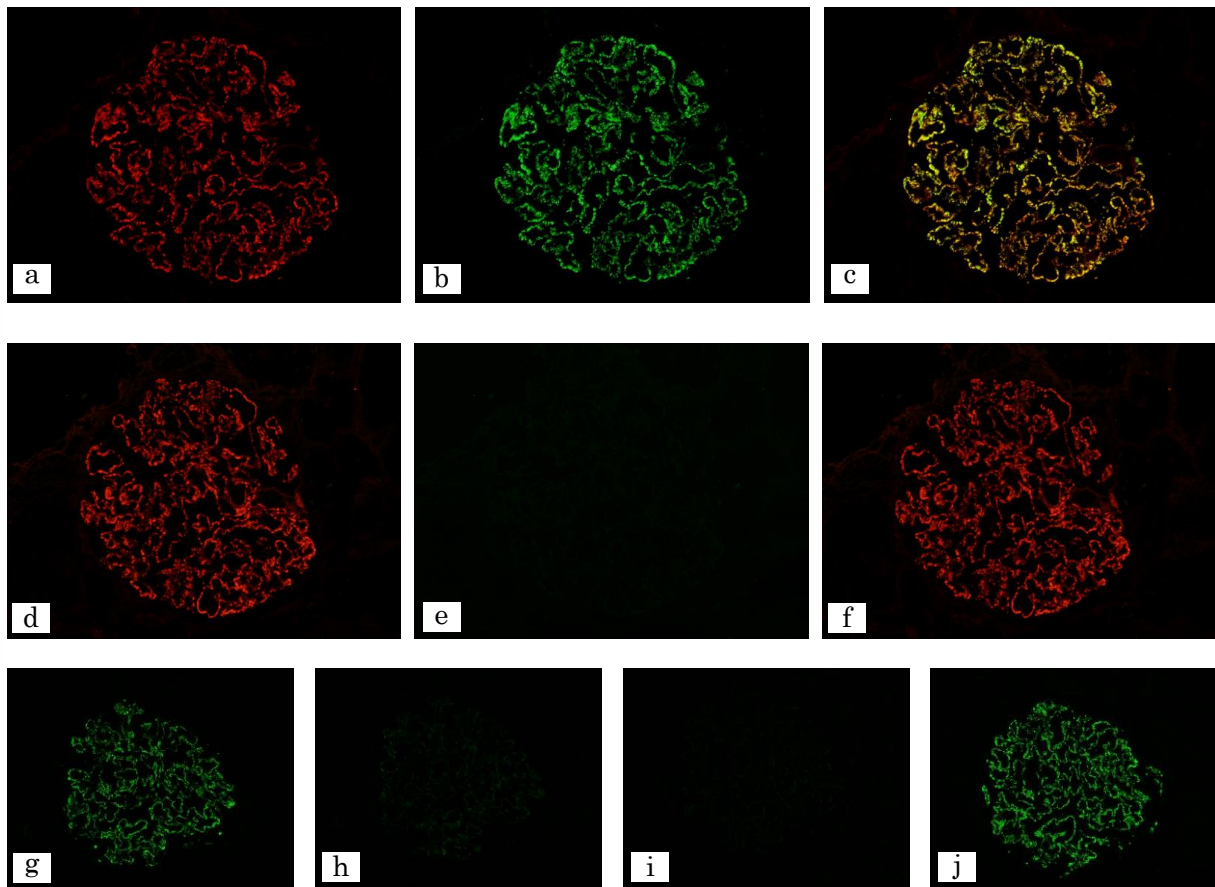


図1 成人特発性膜性腎症

PLA2R1 および THSD7A(Alexa Fluor488)と IgG(TRITC)を用いた二重染色

a,d: IgG(TRITC) b: PLA2R1 (Alexa Fluor488) c: Merged (a,b) e: THSD7A(Alexa Fluor488) f: Merged (d,e)

糸球体基底膜上皮下に沿って IgG (a) および PLA2R1 (b) の細顆粒状沈着が認められ、同一部位に分布することが確認できる (c)。

糸球体基底膜上皮下に沿って IgG (d) の細顆粒状沈着が認められるが、THSD7A (e) は陰性である。

IgG サブクラス(FITC)直接蛍光抗体法

g: IgG1 h: IgG2 i: IgG3 j: IgG4

糸球体基底膜上皮下に沿って IgG1 と IgG4 の細顆粒状沈着が認められる。特に IgG4 が優位に陽性で IgG2 と IgG3 はほぼ陰性である。

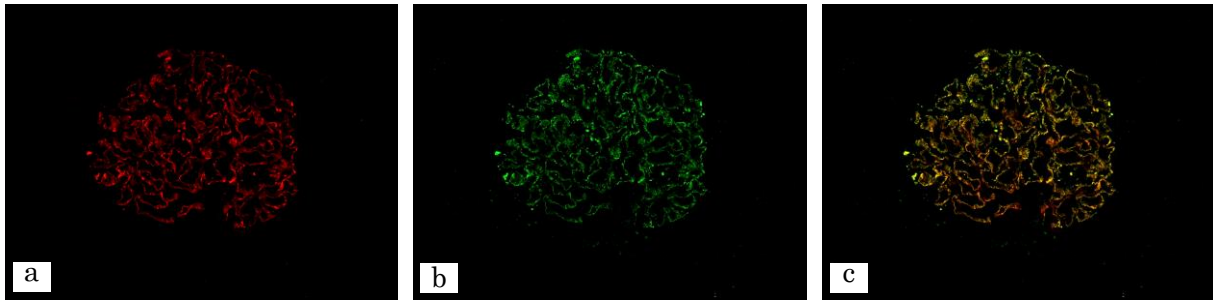


図2 成人特発性膜性腎症

THSD7A(Alexa Fluor488)と IgG(TRITC)を用いた二重染色

a: IgG(TRITC) b: THSD7A (Alexa Fluor488) c: Mage (a,b)

糸球体基底膜上皮下に沿って IgG (a) および THSD7A (b) の細顆粒状沈着が認められ、同一部位に分布することが確認できる (c)。

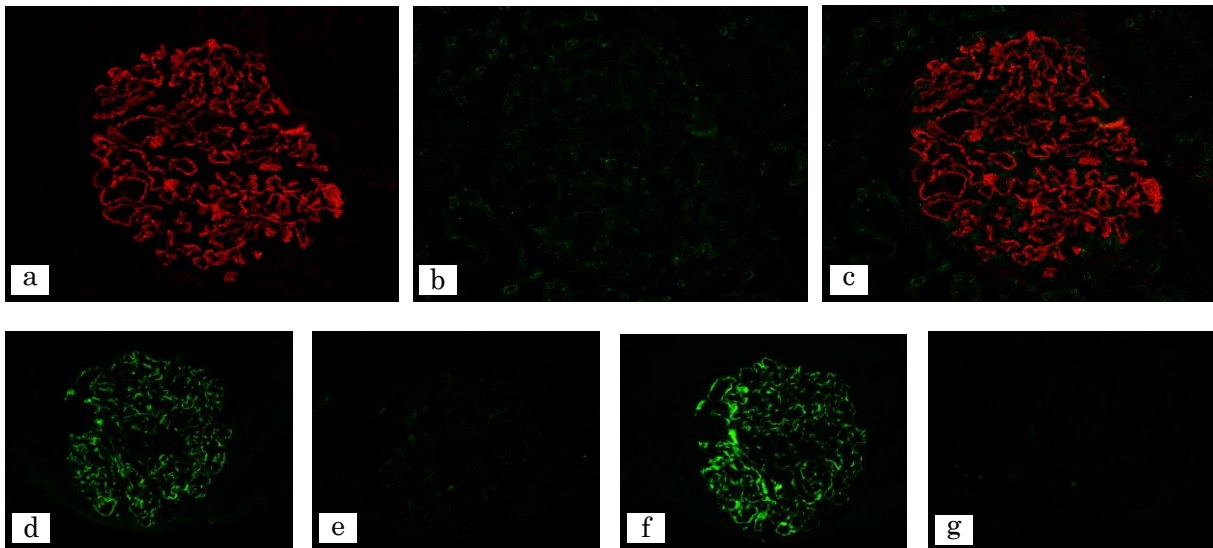


図3 小児特発性膜性腎症

PLA2R1 (Alexa Fluor488)と IgG (TRITC)を用いた二重染色

a: IgG(TRITC) b: PLA2R1(Alexa Fluor488) c: Mage

糸球体基底膜上皮下に沿って IgG (a) の細顆粒状沈着が認められるが、PLA2R1 (b) は陰性である。

IgG サブクラス (FITC)直接蛍光抗体法

d: IgG1 e: IgG2 f: IgG3 g: IgG4

糸球体基底膜上皮下に沿って IgG1 と IgG3 の細顆粒状沈着が認められる。IgG2 と IgG4 は、ほぼ陰性である。

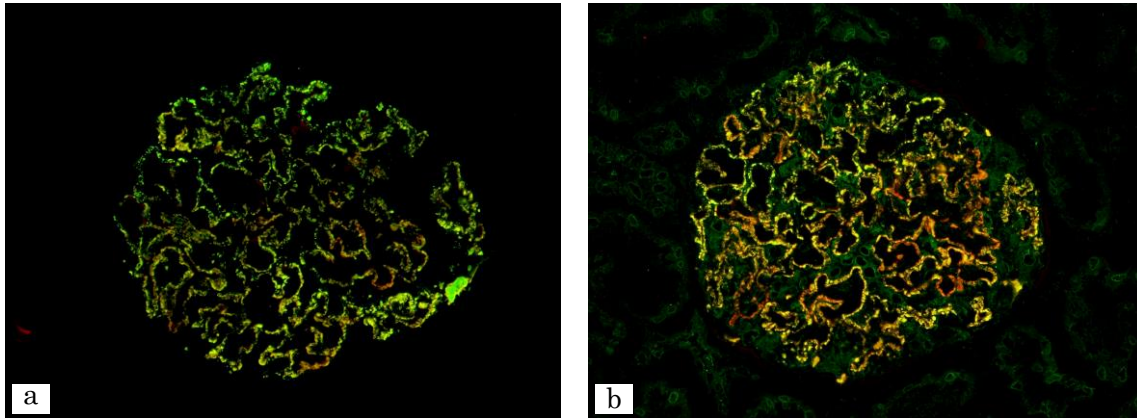


図4 特発性膜性腎症
PLA2R1 抗体のロットによる染色性の差

PLA2R1 (Alexa Fluor488)と IgG (TRITC)を用いた二重染色

- a IgG と PLA2R1 が、糸球体基底膜上皮下の同一部位に細顆粒状の沈着を認める。
- b PLA2R1 は、免疫複合体以外にも糸球体上皮細胞や尿細管上皮細胞にも軽度陽性である。IgG と PLA2R1 を二重染色をすることで、PLA2R1 は免疫複合体の同一部位に細顆粒状に陽性で、糸球体上皮や尿細管上皮との染色性を容易に鑑別する事ができる。

パラフィン標本による PLA2R 1 の蛍光染色

腎生検組織として 2~3 μ m のパラフィン切片を用いた。

- | | |
|---------------------------------------------|---------------------------------|
| 1 脱パラフィン、水洗 | |
| 2 pH6.0 クエン酸緩衝液 | 121 $^{\circ}$ C 10分オートクレーブで前処理 |
| 3 PBS | 5分3回 |
| 4 一次抗体抗ヒト PLA2R1 ウサギポリクローナル抗体 | 室温 1時間 |
| 5 PBS | 5分3回 |
| 6 二次抗体 AlexaFluor488 標識抗ウサギ IgG ロバポリクローナル抗体 | 室温 1時間 |
| 7 PBS | 5分3回 |
- 封入、蛍光顕微鏡にて観察し画像を保存

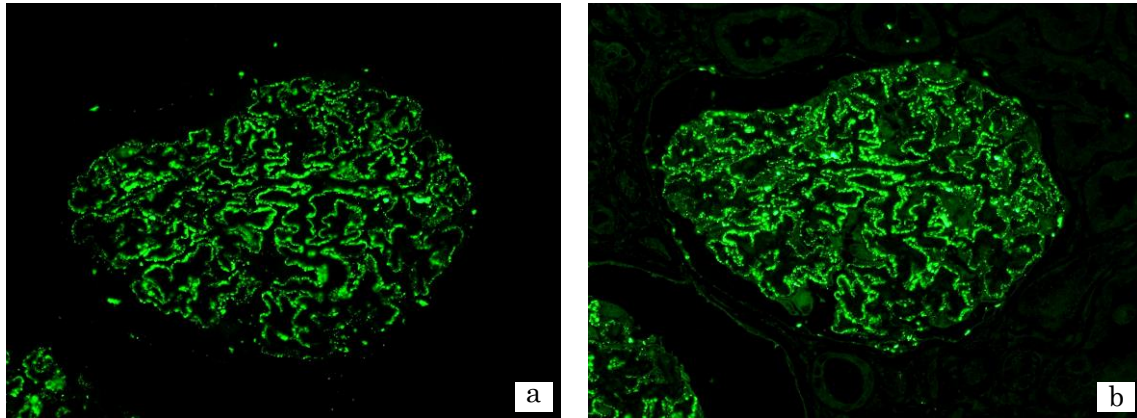


図5 成人特発性膜性腎症
PLA2R1 (Alexa Fluor488 による間接蛍光抗体法) パラフィン切片
糸球体基底膜上皮下に PLA2R1 の細顆粒状沈着を認める (a,b)。
PLA2R1 抗体のロットの違いにより、免疫複合体以外に糸球体上皮細胞や尿細管
上皮細胞にも軽度陽性を認める (b)。

パラフィン標本による PLA2R 1 の酵素抗体法

腎生検組織として 2~3 μ m のパラフィン切片を用いた。

- | | |
|--------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1 脱パラフィン、水洗 | |
| 2 pH6.0 クエン酸緩衝液 | 121 $^{\circ}$ C 10分オートクレーブで前処理 |
| 3 PBS | 5分3回 |
| 4 一次抗体抗ヒト PLA2R1 ウサギポリクローナル抗体 | 室温 1時間 |
| 5 PBS | 5分3回 |
| 6 二次抗体 シンプルステイン MAX-PO(MULTI)
(ニチレイバイオサイエンス社) | 室温 30分~1時間 |
| 7 PBS | 5分3回 |
| 8 DAB 発色、核染、封入 | |

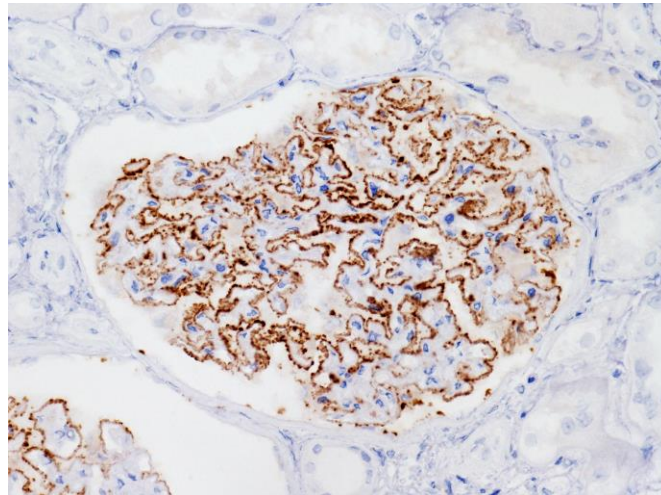


図6 成人特発性膜性腎症
PLA2R1 (シンプルステイン MAX-PO による酵素抗体法)
糸球体基底膜上皮下に沿って PLA2R1 の細顆粒状沈着が認められる。

文献

1. Beck LH Jr, et.al: M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. N Engl J Med 2009; 361 : 11-21
2. Svobodova E, et.al: Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2013; 28 : 1839-1844
3. Larsen CP, et.al: Determination of primary versus secondary membranous glomerulopathy utilizing phospholipase A 2 receptor staining in renal biopsies. Mod Pathol 2013 ; 26 : 709-715
4. Cossey LN, et.al: Phospholipase A 2 receptor staining in pediatric idiopathic membranous glomerulopathy. Pediatr Nephrol 2013 ; 28 : 2307-2311
5. Tomas NM, et.al: Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. N Engl J Med 2014; 371:2277.
6. Iwakura T, et al : Prevalence of enhanced granular expression of thrombospondin type-1 domain-containing 7A in the glomeruli of Japanese patients with idiopathic membranous nephropathy. PLoS One 2015; 10:e0138841