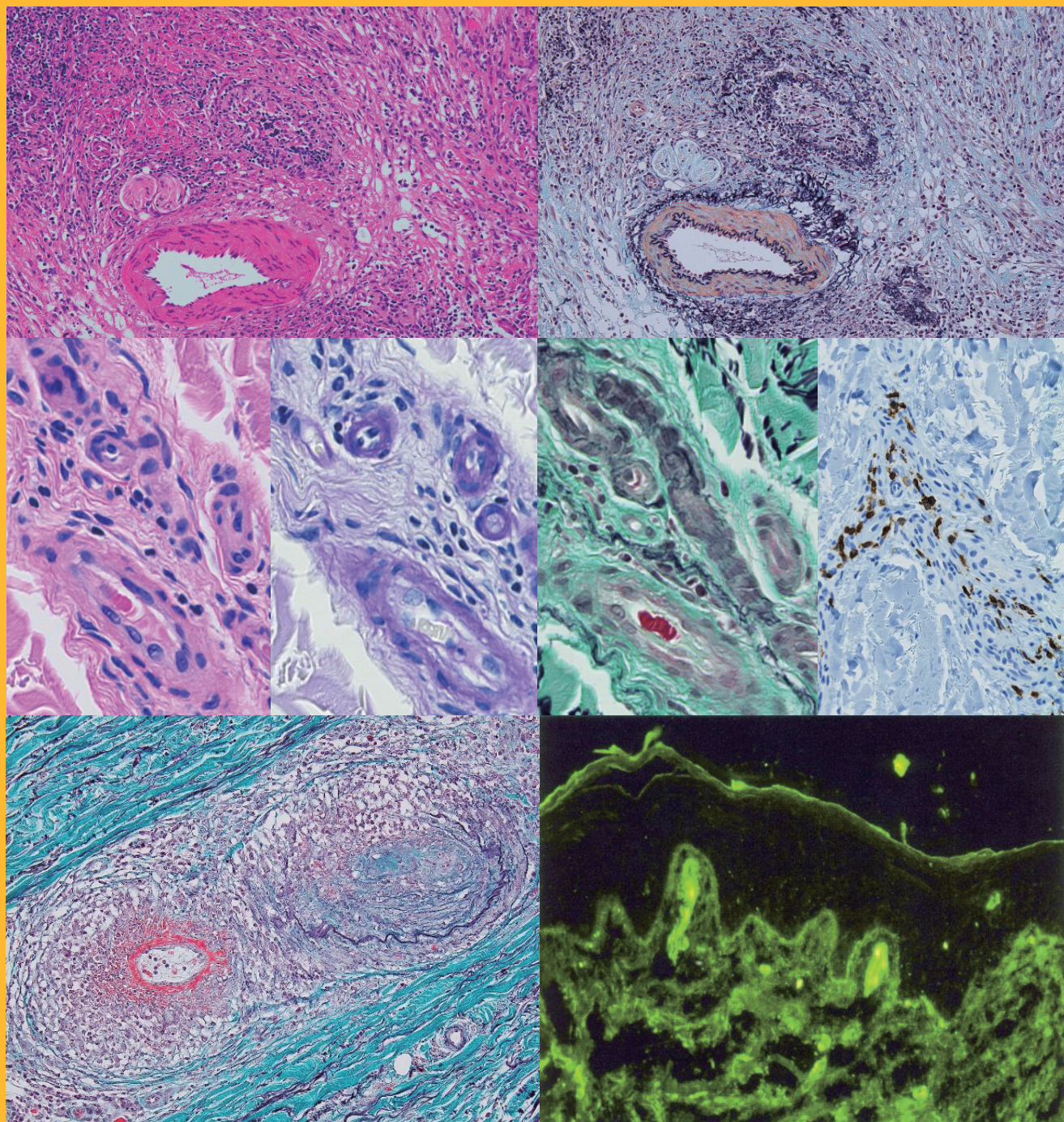


血管炎病理診断のために有用な 染色プロトコル集



厚生労働省 科学研究費補助金・難治性疾患政策研究事業
難治性血管炎の医療水準・患者QOL向上に資する研究班 編

表紙の写真

上段：閉塞性静脈炎の HE 染色（左），Elastica-Masson 染色 Goldner 変法（右）

中段：クリオグロブリン血症性血管炎の皮膚病変。左から HE 染色，ジアスターゼ消化 PAS 染色，Elastica-Masson 染色 Goldner 変法，抗 CD163 免疫組織化学

下段：顕微鏡的多発血管炎の皮膚病変。Elastica-Masson 染色 Goldner 変法（左），IgA 血管炎の抗 IgA 蛍光抗体法（右）

序 文

血管炎は、罹患する血管のサイズによって分類され、それぞれに多彩な臨床像と病理学的特徴を持つ疾患群です。臨床医はその診断に難渋することがしばしばあり、病理学的診断が鍵となることも少なくありません。厚生労働科学研究費 難治性疾患政策研究事業「難治性血管炎の医療水準・患者 QOL 向上に資する研究」班では、血管炎に関する知識の普及、疾患啓発、診断基準や診療ガイドライン等の作成のほか、様々な研究を行っておりますが、血管炎の病理診断を特に重視して臨床病理分科会を設置しております。同分科会は実地臨床医ならびに実地病理医の血管炎診療の質を高めることを目的に活動し、その取組みのひとつとして全国から診断に迷う病理標本についてのコンサルテーションを行っており、一般病理医が経験することが少ないかもしれない血管炎病理所見についての専門的な意見を提供しています。

このプロトコル集は、血管炎の病理診断に関わる医療従事者が、統一された方法で病理学的な評価を行えるよう、血管炎診断に有用な染色法のプロトコルをまとめ、国内で均てん化することを目的として作成されました。本書では、正常血管の解剖学的構造、血管炎診断のための染色法、生検などについて、血管炎に精通したコンサルタントチームのメンバーが詳細に解説しております。また、最新の研究成果や診断技術の進歩を踏まえた内容を盛り込み、実践的な診断に役立つ情報を記載しています。

血管炎の診断は、病理医と複数の診療科の臨床医との連携が必要ですが、不可逆的な臓器障害を来し得る血管炎において患者 QOL 向上のためには、できる限りの早期診断と迅速な治療方針の決定が求められます。

本プロトコル集が、実地病理医や臨床医の診断精度の向上と、患者予後改善に寄与することを願っており、日々の臨床現場で活用され普及することを期待してやみません。

皆様の日常の診療において、本書が少しでもお役に立てれば幸いです。

2025 年 4 月

厚生労働科学研究費 難治性疾患政策研究事業
難治性血管炎の医療水準・患者 QOL 向上に資する研究
研究代表者
順天堂大学医学部膠原病内科 田村直人

編集にあたって

厚生労働科学研究費 難治性疾患政策研究事業「難治性血管炎の医療水準・患者 QOL 向上に資する研究」班 臨床病理分科会は、実地臨床医ならびに実地病理医の血管炎診療の質を高めることを目的とし、血管炎病理診断コンサルテーションを運用するとともに、2016 年には『ウェブ版血管炎病理アトラス』を上梓し、2023 年には『Expert Perspectives on Pathological Findings in Vasculitis』を Modern Rheumatology 誌に掲載してきました。

この度、血管炎病理診断のために有用な染色法等の開発と普及・均てん化を目指した新たな取組みとして『血管炎病理診断のために有用な染色プロトコル集』を作成しましたので、ここにお届け致します。正常血管の組織学的構造を踏まえ、血管壁の破壊の様子を描出する特殊染色法や血管炎の診断の参考となる各種免疫組織化学・免疫蛍光染色等について、具体的な症例を用いて紹介しています。日常診療においてルーチン検査で取り扱わない染色を実施するのはハードルが高い場合がありますが、詳細なプロトコルと典型的な染色像をあわせて提示することにより、国内のどの施設においても結果を再現できるよう意図しました。

本プロトコルをご参照いただくことで、血管炎病理診断の正確性が向上することを期待しています。

2025 年 4 月

厚生労働科学研究費 難治性疾患政策研究事業
難治性血管炎の医療水準・患者 QOL 向上に資する研究
臨床病理分科会長
北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 石津 明洋

目 次

序文	田村直人	1
編集にあたって	石津明洋	2
I. 血管の解剖学的構造		
(1) 血管の解剖学的構造と病理学的特徴	小林一博・倉田 厚	4
(2) 脈管栄養血管 (vasa vasorum)	横内 幸	9
II. 弾性線維染色		
(1) Elastica Masson 染色 Goldner 変法	宮崎龍彦・小林一博	12
(2) Elastica van Gieson 染色	山下大貴・鈴木佑也・池田栄二	17
(3) その他の弾性線維染色 (Movat 染色を含めて)	鬼丸満穂・倉田 厚	19
III. 免疫組織化学・免疫蛍光染色		
(1) 浸潤細胞 characterization (Th1/T-bet, Th2/GATA3, Th17/ROR- γ t, Treg/Foxp3)	菅野祐幸	24
(2) 平滑筋細胞 characterization (α -SMA, h-caldesmon)	倉田 厚	28
(3) 梅毒トレポネーマの検出	倉田美恵・西端友香	32
(4) FFPE 切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出	高橋 啓・大原関利章・横内 幸	36
(5) FFPE 切片を用いた好中球細胞外トラップの検出	益田紗季子	39
(6) 正常腎 FFPE 切片を用いた患者血清中抗 GBM 抗体の GBM への結合確認	西端友香	43
IV. 腎生検		
(1) 腎生検において臨床医が病理診断医に期待すること	中沢大悟	47
(2) 腎生検において病理診断医が臨床医に期待すること	武曾恵理	48
V. 皮膚生検		
(1) 皮膚生検において臨床医が病理診断医に期待すること	川上民裕	53
(2) 皮膚生検において病理診断医が臨床医に期待すること	小川弥生	55

I. 血管の解剖学的構造

(1) 血管の解剖学的構造と病理学的特徴

藤田医科大学病理診断センター・病理診断科 小林 一博

東京女子医科大学病理学 倉田 厚

1. 血管の基本構造と役割

血管は体内の各組織に酸素や栄養素を送り、老廃物を回収する役割を持つ。主な血管には「動脈」「静脈」「毛細血管」の3種類があり、それぞれが独自の構造と役割を果たしている。

- **動脈**：心臓から酸素豊富な血液を全身に送る血管で、壁が厚く高圧に耐える構造を持つ。動脈はその役割から大きく「弾性動脈」と「筋性動脈」に分かれる。弾性動脈（大動脈や肺動脈など）は弾性線維を多く含み、収縮期に拡張し、拡張期に収縮することで血圧の緩衝作用を有する。筋性動脈（冠動脈や腸間膜動脈など）は平滑筋が発達しており、収縮・拡張を繰り返すことで血流量を調整する。
- **静脈**：静脈は組織から二酸化炭素や老廃物を含む血液を心臓に戻す役割を担い、血液が逆流しないように弁が存在する部位もある。特に重力の影響を受けやすい下肢では静脈弁が多く発達している。
- **毛細血管**：毛細血管は動脈と静脈の間に位置し、酸素と二酸化炭素、栄養素と老廃物の交換が行われる場である。内皮細胞からなる非常に薄い一層の構造を持つため、物質のやりとりが効率的に行われる。

2. 血管壁の層構造と組織学的特徴

血管壁は内膜、中膜、外膜の3層から構成され、血管の種類や機能に応じてその厚さや構成成分が異なる。

- **内膜**：最も内側に位置し、単層の内皮細胞が血流に直接接触している。動脈硬化や血管炎では、この内膜が肥厚し、血管が狭窄する原因となることが多い。また、内皮細胞が剥離することで血栓が形成され、血流が遮断されるリスクがある。内膜と中膜の間には弾性線維からなる内弾性板が存在し、両者を隔てている。
- **中膜**：平滑筋と弾性線維で構成され、血管の収縮や拡張に寄与する層である。特に動脈では中膜が発達しており、動脈血圧に拮抗する重要な役割を持つ。弾性動脈の中膜は弾性線維が豊富で、血圧を緩衝する働きがあるのに対し、筋性動脈の中膜には平滑筋が多く、局所的な血流調整に寄与する。高血圧や動脈硬化の進行によって中膜が変性し、肥厚や菲薄化を起こすことが知られている。中膜と外膜の間には弾性線維からなる外弾性板が存在し、両者を隔てている。
- **外膜**：最も外側に位置し、主に結合組織で構成される。外膜には線維芽細胞やコラーゲンが多く存在し、血管の強度を支える役割を果たす。また、中型以上の動静脈には小さな血管（脈管栄養血管 vasa vasorum）が外膜～中膜に存在し、これら血管の外膜および中膜に酸素と栄養を供給する。血管炎が進行すると、外膜に線維化や瘢痕が生じ、血管の柔軟性が失われることがある。

3. 各レベルの血管の病理学的な特徴について

① 大血管系血管の特徴

大血管系の特徴としては、共通の3層の構造を有する点にある。心臓に直接、流入および流出する血管を指す。

● 大動脈およびその大きな一次分枝の特徴

- **内膜：**内膜は単層の内皮細胞および疎性結合組織から構成され、内皮細胞は血液と直接接触している。内皮細胞の下には基底膜があり、内皮細胞を支持する。
- **中膜：**中膜は多層の平滑筋細胞からなり、血管の収縮と拡張を調節する。中膜には多量の弾性線維が含まれており、特に大動脈では弾性板（有窓弾性板）が存在し、血管の弾力性を提供する。
- **外膜：**外膜は疎性結合組織からなり、血管を周囲の組織に固定する。また、外膜～中膜には血管自体を栄養する小さな血管（脈管栄養血管 vasa vasorum）が存在する。

● 大静脈の特徴

- **内膜：**内膜は単層の内皮細胞および疎性結合組織から構成され、内皮細胞は血液と直接接触している。内皮細胞の下には基底膜があり、内皮細胞を支持する。動脈とは異なり、血液の逆流を防ぐ弁が存在する部位もある。
- **中膜：**中膜は数層の平滑筋細胞および弾性線維からなるがいずれも大動脈に比べ顕著に少ない。
- **外膜：**外膜は疎性結合組織からなり、血管を周囲の組織に固定する。また、外膜～中膜には血管自体を栄養する小さな血管（脈管栄養血管 vasa vasorum）が存在する。

② 末梢組織での小血管の分類と特徴

末梢組織で観察される血管は、一般に口径と組織構造に基づいて分類される。極端に大きな血管を除き、以下のように小動脈、細動脈、小静脈、細静脈、毛細血管に分類される。

末梢血管の分類基準

- **小動脈・小静脈：**口径が $100\sim1000\mu\text{m}$ 程度の血管。
- **細動脈・細静脈：**口径が $100\mu\text{m}$ 以下の血管。

小動脈と小静脈は、動脈と静脈の基本的な構造を維持しながらも、末梢で見られる特有の組織学的特徴を持つ。

I. 小動脈の特徴と同定ポイント

- **内弾性板：**小動脈には一本の明瞭な内弾性板が存在し、動脈であることを判別する大きな手がかりとなる。内弾性板は弾性線維染色で、ボールペンで描いたような一本の線として観察できる。
- **内膜：**内弾性板の内側に位置し、内皮細胞層が明瞭である。内膜と中膜の境界が内弾性板により明確に区別される。
- **中膜：**輪状に2層から10層程度の平滑筋細胞が密に配列しており、隙間が少ない充実した構造をしている。平滑筋の間には細い弾性線維が走っているが、静脈と比較すると繊細で弱々しい印象がある。
- **外膜：**外膜には縦走する膠原線維、弾性線維、線維芽細胞が含まれており、血管を周囲の組織に固定する役割を持つ。外弾性板は、内弾性板ほど明瞭ではないものの、認められる。

これらのポイントから、小動脈の同定においては、明瞭な内弾性板の存在と充実した平滑筋からなる中膜が重要な基準となる。

II. 小静脈の特徴と同定ポイント

- **内弾性板**：小静脈では内弾性板が明瞭には観察されない。これは動脈との大きな識別ポイントである。
- **中膜**：中膜は疎な平滑筋細胞から構成されており、動脈に比べて平滑筋の密度が低い。充実した構造ではなく、比較的ゆるやかな配列を示す。内外弾性板が不明瞭化している一方、中膜には内外弾性板に平行な弾性線維が、同径の動脈よりも多く観察されることが多い。
- **外膜**：外膜には膠原線維、弾性線維、線維芽細胞が縦走しており、血管を周囲の組織に固定する役割を果たす。動脈と同様に膠原線維が外膜に多く含まれているが、全体的に柔らかい構造を持つ。外弾性板は観察されにくい。

これらのポイントから、小静脈の同定においては、内弾性板が不明瞭であること、そして中膜が疎な平滑筋細胞で構成されている点が重要な判断材料となる。場合によっては、中膜に内外弾性板に平行な弾性線維が多く認められることも役立つ。

III. 細動脈、細静脈の特徴と同定ポイント

細動静脈は、口径が $100\mu\text{m}$ 以下の血管である。細動脈では、内皮細胞の外側に中膜の平滑筋細胞が一層あり、さらにその外側には線維芽細胞がみられる。

細静脈は同じく内皮細胞および線維芽細胞によって構成されているが、中膜には平滑筋細胞ではなく周皮細胞が存在するとされる。これらの動静脈は並走している伴行血管であることが多く、動脈は径が狭く壁が厚いのに対して、静脈壁は径が広く壁が薄い。

IV. 毛細血管の特徴

毛細血管は、直径 $5\mu\text{m}$ ないしそれ以下の血管で細動脈、細静脈をつなぐ血管である。毛細血管は非常に狭小であり赤血球は馬蹄形に変化して通過しているとされている。内腔面は内皮細胞で覆われ、その周囲を周皮細胞が血管を安定化させ、それら全体を基底膜が覆っている。毛細血管はその構造から連続性毛細血管、有窓性毛細血管、不連続性毛細血管に分けられる。

4. 血管炎に関連する病理学的特徴

血管炎とは、血管壁に炎症が生じる疾患の総称であり、炎症の主な部位や原因によって様々に分類される。詳細は他項に譲るが一般的なものとして血管炎による病理学的変化は以下の通りである。

- **内膜の病理変化**：内膜肥厚は、動脈硬化や血栓形成の結果、生じることもあり、また、血流が滞る要因となって動脈硬化や血栓形成の原因ともなる。内膜肥厚は局所的な血流の減少や、喫煙や糖尿病、高血圧などの全身的风险因子によって促進される。また、血管内皮細胞が剥離すると、血栓形成が起こり、血流が閉塞されることで組織虚血や梗塞を引き起こす。血管炎ではこの内膜肥厚が特に顕著で、周辺組織への炎症の波及も見られることがある。
- **中膜の変性**：血管炎が中膜に及ぶと、平滑筋や弾性線維が変性し、脆弱化することがある。特に嚢胞状中膜変性は、大動脈解離の原因となり、遺伝性疾患（Marfan 症候群など）や高血圧患者で発生しやすい。また、炎症により弾性線維が虫食い状に破壊されることも多く、高安動脈炎や梅毒性大動脈炎で典型的に見られる病理所見である。これにより血管壁が弱くなり、瘤形成や破裂のリスクが増大する。

- **外膜の線維化**：血管炎が外膜に及ぶと、線維性肥厚が生じ、血管の柔軟性が低下する。外膜の線維化は進行した動脈硬化で内膜側からの圧排で生じることもあるが、炎症後の癒痕として特徴的に発生するが多い。Buerger 病や高安動脈炎では外膜の線維化が顕著で、組織学的には膠原線維や平滑筋の増殖が認められる。これにより、血流が悪化し、組織への酸素供給が妨げられることがある。

5. 組織学的な染色方法と観察、血管炎が疑われる場合の特殊染色法とその役割

血管の組織学的な観察には、一般的なヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin & eosin: HE）染色だけでなく、特別な染色が用いられ、血管の各層や病変が詳細に観察できる。詳細は他項で詳しく解説されるため割愛し、診断の際のそれぞれの染色に至る考え方や得意な点などについて述べる。

血管炎が疑われる症例において、小血管の構造を詳細に解析するため、以下の特殊染色法をルーチンで行うことが推奨される。これらの染色法は、診断者の目に入る病理画像の解像度を向上させ、より精密な解析を可能にする。

- **d-PAS 染色（ジアスターゼ消化 PAS 染色）**：小血管の壁肥厚や壁内への炎症細胞の浸潤を明瞭に描出する。病理画像の解像度を上げることに非常に有用である。
- **EM 染色（Elastica Masson 染色）**：小血管から大血管までの層構造を詳細に観察し、弾性線維の変性や損傷の状態を確認するのに使用する。血管壁の状態を明確に描出し、炎症性変化の程度を評価する。HE 染色で確認が難しい微小な赤血球の血管外漏出像を描出するのに適している。血管炎の初期変化や微小病変の評価に役立つ。
- **EVG 染色（Elastica van Gieson 染色）**：小血管から大血管までの層構造を詳細に観察し、弾性線維の変性や損傷の状態を確認するのに使用する。血管壁の状態を明確に描出し、炎症性変化の程度を評価する。

血管炎が疑われる場合、これらの特殊染色をルーチンとして実施し、染色結果に見慣れる反復練習も重要である。

その他、追加の染色が考慮される場合

通常の染色に加え、以下のような状況では追加の染色を行うことで病態理解が深まる場合がある。

- **フィブリノイド壊死が疑われる場合**：Azan 染色または Masson トリクローム染色を用いて壊死の状態を確認する。
- **毛細血管レベルでの変化が認められる場合**：アミロイド沈着の鑑別を行うため、コンゴーレッド染色やダイロン染色などさらなる解析が望ましい。
- **大血管における嚢胞状中膜変性（壊死）が疑われる場合**：Alcian Blue 染色を積極的に用いて、中膜変性の程度を確認する。
- **NETs（好中球細胞外トラップ）が形成されている疑いがある場合**：好中球の内皮への接着、またそれに伴う核破砕が観察された場合、NETs 形成を疑い適切な染色法で確認を行う。
- **形質細胞の浸潤が多い場合**：CD138 免疫染色や IgG4/IgG 免疫染色を行い、形質細胞の性質を確認する。特に、高安動脈炎と IgG4 関連疾患の鑑別において有用である。腫瘍性形質細胞が疑われた場合には、 κ 、 λ 免疫染色も役立つ。

- **平滑筋染色**： α -SMA（平滑筋アクチン）やデスミンなどの抗体を用いることで、血管壁の平滑筋を染色し、内膜と中膜の平滑筋の分布を観察することができる。特に血管炎による平滑筋の変性や壊死の進行度を確認する際に有用である。
- **内皮細胞染色**：CD31 や CD34、因子Ⅷ関連抗原などの抗体で血管内皮細胞を染色することで、内皮細胞の変性や剥離を確認する。血管炎による内皮障害は、血栓形成の誘因となり、組織虚血の原因となるため、その評価は重要である。

これらの染色法を適切に用いることで、血管炎の診断における精度を高め、より良い診断を提供することが可能となる。ただし、血管炎の診断は全身症状との整合性も極めて重要であり、臨床医との十分なコミュニケーションを通じて症例ごとの適切な対応を考慮することも合わせて強く求められる。

結語

血管の解剖学的構造と病理学的特徴は、血液循環の維持と全身の恒常性にとって不可欠である。血管炎の進行は、血管壁の構造に影響を与え、動脈や静脈の閉塞や血流不全を引き起こす。血管の各層の構造的な変化や染色による観察手法を用いることで、血管炎の病態を詳細に理解できる。また、これにより、血管疾患の進行度や病変の広がりを診断する手助けとなる。

I. 血管の解剖学的構造

(2) 脈管栄養血管 (vasa vasorum)

東邦大学医療センター大橋病院病理診断科 横内 幸

はじめに

vasa vasorum は「血管の血管」を意味するラテン語であり、日本語では「脈管栄養血管」と訳される。これは、大型の動脈と静脈（親血管）の血管壁を栄養する微小血管ネットワークである¹⁾。vasa vasorum の密度、走行、形態は、正常状態においても動物種や血管部位による差があるが、動脈硬化症や動脈瘤、大動脈解離、炎症などの病的状態に陥るとさらに大きく変化する。これらの疾患で観察される vasa vasorum の形態学的変化を把握するためには、正常の vasa vasorum に関する知識が必要である。以下に、vasa vasorum の種類、走行、分布、壁構造、幼児期からの成長に伴う形態学的な変化について述べる。

vasa vasorum の種類

vasa vasorum には、親血管に酸素と栄養を供給する arterial vasa vasorum と、老廃物や細胞外液を隣接する静脈やリンパ管へと運ぶ venous vasa vasorum および lymphatic vasa vasorum が存在する。さらに、vasa vasorum は、外膜から中膜に入り込む vasa vasorum externa と、親血管の内腔から中膜に入る vasa vasorum interna に大別される¹⁾。

vasa vasorum の走行、分布

vasa vasorum は、内腔からの血液の拡散による栄養が到達しない領域に存在する。Geiringer²⁾によると、大動脈では 0.5mm、冠動脈（左前下行枝起始部）では 0.35mm が内腔からの血液拡散によって到達可能な血管壁の厚さであり、この厚さを critical depth と定義している。この領域は無血管野とされ、それより深部の中膜から外膜は vasa vasorum による栄養補給が必要と考えられてきた。しかし、その後の研究により vasa vasorum は血管壁の厚さではなく、出生時の血管壁の中膜弾性線維層の数に依存することが明らかになった。この現象は動物種間で共通しており、例えば、大動脈中膜の弾性線維層 (lamellar unit) が 29 層未満のマウス、ラット、ウサギなどでは中膜に vasa vasorum が存在しないが、29 層以上の弾性線維層を持つ動物では vasa vasorum が確認される³⁾。ヒトの大動脈は 50 層以上の lamellar unit で構成されているため、vasa vasorum が存在する^{3,4)}。

弾性型動脈である大動脈では、上行大動脈の vasa vasorum externa は腕頭動脈や冠動脈から、胸部下行大動脈では肋間動脈から、腹部大動脈では腸間膜動脈や腰動脈から分布する。arterial vasa vasorum の密度は大動脈弓部で最も高く、遠位に向かうにつれて低下し、腎動脈分岐下の腹部大動脈で最低となる。また、vasa vasorum の密度には水平方向での差もあり、腹側と背側で異なる。

大動脈では、vasa vasorum は縦軸に沿って走行し、一次 vasa vasorum と呼ばれる。そのサイズは細動脈と同程度である。一次 vasa vasorum から分岐した毛細血管サイズの小血管は二次 vasa vasorum と呼ばれ、大動脈の周りを円周方向に走行している。二次 vasa vasorum から vasa vasorum externa として外膜から中膜に入り込む。成人の胸部大動脈では、中膜の深部 2/3 に vasa vasorum externa が存在するといわれている³⁾。一方、腹部大動脈では中膜への vasa vasorum externa の入り込みはほとんど見られない。

vasa vasorum は、正常では吻合を有さない終動脈であり、vasa vasorum が閉塞するとその灌流域の血管壁は梗塞を起こす。実験動物において vasa vasorum を意図的に閉塞させると中膜の内側 1/3 は損傷を受けないが、中膜の中心部のみが壊死することが報告されている⁵⁾。これは、血管壁の栄養が内腔側からの拡散と外膜の vasa vasorum から補給されていることを裏付けており、とりわけ中膜の中心部が脆弱であることを示している。

大動脈以外の中型筋型動脈では、大腿動脈や腎動脈よりも冠動脈の vasa vasorum の密度が高いことが知られている。また、頭蓋では、頭蓋外血管（内頸動脈や椎骨動脈の中枢側）には vasa vasorum が存在するが、頭蓋内の血管では稀あるいは欠如する。頭蓋内動脈では頭蓋外動脈に比べて中膜と外膜が薄く、内弾性板がより厚く有窓性であること、外弾性板が欠如するなどの解剖学的な特性が要因と考えられている⁶⁾。

vasa vasorum の壁構造

ヒト上行大動脈の vasa vasorum の血管径は、 $40.0 \pm 15.5 \mu\text{m}$ (mean $\pm$ SD) であり、その約 75% は $50 \mu\text{m}$ 未満である¹⁾。vasa vasorum のネットワークは、動脈-細動脈-毛細血管と同様の階層をとる。一次 vasa vasorum と二次 vasa vasorum の一部には、血管壁に平滑筋層が含まれているが、内径 $25 \mu\text{m}$ より小さな二次 vasa vasorum では平滑筋形質を有する周皮細胞が被覆している。

年齢による vasa vasorum のリモデリング

新生児期の動脈中膜の厚さは約 0.3mm であるが、成人では約 1.2mm となり、厚さが約 4 倍になる³⁾。血圧の上昇に伴い、内腔からの酸素や栄養の拡散距離も広がり、critical depth も新生児期では約 0.2～0.3mm であったものが、成人では約 0.5mm となる。

新生児期は、大動脈の外膜に存在する vasa vasorum はまばらであるが、4 歳ごろには外膜に vasa vasorum が発達し始め、vasa vasorum が中膜の外側 1/3 まで進展する。10 歳頃までに中膜の中側 1/3、13 歳までに中膜の内側 1/3 にまで到達する³⁾。

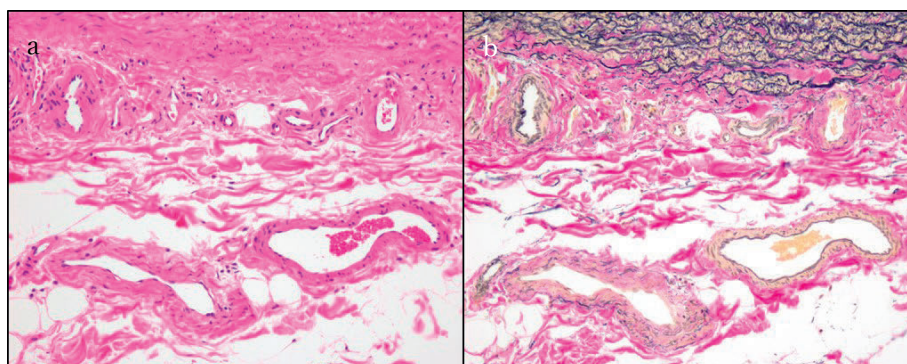


図1 大動脈弓部の外膜に存在する vasa vasorum externa
(a : HE、b : EVG)

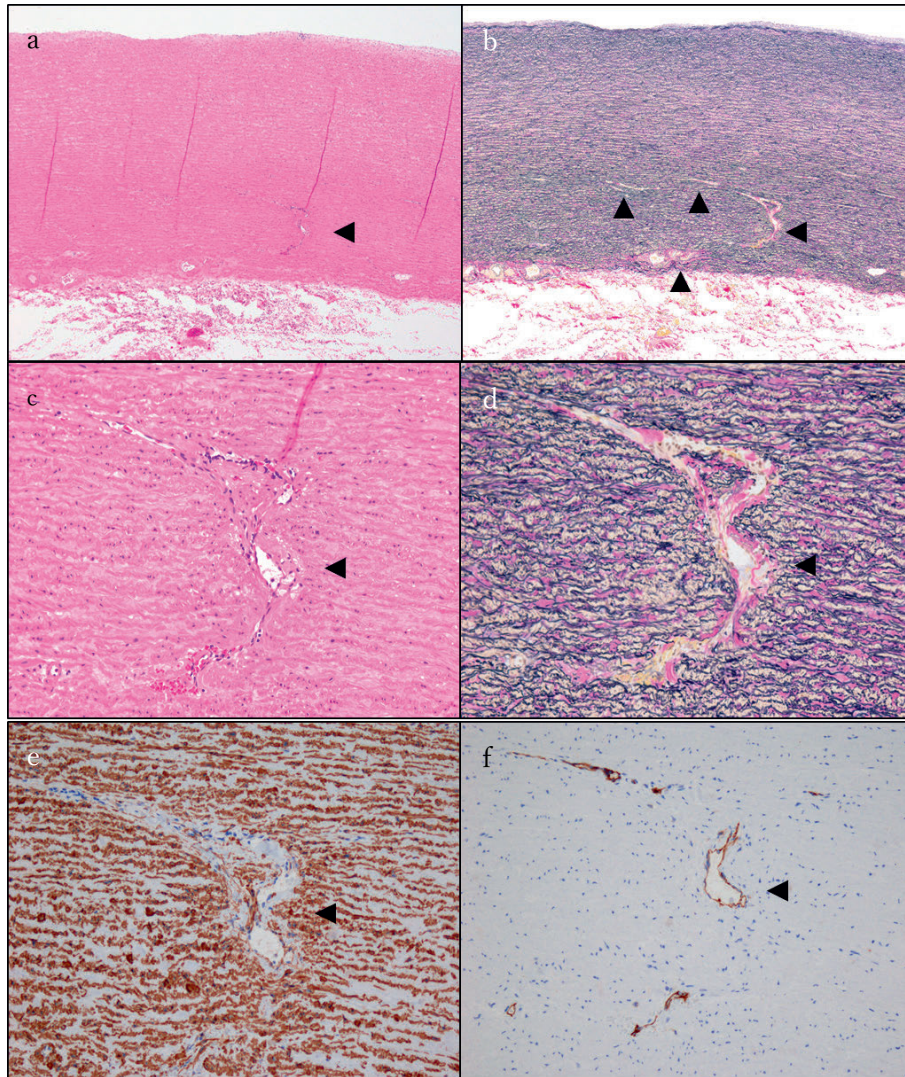


図2 大動脈の中膜を走行する vasa vasorum externa (大動脈弓部)

本例の大動脈の壁厚は 1.75mm で、内膜から約 1 mm 深部の部分に vasa vasorum externa が走行するのが観察される。(a, c : HE、b, d : EVG、e : α -SMA、f : CD31)

○参考文献

1. Phillippi JA. On vasa vasorum: A history of advances in understanding the vessels of vessels. *Sci Adv.* 8: eabl6364, 2022.
2. Geiringer E. Intimal vascularization and atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol* 63:201–11, 1951.
3. Wolinsky H, et al. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res* 20:409–21, 1967.
4. Jadidi M, et al. Mechanical and structural changes in human thoracic aortas with age. *Acta Biomater.* 103:172-188, 2020.
5. Angouras D, et al. Effect of impaired vasa vasorum flow on the structure and mechanics of the thoracic aorta: implications for the pathogenesis of aortic dissection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 17: 468-73, 2000.
6. Yamamoto K, et al. Vasa vasorum: The role in intracranial physiology and pathophysiology. *Surg Neurol Int.* 15:188, 2024.

II. 弾性線維染色

(1) Elastica Masson 染色 Goldner 変法

岐阜大学医学部附属病院病理診断科 宮崎 龍彦
藤田医科大学病理診断センター・病理診断科 小林 一博

○目的・原理

血管炎の形態学的解析には、血管を構成する平滑筋や結合組織、沈着するタンパクの性状を染め分けて観察する必要がある。ここで紹介する Elastica Masson 染色 Goldner 変法 (EMG 染色) は結合組織など間葉系成分を観察するのに最も情報量の多い組織化学染色法である。弾性線維染色として良く使われる Elastica van Gieson 染色では、弾性線維の他は平滑筋と膠原線維がせいぜい染め分けられる程度であるが、EMG 染色は、膠原線維をライトグリーンで薄青緑色に、弾性線維をレゾルシンフクシンで黒紫色に、平滑筋を黄橙色調に、骨格筋を暗赤色に、赤血球を鮮やかな赤橙色に、酸性タンパク質を鮮紅色に、フィブリンを灰色調にと極めて多彩な色彩を呈する。血管炎をはじめ、腎臓・肺・筋組織などの解析に極めて有用な染色である。さらに、EVG 染色は短期間で褪色するが、EMG 染色は褪色しにくいという利点もある。

○準備

a) 検体：FFPE 切片を用いる。剥離防止のため、シランコーティングしたスライドガラスを推奨する。

○試薬

1) 3%重クロム酸カリウム

【再利用可】

重クロム酸カリウム	3 g
蒸留水	100 ml

褐色瓶で常温保管。(使用期限 1 年)

市販品を使っても良い (JAN コード 4517715402815)

2) ワイゲルトのレゾルシンフクシン液 (前田変法)

【再利用可】

調製方法が煩雑なため、市販品の使用を推奨する。(JAN コード 4517715403218, 4517715403225)

4℃保管。(使用期限 4 ヶ月)

3) 3%塩酸アルコール

【再利用不可】

調製に危険を伴うため、市販品の使用を推奨する。(JAN コード 4517715406813, 4517715406820, 4517715406851)

4) ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン

【用時調製・再利用不可】

A 液：95%エタノール	100 ml
ヘマトキシリン	1 g
B 液：塩化第 2 鉄・6 水和物	2 g
蒸留水	95 ml
濃塩酸	1 ml

塩化第2鉄・6水和物2gを蒸留水95mlに溶解後、濃塩酸1mlを加える。

A液、B液とも褐色瓶で常温保管。(使用期限1年)

染色の2時間前にA液・B液を1:1で混合して鉄へマトキシリンとして使用。

市販品を使っても良い(A液:JANコード 4517715403416, 4517715403423, B液:JANコード 4517715403515, 4517715403522)

5) マッソン(ポンソー・キシリジン・酸フクシン)液 【再利用可】

A液:ポンソー・キシリジン 1g

蒸留水 100ml

酢酸 1ml

B液:酸フクシン 1g

蒸留水 100ml

酢酸 1ml

A液・B液を2:1で混合して使用。A液、B液とも褐色瓶で常温保管。(使用期限1年)

市販品を使っても良い(A液:JANコード 4517715401610, 4517715401627, B液:JANコード 4517715402518, 4517715402525)が、内製化したほうがキレイに染まる。

6) リンモリブデン酸・オレンジG液 【再利用可】

リンモリブデン酸 3.5g

オレンジG 2g

蒸留水 100ml

褐色瓶で常温保管。(使用期限1年)

市販品を使っても良い(JANコード 4517715161910, 4517715161927)

7) 2.5%リントングステン酸 【再利用不可】

リントングステン酸 2.5g

蒸留水 100ml

市販品を使っても良い(JANコード 4517715401825, 4514415401818)

8) ライトグリーン液 【再利用可】

ライトグリーン 0.2g

酢酸 0.2ml

蒸留水 100ml

常温保管。(使用期限1年)

市販品を使っても良い(JANコード 4517715408329, 4517715408312)

○方法

① 脱パラ キシレン 5分×3

このタイミングで ③重クロム酸を染色容器に入れ50℃の恒温器で温めておく

純アルコール 3分×2

このタイミングで ⑧鉄へマトキシリン作成

希釈アルコール(90%, 80%, 60%) 数秒ずつ

- ② 流水水洗 3分
 *軽く水気をとる 裏面を拭いて③に入れる
- ③ 3%重クロム酸カリウム 50℃の恒温器内で 60 分 (オレンジ色)
 このタイミングで レゾルシンフクシンを冷蔵庫から室温に出しておく
- ④ 流水水洗 3分
 *軽く水気をとる 裏面を拭いて⑤に入れる
- ⑤ レゾルシンフクシン液 (紫色 箱) 90 分
 *↓ 拭かずに入れる
- ⑥ 3%塩酸アルコール (白ビン) 30～60 秒
- ⑦ 蒸留水で水洗
 *検鏡してレゾルシンフクシン染色性チェック 染色不足なら⑤に戻る。過染なら⑥に戻る
 *戻ったときの時間は適宜調整
- ⑧ 鉄へマトキシリン (2 時間前に調製) 1 分 核が黒く染まる
- ⑨ 流水水洗・色だし 5 分
 *鉄へマトキシリンの色出し時は染色カゴ (or プレパラート) を上下にふってよく洗う
- ⑩ マッソン液 (赤色) 30 秒～40 秒
- ⑪ 1%酢酸 赤色調整 数回出し入れ
- ⑫ リンモリブデン酸・オレンジ G (黄色) 3 分
- ⑬ 1%酢酸 数回出し入れ
- ⑭ 2.5%リントングステン酸 7 分
- ⑮ 1%酢酸 数回出し入れ
- ⑯ ライトグリーン液 10 分 (好みで濃さ調節)
- ⑰ 蒸留水で水洗 あっさりと。
 *色落ちするので長時間しない
- ⑱ 1%酢酸 数回出し入れ
- ⑲ 脱水 70%, 80%, 90%, 95%, 100% (×3) アルコール
- ⑳ 透徹 キシレン ×3 計 15 分
- ㉑ 封入・検鏡

○染色態度

膠原線維はライトグリーンで薄青緑色に、弾性線維はレゾルシンフクシンで黒紫色に、平滑筋は黄橙色調に、骨格筋は暗赤色に、赤血球は鮮やかな赤橙色に、酸性タンパク質は鮮紅色に、フィブリンは灰色調に染色される (図 1～4)。極めて情報量が多い。

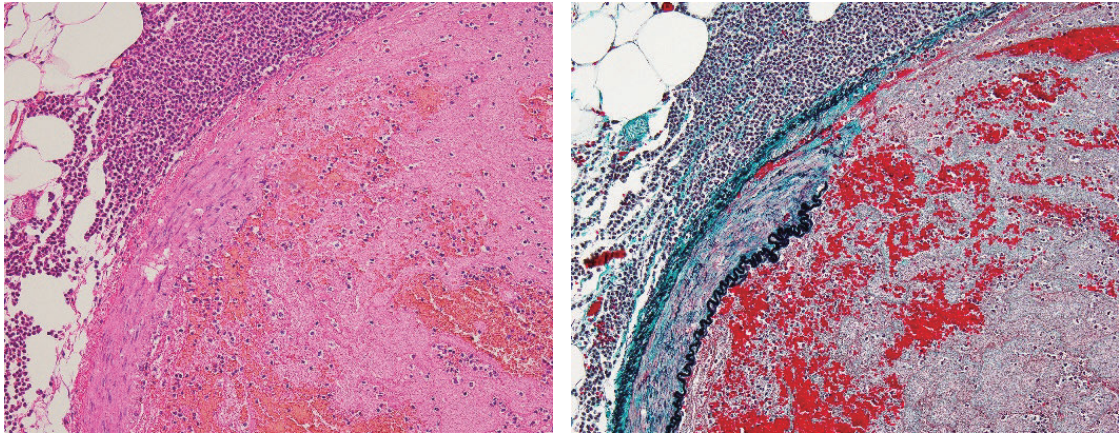


図 1 Segmental arterial mediolysis 症例の動脈瘤病変。EMG 染色では器質化血栓形成と内弾性板の断裂・消失が明らかに観察される。また、中膜平滑筋と膠原線維が色の違いで弁別可能である。

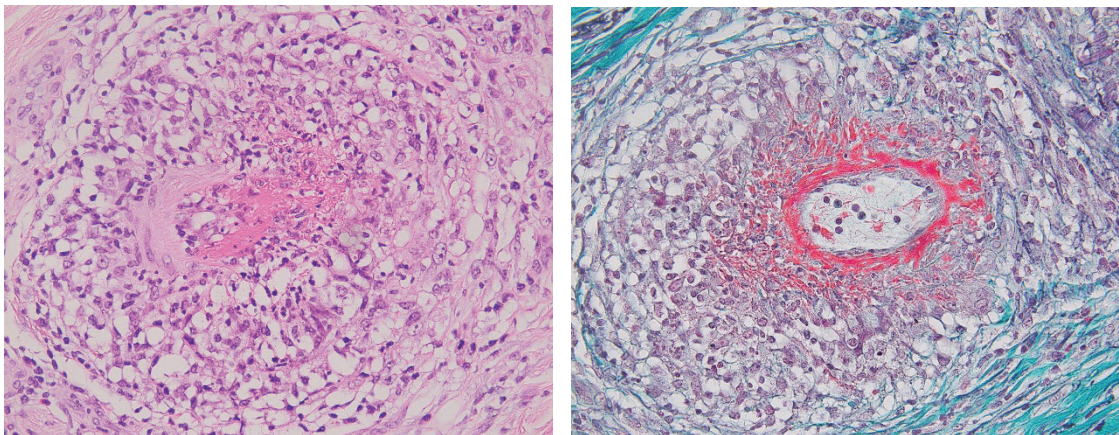


図 2 Microscopic polyangiitis の小動脈炎。EMG 染色ではフィブリノイド壊死が明瞭に描出され、弾性板の破壊・消失も明らかである。

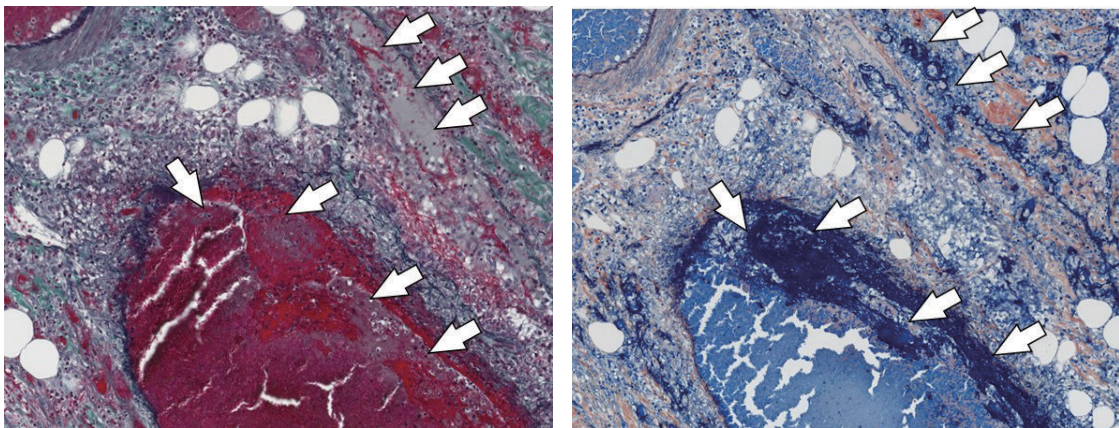


図 3 Thrombotic phlebitis の病変（左 EMG 染色、右 PTAH 染色）。EMG 染色で中央の血管は弾性線維がやや集簇して内弾性板様に見えるが、中膜に繊細な弾性線維がみられ、静脈であることがわかる。EMG 染色で灰色に描出されるフィブリン血栓は PTAH 染色で濃青藍色に描出される（矢印）。

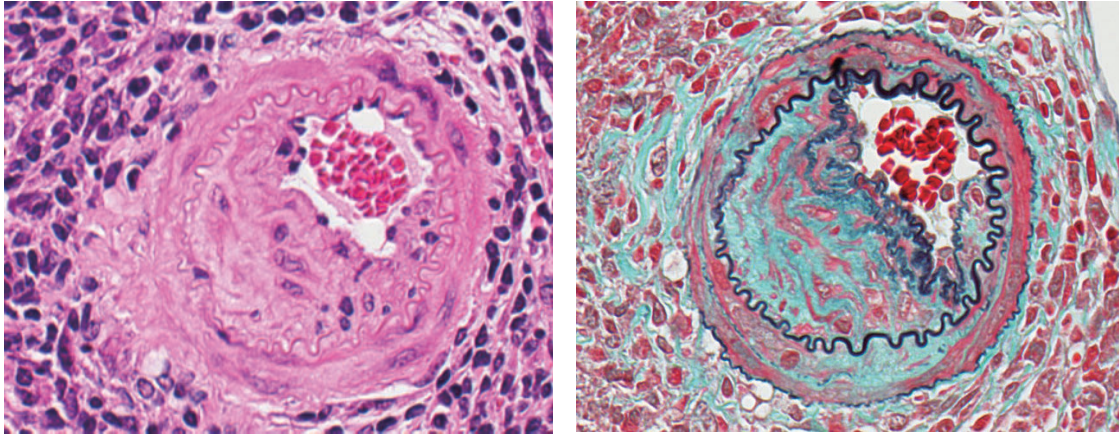


図 4 膠原病モデルマウスの腎臓弓状動脈に見られた動脈炎。EMG 染色では弾性板、著明な内膜肥厚、フィブリノイド変性、中膜の一部線維化、外弾性板の部分的な断裂・消失など豊富な情報を得ることができる。

○参考文献

- 1) 宮崎 龍彦. 血管炎症候群の形態学的診断 tips. 診断病理. 2016;33(1):19-37.
- 2) 山中 宣昭. 腎生検に必要な各種染色法：腎生検病理アトラス 改訂版（日本腎病理協会・日本腎臓学会編）2017; pp32-43, ISBN978-4-88563-286-0
- 3) 渡辺 みか. Elastica-Masson 染色：血管病変の形態学的検討を目的として考案され伝承されてきた優れた染色法. 病理と臨床. 2010;28(3):334-338.
- 4) 高田 多津男, 大崎 博之, 中村宗男. エラスチカ・ゴールドナー染色. 検査と技術 増刊号 病理組織・細胞診のための日常染色法ガイダンス. 2001; 29 (7): 654-657, ISSN:1882-1375.
- 5) 宮崎 龍彦. 実験動物解剖ことはじめ：肝心な固定法と役に立つ染色法のすべて. マウス・ラット モデル作成・解析プロフェッショナル（先端モデル動物支援プラットフォーム編）. 2021; pp81-92, ISBN978-4-7581-2112-5.

II. 弾性線維染色

(2) Elastica van Gieson 染色

独立行政法人国立病院機構 山口宇部医療センター 臨床検査科 山下 大貴・鈴木 佑也
山口大学大学院医学系研究科 医学専攻 病理形態学講座 池田 栄二

○目的

エラスチカ・ワンギーソン (Elastica van Gieson : EVG) 染色は、ワイゲルト染色とワンギーソン染色を組み合わせ、弾性線維、膠原線維、筋線維を染め分けする結合組織に対する染色法である。血管、肺などの弾性線維の豊富な組織の病変あるいは腫瘍の脈管侵襲の有無や深達度の検索などに多く用いられている。ワイゲルト染色により弾性線維を黒紫色に染め、ワンギーソン染色では、酸性フクシンにより膠原線維を赤色に、ピクリン酸により細胞質や筋線維、赤血球を黄色に染める。

○原理

ワイゲルト染色で用いるレゾルシンフクシンは、塩基性フクシンの二量体～四量体からなる大きな分子であり、染色にはこれらと弾性線維の間にファンデルワールス力が強く関与しているものと考えられている。弾性線維は疎水性官能基を側鎖に持つアミノ酸を多数含む親油性の蛋白質であり、親油性色素であるレゾルシンフクシンと疎水結合する。一方、強酸性の染色液中において多くの蛋白質は弾性線維よりも強く正帯電しているため、正荷電するレゾルシンフクシンとは斥力が作用し結合せずに弾性線維が選択的に染色され则认为されている。

ワンギーソン液には 2 種類の分子サイズの異なる色素を用いており、一つの色素は疎な構造の膠原線維に入り込む大きい分子の酸性フクシンである。他の色素は密な構造の筋線維や赤血球などに入り込む小さい分子のピクリン酸であり、各々を染め分ける。

○試薬・調整方法

a) 前田変法レゾルシンフクシン液（武藤化学社）＊冷蔵保存

b) ワンギーソン液

ワンギーソン A 液（飽和ピクリン酸水溶液；武藤化学社）：100mL

ワンギーソン B 液（酸性フクシン水溶液；武藤化学社）：10～15mL

＊A 液に B 液を加え、使用液とする。

c) ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液

ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 1（武藤化学社）＊冷蔵保存

ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 2（武藤化学社）

＊1 液と 2 液を等量混合し、使用液とする。

○方法

- ① 脱パラフィン、脱キシレン、水洗
- ② 前田変法レゾルシンフクシン液 45 分
*室温に戻して使用
- ③ 100%アルコールで分別 余分な染色液を除去
- ④ 流水水洗 5 分
- ⑤ ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液 10 分
- ⑥ 流水水洗 10 分
- ⑦ ワンギーソン液（室温） 10 分
- ⑧ 水洗（余分な染色液を落とす程度）
- ⑨ 脱水、透徹、封入

○染色時の注意点

- ・ワイゲルトの鉄ヘマトキシリン液は、調整後の時間経過により共染が増すので使用時調整が望ましい。
- ・ワンギーソン染色の分別では、ピクリン酸および酸フクシンが水に易溶なので、瞬時に終わらせる。

○染色態度（図 1）

弾性線維、粘液：黒紫色

膠原線維：赤色

核：黒褐色

細胞質、筋線維、赤血球：黄色

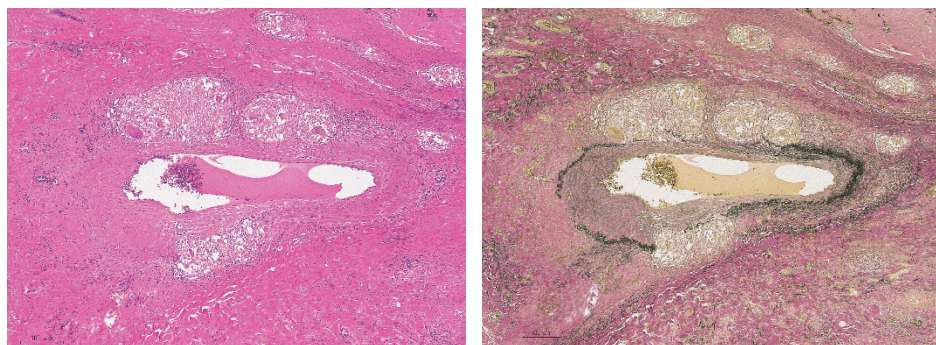


図 1. サルコイドーシス症例の肺切除材料（左：HE 染色、右：EVG 染色）

肺動脈に肉芽腫性炎症が認められる。EVG 染色により血管壁弾性板の断裂が確認され、肉芽腫性血管炎と診断される。

○参考文献

- 1) 富永 晋：エラスチカ・ワンギーソン染色. 水口國雄（編）：Medical Technology 別冊最新染色法のすべて, 18-20, 医歯薬出版, 東京, 2011.
- 2) 外岡暁子：光顕の標本の作製と観察 6) EMG 染色 (EVG 染色) の実際とポイント：腎と透析 82(増刊): 67-70, 2017.
- 3) 町田浩美, 磯崎 勝：elastica van Gieson 染色法. 病理検査技術教本, 131-132, 丸善出版, 2017.

II. 弾性線維染色

(3) その他の弾性線維染色 (Movat 染色を含めて)

九州大学大学院医学研究院病理病態学 鬼丸 満穂

東京女子医科大学病理学 倉田 厚

血管炎を含めた血管病変の組織診断において弾性線維の状況を把握する特殊染色は極めて重要である。一般的に汎用される弾性線維染色には、Elastica van Gieson 染色や Elastica Masson 染色がある。一方で、その他の弾性線維染色として、弾性線維を青に染め出すビクトリアブルー染色や、茶褐色に染め出すオルセイン染色が知られている。いずれも弾性線維の他に B 型肝炎ウイルスの HBs 抗原を染め出すという特徴を有しており、ウイルスの同定や癌の血管侵襲の確認に有用である一方、血管組織の情報が弾性線維に限られるため、血管病変を診断する目的で積極的に行われる染色法ではない。本稿では、血管病変の診断に欠かせない「弾性線維」「血管平滑筋線維（細胞）」「膠原線維」「線維素」の情報に加え、「粘液（酸性ムコ多糖）」の情報をも同一切片で得ることが可能な Movat's Pentachrome 染色について言及し、プロトコルを提示する。

Movat's Pentachrome 染色

○目的・原理

弾性線維を、黒を基調とした染色により認識する方法として、Weigert（ワイゲルト）の弾性線維染色と Verhoeff（ヴァーヘフ）の弾性線維染色が知られる。前者はレゾルシンフクシンで黒（黒紫）色に、後者はヘマトキシリン・ヨウ素複合体で黒（黒青）色に弾性線維を染色する。血管病変の組織診断のための特殊染色として汎用される Elastica van Gieson 染色や Elastica Masson 染色は、Weigert の弾性線維染色を軸に、血管平滑筋や膠原線維などを識別するための染色を追加した多重染色法である。一方、Henry Zoltan Movat により開発された Movat's Pentachrome 染色は、Verhoeff の弾性線維染色に加え、多重染色による識別可能な組織を粘液（酸性ムコ多糖）にまで広げた染色法である¹⁾。つまり、Movat's Pentachrome 染色により細胞核、弾性線維、膠原線維、細網線維、細胞質（平滑筋線維）、粘液（酸性ムコ多糖）、線維素を五色により染め分けることが可能で、このことが Pentachrome 染色と呼ばれる理由である。Movat's Pentachrom 染色は 1972 年に HK Jr Russell により改良され、作業時間の短縮や染色態度の安定性の向上が図られている²⁾。

Movat's Pentachrome 染色は、上記の染色特性から大血管炎を含めた大動脈病変の組織診断に対し特に有用性を発揮すると考えられ、大動脈中膜の弾性線維の断裂、消失や血管平滑筋細胞の脱落とそれに伴う中膜の線維化や粘液変性の状況を一つの標本上で同時に確認することが可能となる。ただし、Russell により改良されたとはいえ、プロトコルが複雑かつ作業工程に長時間を要することや、五色で鮮明に組織を区別するための分別工程に労を要するなどの理由で、病理診断のための特殊染色項目として導入している施設は極めて少なく、研究用に限られるのが現状のようである。

Movat's Pentachrome 染色は、Verhoeff の弾性線維染色の過程で、弾性線維を黒（黒青）色に、鉄ヘマトキシリンで核を黒（青黒）色に染める。この弾性線維染色の原理は、ヘマトキシリン・ヨウ素複合体と

弾性線維との強い親和性によるものとされ、親和性の化学的本質は水素結合と考えられている^{3,4)}。続いて、アルシアンブルーで粘液を青色に染める。さらに Masson Trichrome 染色と同様にビーブリッヒスカーレット・酸性フクシンにより細胞質や平滑筋線維を赤色に、線維素を鮮紅色に染める。最後に、膠原線維を Saffron（サフラン）を用いて黄色に染める。なお、サフランは高価であるため本稿で紹介するプロトコルでは同じ黄色素である Tartrazine（タートラジン）を用いた方法を示した。

○準備

10%ホルマリン固定パラフィン包埋試料を 4 μ m 以下の厚さに薄切

○試薬

- ・ 5%ヘマトキシリン液（ヘマトキシリンを 96%エタノールで溶解）
- ・ 2%塩化第二鉄水溶液（塩化第二鉄を蒸留水で溶解）
- ・ 10%塩化第二鉄水溶液（塩化第二鉄を蒸留水で溶解）
- ・ ルゴール液
- ・ 5%チオ硫酸ナトリウム水溶液（チオ硫酸ナトリウムを蒸留水で溶解）
- ・ 1%アルシアンブルー溶液、PH2.5（アルシアン青 8GX を 3%酢酸溶液で溶解）
- ・ 1%ビーブリッヒスカーレット溶液（ビーブリッヒスカーレットを 1%酢酸溶液で溶解）
- ・ 1%酸フクシン溶液（酸フクシンを 1%酢酸溶液で溶解）
- ・ 5%リントングステン酸水溶液（PTA）（リントングステン酸を蒸留水で溶解）
- ・ 5%リンモリブデン酸水溶液（PMA）（リンモリブデン酸を蒸留水で溶解）
- ・ 1.5%タートラジン水溶液（タートラジンを蒸留水で溶解）

○方法

1) Verhoeff の弾性線維染色用希釈標準液の調整

- ・ 5%ヘマトキシリン液、10%塩化第二鉄溶液、ルゴール液を 2 : 1 : 1 の割合で混合

2) ビーブリッヒスカーレット・酸フクシン混合液の調整

- ・ 1%ビーブリッヒスカーレット溶液と 1%酸フクシン溶液を 4 : 1 の割合で混合

3) 分別用溶液（differentiating solution）の調整（PTA+PMA）

- ・ 5%PTA と 5%PMA を 1 : 1 で混合

4) プロトコル

脱パラ + 水洗（蒸留水）

↓

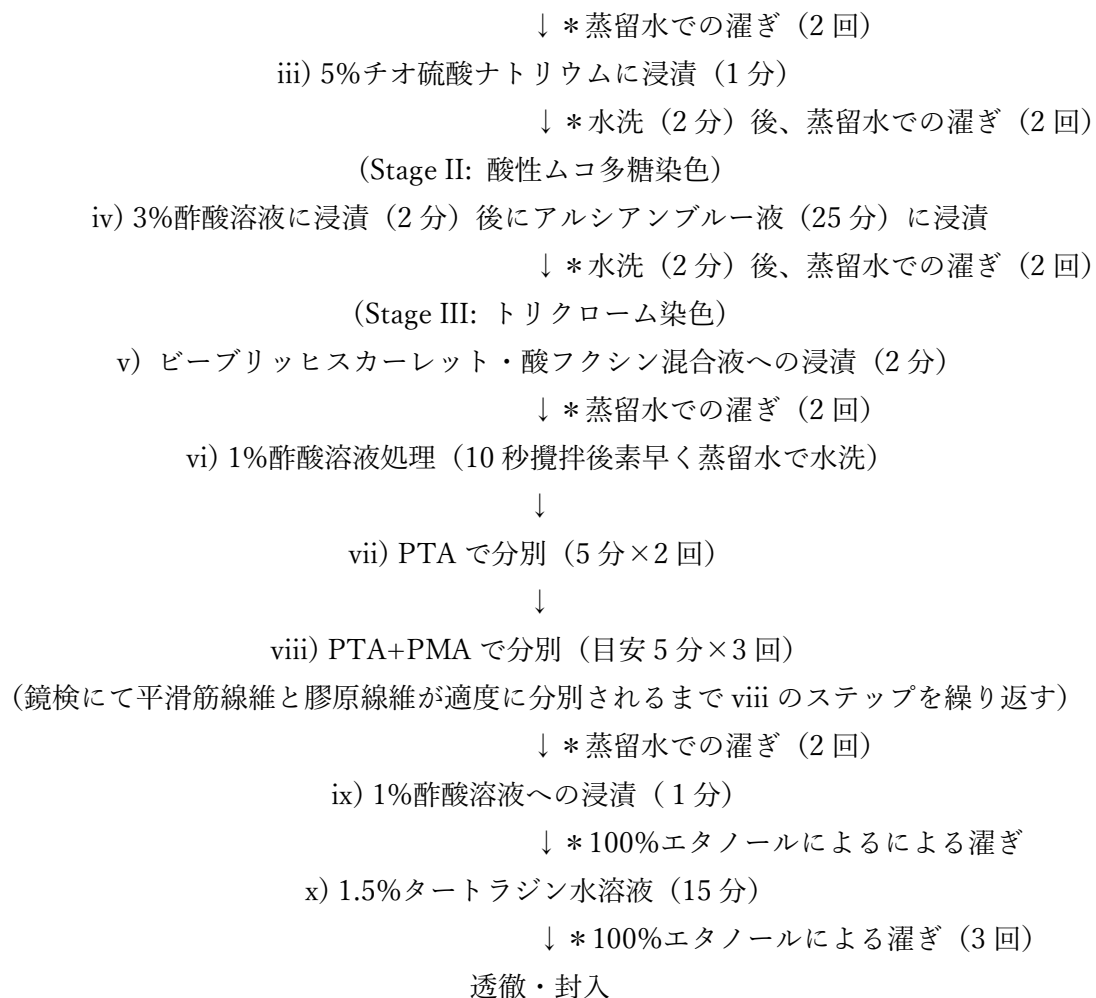
（Stage I: 弾性線維染色）

i) 弾性線維染色用希釈標準液に浸漬（20 分）

↓ * 流水で余分な染色液の除去

ii) 2%塩化第二鉄溶液への浸漬と水洗

（鏡検にて弾性線維と核以外の非特異的反応が脱色され適切な染色状態が得られるまで iii のステップを繰り返す。目安 15～20 回）



注) アルシアンブルーの鮮青色が明瞭でない場合、stage I と stage II を入れ替えることで良好な染色態度を得られることがある。

(写真 A)

○染色態度

核・弾性線維：黒色（黒青色）

膠原線維：黄色

細網線維：黄色

平滑筋線維、細胞：赤色

線維素：鮮紅色

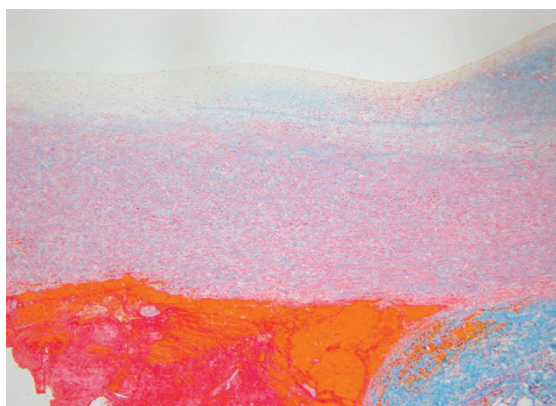
酸性ムコ多糖：鮮青色



(写真 B)



(写真 C)



(写真 D)



(写真 E)

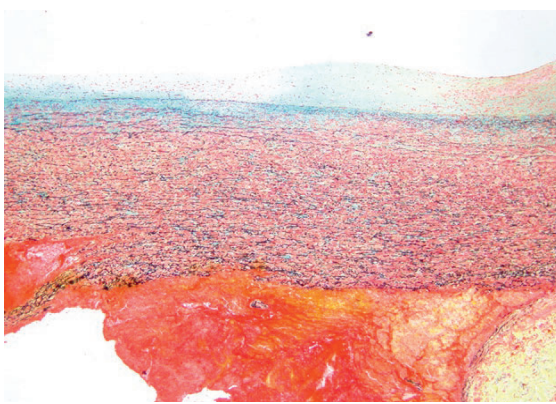
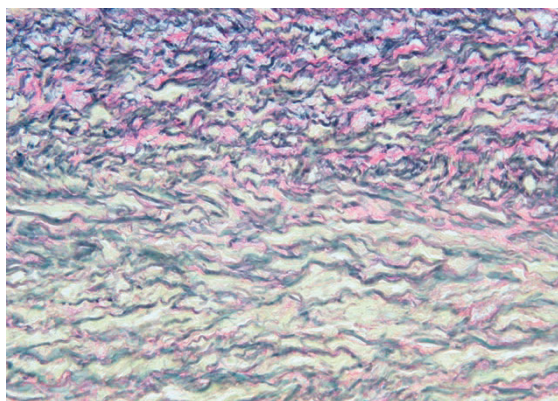
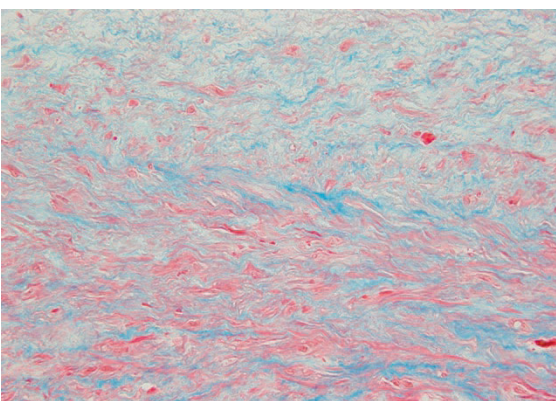


写真 A-E) 急性大動脈解離症例の大動脈組織弱拡大像 (×40) A) HE 染色 B) Elastica van Gieson (EVG) 染色 C) Masson Trichrome (MT) 染色 D) Alcian Blue (AB) 染色 E) Movat's Pentachrome (MP) 染色 MP 染色で、偽腔内血栓のフィブリンが鮮紅色、解離壁外膜膠原線維が黄色、中膜弾性線維が黒色、中膜平滑筋が赤色、内膜側中膜内の粘液が鮮青色に染色される。

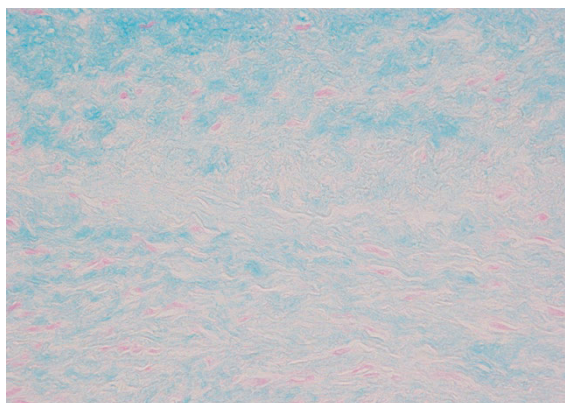
(写真 F)



(写真 G)



(写真 H)



(写真 I)

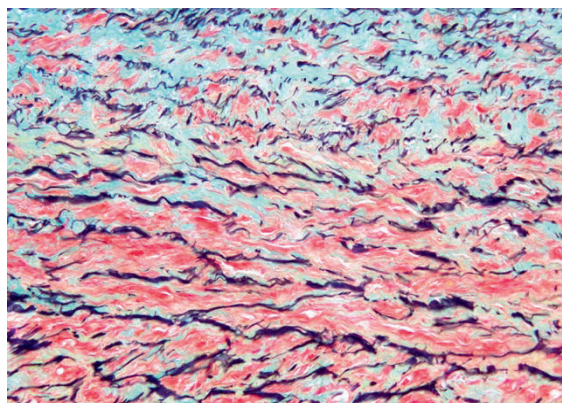
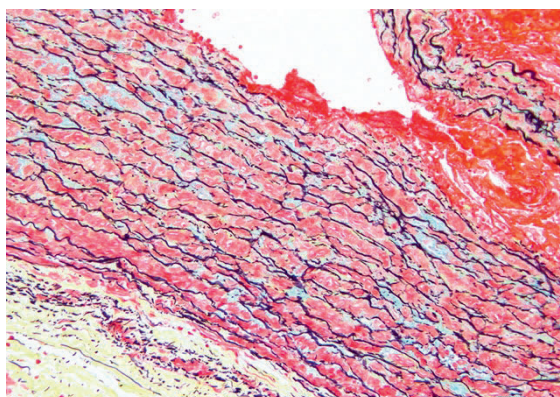


写真 F-I) 大動脈中膜強拡大像 (×400) F) EVG 染色 G) MT 染色 H) AB 染色 I) MP 染色

(写真 J)



(写真 K)

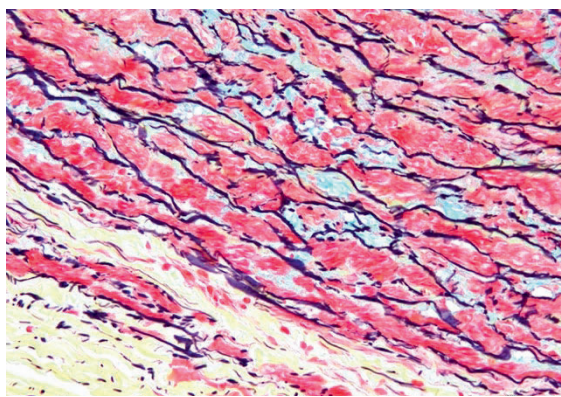


写真 J, K) 解離壁強拡大像 (MP 染色)、J (×200), K (×400)

写真 B-I の特殊染色標本の比較から、大動脈病変の診断に有用な EVG, MT, AB 染色の情報が、MP 染色により同一切片上で評価可能であることが分かる。MP 染色標本 (写真 I-K) では、中膜組織の弾性線維の断裂、消失、平滑筋細胞の脱落と粘液貯留の所見が明らかである。

○参考文献

1. Movat HZ, et al. Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. AMA Arch Pathol. 60: 289-95, 1955
2. Russell HK Jr A modification of Movat's pentachrome stain. Arch Pathol. 94: 187-91, 1972
3. Kazlouskaya V, et al. The utility of elastic Verhoeff-Van Gieson staining in dermatopathology. J Cutan Pathol. 40:211-25, 2013
4. Piccinin MA et al. Histology, Verhoeff Stain. StatPearls [Internet], 2023

Ⅲ. 免疫組織化学・免疫蛍光染色

(1) 浸潤細胞 characterization (Th1/T-bet, Th2/GATA3, Th17/ROR- γ t, Treg/Foxp3)

信州大学学術研究院医学系医学部病理組織学 菅野 祐幸

○目的

CD4 陽性 T 細胞の多くは、ヘルパーT 細胞 (Th) として様々な免疫調節機能を担っているが、サイトカイン分泌を特徴とするサブセットに区分されている。すなわち、Th1 細胞は IFN γ や TNF α などのサイトカインを産生し、細胞傷害性 T 細胞の分化を促すとともに炎症局所に浸潤するマクロファージや好中球を活性化させる。また抗体産生細胞を誘導する場合には IgG1 や IgG3 の産生を誘導する。これに対し、Th2 細胞は IL-4, IL-5 などを産生し、B リンパ球の IgG4, IgE 産生細胞への分化を促進するとともに、好酸球の分化誘導や炎症病変局所に浸潤した好酸球の活性化に寄与する。さらに Th17 細胞は IL-17 ファミリーや IL-21, IL-22 などのサイトカインを産生し、様々な自己免疫疾患の進行に関与することが明らかとなった。また Treg 細胞は IL-10 や TGF β などの免疫抑制性サイトカインを産生し、免疫反応の抑制をもたらす。

したがって、炎症病変局所に浸潤する CD4 陽性 T 細胞のサブセットの割合を明らかにすることは、当該炎症病変の免疫病態の把握に有用であるとともに、発症機序や病勢判断に大きな示唆を与えることになる。末梢血中の T 細胞サブセットの解析には、産生されるサイトカインを標的にしたフローサイトメトリーが一般的に用いられるが、炎症病変局所の解析を目的として組織切片を用いて浸潤リンパ球でのサイトカイン産生を検討する場合には、細胞膜やわずかな細胞質での陽性所見の判断に難渋することになる。これに対し、これら各 Th サブセットへの分化に際して作用するマスター転写制御因子の発現を検討する免疫組織化学では、発現は核に局在するため陽性所見の判断が容易となる。ここでは、それぞれ Th1, Th2, Th17, Treg 細胞のマスター転写制御因子である、T-bet, GATA-3, ROR γ t, Foxp3 を対象とした免疫組織化学のプロトコルを紹介する。

○準備

a) 検体：FFPE 切片を使用。剥離防止のため、シランコーティングしたスライドガラスを用いる。

○試薬

a) 抗原賦活化バッファー

1) 10 mM sodium citrate buffer (pH 6)

クエン酸一水和物 10.5 g

水酸化ナトリウム 5.4 g

蒸留水に溶解して 1L にメスアップ、これを 5 倍濃縮保存液とする。

使用時に蒸留水で 5 倍希釈。

2) 10 mM Tris/ 1 mM EDTA buffer (pH 9) and 10% glycerol

Tris aminomethane 1.21 g

EDTA $\cdot$ 2Na 0.37 g

適当量の蒸留水に溶解し、pH 9.0 に調整後、900 mL にメスアップする。

使用時に 1/9 volume のグリセロールを加え、80°C に加温しておく。

b) 一次抗体希釈液：1%BSA/PBS

Albumin, from Bovine Serum, Fraction V, pH 7.0 (Fuji-film-Wako Cat# 019-27051)

PBS に溶解 (1% w/v)

c) 一次抗体

Anti-T-bet antibody (mouse monoclonal IgG1, clone 4B10: Abcam Cat# ab91109)

Anti-GATA-3 antibody (mouse monoclonal IgG1, clone OTI8H4: Novus Bio. Cat# NBP2-45810) *1

Anti-ROR γ t antibody (mouse monoclonal IgG2a, clone 6F3.1: Millipore Cat# MABF81)

Anti-Foxp3 antibody (rabbit monoclonal IgG, clone 1054C: R&D systems Cat# MAB8214)

d) 二次抗体ポリマーキット

NovoLink™ polymer kit (Peroxidase-labeled Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG: Leica Bio. Cat# RE7200-K)

e) 封入剤

EXCEL mount 480 (ファルマ Cat# 308-600-3)

○方法*1

操作	試薬	反応条件
脱パラ	キシレン/エタノール	
水洗	水道水	3～5 分
内因性ペルオキシダーゼ阻害	0.3%過酸化水素/メタノール	室温 30 分
水洗	水道水	3～5 分
抗原賦活化	T-bet, ROR γ t: sodium citrate buffer (pH6) Foxp3: Tris-EDTA buffer/glycerol (pH9)	Microwave oven: 600 W 20 min Pressure cooker: 110°C 18 min
洗浄	PBS	5 分×3 回
一次抗体	Anti-T-bet antibody (1:500) Anti-ROR γ t antibody (1:1,000) Anti-Foxp3 antibody (1:1,000)	4°C overnight
洗浄	PBS	5 分×3 回
二次抗体	NovoLink™ polymer kit	メーカーの説明書に従う
洗浄	PBS	5 分×3 回
発色	3,3'-diaminobenzidine/アジ化ナトリウム /過酸化水素	
水洗	水道水	3～5 分
核染	ヘマトキシリン	～10 秒*2
水洗	水道水	3～5 分
脱水・透徹	エタノール/キシレン	
封入	EXCEL mount 480	

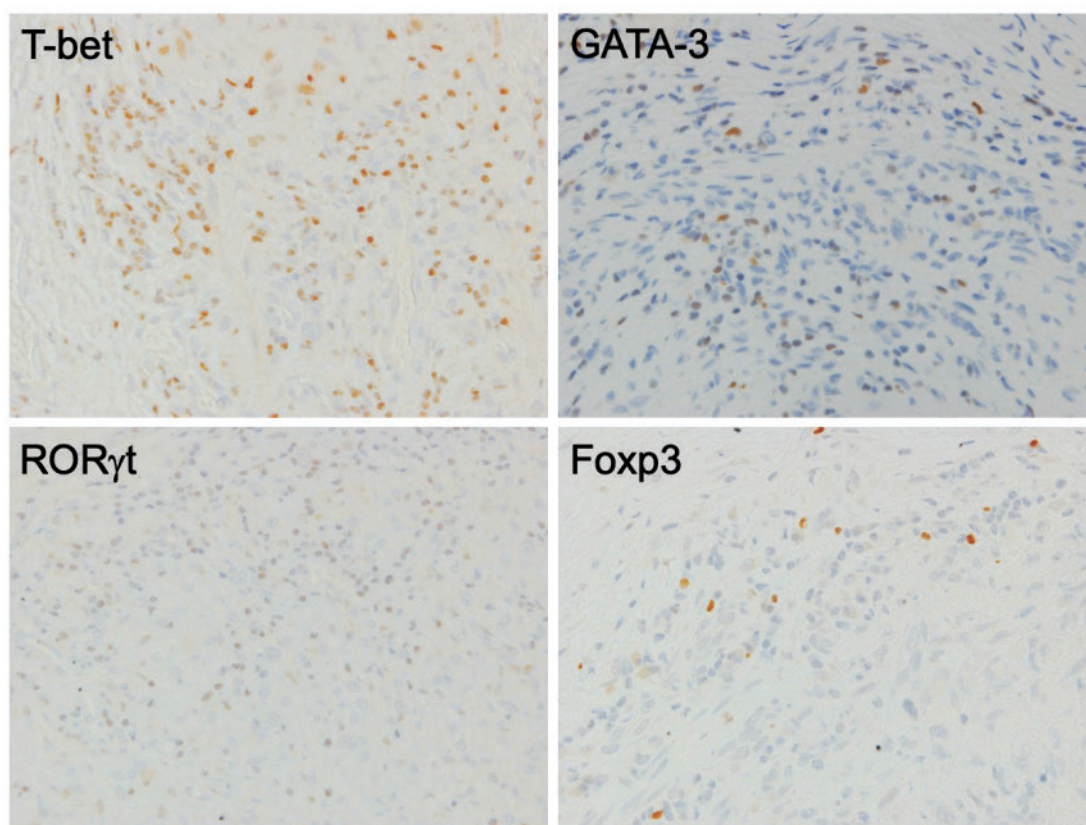
*¹GATA-3 の免疫組織化学は乳腺上皮や尿路上皮の同定を目的として外科病理診断でも頻用されており、automated immunohistochemical stainer (BOND-III; Leica Bio.など)を使用して既存のプロトコルに沿って施行するのがよい。

*²核に発現する転写因子の免疫組織化学であり、短時間で淡く染色する。

○染色態度

巨細胞性動脈炎の側頭動脈生検組織を用いた。核に限局した褐色の発色となる。

自動染色装置を使用した GATA-3 では核染が強めとなっている。



○参考文献

1. Szabo SJ, et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell 100:655–669, 2000.
2. Zheng W, et al. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell 89:587–596, 1997.
3. Ivanov II, et al. The orphan nuclear receptor RORγt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. Cell 126:1121–1133, 2006.
4. Hori S, et al. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 299:1057–1061, 2003.
5. Nicastro M, et al. Fibrocytes in chronic periaortitis: A novel mechanism linking inflammation and fibrosis. Arthritis Rheumatol. 71:1913-1922, 2019.

6. Sorrelle N, et al. Improved multiplex immunohistochemistry for immune microenvironment evaluation of mouse formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Immunol.* 202:292-299, 2019.
7. Satomi H, et al. Predominance of T-bet-positive Th1 cells in infiltrating T-lymphocytes in most of active arteritis lesions of giant cell arteritis. *Virchows Arch.* 486:267-275, 2025.

Ⅲ. 免疫組織化学・免疫蛍光染色

(2) 平滑筋細胞 characterization (α -SMA, h-caldesmon)

東京女子医科大学病理学 倉田 厚

○目的・原理

現状、血管壁の平滑筋は、分化型（収縮型）平滑筋と脱分化型（合成型/分泌型）平滑筋に二分され、中膜には分化型が、内膜には脱分化型が存在しているとされている¹⁾。一般に、中膜の分化型平滑筋は α -SMAに加えて desmin、smoothelin 等分化型マーカーを発現するが、内膜の脱分化型平滑筋は α -SMAは発現するものの desmin、smoothelin 等分化型マーカーを発現せず²⁾、代わりに増殖能・移動能・酵素等の合成分泌能を獲得する¹⁾。

しかしながら、我々は、内膜の平滑筋は一様に脱分化したものではなく、 α -SMA 陽性細胞を分母としての h-caldesmon 陽性率の差異があり（0～80%程度）、h-caldesmon はアクチン・ミオシンに關与する収縮関連蛋白であるため、その陽性率が高いほど物理的に脂質コアの増大を防ぐと想定され、安定化プラークの指標になると提言してきた³⁾。

次に、この陽性率の差異は、プラーク安定化の原因か結果が問題となるが、この陽性率の差異は冠動脈にて、いわゆるプラーク不安定化の指標とされる線維性被膜の薄さや脂質コアの増大よりも、心筋梗塞の発生に關していたこと³⁾、また頸動脈内膜剥離術検体において、この陽性率の差異は同一標本なら脂質コアの遠近でほぼ差異がなく、陽性率が低いことがその後数年以内の全身動脈硬化疾患発生と關することなどから⁴⁾、プラーク安定化の原因と考えられる。

同じ高安動脈炎でも、時相を経るに従って内膜 h-caldesmon 陽性率が上昇する傾向があるため⁵⁾、中膜から脱分化して流入した平滑筋が、時を経るに従って徐々に分化していくと考えられ、この分化速度の個人間差異（プラークの安定/不安定化にも關わる）は、先天的な体質ないしは後天的な栄養・ストレス等によって規定されるものと推察される。

なお、calponin も h-caldesmon と同様の染色態度を示し、中膜のみならず内膜でも種々の程度に陽性となり、安定プラークで陽性率が高まる。一方で、fibroblast activation protein α (FAP α) は内膜のより脱分化した平滑筋のみに陽性となり不安定プラークで陽性率が高まる⁶⁾。Calponin や FAP α の免疫染色は標本が酸で脱灰されると陽性像が得られにくく、EDTA 脱灰が望ましい。 α -SMA、h-caldesmon の免疫染色も EDTA 脱灰が望ましいものの、酸脱灰でも陽性像は得られる。

ここでは、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) 切片を用いた α -SMA、h-caldesmon の免疫染色プロトコルを紹介する。

○準備

- 検体：FFPE 切片を用いる。剥離防止のため、シランコーティングしたスライドガラスを用いる。
- 抗原の賦活化：一次抗体の種類に応じて、抗原賦活化バッファの種類や賦活化条件などの検討が必要である。

○試薬（以下はあくまで一例）

a) 抗原賦活化バッファー：10 mM クエン酸緩衝液 (pH6) …h-caldesmon に用いる。α-SMA には不要。

A 液：クエン酸・一水和物 2.10 g を蒸留水 100 ml に溶解する。

B 液：クエン酸三ナトリウム・二水和物 2.94 g を蒸留水 100 ml に溶解する。

A 液 18 ml と B 液 82 ml を混合し、これに蒸留水 900 ml を加え必要量使用とする。

残りは 4℃にて保存可能。

b) ブロッキング剤

0.3% 過酸化水素メタノール

30%過酸化水素（和光・関東化学）をメタノールにて 100 倍にして使用する。

必要量を工事調整する。

c) 一次抗体

Anti-α-SMA antibody (Cat# 1A4, monoclonal mouse IgG, Dako)

Anti-h-caldesmon antibody (Cat# h-CD, monoclonal mouse IgG, Dako)

d) 二次抗体

EnvisionTM+ Dual Link peroxidase (Dako)

e) ペルオキシダーゼ反応

3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB+ Substrate Chromogen System, Dako)

e) 封入剤

非水溶性封入剤（マリノール：武藤化学，M・X：松浪硝子工業）

○方法

操作	試薬	反応条件
脱パラ	キシレン	10 分×3
	無水エタノール	10 分×3
ブロッキング	0.3% 過酸化水素メタノール	室温 15 分
洗浄	水洗後蒸留水	簡単に
賦活化（h-caldesmon のみ）	10 mM クエン酸緩衝液 (pH6)	オートクレーブ 121℃ 10 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
ブロッキング	1% dry skim milk in PBS	室温 10 分
一次抗体	余分な 1% dry skim milk を払い落して一次抗体を 2~3 滴 滴下する Anti-α-SMA antibody (1:500) Anti-h-caldesmon antibody (1:50)	室温 60 分 室温 180 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
二次抗体	EnvisionTM+ Dual Link peroxidase	室温 40 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
ペルオキシダーゼ反応	DAB+ Substrate Chromogen System	3 分
洗浄	PBS	5 分

核染色	Mayer's hematoxylin	5～10 分
色出し	流水水洗	10 分
脱水	無水エタノール	3 分×4
透徹	キシレン	3 分×3
封入	非水溶性封入剤で封入	

○染色態度（図 1, 2）

図 1, 2 はそれぞれ同一の冠動脈であり、図 1, 2 いずれも、左上が冠動脈内腔、右下が中膜である。

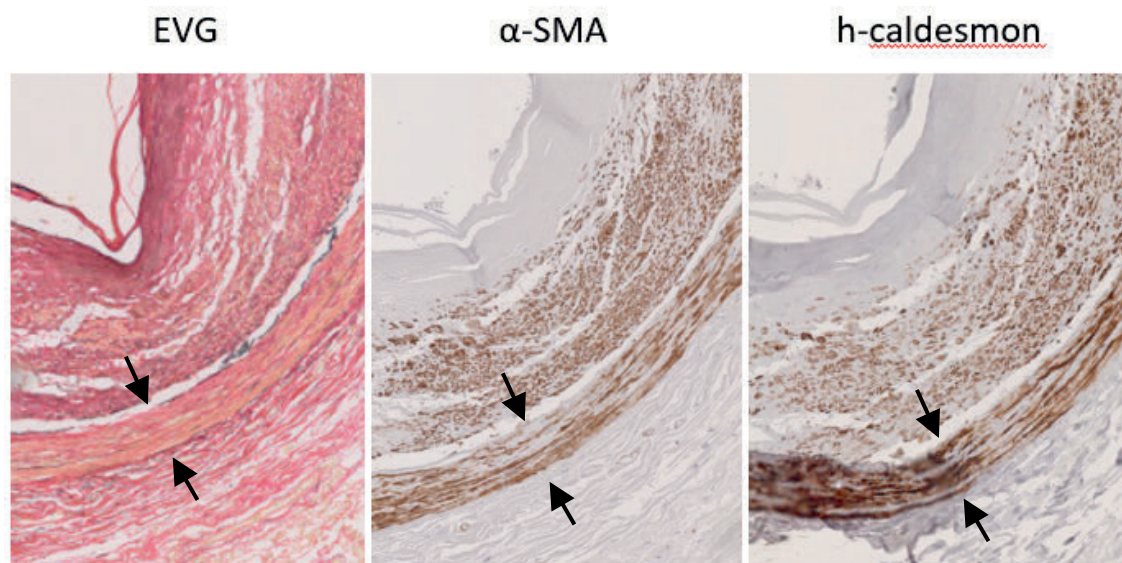


図 1. α -SMA で陽性となる、中膜（矢印間）・内膜平滑筋のうち、h-caldesmon にて、内膜でも大部分が陽性となっている。安定プラークに合致する。

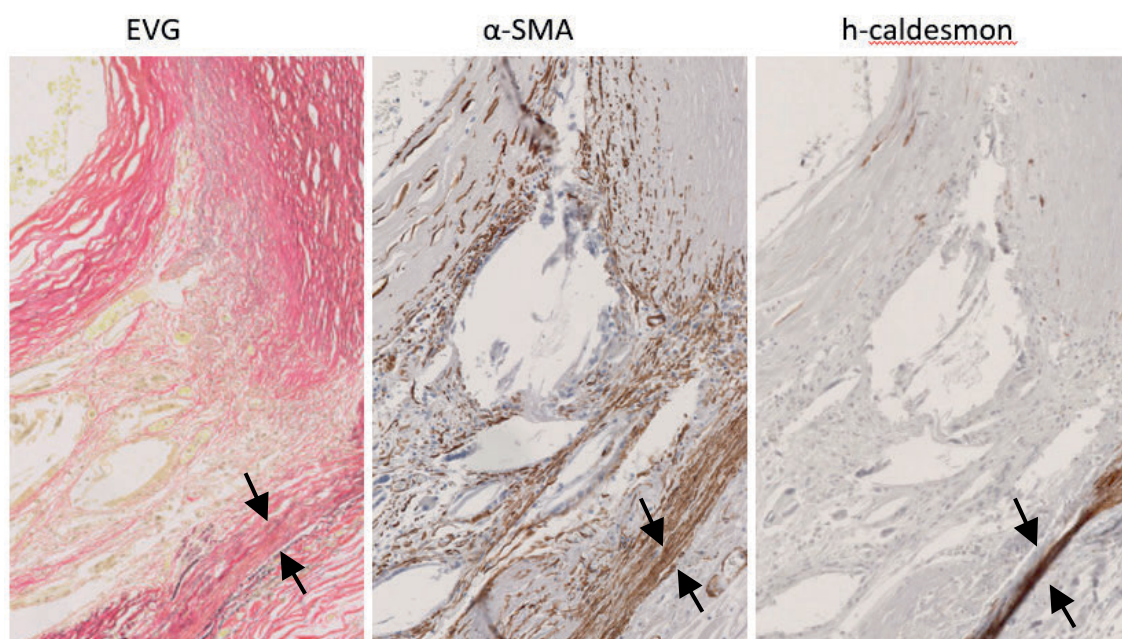


図 2. α -SMA で陽性となる、中膜（矢印間）・内膜平滑筋のうち、h-caldesmon にて、中膜平滑筋は陽性であるが内膜平滑筋は大部分が陰性となっている。不安定プラークに合致する。

○参考文献

1. Elmarasi M, et al. Phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis, hypertension, and aortic dissection. *J Cell Physiol.* 239(4):e31200, 2024.
2. Bruijn LE, et al. Extreme Diversity of the Human Vascular Mesenchymal Cell Landscape. *J Am Heart Assoc.* 9:e017094, 2020.
3. Horita A, et al. Immaturity of smooth muscle cells in the neointima is associated with acute coronary syndrome. *Cardiovasc Pathol.* 24:26-32, 2015.
4. Hashimoto H, et al. Smooth muscle immaturity in the carotid arterial neointima as a prognostic marker for systemic atherogenic cardiovascular events in the Asian male. *Int J Clin Exp Pathol.* 8:14630-14639, 2015.
5. Kurata A, et al. Difference in immunohistochemical characteristics between Takayasu arteritis and giant cell arteritis: It may be better to distinguish them in the same age. *Mod Rheumatol.* 29:992-1001, 2019.
6. Kurata A, et al. Smooth muscle differentiation of coronary intima in autopsy tissues after sirolimus-eluting stent implantation. *Cardiovasc Pathol.* 66:107554, 2023.

Ⅲ. 免疫組織化学・免疫蛍光染色

(3) 梅毒トレポネーマの検出

愛媛大学大学院医学系研究科解析病理学 倉田 美恵
北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 西端 友香

○目的・原理

本稿では感染性動脈炎、特に近年若年層で急増している梅毒感染症の晩期合併症として重要な、梅毒関連大動脈炎についてその形態的特徴と病原体検出のための免疫染色法について述べる。

本邦において梅毒感染者は 1948 年からの調査開始以降大幅に減少し続け 1990 年代～2000 年代は感染者数が少ない状態が長く続いていたが、2011 年より上昇に転じ、特に 2021 年からは急増している¹⁾。20 代を中心とした感染が顕著であり増加傾向が続くと考えられていることから、今後、診断の機会が高まると予想される。

梅毒の病原菌である梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum subspecies pallidum: T. pallidum*) は長さ 6～20 μm のらせん状の菌体をもつ。感染経路は性行為に加え、梅毒に罹患した妊婦からの胎盤を通じた母子感染によって胎児が感染し、先天性梅毒を起こす可能性がある。感染後約 3 週で無痛性の初期硬結や硬性下疳が見られ、やがて自然軽快にいたる(早期顕性梅毒Ⅰ期)。最初の症状出現から 4～10 週で梅毒トレポネーマが血行性に全身に移行し、無痛性紅斑などの多彩な皮膚粘膜症状を呈する(早期顕性梅毒Ⅱ期)。梅毒血清反応陽性で無症状の状態にある潜伏期を経て(潜伏期梅毒)、感染後数年～数十年にはゴム腫、心血管梅毒などの症状を呈することがある(晩期顕性梅毒)。

晩期顕性梅毒の中で突然死の原因ともなりうる病態が心血管梅毒、梅毒関連大動脈炎である。進行した梅毒関連大動脈炎の肉眼像は内膜面に縮緬状の籐壁を形成する「奇妙な」粥状動脈硬化病変と表現される。病態形成としてまず外膜の vasa vasorum に端を発し、引き続き中膜の壊死と血管新生が生じ、進行すると内膜の線維化と粥状硬化が形成され、大動脈瘤となりうる^{2,3)}。心血管危険因子を複数有す患者において粥状動脈硬化と梅毒関連大動脈炎とを鑑別するためには、その病態形成に着目し系統的に診断する必要がある。血清学的に感染あるいは既感染が疑われた場合、病変部からの梅毒トレポネーマの検出が診断の一助となる。

梅毒トレポネーマは試験管内での培養法が確立されていないため、浸出液を暗視野顕微鏡下で観察し菌体を同定する方法、血清中の抗原もしくは抗体を検出する方法、あるいは、病変部に存在する梅毒トレポネーマを特異的・非特異的に染色し、顕微鏡で観察する方法が用いられている^{4,5)}。また、PCR で *T. pallidum* 遺伝子を検出する方法も検討されている。

病理学的な梅毒トレポネーマの検出にはこれまでワルチンスターリー染色が用いられてきたが、染色手技や試薬管理が難しく、また、*Helicobacter pylori* など他の好銀性の菌でも陽性となるため特異性が低いという欠点がある。梅毒トレポネーマに対する抗体を用いた免疫組織化学では特異的な染色が可能であるが、切片の観察範囲が狭く菌体が豊富に存在する場合は比較的容易に陽性を判定できる一方で、切片の観察範囲が広く菌体が少ない場合は陽性所見を見つけるのが困難な場合もある。そういった場合には、免疫組織化学 (immunohistochemistry: IHC) よりも免疫蛍光染色 (immunofluorescence: IF) を用いたほうがコントラストが高く、効率よく陽性所見を見つけることができる。ここでは、ホルマリン固定パラ

フィン包埋組織を用いた梅毒トレポネーマに対する免疫蛍光染色と免疫組織化学のプロトコルを紹介する。

○準備

- 検体：ホルマリン固定パラフィン包埋組織（ヒト）を用いる。剥離防止のため、シランコーティングしたスライドガラスを用いる。
- 抗原の賦活化：一次抗体の種類に応じて、抗原賦活化バッファの種類や賦活化条件などの検討が必要である。

○試薬（以下はあくまで一例）

- 抗原賦活化バッファ：10 mM Tris/1 mM EDTA 緩衝液（pH9）※IF/IHC 共通
Tris aminomethane 1.21 g
EDTA・2Na 0.37 g
適当量の蒸留水に溶解し、pH9.0 に調整後、1 L にメスアップする。
- 内因性ペルオキシダーゼ阻害：3% 過酸化水素加メタノール ※IHC
30% 過酸化水素 1 容
メタノール 9 容
- ブロッキング剤：10% ヤギ血清（Cat# 426042）※IF/IHC 共通
- 抗体：
Anti-Treponema pallidum antibody（Cat# ab209923, polyclonal rabbit IgG）※IF/IHC 共通
Alexa Fluor 594 conjugated Goat Anti-Rabbit IgG H&L（Cat# ab150084）※IF
Horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG（Cat# 111-035-008）※IHC
- 発色基質：DAB ※IHC
DAB 基質キット（Cat# 425011）
- 核染色
マイヤーヘマトキシリン ※IHC
DAPI 入り封入剤（Cat# H-1200）※IF

○方法

IF プロトコル

操作	試薬	反応条件
脱パラ		
賦活化	Tris-EDTA バッファ（pH 9）※1	オートクレーブ 121°C 20 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
ブロッキング	10%ヤギ血清	室温 10 分
一次抗体	Anti-T. pallidum antibody (1:2000 ※2)	室温 60 分
洗浄	PBS	5 分×2 回

二次抗体	Alexa Fluor 594 conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (1:500)	室温 60 分 (遮光)
洗浄	PBS	5 分×2 回
封入	DAPI 入り封入剤	

※1 pH 6 や pH 8 でも陽性所見は得られるが、pH 9 と比較すると感度はやや劣る

※2 データシートの推奨濃度は 1:100 だがバックグラウンドが非常に高く、1:2000 が良好であった

IHC プロトコル

操作	試薬	反応条件
脱パラ		
賦活化	Tris-EDTA バッファー (pH 9) ※1	オートクレーブ 121°C 20 分
内因性 PO 阻害	3%過酸化水素加メタノール	5 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
ブロッキング	10%ヤギ血清	室温 10 分
一次抗体	Anti-Treponema pallidum antibody (1:2000※2)	室温 60 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
二次抗体	HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10000)	室温 60 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
発色	DAB	1~2 分
洗浄	PBS	5 分
核染色	マイヤーヘマトキシリン	2 分
色だし	流水洗	5 分
脱水・透徹		
封入		

※1 pH 6 や pH 8 でも陽性所見は得られるが、pH 9 と比較すると感度はやや劣る

※2 データシートの推奨濃度は 1:100 だがバックグラウンドが非常に高く、1:2000 が良好であった

○染色態度（図 1, 2）

梅毒トレポネーマ：赤色蛍光（IF）または茶褐色（IHC）

核：青色蛍光（IF）または青紫色（IHC）

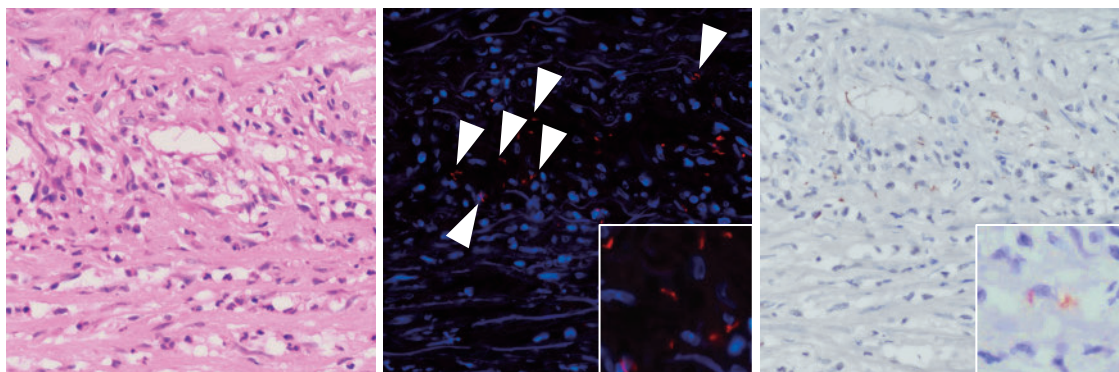


図 1. 晩期梅毒患者の大動脈（左：HE、中：IF、右：IHC）
らせん状の梅毒トレポネーマ（挿入図）が観察された。

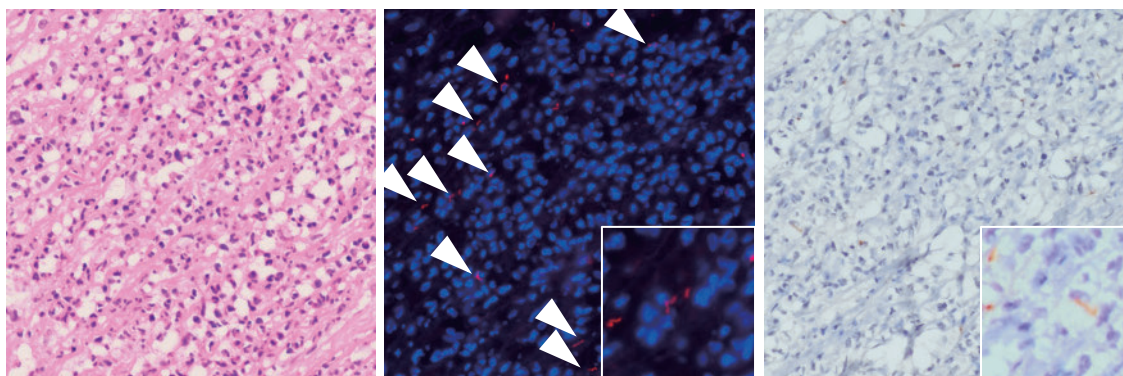


図 2. 晩期梅毒患者の大動脈（左：HE、中：IF、右：IHC）
らせん状の梅毒トレポネーマ（挿入図）が観察された。

○参考文献

1. 国立感染研究所. 病原微生物検出情報（IASR）. 44: 187-189, 2023.
2. Longcope WT, The Association of Aortic Insufficiency with Syphilitic Aortitis. JAMA LIV. 118-120, 1910.
3. Larkin JH, Levy IJ, A Pathological Study of Syphilitic Aortitis and its Serology. J Exp Med. 23: 25-38, 1916.
4. Theel ES, et al. Molecular and Direct Detection Tests for Treponema pallidum Subspecies pallidum: A Review of the Literature, 1964-2017. Clin Infect Dis. 71(Suppl 1): S4-S12, 2020.
5. Tsutsumi Y. Low-Specificity and High-Sensitivity Immunostaining for Demonstrating Pathogens in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections. Immunohistochemistry - The Ageless Biotechnology. Chapter 4, 2019.

Ⅲ. 免疫組織化学・免疫蛍光染色

(4) FFPE 切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出

東邦大学医療センター大橋病院病理診断科 高橋 啓・大原関 利章・横内 幸

○目的・要約

小型血管炎に分類される IgA 血管炎は、IgA サブクラスの IgA1 分子ヒンジ部に糖鎖異常が存在し、この糖鎖異常 IgA1 とこれに対する抗 IgA-IgG 抗体が免疫複合体を形成して血管壁に沈着し炎症をもたらされると考えられている。IgA 血管炎の診断には、皮膚紫斑部からの生検にて小動脈から細動脈、毛細血管などの小血管に核崩壊を伴う多核白血球を主体とした炎症細胞浸潤、すなわち白血球破碎性血管炎が観察され、さらに免疫蛍光抗体 (IF) 法で障害血管壁に IgA の沈着が証明されることが重要である。通常、IF 法には凍結切片を用いた蛍光抗体直接法が用いられているが、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 用検体とは別に凍結検体を準備する必要がある。

腎糸球体病変においては FFPE 切片を用いた IF 法の試みが多数なされているが、他の領域では限られている。ここでは IgA 血管炎診断のために行われた皮膚生検の FFPE 切片を用い IF 法にて IgA 沈着を証明する方法について紹介する。そのポイントは、蛍光抗体直接法に替えて蛍光抗体間接法を用いた点、蛍光色素に FITC とほぼ同じスペクトラムを有し FITC よりも明るく感度の高い Alexa Fluor™ 488 標識二次抗体を用いた点にある。これに非特異反応ブロッキングを適宜用いることにより、血管壁の IgA 沈着を高いシグナルで観察することができた。

本手法は IgA のみならず他の免疫グロブリンの証明にも応用可能で、免疫複合体沈着が診断に重要な糸球体腎炎や他の免疫複合体性小型血管炎の診断時に凍結切片が利用できなかった場合に救済処置として行いうると思われる。

○準備

1. 検体：2-3 μ m に薄切した FFPE 切片を用いる。剥離防止のため、シランコーティングスライドガラスを用いる。
2. 抗原賦活化：タンパク質分解酵素処理（プロテナーゼ K など）を用いる必要がある。

○試薬（以下はあくまで一例）

1. 抗原賦活化：Proteinase K (Agilent 社) 調整済
2. 非特異反応ブロッキング試薬：
Protein Block, Serum-Free, Liquid form (Agilent, X0909)、調整済
3. 抗体：
一次抗体：Rabbit anti-Human IgA polyclonal antibody (DAKO, F0204)、希釈済
二次抗体：Alexa Fluor™ Plus 488 標識二次抗体
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 488 (ThermoFisher, A-11034)、500 倍希釈で使用
4. 自家蛍光抑制・封入剤
Vector TrueVIEW Autofluorescence Quenching kit (Vector 社、SP-8400)

操作	試薬	反応条件
脱パラ		
親水	精製水に浸漬	5 分
抗原賦活	Proteinase K (Agilent)	37°C、30 分
洗浄	PBS	5 分、1 回
非特異反応ブロッキング	Protein Block, Serum-Free, Liquid form (Agilent, X0909)	室温、10 分
一次抗体	抗ヒト IgA polyclonal 抗体	4°C、overnight、暗所
洗浄	PBS 洗浄	5 分、2 回
二次抗体	Alexa Fluor™ Plus 488 標識二次抗体	室温、30 分
洗浄	PBS 洗浄	5 分、2 回
自家蛍光抑制	Vector TrueVIEW® Autofluorescence Quenching Kit	室温、5 分
洗浄	PBS	5 分、1 回
封入	水溶性封入剤	

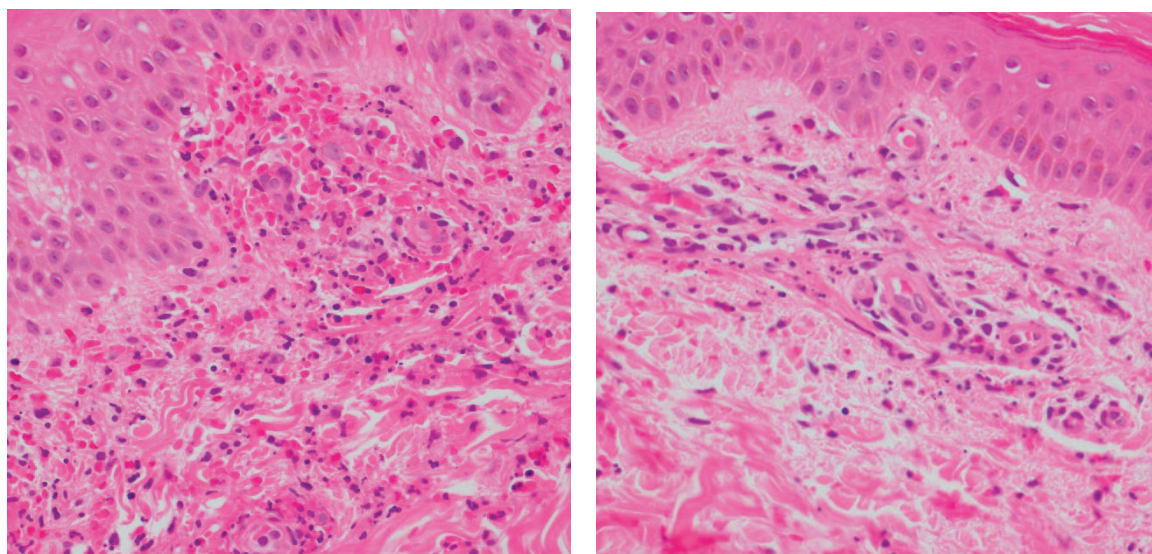


図 1：IgA 血管炎の皮膚病変。出血と共に核破砕像を伴う白血球破砕性血管炎が観察される。(HE 染色、×400)

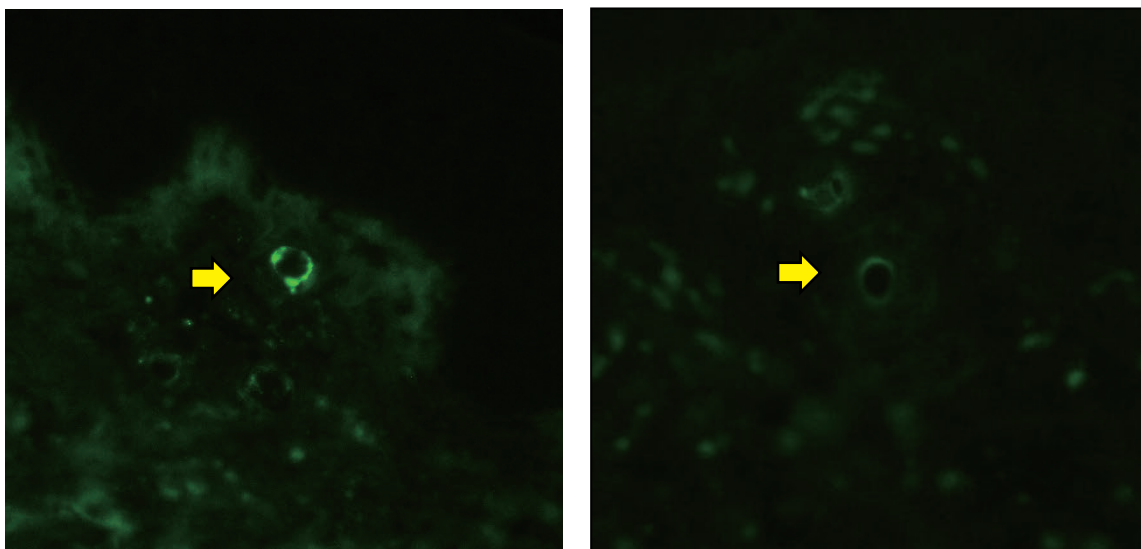


図 2：FFPE 切片を用いた蛍光抗体間接法、IgA、皮膚（左：Alexa Fluor™ 488 標識二次抗体、右：FITC 標識二次抗体

（Olympus 落射蛍光システム、顕微鏡デジタルカメラ DP73、×400, iso1600, 1/9 秒）

参考文献

1. Jennette JC et al: 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013; 65: 1-11
2. 日本循環器学会:血管炎症候群の診療ガイドライン 2017 年改訂版. https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2020/02/JCS2017_isobe_h.pdf
3. Eidan AJ. Direct immunofluorescence on formalin-fixed, paraffin-embedded versus fresh frozen human renal biopsies: a comparative study. *J Immunoassay Immunochem.* 2024, 23:1-14.
4. Valencia-GA, et al. The Value of Direct Immunofluorescence on Proteinase-Digested Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Skin Biopsies. *Am J Dermatopathol.* 2018, 40:111-117.

Ⅲ. 免疫組織化学・免疫蛍光染色

(5) FFPE 切片を用いた好中球細胞外トラップの検出

北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 益田 紗季子

○目的・原理

好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) は病原微生物やサイトカイン、自己抗体など様々な刺激により活性化された好中球から放出される網状構造物で、DNA に種々の抗菌物質が絡み合った構造をとり、病原微生物に対する感染防御を担う。一方で、過剰な NETs 形成は組織障害や血栓形成、自己抗体産生などに関与する。ANCA 関連血管炎をはじめとした血管炎やその他の自己免疫・自己炎症性疾患で NETs 形成が亢進しており、病態形成への関与が示唆されている^{1,2)}。

NETs を誘導する物質としては、病原微生物やサイトカイン、自己抗体など各種因子が報告され、誘導物質により異なるシグナル応答が生じていると考えられており、NETs 形成機序については不明な点が多い³⁾。一般的な機序として、まず NADPH オキシダーゼの活性化により活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が産生され、ROS の作用により peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) が核へ移行する。PAD4 はヒストン尾部のアルギニンをシトルリンへ変換させることにより、ヒストンと DNA との結合性を低下させ、核の脱凝縮が誘導される。また、核の脱凝縮には、細胞質から核内に移行したミエロペルオキシダーゼ (MPO) や好中球エラスターゼ (neutrophil elastase: NE) も関与する。核膜の破綻により細胞質と DNA 成分が混合し、最終的には細胞膜の破綻とともに NETs が放出される。

組織中の NETs の同定には、核成分 (DNA やヒストン) と好中球の細胞質成分 (MPO や NE) が共局在していることを確認する必要がある⁴⁾。ここでは、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded: FFPE) 切片を用いた DNA とシトルリン化ヒストン、MPO に対する間接免疫蛍光染色のプロトコルを紹介する。

○準備

- a) 検体：FFPE 切片を用いる。剥離防止のため、シランコーティングしたスライドガラスを用いる。
- b) 抗原の賦活化：一次抗体の種類に応じて、抗原賦活化バッファの種類や賦活化条件などの検討が必要である。

○試薬 (以下はあくまで一例)

- a) 抗原賦活化バッファ：10 mM Tris/1 mM EDTA 緩衝液 (pH9)
Tris aminomethane 1.21 g
EDTA・2Na 0.37 g
適量の蒸留水に溶解し、pH9.0 に調整後、1 L にメスアップする。
- b) ブロッキング剤
Protein Block Serum-free (Cat# X0909)

c) 抗体

Anti-MPO antibody (Cat# AF3667, polyclonal goat IgG)

Anti-Histone H3(citrulline R2+R8+R17) antibody (Cat# ab5103, polyclonal rabbit IgG)

Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor 488) (Cat# ab150129)

Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594) (Cat# ab150076)

d) 自家蛍光抑制・封入剤

Vector TrueVIEW Autofluorescence Quenching kit with DAPI (Cat# SP-8500)

○方法

操作	試薬	反応条件
脱パラ		
賦活化	Tris-EDTA バッファー (pH9)	オートクレーブ 121°C 20 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
ブロッキング	Protein Block Serum-free	室温 10 分
一次抗体① ※1	Anti-MPO antibody (1:100)	4°C Over night
洗浄	PBS	5 分×2 回
一次抗体② ※1	Anti-Histone H3(citrulline R2+R8+R17) antibody (1:50)	室温 60 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
二次抗体	Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor 488) (1:500) Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 594) (1:500)	室温暗所 60 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
自家蛍光抑制	Vector TrueVIEW Autofluorescence Quenching kit	2 分
洗浄	PBS	5 分
封入	DAPI 入り封入剤で封入	

※1 混合して染色することは可能であるが、予備検討では別々に染色した方がコントラストよく染色できた。

○染色態度（図 1, 2, 3）

MPO（好中球）：緑色蛍光

シトルリン化ヒストン：赤橙色蛍光

DNA：青色蛍光

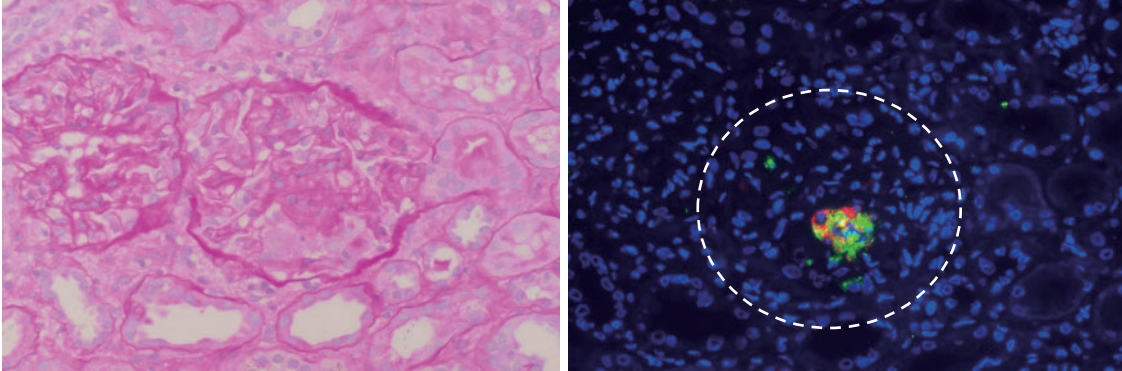


図 1. MPO-ANCA 関連血管炎症例の腎生検（左：PAS 染色、右：NETs 染色）

糸球体糸球壊死部に一致して NETs の沈着が認められた。

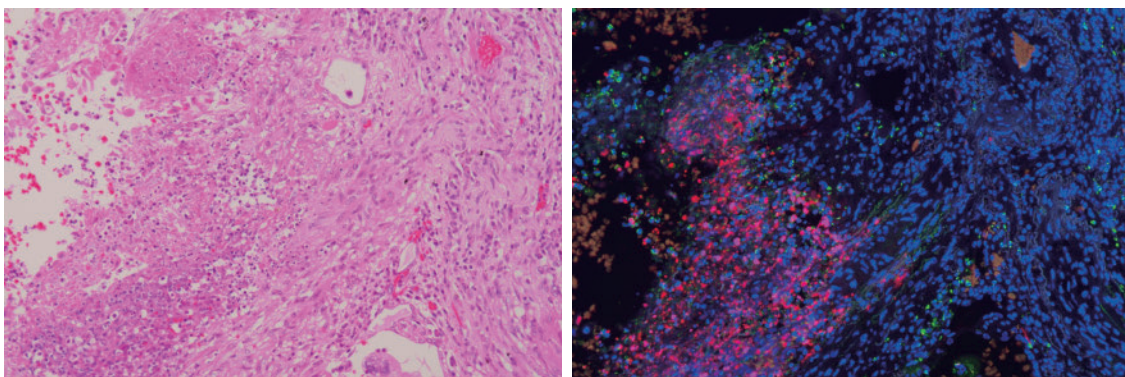


図 2. MPO-ANCA 関連血管炎の肺壊死性肉芽腫（左：HE 染色、右：NETs 染色）

血管を巻き込むように壊死性肉芽腫が認められ、壊死部に多量の NETs 沈着が認められた。

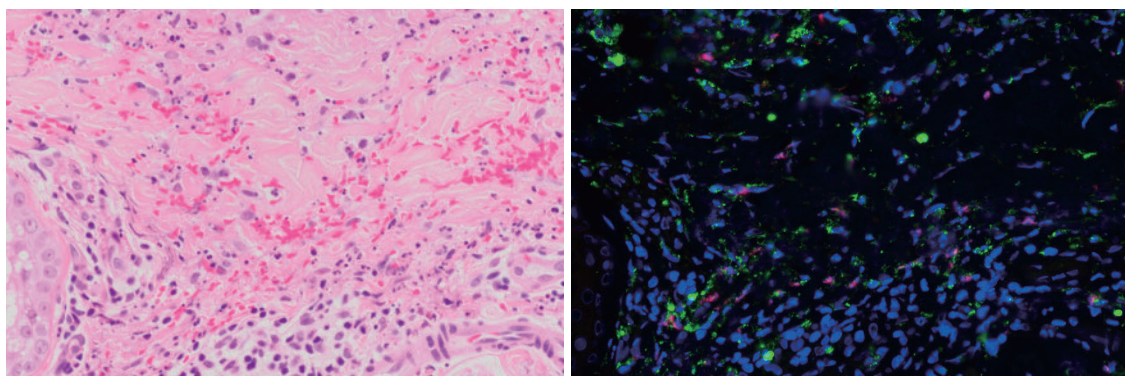


図 3. IgA 血管炎の皮膚生検（左：HE 染色、右：NETs 染色）

白血球破碎性血管炎が認められ、散在性に NETs が認められた。

○参考文献

1. Nakazawa D, et al. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Rheumatol.* 15: 91-101, 2019.
2. Masuda S, et al. Formation and disordered degradation of neutrophil extracellular traps in necrotizing lesions of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Am J Pathol.* 189: 839-846, 2019.
3. Chen T, et al. Receptor-mediated NETosis on neutrophils. *Front Immunol.* 12:775267, 2021.
4. Brinkmann V, et al. Immunodetection of NETs in paraffin-embedded tissue. *Front Immunol.* 7: 513, 2016.

Ⅲ. 免疫組織化学・免疫蛍光染色

(6) 正常腎 FFPE 切片を用いた患者血清中抗 GBM 抗体の GBM への結合確認

北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 西端 友香

○目的・原理

抗 GBM 抗体は、糸球体や肺胞の基底膜を構成している IV 型コラーゲン {type IV collagen: Col(IV)} に対する自己抗体である。抗 GBM 抗体が産生されることにより、びまん性半月体形成性壊死性糸球体腎炎や肺出血をきたす臓器特異的自己免疫疾患である抗 GBM 病が発症する¹⁾。本邦における抗 GBM 病の発症年齢のピークは 50～60 歳台で、男性よりも女性にやや多い^{2, 3)}。ANCA 関連血管炎と比較すると抗 GBM 病は腎予後が不良で生存率が低いことが知られている一方で、十分な治療を行えば、寛解後に再燃することは少ない。

抗 GBM 抗体によって認識される主要なエピトープは EA と EB であり、これらは $\alpha 3$ サブユニット非コラーゲン領域の NC1 ドメイン { $\alpha 3$ -subunit non-collagenous domain of type IV collagen: $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ } に存在する⁴⁾。2つの 3-4-5 の α サブユニット NC1 ドメイン同士がスルフィルイミン結合により連結して六量体を形成しており、 $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ の GBM エピトープは立体構造上の潜在 (cryptic) 領域に存在し⁵⁾、スルフィルイミン結合が切断されることで初めて表出する。抗 GBM 病患者で潜在抗原が表出するメカニズムは未だ不明であるが、何らかの原因により Col(IV) の NC1 ドメインの六量体が解離すると、抗 GBM 抗体がエピトープに結合し、補体カスケードが活性化され、補体依存性の組織破壊が起こる。

抗 GBM 病の診断には、臨床症状に加えて ELISA などによる血清抗 GBM 抗体価の測定または腎生検における糸球体基底膜への IgG の線状沈着により抗 GBM 抗体の存在を証明する必要がある。前述のように抗 GBM 抗体によって認識される主要なエピトープは立体構造的に隠れているため、一般的な抗原賦活化処理では FFPE 正常腎組織に抗 GBM 病患者血清を反応させても腎生検で観察されるような糸球体基底膜への IgG の線状沈着は認められない。しかし酸性条件下で加熱することで正常腎組織の GBM 抗原が表出することが報告されており^{6, 7)}、抗 GBM 病が疑われるが腎生検の施行が困難な例では、本プロトコルを用いることで血清中の抗 GBM 抗体の糸球体基底膜への結合性を確認できる⁸⁾。

○準備

- a) 検体：ホルマリン固定パラフィン包埋の正常腎組織（ヒト）を用いる。剥離防止のため、シランコーティングしたスライドガラスを用いる。
- b) IgG 抽出：被検血清を用いるよりも IgG を抽出してから用いたほうが、バックグラウンドが抑えられる。

○試薬（以下はあくまで一例）

- a) IgG 抽出：2 ml チューブ用の市販キット（Cat# 28903134）
添付文書に従い IgG を抽出する
- b) 抗原賦活化バッファー：0.2 M 塩酸（pH 0.9）
- c) 内因性ペルオキシダーゼ阻害：3%過酸化水素加メタノール
30% 過酸化水素 1 容
メタノール 9 容

d) ブロッキング剤：Protein Block Serum-Free (Cat# X0909)

- 抗体：
 - Horseradish peroxidase conjugated rabbit anti-human IgG (Cat# 111-035-008)
- ポジティブコントロール抗体：
 - Anti-human α 3(IV)NC1 antibody (Clone: H31, Cat# 7076)
 - HRP conjugated goat anti-rat IgG2a antibody (Cat# STAR113P)
- 発色基質：DAB
 - DAB 基質キット (Cat# 425011)
- 核染色：マイヤーヘマトキシリン
- 洗浄バッファー：0.1%(w/v) Tween-20 加 PBS
 - PBS 1 L
 - Tween-20 1 g

○方法

操作	試薬	反応条件
脱パラ		
賦活化	0.2M 塩酸 (pH 0.9)	オートクレーブ 121°C 6~10 分※
洗浄	蒸留水	
内因性 PO 阻害	3%過酸化水素加メタノール	5 分
洗浄	PBS	5 分×2 回
ブロッキング	Protein Block Serum-Free	室温 10 分
一次抗体	被検血清抽出 IgG (GBM 抗体価 100~1000U/ml) ポジティブコントロール：ラット抗 α 3(IV)NC1 抗体	室温 60 分
洗浄	PBS-T	5 分×3 回
二次抗体	HRP conjugated rabbit anti-human IgG (1:1000) ポジティブコントロール：HRP conjugated anti-rat IgG2a antibody (1 μ g/ml)	室温 60 分
洗浄	PBS-T	5 分×3 回
発色	DAB	3~10 分
洗浄	PBS	5 分
核染色	マイヤーヘマトキシリン	2 分
色だし	流水洗	5 分
脱水・透徹		
封入		

※温度を下げるあるいは時間を短くすると GBM が表出されない可能性が高い。

○染色態度（図 1, 2）

GBM：茶褐色

核：青紫色

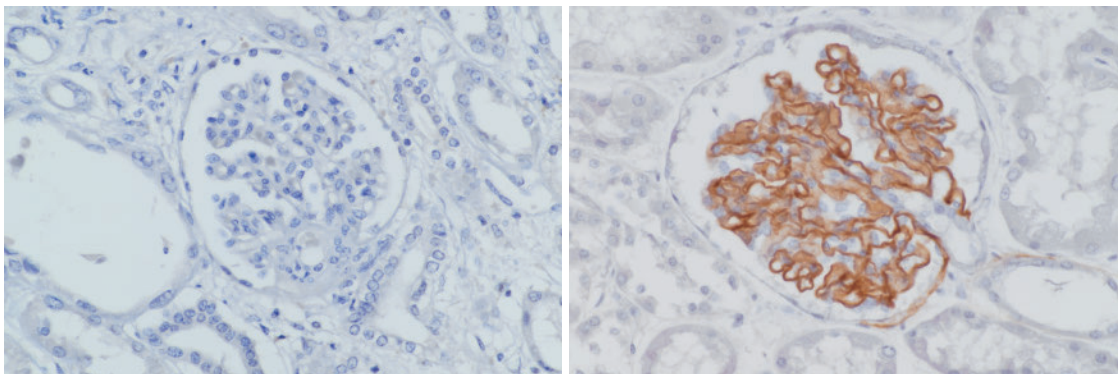


図 1 正常腎 FFPE 組織と抗 $\alpha 3(IV)NC1$ モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学（賦活化液による反応性の違い（左：pH 9、右：pH 0.9））

一般的な熱賦活化処理で用いる pH 9（Tris-EDTA）では GBM の陽性所見が見られないが、pH 0.9（0.2M 塩酸）による酸性熱処理では GBM が線状に染色される。

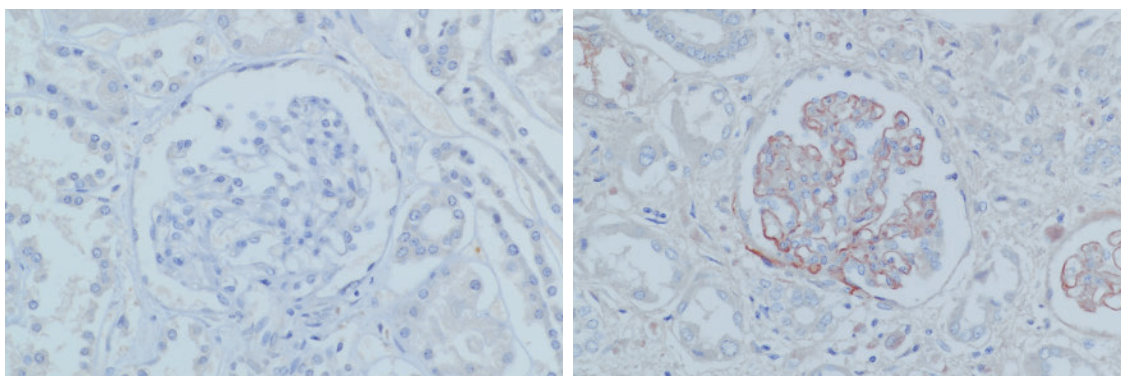


図 2 正常腎 FFPE 組織と患者血清抽出 IgG との反応性（左：pH 9、右：pH 0.9）

モノクローナル抗体同様、患者血清由来の IgG でも GBM が線状に染色される。

○参考文献

1. McAdoo SP, & Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. Clin J Am Soc Nephrol. 12: 1162–1172, 2017.
2. Hirayama K, et al. Anti-glomerular basement membrane antibody disease in Japan: Part of the nationwide rapidly progressive glomerulonephritis survey in Japan. Clin Exp Nephrol. 12: 339–347, 2008.
3. Koyama A, et al. A nationwide survey of rapidly progressive glomerulonephritis in Japan: Etiology, prognosis and treatment diversity. Clin Exp Nephrol. 13: 633–650, 2009.
4. Pedchenko V, et al. Molecular Architecture of the Goodpasture Autoantigen in Anti-GBM Nephritis. N Engl J Med. 363: 343–54, 2010.

5. Vanacore R, et al. Sulphilimine cross-links in Goodpasture's disease. Clin Exp Immunol. 164 Suppl 1: 4-6, 2011.
6. Naito I, et al. Immunohistochemical diagnosis of Alport's syndrome in paraffin-embedded renal sections: antigen retrieval with autoclave heating. Med Electron Microsc. 36: 1-7, 2003.
7. Nishibata Y, et al. Epitope recognized by anti-glomerular basement membrane (GBM) antibody in a patient with repeated relapse of anti-GBM disease. Exp Mol Pathol. 107: 165-170, 2019.
8. Sato M, et al. Demonstration of equivocal anti-glomerular basement membrane antibody positivity as a non-specific reaction through multiple immunologic assays in a case of pediatric asymptomatic hematuria. Clin Biochem 120: 110650, 2023.

IV. 腎生検

(1) 腎生検において臨床医が病理診断医に期待すること

北海道大学大学院医学研究院免疫・代謝内科学 中沢 大悟

1. ANCA 関連腎炎では組織重症度を Berden 分類でも評価していただければ予後予測が可能となる。
2. IgA 血管炎では組織重症度を ISKDC で評価いただければ予後の評価や特定疾患申請に役立つ。
3. 血管炎の評価として、糸球体病変のみならず小葉間動脈レベルの血管炎の有無や間質の peritubular capillaritis の有無を評価いただくことで対象となる血管サイズを把握できる。
4. ANCA 関連血管炎は高齢者が多いので、もともとの CKD の状態や動脈硬化などの背景を組織学的に評価いただき発症前の腎臓の状態を把握することで腎機能改善の目安が想定できる。これは臨床経過（データや既往歴など）も加味する必要があり臨床医と病理医の連携が必要であると考える。
5. 他の腎炎の合併の有無を評価（膜性腎症や IgG4 関連疾患など合併するケースあり）→ 病態把握につながる。

他、血管炎に限らず病理組織における検体の質の確保

- a. 均一な薄切り切片が望ましい。
- b. IF に用いる検体に糸球体が存在すること（実体顕微鏡などで事前に検体に糸球体があることを確認できるなど）
- c. option でもよいので電子顕微鏡写真の評価をしていただけること。

IV. 腎生検

(2) 腎生検において病理診断医が臨床医に期待すること

公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院腎臓内科 武曾 恵理

I. 腎生検病理診断医に提供されるべき適切かつ十分な患者情報のポイント

昨今腎生検の対象者年齢は上昇しており、特に全身血管炎患者は高齢者で急速進行性腎炎の病態を呈する事が多いため、腎生検が必須であるが、腎組織には年余にわたる様々な病態の結果としての腎病理所見が表出されており、これらを解析するにはその病歴および検査情報の充実した提供が必須である。日本腎病理協会／日本腎臓学会が編集した腎生検病理アトラス（改訂版）¹⁾には腎生検臨床情報記載用紙（成人用）の臨床情報記載表（図1）や検査成績記載表（図2）の用紙案が参考として掲載されており（小児用も参照）、腎生検を施行するに当たり、臨床側から病理診断者へ提供すべき情報一覧となっている。内容の詳細については他稿に譲る²⁾が、ここでは特に血管炎に関連ある情報のポイントを概説する。

腎生検臨床情報記載用紙	
患者登録番号 (ID number) :	生検番号 :
診療科 :	(前回腎生検 : 無・有 回)
主治医 :	(前回番号 :)
(ふりがな)	
患者氏名 :	(西暦 年 月 日生, 歳, 男・女)
腎生検目的 (必要時記載) :	
生検種類 : (☐ 自己腎, ☐ 移植腎)	
臨床診断 : #1	#2 #3
WHO 臨床症候群分類 (☐ 項目) :	
☐ 急性腎炎, ☐ 急速進行性腎炎, ☐ 無症候性血尿, ☐ 慢性腎炎, ☐ ネフローゼ	
発症時期 : 年 月 日 (あるいは 不明), 先行感染 (+/-/ 不明)	
肉眼的血尿 (+/-/ 不明), 浮腫 (+/-/ 不明), ネフローゼ状態 (+/-/ 不明)	
主訴 :	
病歴 (検診歴) : 検診 (無・有 : 蛋白尿 -/+ , 年 前, 血尿 -/+ 年 前, 不明)	
既往歴 : 高血圧 (あり, なし), 糖尿病 (あり, なし)	
特記事項 :	
妊娠歴 : 出産 (+/-/ 不明), 自然流産 (+/-/ 不明), 妊娠高血圧症 (+/-/ 不明)	
家族歴 : 腎不全・腎障害 (+/-/ 不明), 家族性血尿 (+/-/ 不明)	
聴力障害 (+/-/ 不明), 視力障害 (+/-/ 不明), 遺伝性疾患 (+/-/ 不明)	
糖尿病 (+/-/ 不明), 高血圧 (+/-/ 不明)	
コメント・その他 (☐ 例) 腎コロボーマ症候群など自由記載)	
現症 : 身長 _____ cm, 体重 _____ kg, BMI _____	
血圧 _____ - _____ mmHg (降圧薬の無・有 :), 高血圧 (+/-/ 不明, _____ 年),	
糖尿病 (+/-/ 不明, _____ 年), インスリン治療 (+/-/ 不明), 経口糖尿病薬 (+/-/ 不明)	
眼底所見 (DM 福田分類 _____ 度・未, HT Scheie H _____ 度, S _____ 度, KW _____ 度・未)	
治療 (服薬) 歴 :	
経口ステロイド 無・有 (), ステロイドパルス 無・有 ()	
免疫抑制薬 無・有 (), 抗凝固薬 無・有 (), 抗菌薬 無・有 ()	
抗血小板薬 無・有 (), NSAIDs 無・有 (), H ₂ ブロッカー/PPI 無・有 (),	
抗不整脈薬 無・有 (), その他 無・有 ()	
血液透析 無・有 (), 腹膜透析 無・有 (), 腎移植 無・有 ()	

図1 腎生検臨床情報記載用紙

腎生検検査成績記載用紙			HIVAb*		+/-/不明		Bence-Jones 蛋白 *																																																																																																														
患者登録番号: _____			培養, その他				Selectivity index*																																																																																																														
生検番号: _____							その他																																																																																																														
検尿所見			血液生化学検査																																																																																																																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>日付</th> <th>/</th> <th>/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>尿 pH</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>蛋白定性</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>尿量 mL/日</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>蛋白定量 mg/dL, g/日</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>尿クレアチニン, mg/dL</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>蛋白/クレアチニン比</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>尿糖</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>潜血反応</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>沈渣 RBC</td><td></td><td></td></tr> <tr><td> WBC</td><td></td><td></td></tr> <tr><td> Epi</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>硝子円柱</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>顆粒・細胞性</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>蛸様・巨大</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>その他所見</td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>			日付	/	/	尿 pH			蛋白定性			尿量 mL/日			蛋白定量 mg/dL, g/日			尿クレアチニン, mg/dL			蛋白/クレアチニン比			尿糖			潜血反応			沈渣 RBC			WBC			Epi			硝子円柱			顆粒・細胞性			蛸様・巨大			その他所見			<table border="1"> <thead> <tr> <th>日付</th> <th>/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>BUN</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>Cr</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>Cystatin C*</td><td>mg/L</td></tr> <tr><td>UA</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>Na</td><td>mEq/L</td></tr> <tr><td>K</td><td>mEq/L</td></tr> <tr><td>Cl</td><td>mEq/L</td></tr> <tr><td>Ca</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>P</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>Mg</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>T.prot</td><td>g/dL</td></tr> <tr><td>Alb</td><td>g/dL</td></tr> <tr><td>α1</td><td>%</td></tr> <tr><td>α2</td><td>%</td></tr> <tr><td>β</td><td>%</td></tr> <tr><td>γ</td><td>%</td></tr> <tr><td>M 蛋白</td><td>不明・--++ ()</td></tr> <tr><td>T.chol</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>TG</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>HDL-C</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>GOT (AST)</td><td>U/L</td></tr> <tr><td>GPT (ALT)</td><td>U/L</td></tr> <tr><td>LDH</td><td>U/L</td></tr> <tr><td>Al-p</td><td>U/L</td></tr> <tr><td>γ-GTP</td><td>U/L</td></tr> <tr><td>CK (CPK)</td><td>U/L</td></tr> <tr><td>Glu (FBS)</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>HbA1c (NGSP)</td><td>%</td></tr> </tbody> </table>									日付	/	BUN	mg/dL	Cr	mg/dL	Cystatin C*	mg/L	UA	mg/dL	Na	mEq/L	K	mEq/L	Cl	mEq/L	Ca	mg/dL	P	mg/dL	Mg	mg/dL	T.prot	g/dL	Alb	g/dL	α1	%	α2	%	β	%	γ	%	M 蛋白	不明・--++ ()	T.chol	mg/dL	TG	mg/dL	HDL-C	mg/dL	GOT (AST)	U/L	GPT (ALT)	U/L	LDH	U/L	Al-p	U/L	γ-GTP	U/L	CK (CPK)	U/L	Glu (FBS)	mg/dL	HbA1c (NGSP)	%
日付	/	/																																																																																																																			
尿 pH																																																																																																																					
蛋白定性																																																																																																																					
尿量 mL/日																																																																																																																					
蛋白定量 mg/dL, g/日																																																																																																																					
尿クレアチニン, mg/dL																																																																																																																					
蛋白/クレアチニン比																																																																																																																					
尿糖																																																																																																																					
潜血反応																																																																																																																					
沈渣 RBC																																																																																																																					
WBC																																																																																																																					
Epi																																																																																																																					
硝子円柱																																																																																																																					
顆粒・細胞性																																																																																																																					
蛸様・巨大																																																																																																																					
その他所見																																																																																																																					
日付	/																																																																																																																				
BUN	mg/dL																																																																																																																				
Cr	mg/dL																																																																																																																				
Cystatin C*	mg/L																																																																																																																				
UA	mg/dL																																																																																																																				
Na	mEq/L																																																																																																																				
K	mEq/L																																																																																																																				
Cl	mEq/L																																																																																																																				
Ca	mg/dL																																																																																																																				
P	mg/dL																																																																																																																				
Mg	mg/dL																																																																																																																				
T.prot	g/dL																																																																																																																				
Alb	g/dL																																																																																																																				
α1	%																																																																																																																				
α2	%																																																																																																																				
β	%																																																																																																																				
γ	%																																																																																																																				
M 蛋白	不明・--++ ()																																																																																																																				
T.chol	mg/dL																																																																																																																				
TG	mg/dL																																																																																																																				
HDL-C	mg/dL																																																																																																																				
GOT (AST)	U/L																																																																																																																				
GPT (ALT)	U/L																																																																																																																				
LDH	U/L																																																																																																																				
Al-p	U/L																																																																																																																				
γ-GTP	U/L																																																																																																																				
CK (CPK)	U/L																																																																																																																				
Glu (FBS)	mg/dL																																																																																																																				
HbA1c (NGSP)	%																																																																																																																				
血液検査			血清・免疫学的検査																																																																																																																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>日付</th> <th>/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>白血球</td><td>×10⁴/μL</td></tr> <tr><td> 好中球</td><td>%</td></tr> <tr><td> 好酸球</td><td>%</td></tr> <tr><td>リンパ球</td><td>%</td></tr> <tr><td> 単球</td><td>%</td></tr> <tr><td>RBC</td><td>×10⁴/μL</td></tr> <tr><td>Hb</td><td>g/dL</td></tr> <tr><td>Ht</td><td>%</td></tr> <tr><td>Plt</td><td>×10⁴/μL</td></tr> <tr><td>PT</td><td>sec・%</td></tr> <tr><td>APTT</td><td>sec・%</td></tr> <tr><td>Fib</td><td>mg/dL</td></tr> </tbody> </table>			日付	/	白血球	×10 ⁴ /μL	好中球	%	好酸球	%	リンパ球	%	単球	%	RBC	×10 ⁴ /μL	Hb	g/dL	Ht	%	Plt	×10 ⁴ /μL	PT	sec・%	APTT	sec・%	Fib	mg/dL	<table border="1"> <thead> <tr> <th>日付</th> <th>/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>抗 CCP 抗体 *</td><td>U/mL</td></tr> <tr><td>抗核抗体 (定量)</td><td>+・-, 倍 Homogeneous Speckled Nucleolar Peripheral DC</td></tr> <tr><td>抗 DNA 抗体 *</td><td>IU/mL</td></tr> <tr><td>抗 dsDNA 抗体 *</td><td>IU/mL</td></tr> <tr><td>抗 ENA 抗体など *</td><td>+・- RNP, Sm, SSA, SSB, Jo-1, ARS, Scl70, Centromere</td></tr> <tr><td>抗リン脂質抗体 *</td><td>+・- β1GPI, CA, LA</td></tr> <tr><td>IgG</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>IgA</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>IgM</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>IgE*</td><td>IU/dL</td></tr> <tr><td>C3</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>C4</td><td>mg/dL</td></tr> <tr><td>CH50</td><td>U/mL</td></tr> <tr><td>Cryoglobulin* パターン</td><td>+・-()</td></tr> <tr><td>MPO-ANCA*</td><td></td></tr> <tr><td>PR3-ANCA*</td><td></td></tr> <tr><td>抗 GBM 抗体 *</td><td></td></tr> <tr><td>その他</td><td></td></tr> </tbody> </table>									日付	/	抗 CCP 抗体 *	U/mL	抗核抗体 (定量)	+・-, 倍 Homogeneous Speckled Nucleolar Peripheral DC	抗 DNA 抗体 *	IU/mL	抗 dsDNA 抗体 *	IU/mL	抗 ENA 抗体など *	+・- RNP, Sm, SSA, SSB, Jo-1, ARS, Scl70, Centromere	抗リン脂質抗体 *	+・- β1GPI, CA, LA	IgG	mg/dL	IgA	mg/dL	IgM	mg/dL	IgE*	IU/dL	C3	mg/dL	C4	mg/dL	CH50	U/mL	Cryoglobulin* パターン	+・-()	MPO-ANCA*		PR3-ANCA*		抗 GBM 抗体 *		その他																																											
日付	/																																																																																																																				
白血球	×10 ⁴ /μL																																																																																																																				
好中球	%																																																																																																																				
好酸球	%																																																																																																																				
リンパ球	%																																																																																																																				
単球	%																																																																																																																				
RBC	×10 ⁴ /μL																																																																																																																				
Hb	g/dL																																																																																																																				
Ht	%																																																																																																																				
Plt	×10 ⁴ /μL																																																																																																																				
PT	sec・%																																																																																																																				
APTT	sec・%																																																																																																																				
Fib	mg/dL																																																																																																																				
日付	/																																																																																																																				
抗 CCP 抗体 *	U/mL																																																																																																																				
抗核抗体 (定量)	+・-, 倍 Homogeneous Speckled Nucleolar Peripheral DC																																																																																																																				
抗 DNA 抗体 *	IU/mL																																																																																																																				
抗 dsDNA 抗体 *	IU/mL																																																																																																																				
抗 ENA 抗体など *	+・- RNP, Sm, SSA, SSB, Jo-1, ARS, Scl70, Centromere																																																																																																																				
抗リン脂質抗体 *	+・- β1GPI, CA, LA																																																																																																																				
IgG	mg/dL																																																																																																																				
IgA	mg/dL																																																																																																																				
IgM	mg/dL																																																																																																																				
IgE*	IU/dL																																																																																																																				
C3	mg/dL																																																																																																																				
C4	mg/dL																																																																																																																				
CH50	U/mL																																																																																																																				
Cryoglobulin* パターン	+・-()																																																																																																																				
MPO-ANCA*																																																																																																																					
PR3-ANCA*																																																																																																																					
抗 GBM 抗体 *																																																																																																																					
その他																																																																																																																					
感染症検査			腎機能検査																																																																																																																		
<table border="1"> <thead> <tr> <th>日付</th> <th>/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>HBsAg</td><td>+/-/不明</td></tr> <tr><td>HBsAb</td><td>+/-/不明</td></tr> <tr><td>HBcAb*</td><td>+/-/不明</td></tr> <tr><td>HBeAg*</td><td>+/-/不明</td></tr> <tr><td>HBeAb*</td><td>+/-/不明</td></tr> <tr><td>HBV-DNA*</td><td>+/-/不明</td></tr> <tr><td>HCVAb</td><td>+/-/不明</td></tr> <tr><td>HCV-RNA*</td><td>+/-/不明</td></tr> <tr><td>TPHA</td><td>+/-/不明</td></tr> </tbody> </table>			日付	/	HBsAg	+/-/不明	HBsAb	+/-/不明	HBcAb*	+/-/不明	HBeAg*	+/-/不明	HBeAb*	+/-/不明	HBV-DNA*	+/-/不明	HCVAb	+/-/不明	HCV-RNA*	+/-/不明	TPHA	+/-/不明	<table border="1"> <thead> <tr> <th>日付</th> <th>/</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>eGFRcreat**</td><td></td></tr> <tr><td>eGFRcys**</td><td></td></tr> <tr><td>RPF* (方法)</td><td>mL/分</td></tr> <tr><td>GFR* (方法)</td><td>mL/分</td></tr> <tr><td>FF*</td><td></td></tr> <tr><td>%TRP*</td><td>%</td></tr> <tr><td>FENa*</td><td>%</td></tr> <tr><td>血清 β₂MG*</td><td>μg/mL</td></tr> <tr><td>尿中 β₂MG*</td><td>μg/L</td></tr> <tr><td>尿中 NAG*</td><td>IU/L</td></tr> </tbody> </table>									日付	/	eGFRcreat**		eGFRcys**		RPF* (方法)	mL/分	GFR* (方法)	mL/分	FF*		%TRP*	%	FENa*	%	血清 β ₂ MG*	μg/mL	尿中 β ₂ MG*	μg/L	尿中 NAG*	IU/L																																																																
日付	/																																																																																																																				
HBsAg	+/-/不明																																																																																																																				
HBsAb	+/-/不明																																																																																																																				
HBcAb*	+/-/不明																																																																																																																				
HBeAg*	+/-/不明																																																																																																																				
HBeAb*	+/-/不明																																																																																																																				
HBV-DNA*	+/-/不明																																																																																																																				
HCVAb	+/-/不明																																																																																																																				
HCV-RNA*	+/-/不明																																																																																																																				
TPHA	+/-/不明																																																																																																																				
日付	/																																																																																																																				
eGFRcreat**																																																																																																																					
eGFRcys**																																																																																																																					
RPF* (方法)	mL/分																																																																																																																				
GFR* (方法)	mL/分																																																																																																																				
FF*																																																																																																																					
%TRP*	%																																																																																																																				
FENa*	%																																																																																																																				
血清 β ₂ MG*	μg/mL																																																																																																																				
尿中 β ₂ MG*	μg/L																																																																																																																				
尿中 NAG*	IU/L																																																																																																																				
			腎形態・機能検査																																																																																																																		
			□超音波: 腎サイズ 右 cm, 左 cm □ IVP/DIP : □ CT scan : □ MRI* : □ RI renogram* :																																																																																																																		
			*: 鑑別診断に必要な項目																																																																																																																		
			**: mL/分/1.73 m ² (18 歳以上)																																																																																																																		

1. 問診のポイント：以下の様々な情報が特に血管炎では重要である。
- 主訴と現病歴：血管炎における血尿、発熱、皮膚所見などの所見がいつから、どのように患者自身および時には家族もあったかも含めて確認。現病歴では症状に先行した感染、さらには粉塵（都市災害から、大掃除などの埃も含めた）暴露歴。
 - 既往歴：腎を含めた他臓器疾患の履歴と、病理診断に影響する高血圧、糖尿病、膠原病の病歴、治療内容に加えて、癌の既往、特に昨今治療の進歩で増えてきている長期担癌患者における放射線を含む治療情報の詳細。
 - 職業歴：血管炎では粉塵暴露歴情報。
 - 嗜好歴：喫煙歴（本数×年数）。

- 服薬歴：腎疾患に関連の深い薬剤（RAS 阻害剤、ステロイド剤、高脂血症薬など）に加え、サプリメントや民間薬の慢性、および急性の接種情報。
- ワクチン接種：特に COVID-19 パンデミック後の日時、副反応の有無を含めたワクチン接種情報。

2. 身体所見のポイント

- 基本情報：全身炎症による腎炎などの体重の急激な減少。
- 理学所見：皮疹とくに紫斑などの皮膚所見と、リンパ節腫大。

3. 各種検査所見のポイント

腎生検時およびこれまでの経過についても検査情報は必須である。病理傷害部位を推測する重要な情報となる。

- 尿所見
 - ・糸球体病変所見：変形赤血球の有無とその重症度は血管炎が糸球体に及んでいることを、蛋白尿の程度は足細胞を含む基底膜傷害を示唆する。
 - ・尿細管病変所見：尿糖、pH、比重異常、尿 NAG、 β 2 MG 異常によりその急性および慢性の細胞破壊による機能低下を示唆する。
- 血液生化学検査所見

血管炎は全身炎症病態であり、腎機能低下を来していることも多く、普遍性炎症所見が見られるが、特に好酸球増多情報は重要である。しばしば急速進行性糸球体腎炎所見を呈するため Cr 上昇（昨今では Cystatin C も必須）、eGFR 低下はその経過も含めた情報が求められる。糖尿病合併例では程度と歴史を知るため HbA1c の経過も必須である。
- 血清学的検査

全身炎症としての多クローン性ガンマグロブリン増多、EGPA に特異的な IgE 増多、さらに補体の上昇は炎症に伴って、低下はクリオグロブリン血症などに時に見られる。また、膠原病、血管炎の指標である自己抗体については詳細情報が求められ、SSA、SSB 抗体は間質病変を Scl-70 抗体は小動脈血管硬化病変を示唆する。RPGN では ANCA および抗 GBM 抗体情報が必須である。
- 感染症検査

血管炎に関連する感染症情報も多く、TPHA, STS および抗カルジオリピン抗体情報は病理学的 TMA 所見との関連が強く、C 型肝炎ウイルス陽性所見はクリオグロブリン血症の情報として必須である。
- 画像所見

腎生検の施行の可否を確認する際のマクロ画像所見として、両腎の左右差、表面の不整、エコー所見による皮質の菲薄化、および皮随境界の不明瞭など、組織病理診断前の重要な情報である。腎生検で得られる血管炎所見は細動脈サイズのものに限られるため、中、大血管の情報が得られる MRI や CT などの所見は病理診断前に確認すべき重要所見である。

4. 臨床診断

上記の病歴や身体検査所見より、症候の区分、進行度の区分を加味した臨床診断がなされる。現在 WHO では以下の臨床症候群が分類されている。

- # 無症候性血尿症候群
- # 急性腎炎症候群
- # 急速進行性腎炎症候群
- # 慢性腎炎症候群
- # ネフローゼ症候群

時には複数の臨床症候が同一患者に重層している場合もある。

II. 病理標本の適切な採取と標本の提供

腎臓専門医は病態を把握しつつ腎生検の必要性が認められた場合、患者および関係者への十分なインフォームド・コンセントを得て、安全を確保しつつ腎組織の採取と病理への標本提出を行う。わが国では腎臓専門医や泌尿器科医など臨床側が腎生検を施行し、標本採取を行っている。詳細は別項³⁾にあり、ここでは自施設例を示す。

1. 適切な採取標本の光顕、蛍光抗体法、電顕検索用組織の提供

皮質の採取は必須である。開放腎生検でなく、多く行われている針生検では確実な病理診断と安全性も考え、18G 針で 2 cm の長さの腎組織を 2～3 本採取する。その際可能であれば実体顕微鏡で、なければ通常の顕微鏡低倍率で組織を生理食塩水に浸した状態で観察し、赤い球状（直径約 200 μm ）の糸球体を観察して皮質を確認、被膜側から皮質、皮髄の境界部と髄質の一部が含まれていることを確認する。他の一本は皮質部分を十分に採取し、被膜側から、糸球体が含まれていることを確認して電顕用に 1～2 mm、蛍光抗体法用に 3～5 mm 切り分け、残りを光顕用とする。これらの処置中にピンセットで組織をつままないように注意する。

2. 固定法

採取した組織はあらかじめ用意した固定液に光顕、電顕組織はすぐにつける。

- 光顕用固定液

10～20%緩衝ホルマリン：最も広く用いられており、免疫染色を行う場合には薦められる。腎生検針組織であれば 4 時間で充分固定される。

Dubosq-Brazil, Bouin などアルコール含有固定液：基底膜の染色性、Masson Trichrome 染色などに有用とされ、組織の自然なふくらみが維持される傾向がある。3 時間以上は固定に要する。ピクリン酸などを用いるため免疫抗原性は落ちる事に注意が必要である。

- 蛍光抗体法用固定

切り分け後、早急にクライオモルド（1 号）に OCT コンパウンドを少量入れて中央に水分を除いた状態で組織を置き、さらにコンパウンドで包埋して底に沈め、クライオモルドを液体窒素やドライアイス＋アセトンに浮かせて、急速に凍結固定する。

これらが不可な場合はシャーレに脱脂綿を生理食塩水にひたした状態で組織を入れ、早急に病理検査室に提出して凍結固定を依頼する。抗原性を確保するため迅速な対応が必要である。

- 電顕固定液

グルタルアルデヒド固定液に 1 mm サイズの糸球体の含まれている組織を浸し、4℃で保管する。

これらの組織の固定ののち、病理検査室への提出を速やかに行うことが望まれる。

腎生検においては適切な臨床情報と病理標本の提供が必須である。

臨床側は、病理診断をあおぐにあたり得られた情報から推測できる病変の主座や重症度、および診断名の推測とその根拠が提示されるべきで、これに対して病理診断医は病理所見からそれらの推測の妥当性の判断や新たな所見の提示を行い、臨床側と協力して治療計画を構築する。可能であれば、その経過情報の病理側への提供が求められる。

参考文献

1. 横山 仁 腎生検臨床情報記載用紙：成人：腎生検病理アトラス 改訂版 日本腎病理協会／日本腎臓学会編 pp13-22 東京医学社 東京 2017
2. 武曾恵理：2. 腎生検前のチェック項目 第一章 腎生検の手技とポイント：腎生検・病理診断—臨床と病理の架け橋 編集：「腎と透析」編集委員会 腎と透析 Vol.82 増刊号 2017;82(増刊号) pp13-28 東京医学社 東京 2017
3. 山中宣昭：腎生検標本の扱い方・固定法および染色法。日本腎臓学会・腎病理診断標準化委員会（編）：腎生検病理診断標準化への指針 pp65-95 東京医学社 東京 2005

IV. 皮膚生検

(1) 皮膚生検において臨床医が病理診断医に期待すること

東北医科薬科大学医学部皮膚科 川上 民裕

はじめに

血管炎は、病理組織所見での壊死性血管炎が検出されて初めて確定診断となる。皮膚科医が血管炎に對峙した際には、皮膚生検で患部を取り出し、その中に壊死性血管炎を検出して、初めて確定診断となる。別の言い方をすると、皮膚科医は病変皮膚内から壊死性血管炎を発見するために皮膚生検を行う。そして皮膚生検は、患者への負担が多いので、頻回に施行したり、多数箇所から採取することを皮膚科医はしたくない。そのため、一つの皮膚生検標本をより有効に吟味したい、と皮膚科医は願っていることを病理診断医の先生方に理解して頂きたい。

以下に示す方略は、典型的な壊死性血管炎像を検出するための皮膚生検標本の最大限活用法である。この試みによって、私の過去の経験では約2倍の血管炎検出率アップを達成できた¹⁾。病理診断医の先生方には是非とも理解して頂き、御協力を賜りたい。

1. 紡錘形の皮膚標本は、長軸から切り出してほしい

癌の全摘出を対象とした皮膚生検標本は、もしかしたら、短軸で切り出すかもしれない。しかし、典型的な血管炎病理組織像を検出したい場合は、もし、その標本が紡錘形の皮膚標本であったなら、是非、長軸から切り出すことを希望する。紡錘形の長軸標本は、本当に単純な理由であるが、物理的に短軸標本より、広い範囲を見ることができる。すなわち、典型的な血管炎病理組織像を検出しやすい。

2. Deep cut（深切り）をしてほしい

通常、皮膚生検標本はホルマリン固定され、病理医と臨床検査技師が判断し、適当と思われる1断面のみを切り出し、病理標本が完成する。この切出し面で壊死性血管炎像が発見できない場合でも、あきらめてはいけない。深切り切片（Deep cut や Step section）の検討を行う。切り出し面から50枚目、100枚目、150枚目、ときには200枚目を検討するべきである。連続切片ではないので、4～5枚の標本を検討するだけでさほど時間を要さない。

以上の作業が、いかに重要であるか、過去の皮膚生検を振り返ってみた。大学病院皮膚科を来院した2003年から2012年まで（過去10年間）の皮膚動脈炎（かつての皮膚型結節性多発動脈炎）101症例を検証した。皮膚生検1箇所施行が79例、2箇所施行が22例認められた。2009年頃からは、ほとんど2箇所施行であった。1箇所施行79症例中、10症例は深切しなければ血管炎が確認できなかった。すなわち13%の血管炎像検出率アップである。2箇所施行22症例中、12症例は1箇所施行の通常のやり方では見落としていた可能性のある症例であった。すなわち2倍以上の血管炎像検出率アップである¹⁾。

担当病理医や臨床検査技師にとって、深切りは負担である。しかし、一度、深切り切片で検出できた血管炎像を経験して頂ければ、病理診断医にも納得して頂けると考える。

補足

1. 特殊染色

すでにされておられる多くの病理診断医の先生方への確認事項である。通常の HE 染色に追加して、マッソン染色とエラスチカ染色を施行してほしい。マッソン染色はフィブリノイド壊死の確認、エラスチカ染色は内弾性板の破壊や動脈の確認のため、施行する。

2. 白血球破碎性血管炎 (leukocytoclastic vasculitis)

血管炎とは病理組織における核塵を伴う好中球浸潤、血管壁のフィブリノイド壊死を主徴とした壊死性血管炎 (necrotizing vasculitis) を病態の主座とした疾患群のことをいう。ところが、こと皮膚に関してはこれがあてはまらないことがある。真皮乳頭層から乳頭下層、網状層に位置する血管は、その血管腔が狭くかつ血管壁が薄いため、フィブリノイドの沈着に耐えられず、フィブリノイド壊死を呈さない。さらに、好中球浸潤から核塵の浸潤が目立つ。ここから白血球破碎性血管炎 (leukocytoclastic vasculitis) と呼ばれる。この形状の相違は病理学的意味合いが大きいので、壊死性血管炎と白血球破碎性血管炎を明白に分けることを病理診断医の先生方は好むかと考える。一方、皮膚科医にとって、壊死性血管炎も白血球破碎性血管炎も皮膚血管炎の典型的所見である。

文献

- 1) Kawakami T, Kimura S, Takeuchi S, Soma Y. Significance of two skin biopsy performances with consecutive deeper sections in the differential diagnosis between cutaneous polyarteritis nodosa and livedo vasculopathy. Acta Derm Venereol. 2014; 94 (1): 84-85.

IV. 皮膚生検

(2) 皮膚生検において病理診断医が臨床医に期待すること

札幌徳洲会病院 病理診断科 小川 弥生

はじめに

皮膚の脈管は、皮下の小動脈から細動脈が分岐し真皮網状層に深層血管叢、交通枝を経て、浅層血管叢を形成し、毛細血管が真皮乳頭部に流入する。そのあと毛細血管後細静脈となって浅層血管叢に戻り、交通静脈を経て、皮下の小静脈に移行する。皮下組織では血管系は葉間結合組織内を走行して血管壁には平滑筋細胞を有する小動脈がみられ、真皮乳頭部では平滑筋細胞を有さない細動脈が主体である¹⁾。これらの血管を主座として炎症を生じる病変が皮膚の血管炎で、傷害される血管のサイズや炎症のパターンは病態や部位によって異なり、全身の血管炎分類 CHCC2012²⁾を参考にした D-CHCC2018³⁾として提唱された。

D-CHCC2018 では、皮膚科臨床の立場からみる皮膚限局性血管炎と皮膚に血管炎がみられる全身性血管炎が整理されており、傷害される血管を真皮の細動静脈と皮下組織にある平滑筋層を有する小動静脈に分けている。皮膚血管炎の分類と特徴を理解して、適宜臨床と連携することは病理診断に役立つと思われる。本稿では、皮膚血管炎の臨床病理学的所見を整理し、鏡検する際のポイントとなる臨床情報を基に臨床医への期待をまとめる。

I. 皮膚血管炎：障害血管とパターン

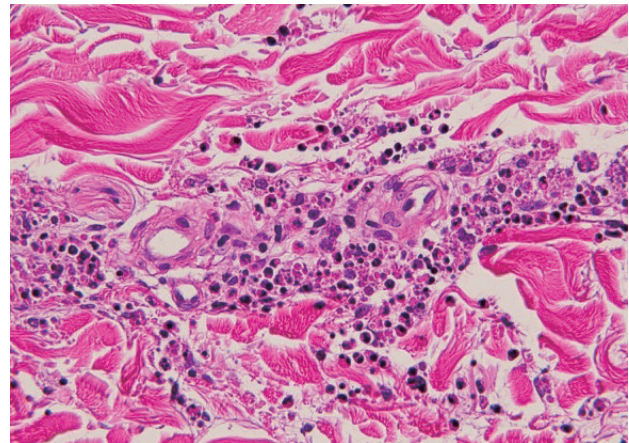
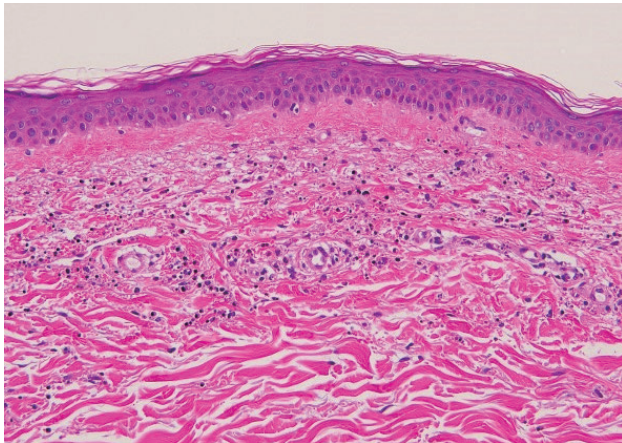
皮膚の血管病理では、血管の走行を反映して、部位・深さによって傷害血管のサイズが異なり、これらは皮膚症状に関連する。代表的な皮膚血管炎の臨床病理学的特徴を下記に要約する。

① 真皮細動静脈を主体に傷害する疾患

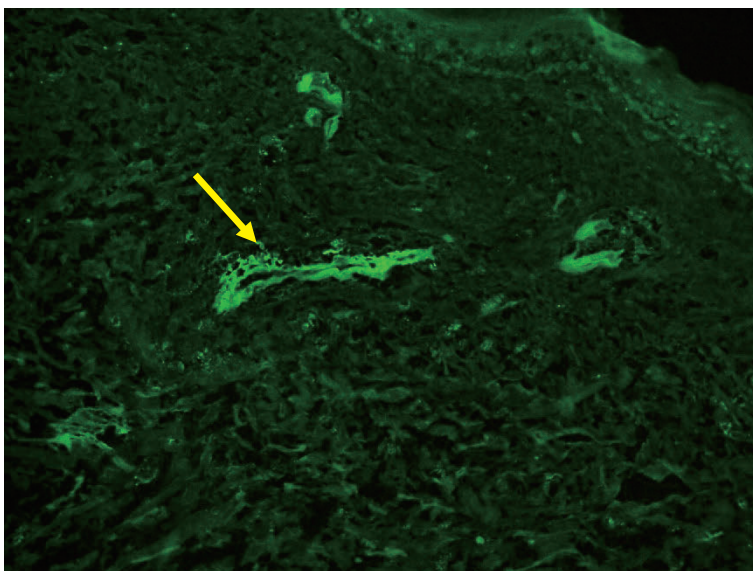
- A) 皮膚白血球破碎型血管炎 (LCV; leukocytoclastic vasculitis) : CHCC2012 では単一臓器の血管炎に分類された。皮膚所見として紫斑や紅斑、結節、水疱、膿疱、あるいは潰瘍を形成する。多様な病態を背景として、真皮浅層の細動静脈および毛細血管における壊死性動脈炎の1つのパターン(LCV パターン)と捉えられる。真皮の小血管の内皮細胞腫大、フィブリン沈着、赤血球漏出がみられ、とくに好中球浸潤とその核破壊像が特徴である(図 a, b)。蕁麻疹様血管炎、IgA 血管炎、クリオグロブリン血症性血管炎やその他の薬剤や感染を契機とした血管炎でも見られる。
- B) 蕁麻疹様血管炎：正補体血症性蕁麻疹様血管炎と低補体性蕁麻疹様血管炎に分かれる。いずれも真皮の細動静脈炎で、低補体性は SLE の合併が多い。正補体性は、24 時間以上持続して色素沈着や紫斑を残す蕁麻疹様の皮疹で、炎症細胞を伴う蕁麻疹と連続性をもつ疾患概念とも捉えられている。核塵をとまなう血管周囲性の好中球浸潤と赤血球漏出があり、LCV パターンを示す。
- C) IgA 血管炎：浸潤を触れる紫斑で下腿に多発することが多い。水疱や糜爛を伴うこともある。病理所見では、真皮浅層の細小血管に LCV パターンを認め、蛍光抗体法で細小血管壁に IgA 染色が陽性となることが特徴である(図 c)。真皮に浮腫と炎症像がみられ、表皮に海

綿状態や球状変性、水疱、膿疱などを生じることもある。関節痛や腹部症状、糸球体腎炎の併発に注意を要する。

- D) クリオグロブリン血症性血管炎：血漿中に寒冷刺激で沈殿するクリオグロブリンが検出され、真皮上層の細小血管にクリオグロブリンからなる血栓（硝子様血栓）が形成され、紫斑を生じる。皮膚外症状としては神経症状や糸球体腎炎がみられる。病理所見は、細小血管内腔の硝子様血栓（免疫蛍光染色で免疫グロブリンや補体が陽性）と血管周囲の単核球浸潤が主で、LCV パターンや小動脈のフィブリノイド壊死を伴うこともある。



(a) 真皮浅層の細血管周囲に炎症細胞浸潤をみる (b) a の拡大：核塵を伴う好中球浸潤



(c) IgA 染色では真皮浅層の細小血管壁に陽性所見を認める (→)

② 真皮の細小血管および皮下の平滑筋を伴う小型血管炎

- A) 多発血管炎性肉芽腫症：上下気道および腎における血管炎で、組織学的には肉芽腫性血管炎を特徴とする ANCA 関連血管炎。主な皮膚所見は浸潤をふれる紫斑で、LCV パターンが多い。

- B) 顕微鏡的多発血管炎：巣状分節性壊死性糸球体腎炎、関節炎、末梢神経障害、肺出血、消化器症状などを呈する ANCA 関連血管炎。主な皮膚所見は浸潤をふれる紫斑で、LCV パターンが多い。
 - C) 好酸球性多発血管炎性肉芽腫症：喘息や好酸球増多を伴う全身性血管炎で ANCA 関連血管炎の一型。皮膚所見は 50% 程度⁴⁾に報告され、紫斑、皮下結節、蕁麻疹その他好酸球性皮膚炎などを呈する。ANCA は 3 割程度に陽性。血管炎としての LCV の他、好酸球増多に関連する皮膚所見として、好酸球の脱顆粒で膠原線維変性(Wells 症候群)を呈する例もある。
- ③ 主として皮下の小動静脈を傷害する血管炎
- A) 結節性多発動脈炎(PN; polyarteritis nodosa)：真皮深層の細動脈あるいは皮下の小・中動脈を傷害し、全身型 PN の皮膚病変と皮膚型 PN に分かれる。全身型 PN では、約半数に皮膚所見があり⁵⁾、網状皮斑、結節、蕁麻疹、潰瘍、表皮壊死などを呈する。皮膚型 PN では、主として網状皮斑、結節、潰瘍などを呈する。
 - B) ペーチェット病：口腔内アフタ、ブドウ膜炎、外陰部潰瘍、皮膚症状などを認める。皮膚症状としては、結節性紅斑様皮疹、血栓性静脈炎、毛包炎がみられ、うち血栓性静脈炎は四肢に有痛性の皮下硬結として触れ、組織学的には皮下脂肪組織の小静脈に血栓傾向を認め、血栓のみられる血管周囲に炎症細胞浸潤と脂肪織炎を呈する。
- ④ 薬剤に関連した血管炎
- 皮膚小型血管炎の 10% が薬剤関連とされ⁶⁾、内服後 1 週間から 10 日後にみられる例が多いが、遅れて発症する症例もみられる⁷⁾。皮膚症状は点状出血、紫斑、丘疹、結節まで様々である。診断にはその他の小・中型血管炎の背景、例えば膠原病、感染、悪性腫瘍などを除外し、IgA 血管炎や ANCA 関連血管炎も同様の所見を呈するので除外する必要がある。水疱、膿疱や表皮壊死を伴う激しい LCV では短期間の副腎皮質ステロイド投与も検討する。

II. 診断に役立つ臨床情報（臨床医への“期待”）

皮膚血管炎の病理診断では、血管炎がみられる部位（真皮浅層、深層、皮下組織）と傷害血管のサイズ（毛細血管、細動静脈、平滑筋を伴う小動静脈）、血管炎のパターン（LCV パターン、フィブリノイド壊死性動脈炎、肉芽腫性動脈炎、血栓を伴うもの）などの病理所見と、臨床情報を参考に報告する。其々の血管炎においては、前述したような臨床上的特徴もあることから、下記のような情報を入手すると適確に診断に活かすことができる。

- ① 全身型血管炎の可能性、たとえば高い炎症反応、発熱、倦怠感などの血管炎症状はないか
- ② 血清 ANCA の値、好酸球増多症や血清クリオグロブリンの有無
- ③ 神経症状、肺野異常、尿異常の有無
- ④ 発症前の投薬に血管炎との関連が疑わしいものはないか
- ⑤ ウイルス感染や細菌感染の有無と時期
- ⑥ 発症後から生検までの日数や、治療開始の有無
- ⑦ 皮膚症状のみられる部位、マクロの皮膚所見、症状の出現に寒暖や何等かの契機などの傾向がないか

これらの情報についての要約が検体提出時に明確になっていると、病因を絞って考察しながら診断を進めることができる。とくに血管炎の診断においては、全身性あるいは皮膚限局型血管炎かという点で、診療方針に影響が大きいと思われるので、詳細な記述が望ましく、本稿で臨床サイドへの“期待”という形でまとめた。

III. おわりに

日常の生検で遭遇する主要な皮膚血管炎の診断に、必要な臨床情報は依頼書にわかる範囲で記載があると診断に役立つ。これらの情報を活用するためには、皮膚の病理所見を詳細に記述することが基本で、病理医サイドには傷害血管の部位・サイズやその特徴も覚えておくことを期待したい。

1. 齊田俊明 正常皮膚の組織所見 皮膚病理組織診断学入門 改訂第3版 p 6 南江堂, 2017
2. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA et al. 2012 revised international chapel hill consensus conference nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013; 65:1-11
3. Sunderkötter CH, Zelger B, Chen KR et al. Nomenclature of cutaneous vasculitis: dermatologic addendum to the 2012 revised international chapel Hill consensus Conference Nomenclature of vasculitides. *Arthritis Rheumatol* 2018; 70:171-184
4. Frumholtz L, Laurent-Roussel S, Aumaitre O et al. Clinical and pathological significance of cutaneous manifestations in ANCA-associated vasculitis. *Autoimmun Rev* 2017; 16:1138-1146
5. Kluger N, Pagnoux C, Guillevin L et al. Comparison of cutaneous manifestations in systemic polyarteritis nodosa and microscopic polyangiitis. *Br J Dermatol* 2008; 159:615-620
6. Fiorentino DF. Cutaneous vasculitis. *J Am Acad Dermatol* 2003;48: 311-340.
7. Guzman AK, Balagula Y. Drug-induced cutaneous vasculitis and anticoagulant-related cutaneous adverse reactions: insights in pathogenesis, clinical presentation, and treatment. *Clin Dermatol* 2020; 38: 613-628.

血管炎病理診断のために有用な染色プロトコル集

発行：2025 年 5 月

厚生労働省科学研究費補助金・難治性疾患政策研究事業
難治性血管炎の医療水準・患者 QOL 向上に資する研究班
(難治性血管炎班)

印刷：大倉印刷株式会社

〒112-0001 東京都文京区白山 3-6-17

本プロトコル集の著作権は難治性血管炎の医療水準・患者 QOL 向上に資する研究班に帰属します。



**Japan Research Committee of the Ministry of Health Labour,
Welfare for Intractable Vasculitis**