

維に富む組織は、固定による収縮が大きく、変形してしまうため、軽く固定した後に切り出したほうがよい場合もある。また、血管などのように、採取する部位によって性状が異なる可能性がある場合には、採取する部位も厳格に決めておく必要がある。

2) 固定

固定については通常の中性ホルマリンや4% paraformaldehyde/PBS および PLP などの固定液¹⁾があるが、目的に応じて固定法を選択する。固定さえしっかりしていれば、たいいていの免疫組織化学や ISH²⁾で、十分な染色結果が得られる。逆に過固定であったり固定不良の検体ではいろいろな染色法の工夫をしてもうまくいかないことが多いので、まず、固定をしっかりとこなうことが何より重要である。筆者らは免疫組織化学での抗原性や ISH での mRNA の保存を良くするため、固定時間はできるだけ短くするようにしている¹⁾⁻⁴⁾。本来は目的とする抗体ごとに、固定の最適条件が一つ一つ異なっており、それをおこなうべきであるが、本稿においては使用頻度の高い固定法を述べる。

(1) 4% Paraformaldehyde/ phosphate buffered saline (4% PFA/PBS)

広く免疫組織化学や ISH に用いられている方法で、筆者らの使用頻度が最も高いのはこの方法である¹⁾⁻⁴⁾。アルデヒドを含んでいるため、形態の保存と蛋白系抗原の保持の両者に優れている。筆者らはこの固定法を用いてサイトカインの免疫組織化学や ISH を行っているが、良好な結果が得られている。固定に際しては1cm × 1cm × 3mm 程度の大きさに切った組織片を固定液中に浸漬し、室温で2 ~ 4時間固定する。このときに、固定用の瓶を回転振盪機に載せて固定すればより固定液の浸透がよい。また、大きな検体の場合は、検体の大きさに応じて固定時間を長くする。本固定法は固定時間が短く、固定作用も10%ホルマリンに比較して弱いため、ブロックの保存や薄切後の切片の保存も低温^{4℃}で行い、室温には置かない。

(2) periodate lysine- paraformaldehyde (PLP) 固定^{5), 6)}

一般に、免疫グロブリン、補体、酵素蛋白等の糖を含んだ蛋白は、アルデヒド系固定液により蛋白の部分の抗原決定基が変性しやすい。そのためアルデヒドの濃度が高いと抗原性が失われやすく、逆に低いと組織および細胞の構造の保存や抗原の固定が不良になる。この問題を解決するため糖蛋白の糖の部分の不動化で固定力を補い、その分だけアルデヒドの濃度を下げることが可能にしたのが PLP 固定法である。この固定法は酵素電顕にも応用できる有用な固定法であり、凍結ブロックは-80℃で長期間保存が可能である。

3) 脱脂

パラフィンブロック作成の際は、十分に脱脂することが必要である。脱脂が不十分であると、パラフィンの組織への浸透が悪く、薄切が困難な場合もある。脱脂はエタノールやクロロホルムなどに浸漬して4℃で行うが、回転振盪機上で振盪すると脱脂時間は短縮される。また、マイクロウェーブ照射によって脱脂が早く進むという報告もある。

4) 脱灰^{5), 6)}

硬組織を含む場合には脱灰操作が必要となる。脱灰液はギ酸などの酸の他に、キレート剤の EDTA などがあるが、抗原決定基を構成する糖蛋白は、酸やアルカリによって変性しやすいため、脱灰には中性領域 (pH 7.1 ~ 7.4) での脱灰が可能な EDTA がよく、かつ低温で処理するのが望ましい。

5) 免疫組織化学

弾性線維に関する染色でも原則的には通常組織での免疫組織化学の手順と変わるところはなく、サイトカインや蛋白分解酵素などの免疫組織化学もおこなうことができる。免疫組織化学は前述の固定による影響が大きいため、染色がうまくいくか否かはそれらの条件に左右される。また、細胞密度が少なく、

線維成分を多く含む組織切片は染色中に剥がれる傾向が強く、それを防ぐために薄切時にはシラン・コーティングされたスライドガラスを用い、伸展や乾燥も十分におこなう。また、免疫組織化学の賦活化のためにしばしばオートクレーブ処理をおこなうが、広く用いられている121℃で5分という条件では切片が剥がれやすいため、筆者らはこれを105℃で30分に変えておこなっている。実際に染色性を比較すると、オートクレーブの温度が121℃と105℃とでは、染色性には差は認められず、121℃では部分的に切片が剥がれてしまうことから、免疫組織化学の賦活化のオートクレーブは105℃で30分の方が適していると思われた。このほか、マイクロウェーブを用いる方法や、トリプシンやペプシンなどの蛋白分解酵素で消化反応を行うことも多い。特にエラスチンなどの基質の場合は組織の中では他の基質と絡み合ったり重なっていることにより、抗原と抗体との結合を阻害する可能性もあるため、酵素による消化をおこなうこともある。

6) *in situ* hybridization

エラスチンを含む組織での *in situ* hybridization (ISH) の反応条件や留意点についても通常の ISH と変わることはなく、固定時間は短い方がよい。また、反応がうまくいくかどうかは、ISH のプローブの特異性に左右されることが多い。近年は免疫組織化学よりも ISH の結果を示す論文が多くなっている。原因はさまざまあげられるが、一つには市販の検出キットにより、以前よりも ISH が簡便になり、感度もあがったことがあげられる。免疫組織化学では抗原分子が固定によって構造変化を受けやすく、しかもその構造変化は抗原によって異なり、最適な固定法も抗原ごとに異なっている。また、市販されていない抗体は入手しにくく、作成も困難で、業者依頼は非常に高額になる。一方、ISH では mRNA が保存されていれば固定の影響をうけにくいということと、塩基配列が分かれば、オリゴプローブの合成や標識は可能で、安価におこなえるという利点がある。一般的には蛋白を産生している細胞と、保有、貯蔵している細胞とは分布が同じであるが、基質であるコラーゲンなどの場合にはすでに作られた蛋白の分布

(免疫組織化学) と現在産生している細胞の分布 (ISH) は異なってくる (図 1)。ISH で使うプローブの種類については、二本鎖 cDNA, 一本鎖 DNA, 合成オリゴヌクレオチド、一本鎖 RNA などがある。それぞれに特徴があるが、入手可能であれば一本鎖 RNA が理想的である。最近では、核酸の塩基配列をインターネットなどで検索できるので、オリゴプローブも合成可能である。プローブの標識については、現在はジゴキシゲニンなどの非放射性物質による標識が多く用いられている。実際の ISH の手順については成書を参照されたい²⁾。おおまかに述べると、脱パラフィン、ハイブリダイゼーション前の前処理、ハイブリダイゼーション、洗い、そしてシグナルを可視化するための発色反応である。

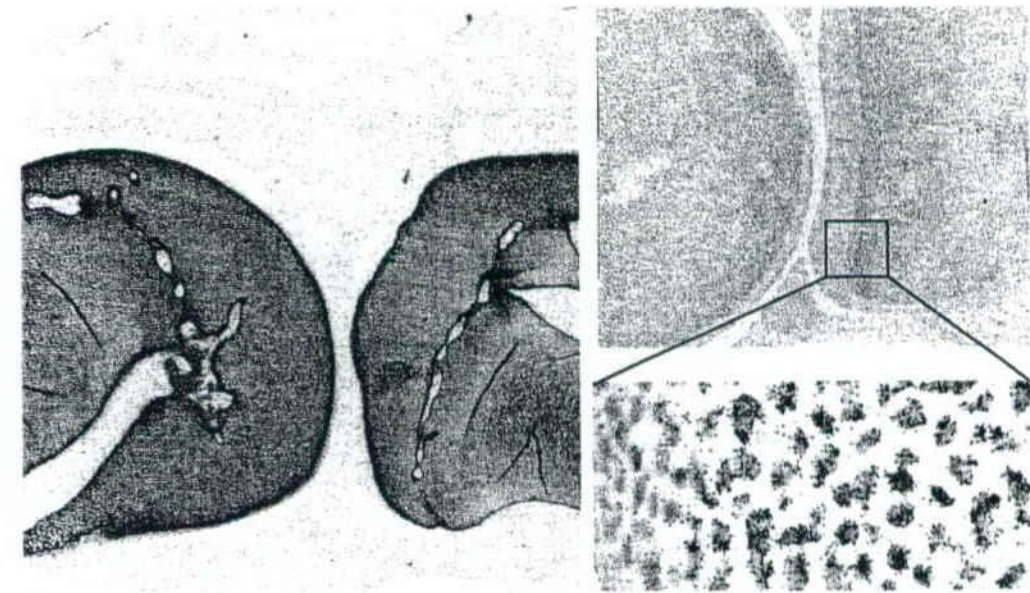


図 1 : ニワトリ胚の関節組織での II 型コラーゲンの蛋白と mRNA の分布
蛋白 (左) の陽性範囲は軟骨基質全体であるのに対して、mRNA (右) は軟骨細胞のみが陽性となる。

7) MicroProbe Staining System

最近、筆者らは MicroProbe Staining System (Fisher Scientific 社, USA) を用いて ISH をおこなっている。反応の流れは通常の ISH とだいたい同じであるが、手順がかなり簡略化され、ハイブリダイゼーションの時間が30分~ 2時間

となり、実験全体が2～3時間で終了できる。一般のISH法ではハイブリダイゼーション時間は12～18時間で、切片がはがれやすいが、このシステムでは標本がはがれることは少ない。この方法は毛細管現象を利用して反応液を吸い上げたり、排出したりするシステムで、スライドガラスの上側と下側の角の部分にセラミクスが塗装されている。このスライドガラスを2枚向かい合わせると、セラミクス塗料の厚みで150 μ mの隙間ができる(図2)。反応液はこの隙間を毛細管現象で上がり、必要な量のプローブ液が切片を覆うようになっている。これをインキュベーター(反応槽)に入れて反応させる。

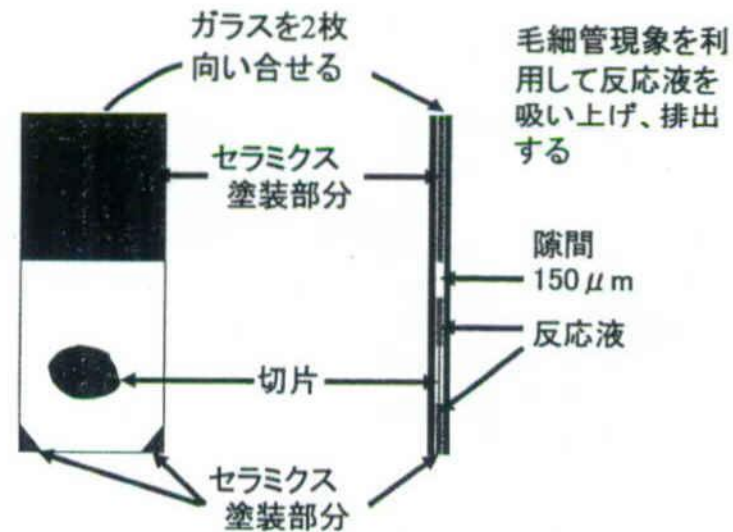


図2：MicroProbe Staining System の原理
このシステムでは毛細管現象を利用して反応液を切片上に載せている。

2. 肺動脈を用いた検討

1) 肺動脈研究について

大動脈は加齢とともに硬化性変化が進行するが、動脈硬化を促進させる因子としては加齢の他に高血圧、糖尿病、高脂血症などが挙げられる。しかし、肺動脈では肺高血圧症以外に高度の硬化性病変をみることは少なく、加齢に伴う肺動脈の変化については、簡単な問題ではないものと思われる。

大循環系での血圧の上昇が大動脈硬化の大きな原因の一つであるとするなら

ば、血圧上昇のみられない肺動脈では、大動脈に比較して血圧の影響を無視した純粋な加齢的变化を把握しやすいのではないかと思われ、検討を行った。

2) 検討の対象

0～90歳までの剖検症例を対象に、肺動脈が左右に分岐する直前の部分を輪切りにして切り出した。この部分の肺動脈は大動脈に相当する弾性型の太い動脈部分である。症例の選択については、明らかな肺高血圧症の症例や肺動脈幹を巻き込む肺癌の症例を除いては特に制限を設けなかった。採取された検体は4% Paraformaldehyde / PBS で2～3時間、室温で固定し、通常のパラフィン包埋標本を作成した。ブロックは2 μ mに薄切、乾燥したものを脱パラフィン後に組織染色に用いた。

3) 方法

免疫組織化学および古典的な特殊染色によって、肺動脈の構成成分である、弾性線維、平滑筋線維、膠原線維について加齢的な変化を検討した。

血管の構成成分を染め分ける染色法として、Elastica Goldner (E-G) 染色やElastica van Gieson などの染色法がある。いずれも、免疫染色や精密な分析法が開発される以前からの方法であるが、現在もなお利用されている。今回は、E-G 染色と抗体を用い動脈の主要な構成成分の蛋白の同定をおこない、画像解析装置 Image Processor for Analytical Pathology- WIN (IPAP-WIN、住化テクノサービス株式会社) を用いて上記の成分の加齢的な変化を組織定量的に検討した。

4) 免疫染色と E-G 染色との比較

はじめに連続切片を作成し、E-G 染色と免疫染色の両方を行い、血管中膜における弾性線維、平滑筋線維、膠原線維、それぞれの分布状態を確認した。次に、同一視野での E-G 染色のレゾルシン-フクシンと抗トロポエラスチン抗体の陽

性部位、オレンジ G と抗平滑筋抗体陽性部位、ライトグリーンと抗 I 型コラーゲン抗体陽性の面積を画像解析装置 (IPAP-WIN) で測定し比較した (図 3)。その結果、免疫染色と E-G 染色の間では弾性線維は $r=0.82$ 、平滑筋線維は $r=0.96$ 、膠原線維は $r=0.73$ といずれも高い正の相関が得られ、E-G 染色の各成分が免疫染色での弾性線維、平滑筋線維、膠原線維をそれぞれ表すことが明らかになった (図 4)。E-G 染色は古くからの方法であり、検体の固定条件などにはあまり影響を受けない。E-G 染色と免疫染色の結果の間に相関が得られない場合は、免疫組織化学のために試料を新たに収集しなければならないが、良好な相関が得られると、これまでに蓄積してあるパラフィンブロックが利用でき、過去の症例の検討が可能となる。

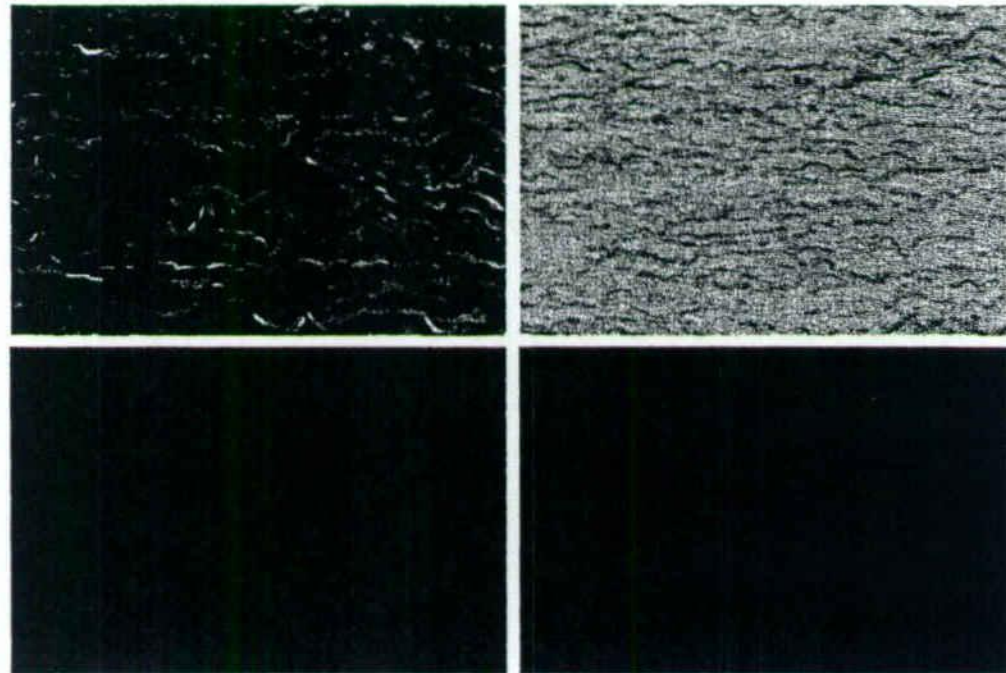


図 3 : Elastica Goldner 染色と免疫染色の比較
Elastica Goldner 染色で青紫色に染色される弾性線維 (左) と抗トロポエラスチン抗体で陽性 (茶かっ色) となる成分 (右)。それぞれの下段は画像解析装置での解析画像。

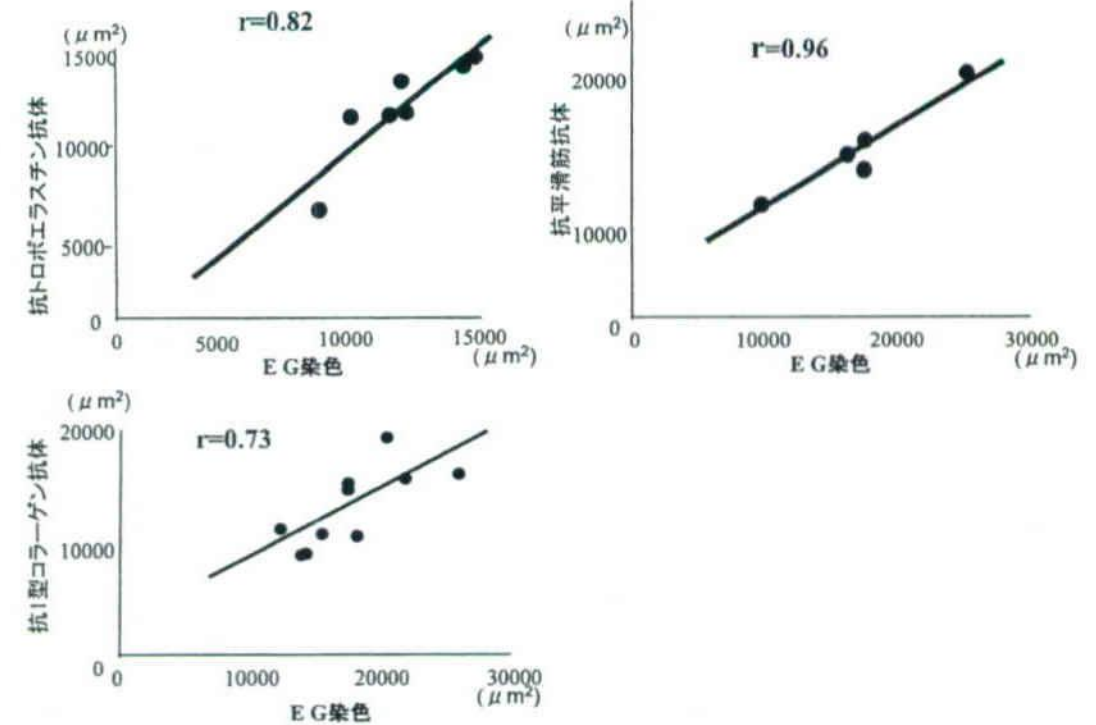


図 4 : Elastica Goldner 染色と免疫染色の面積の比較
Elastica Goldner 染色での弾性線維、平滑筋線維、膠原線維の各成分と免疫染色のトロポエラスチン、平滑筋アクチン、I 型コラーゲンの面積を比較した。いずれも $R=0.7$ 以上の正の相関を示す。

5) 肺動脈中膜の単位面積あたりの加齢的变化

上記の方法で肺動脈の各成分の加齢変化を計測した結果、興味深い所見が得られた。単位面積あたりの値で見ると、加齢に伴って膠原線維は増加するものの、弾性線維と平滑筋線維は減少していく傾向にあった (図 5)。この所見は大動脈壁における加齢変化としてすでに報告されている結果^{7) 8)}と類似している。

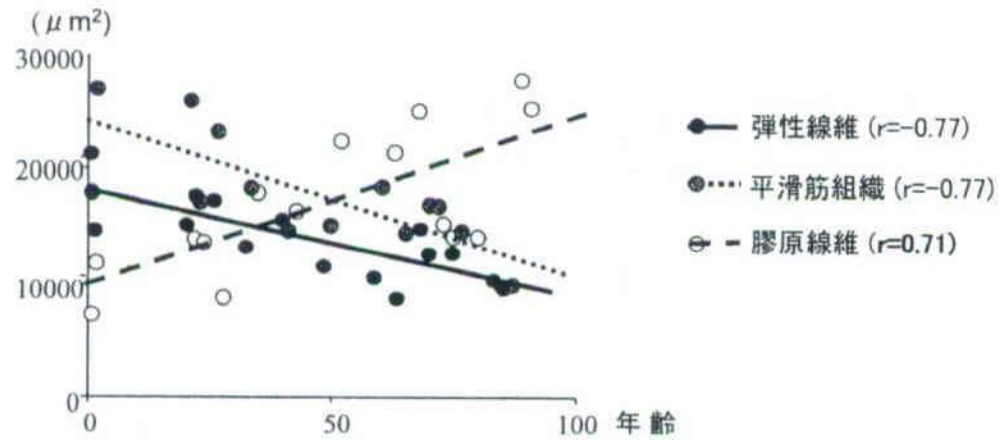


図5：単位面積当たりの肺動脈各成分の加齢変化
加齢とともに、膠原線維は増加するが、弾性線維と平滑筋線維は減少する。

6) 肺動脈中膜の断面全体における加齢的变化

次に、血管の断面での中膜の面積全体を測定し、各成分の総面積を求めた。その結果、肺動脈の中膜の断面積は加齢とともに増加し（図6）、血管の直径も大きくなっていった。個々の成分については、膠原線維は加齢とともに増加し、弾性線維や平滑筋線維も少しずつではあるが増加していた（図7）。しかし、その増加の割合が膠原線維では非常に大きいものに対して、弾性線維や平滑筋線維はゆっくりであるため、相対的には減少していくように見えるということが明らかとなった。

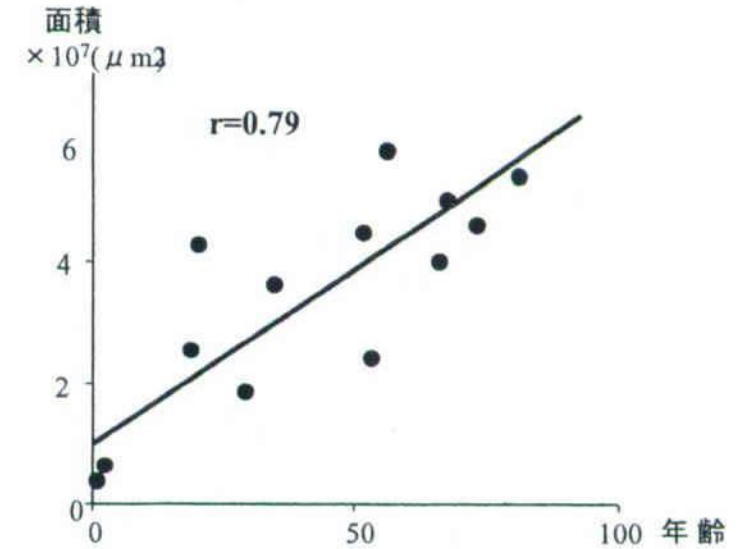


図6：肺動脈中膜の面積の加齢変化
加齢とともに肺動脈の中膜の横断面の面積は増加する。

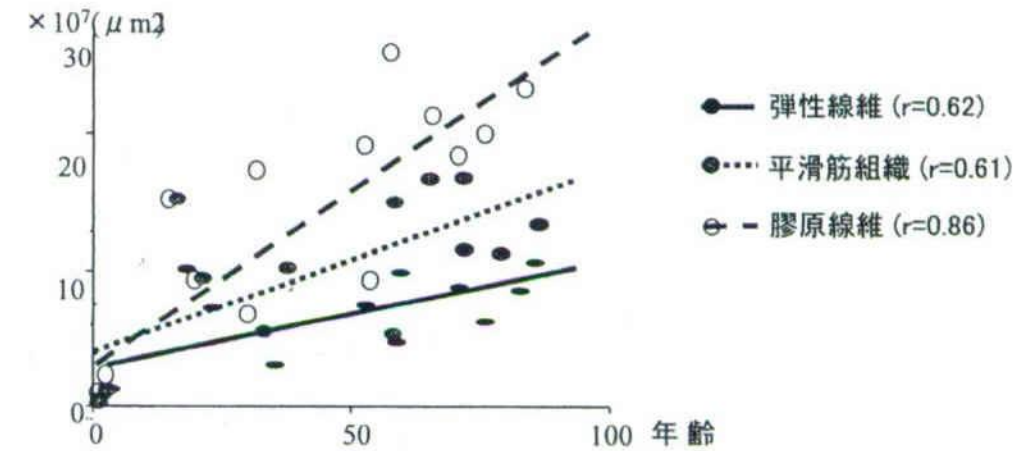


図7：肺動脈の各成分の加齢変化
肺動脈の横断面において、膠原線維、弾性線維、平滑筋線維いずれも加齢とともに増加するが、膠原線維に比較して弾性線維や平滑筋線維の増加はゆるやかである。

7) 肺動脈中膜の内側側、外側側での比較

さらに肺動脈の中膜を内側から外側に向かって3等分し、それぞれの領域について弾性線維・平滑筋線維、膠原線維の面積を測定した。その結果、各成分の面積の比率は内側側の中膜では、弾性線維：平滑筋線維：膠原線維 = 20：23：

28であるのに対し、外膜側では22:25:26であり、内膜側で膠原線維の比率が増加していた。

8) 肺動脈中膜の変性を引き起こす要因

中膜の変性の原因としては、最近注目されているアポトーシス^{9) 10)}の他に、エラスターゼをはじめとする蛋白分解酵素を発現する顆粒球系細胞¹¹⁾やマクロファージ^{12) 13)}などがあげられる。さらに血漿成分の血管壁への染み込みも考えられる。そこで、顆粒球、アポトーシス陽性細胞、エラスターゼ陽性細胞の数を検討したところ、中膜の内膜側が外膜側に比べて多かった(表1)。また血漿成分を代表するアルブミンの染み込みについても内膜側のほうが明らかに高度であった。ヒトの寿命は70~80年と長い。悪性腫瘍や破壊性疾患のようなレベルでアポトーシスや蛋白分解酵素などの血管の障害因子が多量に発現したら、ヒトはあっという間に死んでしまう。したがって、肺動脈ではゆっくりではあるものの、加齢とともに弾性線維や平滑筋線維の変性は進行しており、代わって膠原線維の増加が起こっているといえる。

	LCA (個数)	エラスターゼ (個数)	アポトーシス (個数)	CD68 (μm^2)
内膜側	1.65±0.7	0.28±0.19	25±6.5	550±289
外膜側	0.67±0.7	0.16±0.17	17.9±5.1	628±484

表1: 肺動脈におけるアポトーシスや炎症性細胞数
好中球(LCA: leukocyte common antigen)、エラスターゼ、アポトーシス陽性細胞は中膜の内膜側の方が外膜側よりも陽性細胞数が多い。

参考文献

1) 澤井高志、宇月美和、高橋裕一、宮崎修吉、斎藤隆幸、井上絃子: パラフィン切片を用いたサイトカインの免疫染色学的方法. 病理と臨床 10:1067-1070. 1992.

2) 澤井高志、宇月美和: ラジオアイソトープ(RI)を用いた *in situ* hybridization (ISH) の実践と応用. 組織細胞化学 1995 (日本組織細胞化学会編), pp132-138. 1995 学際企画, 東京

3) 井上尚美、宇月美和、森山芳則、安藤紀昭、佐藤克巳、小島忠士、鈴木勝己、澤井高志: 慢性関節リウマチ(RA) 関節破壊に関与する酸性プロテアーゼ(Cathepsin D) の活性化機構に関する免疫組織化学的解析. 炎症 15:313-321. 1995.

4) 松本不二夫、宇月美和、金子智香、力丸暁、国分正一、澤井高志: 急速破壊型股関節症(RDC)における関節組織での Matrix Metalloproteinases (MMPs), Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMPs) の発現について - 滑膜組織と骨破壊部の免疫組織化学的解析 -. リウマチ 37:688-695. 1997.

5) 森士朗、手島貞一、澤井高志、京極方久: 硬組織に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色のための脱灰法の開発. 病理と臨床 4:667-670. 1986.

6) 森士朗: 硬組織免疫組織化学のための脱灰法. 組織細胞化学 1990 (日本組織細胞化学会編), pp 83-91. 1990. 学際企画, 東京.

7) 矢野広志: 人大動脈中膜の加齢的变化. 久留米医誌 36:1042-1095, 1973.

8) 坂本寛志: 細胞外マトリックスの加齢的变化. 現代医療 23:2365-2370, 1998.

9) Smith JD, McLean SD, Nakayama DK: Nitric oxide causes apoptosis in pulmonary vascular smooth muscle cells. Journal of Surgical Research 79:121-127, 1998.

10) Hishikawa K, Oemar BS, Tanner FC, Nakai T, Fujii T, Luscher TF: Overexpression of connective tissue growth factor gene induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells. Circulation 100:2108-2112, 1999.

11) Reape TJ, Groot PH: Chemokines and atherosclerosis. Atherosclerosis 147:213-225, 1999.

12) Ohtsuki K, Hayase M, Akashi K, Koyiwada S, Strauss HW: Detection of

monocyte chemoattractant protein-1 receptor expression in experimental atherosclerotic lesions : an autoradiographic study. *Circulation* 104 :203-208, 2001.

- 13) Kinard F, Jaworski, Sergent-Engelen T, Goldstein D, Van Veldhoven PP, Holvoet P, Trouet A, Schneider YJ, Remacle C : Smooth muscle cells influence monocyte response to LDL as well as their adhesion and transmigration in a coculture model of the arterial wall. *Journal of Vascular Research* 38 : 479-491, 2001.

3. 加齢および肺高血圧症に伴う肺動脈幹の変化 —組織計測を用いた解析—

鎌滝章央¹、宇月美和¹、佐々木信人^{1,2}、澤井高志¹

¹ 岩手医科大学 病理学第一講座

² 岩手医科大学 内科学第三講座

はじめに

肺の血管病変というと肺高血圧症や膠原病に伴う plexiform lesion や線維性の内膜肥厚、フィブリノイド血管炎など中小動脈にみられる固有の血管病変が連想され、いわゆる“硬化性病変”についてはあまり関心が払われてこなかった。平均血圧10 mmHg と大動脈と異なり血圧も低い環境ではそれほど目立った変化がみられないことも事実である。しかし、肺動脈といえども生体であり、加齢に伴い変化が進行していくことが予測される。また、肺高血圧症の場合でも、変化の顕著な中小動脈の血管だけでなく、大きな血管もなんらかの影響を受けていることが考えられる。

本研究では、組織計測を用いて肺動脈幹を構成する成分である弾性線維、膠原線維、平滑筋線維について、初めに加齢に伴う変化を検討し⁽¹⁾、次に膠原病に伴う肺高血圧症の場合について検討した。

1. 検索の対象および方法

検索の対象：

加齢による変化：0才から90才までの15症例で、いずれも心疾患および心臓に慢性的な影響を与える肺、およびその他の疾患のない剖検症例である。

肺高血圧症：肺高血圧症（PH）の膠原病、原発性肺高血圧症（PPH）の剖検症例、計10例であり、心奇形による肺高血圧症は含まれていない。

計測部位：組織計測の部位は右の心室から出てすぐの左右の肺動脈に分岐する

部位である。縦軸に垂直（輪切り）切りホルマリンで固定後、パラフィンに包埋した後薄切して用いた。

一般染色：ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、エラスチカゴールドナー（EG）染色、アルシアンブルー（Al-blue）染色をおこなった。

免疫染色：免疫染色は対象とする弾性線維、平滑筋線維、膠原線維に合わせて、抗エラスチン抗体、抗平滑筋抗体、抗コラーゲンI型抗体をもちいた。免疫染色の方法は通常行われているABC法DAB発色による。

計測：EG染色の弾性線維（エラスチカ）、平滑筋線維（ボンソー）、膠原線維（グリーン）を病理画像解析システム（Image processor for analytical pathology, IPAP）を用いて、測定した。解析時の、それぞれの線維を異なる色で表した像をFig. 1に示す。次に免疫染色による弾性線維、平滑筋線維、膠原線維のDAB発色をそれぞれ計測した。そして、EG染色と免疫染色によるそれぞれの成分の測定結果を比較し、線維成分や間質成分をみることに利用されてきたEG染色が真にそれぞれの成分を表現できているのか検討した。EG染色が成分を正しく表現できているのであれば、パラフィンブロックの形で保存している免疫染色に適さない古い症例でも解析に用いることができるため、保存ブロックが有用であることも証明される。

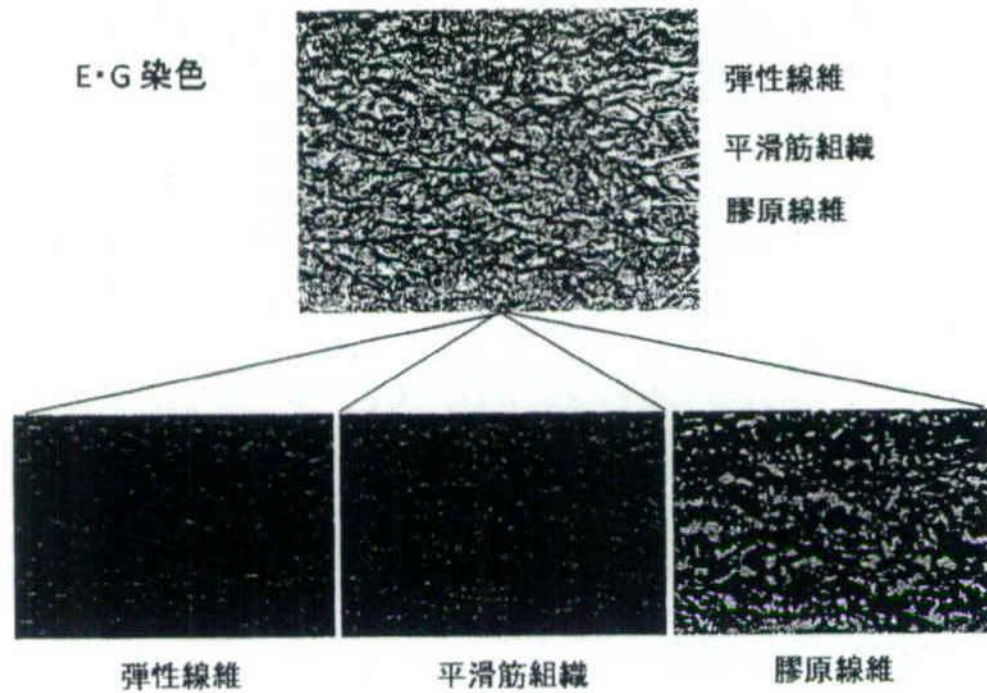


Fig. 1 画像解析システムによる解析像
一つの像を、弾性線維（赤）、平滑筋線維（青）、膠原線維（緑）に分離して解析した。

2. 結果

1) EG 染色と免疫染色の相関

Fig. 2 に弾性線維、平滑筋線維、膠原線維の EG 染色と免疫染色の像を、さらにそれぞれを比較したグラフを Fig. 3 に示した。いずれも $r=0.82, 0.96, 0.73$ と有意の相関を示した。これにより保存してあるパラフィンブロックでも EG 染色をすることにより弾性線維、平滑筋線維、膠原線維を定量化して比較することが可能であることが証明された。

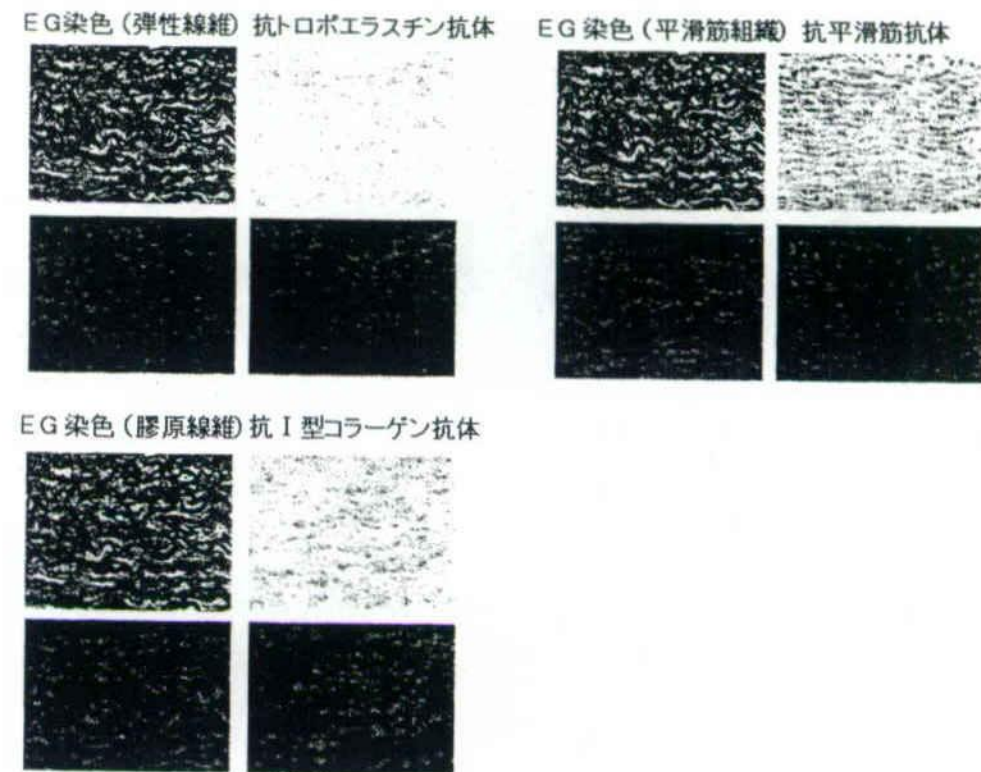


Fig. 2 EG 染色と免疫染色の像の比較
EG 染色の像と抗エラスチン抗体、抗平滑筋抗体、抗コラーゲン I 抗体を用いた免疫染色の像を比較した。明視野の像の下の写真で、それぞれの線維の部分を示している。

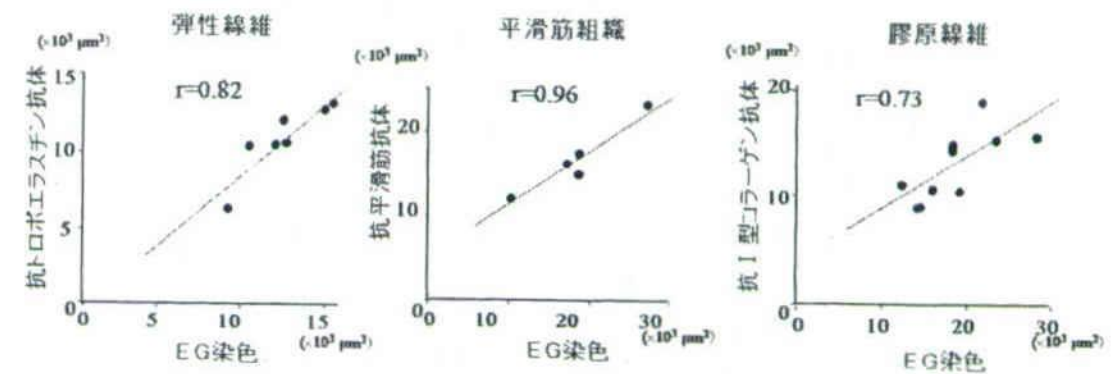


Fig. 3 EG 染色と免疫染色から測定した線維の面積の比較
EG 染色と免疫染色で得られた線維の面積を比較した結果、弾性線維、平滑筋線維、膠原線維いずれも高い相関を示した。

2) 加齢による変化と内膜、外膜側の比較

I. 加齢による変化

パラフィンブロックから切片を薄切してEG染色を行い、IPAPでその面積を測定した。加齢とともに弾性線維は、 $r = -0.77$ と減少し、平滑筋線維も $r = -0.77$ と減少した。一方、膠原線維は $r = 0.71$ と加齢とともに増加していることが証明された (Fig. 4)。

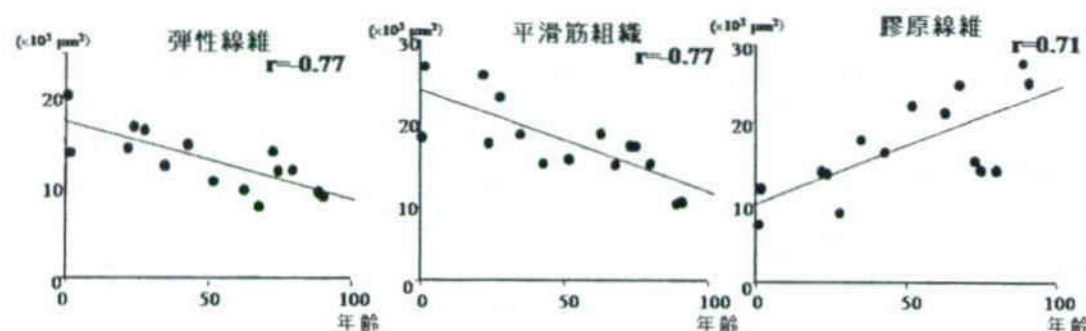


Fig. 4 加齢に伴う肺動脈の線維成分の変化
0-90歳の15例で、加齢に伴う線維の変化をIPAPによって解析した。
弾性線維と平滑筋線維は加齢に伴い減少していたが、膠原線維は増加していた。

II. 肺動脈中膜の内膜側と外膜側の比較

壁を厚さで三等分し、その一番内側の内膜側と一番外側の外膜側を比較した。その結果、内膜側のほうが外膜側より弾性線維と平滑筋線維の減少や膠原線維の増加が強く起こっていることが証明された。

III. 内膜側と外膜側の変化を引き起こすパラメータの比較

内膜側と外膜側の差が如何なる原因で引き起こされるかを明らかにするために、白血球、マクロファージ、エラスターゼ陽性細胞、アポトーシスを、抗LCA抗体、抗CD68抗体、抗エラスターゼ抗体、TUNEL法を用いて、それぞれ解析した。その結果、肺動脈の内膜側では外膜側に比較して炎症性細胞、エラスターゼ陽

性細胞、アポトーシスの増加などがみられたがCD68陽性のマクロファージはほぼ同じで差がないことが明らかになった。また、定量化はおこなっていないものの、抗アルブミン抗体で染色した結果、内膜側のほうが外膜側に比較して血漿成分のしみ込んでいることが証明されたが、これが原因なのか、結果なのかは不明である。

以上の結果より、肺動脈でも加齢とともに変化が起こっており、壁の構成成分からみると弾性線維と平滑筋線維は減少し、膠原線維は増加することが明らかになった。

3) 肺高血圧

肺高血圧症例についても同様に剖検症例10例に対してEG染色を施行し、IPAPで計測して比較した。その結果、

- 1) 肺高血圧症の症例では加齢に対して弾性線維の著明な減少が認められた。
- 2) 膠原線維は若年者で高い傾向を示し、平均的にもやや高い値を示した。
- 3) 一方、平滑筋組織の面積は加齢的变化からみて減少の傾向はなかった。
- 4) 平滑筋細胞の核数は、加齢的变化に対して変化せず、ほぼ一定の数を示した。
- 5) また、平滑筋/核、つまり胞体の平均面積も加齢に対しても変化せず、ほぼ一定の値を示した (Fig. 5)。

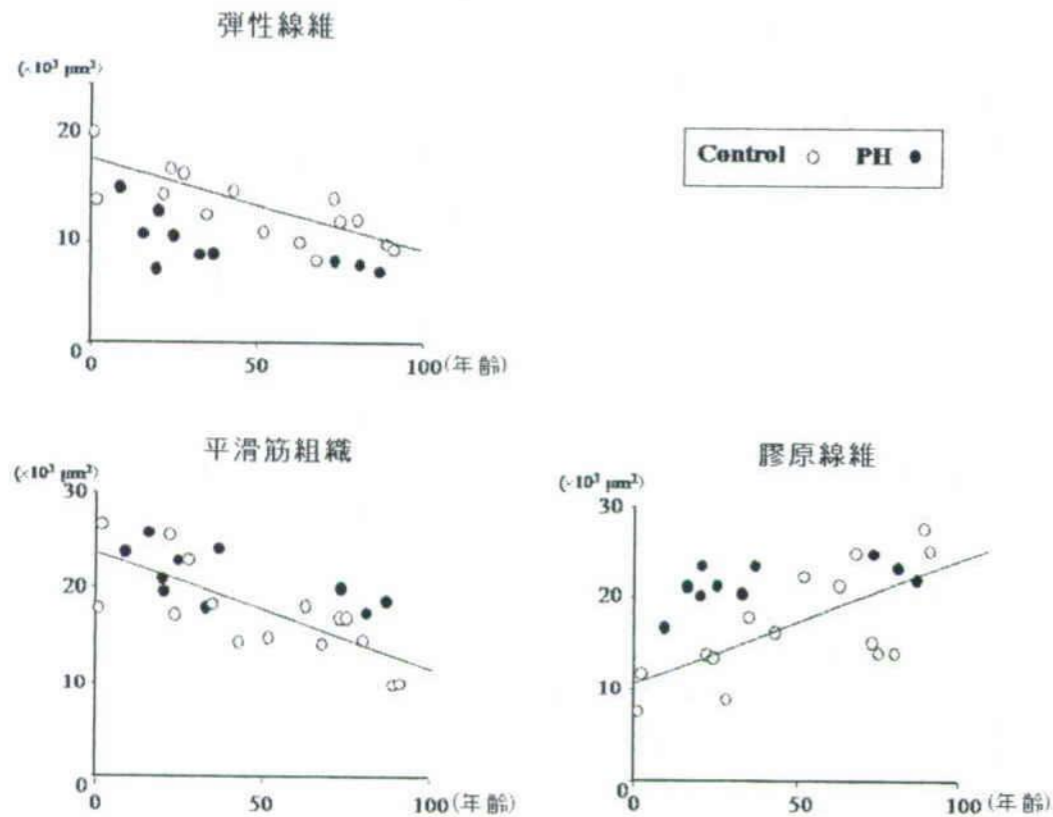


Fig.5 肺高血圧症に伴う肺動脈の線維成分の変化
10例の肺高血圧症の患者の肺動脈の線維成分をIPAPによって解析した。
正常の加齢変化とは異なり弾性線維は顕著に減少しており、膠原線維はや
や高い値を示した。

肺高血圧症の肺動脈中膜は正常の加齢的变化とは異なる態度を示した。弾性線維は加齢変化のように減少していたが、膠原線維は加齢にともなう増加が認められるものの若い年代の剖検症例でも増加していた。また、平滑筋組織の面積は加齢とともに減少していたが、肺高血圧症の場合は加齢に伴う減少傾向はみられず、全体の面積を核の数で割った平均の細胞面積（容積）も、一定の傾向を示した。

3. 考 察

ヒトの大動脈の場合、一般には加齢とともに動脈硬化が進展し、高度になると内膜の肥厚、弾性線維の断裂、平滑筋の萎縮、アテロームの形成、石灰沈着

などが起こり、さらに高度になると動脈瘤の形成や解離性の変化を引き起こす。その原因としては高血圧、糖尿病、高コレステロール血症あるいは最近喫煙などもあげられ、メタボリックシンドロームとして大きな社会問題にもなっている⁽²⁾。

肺動脈幹の場合は肺高血圧症や高コレステロール血症などで内膜の肥厚が起こることが知られているが⁽³⁾、肺実質における中小の肺動脈と違い、あまり大きな障害と関連した変化は指摘されてきてない。しかし、今回の結果は、サイズの大きい肺動脈幹でも加齢や肺高血圧症とともに壁を構成する成分に変化が起こっていることを示している。組織学的には、弾性型動脈である太い肺動脈幹においては、弾性線維と平滑筋線維の断裂や消失による量的減少、膠原線維の増加という結果が得られた。また、壁の内外を比較すると内膜側が外膜側よりも変化がより顕著であり、そこに関連する因子として、白血球、エラスターゼ陽性細胞、アポトーシス陽性細胞が外膜側に比較して内膜側で多く認められた。また、抗体を用いて検討した結果、内膜側では外膜側に比較し、アルブミンの染み込みがより目立つという結果が得られた（データ提示せず）。

Wagenvoort らも正常の肺動脈幹では加齢とともに弾性線維は減少し、膠原線維に置き換えられ、その結果、壁全体の弾力性が減少すると報告している⁽⁴⁾。中膜については、加齢とともに筋線維の配列は不規則になるものの大きな変化はないと報告しており、今回の結果と異なるが、この違いは我々が計測の対象について中膜を構成する平滑筋に絞って定量化しているのに対し、彼らは中膜全体としての層の厚さを問題にしているためではないかと思われる。一般的に肺動脈幹を構成する成分のなかで肺高血圧症においてもっとも目立つのは内膜の肥厚であるが、これは、結果としてみられるものの大動脈に比較して軽度であり、粥状硬化のような激しい変化まで至るものはない。

肺高血圧症における中小の肺動脈を対象とした変化についての報告は多いものの肺動脈幹あるいは太い肺動脈の壁を構成する成分についての解析は少なく、1960-1970年代のWagenvoort らの報告が中心である。肺動脈幹の変化は全身に

与える影響は少ないものの、成分に対する抗体やプローブを用いた解析が可能になった現在、弾性線維や膠原線維の再生とこれを産生する責任細胞、あるいは平滑筋細胞の活性について、さらには破壊の面でもこれらの線維を分解する酵素やその動態についての把握が可能かもしれない。

肺動脈幹の加齢に伴う変化は弾性線維と平滑筋線維の減少と膠原線維の増加である。弾性線維は加齢とともに減少するという傾向は動物などでも観察されており、そのなかでもっとも重要な因子としてエラスターゼの活性化があげられているものの⁽⁵⁾、活性の亢進の理由についてはあきらかにされてない。好中球エラスターゼは平滑筋細胞も産生するという吉田らの報告もあり⁽⁶⁾、また MMP12⁽⁷⁾ や、その他の MMP の発現も証明されていることから⁽⁸⁾、平滑筋細胞の動態については phenotype modulation として secretory form としての蛋白の合成や spindle form としての収縮の変換だけの問題だけではなく、蛋白分解酵素の発現の面からも興味のもたれる現象である。

膠原病の肺高血圧症や原発性肺高血圧症を検討した結果、弾性線維の減少、平滑筋線維の一定化の傾向がみとめられた。一般に肺高血圧症の変化として太い血管に目立つのは内膜の肥厚である。この変化については、内皮細胞の障害、弾性板の変化、平滑筋細胞の活性化と遊走、spindle form から secretory form への形質変換など大動脈と同じ機構が作用しているものと思われる。今回は、加齢における動態を対照としたが、肺高血圧症の原因となる基礎疾患、膠原病の種類、程度、血圧の程度、罹病期間など本来、検討すべきパラメータは数多く、今後、検討していく必要がある。

また、弾性線維、平滑筋線維、膠原線維では、それぞれが血管構築において、その役割も異なるため環境の変化に対する反応の仕方も異なる可能性がある。平滑筋は、肺高血圧症例でも減少傾向がみられず、むしろこの平滑筋線維の増大が中膜を肥厚させて肺高血圧症をさらに亢進させるともいわれている。エラスターゼの発現によりエラスチンの分解が亢進するため、これを補う形で平滑筋が発達するという実験結果もあり⁽⁹⁾、この結果は、エラスターゼの活性を抑

制し、エラスチン分解を抑えると平滑筋の発達も起こらず肺高血圧症の亢進も抑えることができるという治療に繋がるものである。また、エラスターゼの活性抑制は弾性線維の消失を防ぐため平滑筋の遊走を抑えるという報告もある⁽¹⁰⁾。これらの結果が、肺動脈の太い部位に起こる現象に関連するかは不明であるが、弾性線維と平滑筋線維の関係は、血管の弾性作用に関連する機能をもつものとして面白い。最近の報告では、高血圧症などのように圧負荷が亢進すると、細胞内の Rho が活性化され、細胞の増殖が起こるとされているが⁽¹¹⁾、*in vivo* において数の増加が実際に起こっているかどうかは疑問であり、我々の結果も単に全体の容積を核の数で割った値であるが、一つの核当たりの細胞の容積はほぼ一定であり、数的に増加するという結果は得られていない。これは、肺高血圧という適度な刺激が絶えず平滑筋細胞に与えられるため増加もしない代わりに正常でみられる萎縮という現象が起こらないのではないかとも思われる。

大動脈の障害因子については、前述のごとく、高血圧⁽¹²⁾、酸化 LDL⁽¹³⁾、好中球エラスターゼ⁽¹⁴⁾、マクロファージから放出される MMP-2、-9⁽¹⁵⁾、NO の作用⁽¹⁶⁾、フリーラジカル⁽¹⁷⁾、さらに HSP⁽¹⁸⁾ などの面から検討されており、肺動脈においても今後の検討課題である。

参考文献

1. 宇月美和, 岩崎真弓, 伊藤吉賢, 大内修二, 及川眞一, 澤井高志. 画像解析による肺動脈幹中膜の加齢学的変化. 脈管学 2003;43:659-666.
2. von Eckardstein A. Risk factors for atherosclerotic vascular disease. Handb Exp Pharmacol 2005;170:71-105.
3. Nityanand S, Roy AK, Zaidi SH, Singh GB. Experimental pulmonary embolism and pulmonary arteriosclerosis: effect of hypercholesterolemia. Indian J Med Res 1965;53:849-54.
4. Wagenvoort CA, Wagenvoort N. Age changes in muscular pulmonary arteries. Arch Pathol 1965;79:524-8.

5. Robert L, Jacob MP, Frances C, Godeau G, Hornebeck W. Interaction between elastin and elastases and its role in the aging of the arterial wall, skin and other connective tissues. A review. *Mech Ageing Dev* 1984;28:155-66.
6. Yoshida Y, Mitsumata M, Ling G, Jiang J, Shu Q. Migration of medial smooth muscle cells to the intima after balloon injury. *Ann N Y Acad Sci* 1997;811:459-70.
7. Wu L, Tanimoto A, Murata Y, Sasaguri T, Fan J, Sasaguri Y, et al. Matrix metalloproteinase-12 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Genes Cells* 2003; 8 :225-34.
8. Okada Y, Katsuda S, Nakanishi I. An elastinolytic enzyme detected in the culture medium of human arterial smooth muscle cells. *Cell Biol Int* 1993; 17:863-9.
9. Ilkiw R, Todorovich-Hunter L, Maruyama K, Shin J, Rabinovitch M. SC-39026, a serine elastase inhibitor, prevents muscularization of peripheral arteries, suggesting a mechanism of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 1989;64:814-25.
10. Ye CL, Rabinovitch M. Inhibition of elastolysis by SC-37698 reduces development and progression of monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1991;261:H1255-67.
11. Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* 1999;84:1186-93.
12. Frohlich ED, Susic D. Blood pressure, large arteries and atherosclerosis. *Adv Cardiol* 2007;44:117-24.
13. Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S. Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 2006;185:219-26.
14. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques:production by macrophages. *Circulation* 2003;107:2829-36.
15. Deguchi JO, Aikawa M, Tung CH, Aikawa E, Kim DE, Ntziachristos V, et al. Inflammation in atherosclerosis:visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo. *Circulation* 2006;114:55-62.
16. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis:an update. *Nitric Oxide* 2006;15:265-79.
17. Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2006; 6 : 1 -19.
18. Mehta TA, Greenman J, Ettelaie C, Venkatasubramaniam A, Chetter IC, McCollum PT. Heat shock proteins in vascular disease--a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;29:395-402.

Presentation Trainer

学会発表講座



リウマチ性疾患における 病理組織画像のプレゼンテーション

リウマチ・膠原病の分野における
組織画像の意義と役割

一般にリウマチ・膠原病の分野では、臨床的な病変部の肉眼写真、研究面においては血清や培養細胞を使った実験が多く、病理組織画像に対する依存はあまり大きくないのではないと思われる。それゆえ、学会などで投影される組織の顕微鏡写真をみると目を覆い隠されるようなスライド写真が多い。そのような場面で発表者は悠然と話しているが、これは発表者が画像の読み取れなさを恐れているためであり、かえって幸せなのかもしれない。発表中に見せてもらうことがある。もう一つは、発表中、会場での質問に対して、自分はよく見えないので、病理の先生がこう言っているという報告がたまにある場合がある。しかし、自己見えない報告は説明目的で用いられることが多い。

見えないということ、つまり自己確認することが困難な病変部位の顕微鏡写真である。臨床の先生も組織画像の価値は十分に認識しているはずである。結局、昔習った組織、病理像をしっかりと見ることが大切なのではないかと、筆者は思う。自己見えない病変部位の顕微鏡写真の活用方法を、臨床医の先生に話してみたい。また、自己見えない病変部位の顕微鏡写真の活用方法を、病理学会に伝える。自己見えない病変部位の活用方法を病理学会に伝える。自己見えない病変部位の活用方法を病理学会に伝える。

臨床を代言する細胞、
組織所見に注目する

リウマチ・膠原病の分野で対象となる臓器は限られており、滑膜、腎臓、肺、血管、筋肉、皮膚などの炎症性病変である。ここでは腫瘍とは異なり、関節炎、腎炎、肺炎、血管炎、筋肉炎、皮膚の線維化など一般には細胞より組織構築を問題とすることが多いが、細胞としても、リンパ球、形質細胞、マクロファージ、あるいは好中球、好酸球など主に炎症性細胞が対象となる。たとえば構造的にみると、肺のような肺高血圧症のPlexiform lesion、細胞学的には、肺のような化膿性関節炎の滑膜組織に浸潤する好中球が診断の決め手となる。

組織染色の使い分け

リウマチ・膠原病での発表で用いられる染色は、通常使われるヘマトキシリン・エオジン(HE)染色のほか、エラスチン・マッソントリクローム(EM)染色、あるいは単にマッソントリクローム染色を用いることが多い。病理診断では、HE染色が全体の95%以上で使われているが、これは塩基性の色素であるヘマトキシリンと好酸性の色素であるエオジンを組み合わせただけのものであり、悪性腫瘍の診断などに多く使われている。これに対してEM染色は組織の構築をみるもので、線維化、血管の破壊の観察などに使われる。肺の血管炎の例では左のEM染色が右のHE染色に比較して

澤井高志

岩手医科大学医学部病理学講座
先進機能病理学分野 教授

三浦康宏

同 病理学講座先進機能病理学分野

宇月美和

同 病理学講座先進機能病理学分野 講師

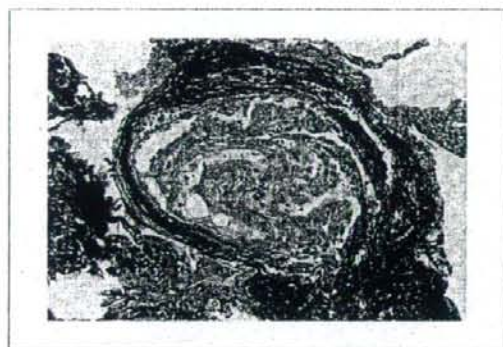


図1 肺高血圧症の動脈にみられたPlexiform lesion (EM染色)

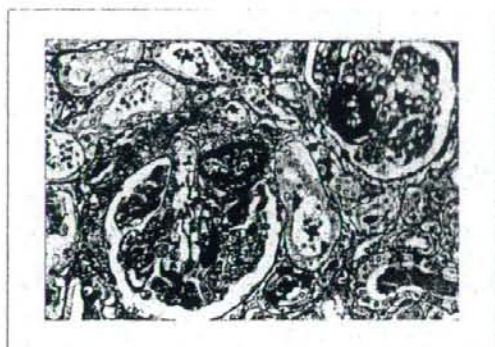


図4 SLEの腎にみられたフィブリン沈着(AM染色)

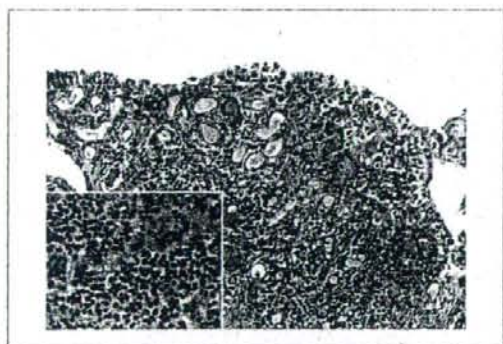


図2 化膿性関節炎の滑膜組織に浸潤する好中球(HE染色)



図5 EDTA脱灰(左)とキ酸脱灰(右)による滑膜組織でのMMP-9免疫染色

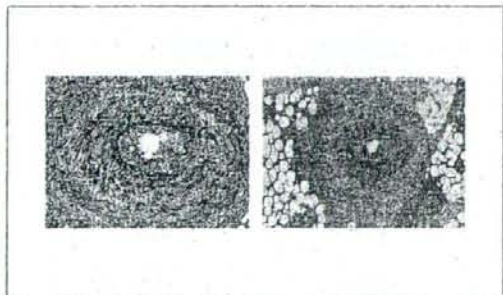


図3 血管炎のEM染色(左)とHE染色(右)

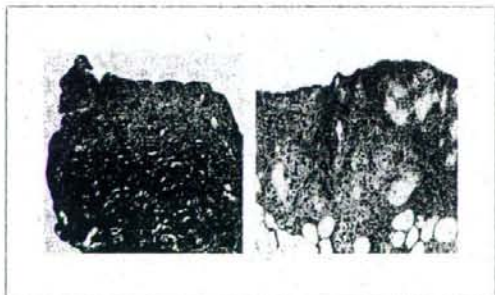


図6 初期RA滑膜の凍結標本

壁の破壊、内弾性板の断裂の状態がよくわかる。前述のごとく、腫瘍診断ではおもにHE染色を利用するのに、リウマチ・膠原病の分野ではこのようにEM染色を用いることが多い。このEM染色は膠原線維、弾性線維、平滑筋線維など組織構築を示す場合に用いられ、弾性線維染色あるいは単に線維染色とも呼ばれる。同じような間質を染め分ける染色には、EM染色のほかにもエラスチカワンギーソン染色などが用いられている。また、フィブリン沈着を示す場合は図4のようにアザンマロリー(AM)染色を用いるとスライドのごとく腎糸球体でのフィブリノイドの沈着が赤く示され、病巣がHE染色に比べて目立ち、より効果的である。

■固定について

標本の固定は組織の構築や細胞の形態を保持し、染色性を維持するのに必須であり、それはプレゼンテーションにも影響してくる。固定の目的というのは、その器官のとおり蛋白を固定して染色液との反応をよくすることであるが、一般には10%ホルマリン固定液あるいは4%パラホルムアルデヒドが使われる。この際、薄める液としては単に水でもいいが、ホルマリンは分解されてギ酸を生じ、強酸性になって免疫染色での抗原の失活が生じやすく扱いにくくなる。これを防ぐには緩衝液を使って固定液が酸性に傾かないように保持するのが望ましい。図5は極端な例であるが、通常のギ酸脱炭(右)ではEDTA脱炭(左)と異なりパンヌス域でのMMP-9の発現が証明できない。標本の固定時間が長すぎるとリンパ球のある種のマーカーや免疫グロブリンの固定ができないことはしばしば経験するが、図5の結果は脱炭によって抗原性が失われることを示している。

なお、固定する際の組織の大きさは、小さければ小さいほどよい。よく関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis; RA)の手術の際に手術室にパンヌスなどをもらいにいくと整形外科の先生たちは気前よくどっさりとかた

まりで試料を提供してくれるが、もらってから病理医がノミで小さくするのに苦労しているのを案外知られていないと思う。ちなみにパンヌスの付近を用いる場合は明らかな骨組織のある硬い部位ではなく、手で触ってざらざらするくらいのところのほうが扱いやすい。

凍結試料や電顕試料など特殊な検体についてはここでは触れない。これは病理医や専門家に依頼して処理してもらうことをお勧めする。また、凍結切片は抗原性が保持できるから組織として理想的だと思っている方もいらっしゃると思うが、凍結標本は一般に固定が悪く、細胞の胞体など形の輪郭が見つからないため、細胞の種類に関しては同定しにくい。図6は初期のRAの滑膜組織を凍結切片にしてHE染色したものであり、ヘマトキシリンの青い色によって細胞が増えていることはわかるが、細胞の種類までは同定できない。mRNAを同定するための*in situ* hybridizationにおいても生の組織よりは4%パラホルムアルデヒドで4~6時間程度固定したほうが、組織も確認できmRNAの失活も少ない。この固定方法はリウマチ、膠原病でしばしば取り上げられるサイトカインや蛋白分解酵素の証明にも適している。図7、8はRAで最近何かと注目されているTNF- α とMMP-3の滑膜組織に対する免疫染色である。ホルマリンによる通常の時間をかけた固定では検出できないが、上記の固定法を用いればこのように証明が可能となる。一般に、これまでは固定による形態の保存と抗原性の保存は反比例するといわれてきたが、最近の抗体は極端に固定が長くなければある程度の固定でも利用できるものが増えてきている。

■発表の目的に合ったスライドを用意する

標本ができあがると鏡見して所見をとる。自分で学習することは必要だが、学会で発表する症例であれば一応病理の専門家にみてもらって説明を受けるほうがいい。その際でもノートを取ってあとで清書による確認は必要である。学会発表の目的が症例報告か、研究

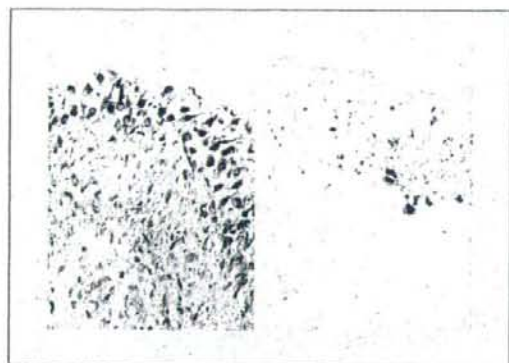


図7 RAの滑膜(左)と骨吸収部(右)にみられるTNF- α

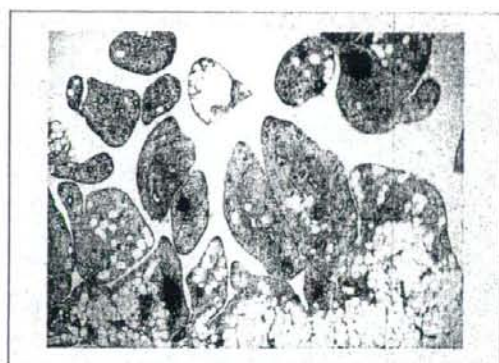


図10 OA患者の滑膜(リンパ濾胞を認める)

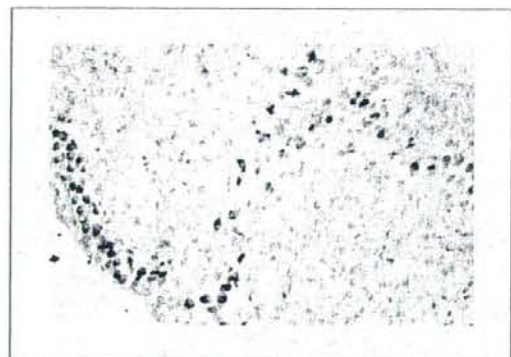


図8 滑膜組織にみられるMMP-3のmRNA
(*in situ hybridization*)

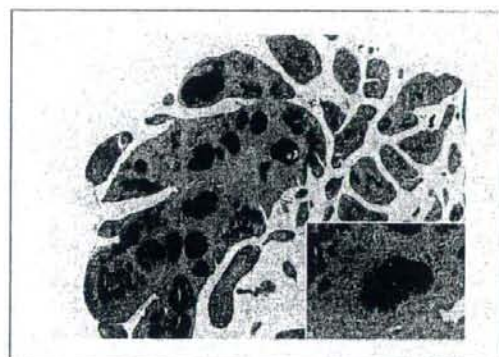


図11 結晶性関節炎の滑膜組織

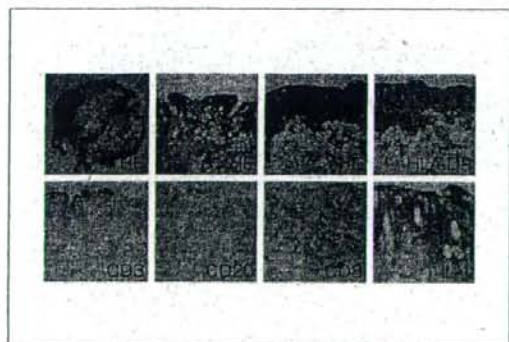


図9 初期RAの滑膜組織における各種細胞マーカーの免疫染色

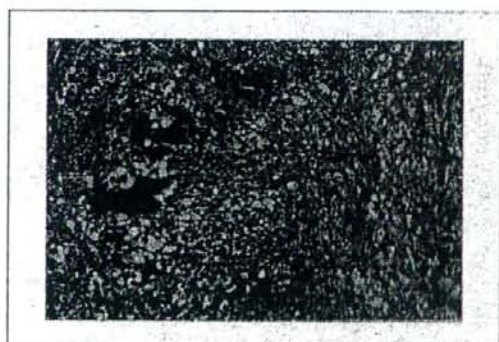


図12 側頭動脈炎の組織画像(高倍率)

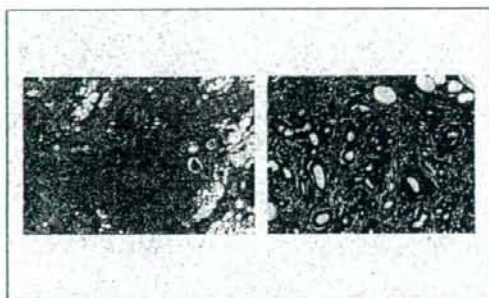


図13 シェーグレン症候群の唾液腺炎の低倍率(左)と高倍率(右)

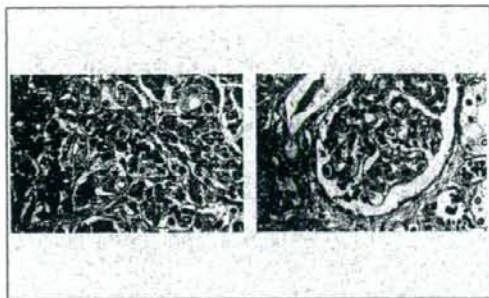


図14 AIDS患者の唾液腺(左)と腎(右)に認められたサイトメガロウイルス

成果の発表かということにもよるが、しばしば問題になるのは前者の症例発表の場合である。リウマチ・膠原病の症例報告ではよく血管炎の組織像を発表スライドに1, 2枚入れてくることが多いが、スライドをみるとスクリーンに映っている組織像が血管かどうかわからないことがある。特に、最近はパワーポイントを使って小さな画面を何枚も組み合わせることが簡単にできるようになってきており、その分だけ画像が小さくて見えないスライドを形式的に出したにすぎない場合がある。図9はRAの初期病変の組織像と、浸潤している細胞をモノクローナル抗体で証明したものである。提出した意義は認めるが、これでは聞いている者にとって内容の確認ができないまま次のスライドに移ることが多く、聴者の自己満足に終わってしまう。ここが論文発表と異なるところであり、病理医など専門家に相談して講演の主旨に従って必要なものを出すべきで、すべてを出す必要はない。しかし、一方では、図10のように病理の先生にみてもらったという変形性関節症(Osteoarthritis: OA)の組織像をRAとして出してくる場合もある。これは炎症性細胞浸潤は少し見られるものの典型的なOAであり、一概に講演する臨床家のせいとはいえない場合もある。

■最大の演出効果をねらう

学会での講演は聞くと同時にスライドを見るという効果大きい。まさに「百聞は一見に如かず。」である。したがって、その効果を最大限に生かす必要がある。そのためには自分の講演内容の目的にあったスライドを準備すべきである。一般に、スライドは低倍率で組織の全景から倍率を上げていくのが原則であり、最初から高倍率だけということとはあり得ない。図11は結晶性関節炎の像である。滑膜に散在する多数の結晶構造物の低倍と高倍を出しているが、結晶性関節炎として間違いない所見であり、時にはこのように低倍と高倍を組み合わせるとスライドにすることもよい。しかし、図12のように側頭動脈炎のスライドでは一部に巨細胞はみられるものの、動脈としての全体像が示されていないためはたしてこれが側頭動脈炎かどうかという確定は難しく、周囲を納得させるにはより低倍率の組織画像が欲しい。図13の場合は低倍ではよくわからないが、右のように高倍の写真を加えると唾液腺に浸潤している炎症性細胞浸潤と組織の破壊の関係がよくわかる。

さらに気の利いた方法は、スライドのなかに矢印などのマーキングをするとより効果的である。たとえば、図11のサイトメガロウイルス(CMV)のように特殊な物質(細菌、ウイルス、原虫)が診断の決め手になる場

合は矢印あるいはマーキングを行い、それを堂々と提示するのが効果的な方法である。

おわりに

たかが組織像、されど組織像であり、発表の際に使われる1枚のスライドが演者の発表内容の評価や場合によっては人格を左右することになる。最後の課題はやはり講演者の学習である。学生時代の古いノートやテキストあるいは図譜でも参考にして学習する機会をもつのもいいことだと思うし、時間に余裕のある方は自分でミクロ写真を撮影してみるのもいい。最近はデジタル化されているので失敗したらすぐ撮り直すことが可能であり、多数撮影してそこからいい画像を選ぶ

こともできるようになった。組織所見を提示することの長所は事実をそのまま提示できるということである。組織の説明に自信がないと学会場で質問されて答えられなくなってしまうことが多い。これを防ぐにはやはり学習して事前に自信をつけていくことが最良の方法である。

写真の撮り方については「病理と臨床」(文光堂)のvol.23 No.9～vol.25 No.7(病理写真の作法-よりよいプレゼンテーションのために-二村聡)に出ているので機会があれば一読されたい。肝心なのは、発表者が聴衆に一番訴えたいことは何かということを考えながら準備を進めることである。

第2章 病理 病態生理

病 理 —滑膜の炎症から骨破壊まで—

要 旨

関節リウマチは免疫異常を背景とした全身性の疾患であるが、その標的臓器は主に関節であり、病理組織学的な特徴として滑膜細胞の増殖、血管の新生、炎症性細胞の浸潤、軟骨・骨破壊などが挙げられる。ここでは滑膜に始まる炎症から軟骨・骨破壊に至る過程を病理組織学的な見地から説明し、それぞれの stage や病変部に見られる細胞とその機能、さらに病変形成に関する因子について述べた。

はじめに

関節リウマチ (RA) は免疫異常を基礎とする全身性の炎症性疾患であるが、その標的臓器は主として関節であり、関節での炎症が慢性に経過した結果、軟骨、骨の吸収さらには線維化に至り、臨床的には関節の屈曲、変形、高度の運動障害などが見られるようになる。RA の炎症は「滑膜に始まり関節に終わる」と言われるが、ここでは、関節の滑膜で始まった炎症がどのような過程を経て関節の破壊に至るかを最近の知見を加えながら病理組織学的に述べてみたい。

組織に関する記載はそれほど大きく変わるわけではないが、病態、治療に関する興味の変化とともに組織像への関心も変化する。例えば、5年前はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) などのタンパク分解酵素が注目されており、我が国では腫瘍壊死因子 (TNF) α に対する生物学製剤が使われ始めた頃であったが、今やパラダイムシフトとも言うべき現象が起っている。したがって、現在の関心はサイトカインの動態のほうが大きいのではないと思われるが、ここでは RA の基本的な病理組織像を中心に説明する。

● キーワード

関節リウマチ
病理組織学
滑膜炎
軟骨・骨破壊