

厚生労働科学研究費補助金  
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  
分担研究報告書

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 薄切切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出

研究分担者： 高橋 啓 東邦大学 医学部 教授  
宮崎 龍彦 岐阜大学 医学部附属病院 教授  
石津 明洋 北海道大学大学院 保健科学研究所 教授  
研究協力者： 大原関 利章 東邦大学 医学部 准教授

研究要旨 皮膚 IgA 血管炎では血管壁への IgA の沈着を証明する方法として、凍結切片を用いた蛍光抗体直接法が用いられている。ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片において IgA 沈着を証明可能な方法について検討した。その結果、FFPE 切片を非特異反応ブロッキング試薬にて前処理し、一次抗体を 4℃、overnight で反応、二次抗体に Alexa Fluor™ Plus 488 蛍光色素を用いた蛍光抗体間接法を行うことで、凍結切片蛍光抗体直接法と同程度の陽性像を得ることが期待できた。

#### A. 研究目的

皮膚 IgA 血管炎の病理診断には、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いたヘマトキシリン・エオジン (HE) 標本による形態診断だけでなく凍結切片を用いた蛍光抗体直接法による血管壁への免疫グロブリン A (Immunoglobulin A, IgA) 沈着の証明が必要である。FFPE 切片と凍結切片は検体採取後の処理が異なる為、2カ所から皮膚を採取することが多い。FFPE 切片を用いて IgA 沈着を証明できれば皮膚の採取個数を減らすことが出来る。本研究は、FFPE 切片に対して蛍光抗体法を行い IgA 血管炎診断における有用性を明らかにすることを目的としている。

これまでの検討で FFPE 切片を用いた IgA の証明には、1 次抗体の反応条件を 4℃、overnight とし、蛍光抗体間接法を用いるのが最適な方法と考えられ

た。今回はより強いシグナルを得るための方法について検討を行った。

#### B. 研究方法

##### 検討 1：FFPE 切片を用いた IgA 蛍光抗体間接法 FITC 標識二次抗体と Alexa Fluor™ Plus 488 標識二次抗体の比較

2018 年 1 月～2021 年 2 月の間に当院にて実施された皮膚生検のなかで、1) IgA 血管炎の臨床診断、2) 同時に採取された組織の凍結切片を用いた蛍光抗体直接法で IgA 陽性の条件を満たした 11 例を対象とした。また、非 IgA 血管炎で、凍結切片による蛍光抗体直接法にて IgA 陰性が確認されている皮膚生検 3 例を陰性対照 (NC)、IgA 腎症の腎生検検体で凍結切片に対する蛍光抗体直接法にて IgA 陽性が確認されている 2 症例を陽性対照 (PC) とした。

各検体の FFPE ブロックから 3 $\mu$ m 厚の FFPE 切片を作製、脱パラフィン後に精製水に浸漬、0.05%プロテアーゼ (type XXIV SIGMA) で 37 $^{\circ}$ C、30 分処理した。PBS に 5 分浸漬後、一次抗体 (抗ヒト IgA 抗体 F0204、DAKO) を 4 $^{\circ}$ C、overnight 反応させた PBS にて 5 分間、2 回洗浄の後、FITC 標識二次抗体 (Swine 抗ウサギ Igs, DAKO 社 (F0205), 20 倍希釈)、あるいは Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 488 標識二次抗体 (Goat 抗ウサギ IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed, ThermoFisher 社, 500 倍希釈) を 37 $^{\circ}$ C、30 分反応させた。PBS で 5 分間、2 回洗浄の後、水溶性封入剤 (fluoromount) で封入した。OLYMPUS 社の落射蛍光システムと顕微鏡カメラ (DP73, software: WinnROOF2018) を装着した顕微鏡を用いて撮影 (iso1600, 1/9 秒) し、染色性、陽性強度を評価した。

#### 検討 2: FFPE 切片を用いた IgA 蛍光抗体間接法 ブロッキング試薬の効果

追加検索が可能であった対象 7 例に対して、検討 1 で用いた一次抗体: (ウサギ抗ヒト IgA ポリクローナル抗体, DAKO 社 (F0204), 希釈済, 4 $^{\circ}$ C, overnight)、二次抗体: Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 488 標識二次抗体 (Goat 抗ウサギ IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed, ThermoFisher 社, 500 倍希釈, 室温, 30 分) を用い、一次抗体反応前に 非特異反応ブロッキング試薬 (Protein Block, Serum-Free, Liquid form, Agilent 社 (X0909)) を室温, 30 分反応させた。

(倫理面への配慮)

本研究は既存の病理検体とカルテ情報の一部を用いた研究であり、倫理委員会申請承認後、診療科 Web でのオプトアウトで対応した。

#### C. 研究結果

##### 結果 1: FITC 標識二次抗体と Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 488 標識二次抗体の比較

陽性対照の全例で糸球体が陽性であること、糸球体以外に陽性所見がないこと、陰性対照の皮膚組織が陰性であることを確認した。

皮膚 IgA 血管炎 11 例のうち、FITC 標識二次抗体: 1+以上の陽性 3 例、判定困難 4 例、陰性 4 例に対して、Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 488 標識二次抗体: 1+以上の陽性 8 例、判定困難 2 例、陰性 1 例であり、Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 488 標識二次抗体を用いた場合には強いシグナル発光を得ることが出来、観察が容易になった (図)。しかし、時に血管壁以外の蛍光陽性所見をみ、評価に困難を感じる場合があった。

##### 結果 2: FFPE 切片を用いた IgA 蛍光抗体間接法 ブロッキング試薬の効果

検討 1 の結果を基に、二次抗体として Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 488 標識抗体を用い、非特異反応ブロッキング試薬による効果を検討した。非特異反応ブロッキング試薬で前処置することにより背景とのコントラストがより明瞭となった。一方、2 例で Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 488 蛍光色素のシグナル発光が減弱したが、判定に苦慮することはなかった。しかし、血管壁以外の陽性所見を完全に抑制することは困難であった。

#### D. 考察

IgA 血管炎症例に対して、FFPE 薄切切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出方法を検討した。検討の結果、FFPE 切片を 1) 非特異反応ブロッキング試薬にて前処置し、2) 一次抗体を 4 $^{\circ}$ C、overnight で反応、3) 二次抗体に Alexa Fluor<sup>TM</sup> Plus 488 蛍光色素を用いた蛍光抗体間接法を行うことで、凍結切片蛍光抗体直接法と同程度のシグナル発光を得ることができた。一方、血管壁以外、おそらくは血漿成分と思われる領域にも陽性像を認めることがあった。陽性部の局在を注意深く観察することで判別可能であったが、時に紛らわしい陽性像があった。今後、他のブロッキング方法を試みるほか、直接法 (immune complex 法: 一次抗体と Alexa Fluor<sup>TM</sup>

Plus 488 標識二次抗体とを結合させた後に FFPE 切片上で反応させる方法)などについて検討する予定である。

#### E. 結論

FFPE 切片に対する蛍光抗体法は皮膚 IgA 血管炎における IgA 沈着の証明に有用である。FFPE 切片を非特異反応ブロッキング試薬にて前処置し、一次抗体を 4°C、overnight で反応、二次抗体に Alexa Fluor™ Plus 488 蛍光色素を用いた蛍光抗体間接法を行うことが最適で、凍結切片による蛍光抗体直接法と同程度の結果が得られる事が期待された。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tozaki N., Tawada C., Niwa H., Mizutani Y., Shu E., Kawase A., Miwa Y., Ohnishi H., Sasai H., Miyako K., Hosokawa J., Kato A., Kobayashi K., **Miyazaki T.**, Shirakami Y., Shimizu M., Iwata H. A case of VEXAS syndrome (vacuoles, E1 enzyme, X-linked, autoinflammatory, somatic) with decreased oxidative stress levels after oral prednisone and tocilizumab treatment. *Front Med (Lausanne)*. 9:1046820, 2022
2. Kawamura M., Mizutani Y., Mizutani Y., Matsuyama K., Shu E., **Miyazaki T.**, Seishima M. Clinical and pathological differences between skin-limited IgM/IgG vasculitis and skin-limited IgA vasculitis. *Journal of Cutaneous Immunology and Allergy*. 4(2):28-33, 2021
3. **宮崎 龍彦**. 組織の取り扱いと固定方法の基礎—生命現象をミクロのレベルで可視化して捉える大切な入口—. In: 日本組織細胞化学会, editor. *組織細胞化学 2022*. 東京: 学際企画; 2022. p258.
4. **宮崎 龍彦**. 【血管炎の診療 update—診断・治療の新展開—】血管炎の病理. *日本臨床*. 80(8): 1170-1176, 2022
5. Yokouchi Y, **Oharaseki T**, Asakawa N, Makino H, **Takahashi K**: Histological studies shed new light on the initiation and characteristics of calcification of coronary artery aneurysms in

Kawasaki disease. *Cardiovasc Pathol*. 2022 Nov-Dec;61:107456. doi: 10.1016/j.carpath.2022.107456. Epub 2022 Jul 19

6. Ishizu A, Kawakami T, Kanno T, Takahashi K, Miyazaki T, Ikeda E, Oharaseki T, Ogawa Y, Onimaru M, Kurata M, Nakazawa D, Muso E, Harigai M: Expert perspectives on pathological findings in vasculitis. *Modern Rheumatology*: 1-11, 2022
7. Ito F, Oharaseki T, Tsukui D, Kimura Y, Yanagida T, Kishi F, Yamakawa Y, Kameoka Y, Suzuki S, Uno K, Suzuki O, Miura N, Ohno N, Takahashi K, Kono H, Suzuki K: Beneficial effects of anti-apolipoprotein A-2 on an animal model for coronary arteritis in Kawasaki disease. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2022 Dec 22;20(1):119. doi: 10.1186/s12969-022-00783-7.
8. **大原関利章, 高橋 啓**: 系統的血管炎の歴史と分類. *日本臨床* 80 (8) : 1177 -1181 , 2022
9. Kawakami T, Yokoyama K, Ikeda T, Nishibata Y, Sakiko M, Tomaru U, **Ishizu A**. Similar deposition of neutrophil extracellular traps in the dermis among COVID-19-associated IgA vasculitis, post-COVID-19 vaccination IgA vasculitis, and COVID-19-unrelated IgA vasculitis. *J Dermatol* (in press)
2. 学会発表
  1. **石津明洋**. FFPE 切片を用いた血管壁免疫グロブリン沈着の検出 (進捗報告). 第 9 回 日本皮膚科学会新血管炎・血管障害診療ガイドライン改訂委員会. 2021, 11. 28 (東京)
  2. **高橋 啓**: 系統的血管炎の病理—大型・中型血管炎の鑑別のポイント—. 第 26 回日本病理学会中部支部スライドセミナー, 岐阜, 2023/03
  3. 川村美保、水谷陽子、松山かなこ、周 円、**宮崎龍彦**、清島真理子. IgG/IgM 血管炎および IgA 血管炎の臨床的組織学的比較検討. 第 39 回日本臨床皮膚科医会. 札幌, 2020/6/18
  4. 益田紗季子, 西端友香, 外丸詩野, 横山華英, 池田高治, 川上民裕, **石津明洋**. COVID-19 発症後および COVID-19 ワクチン接種後 IgA 血管炎の皮膚生検組織における好中球細胞外トラップの沈着—COVID-19 非関連 IgA 血管炎との比較. 第 27 回日本血管病理研究会
- H. 知的財産権の出願・登録  
該当なし

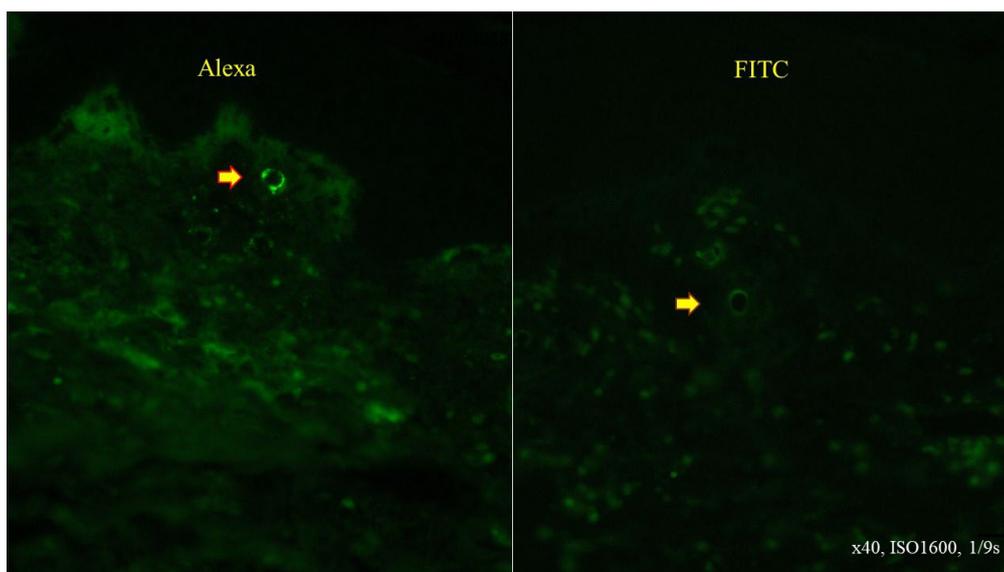


図 検討1 FITC 標識二次抗体と Alexa Fluor™ Plus 488 標識二次抗体の比較

	臨床診断	Sample	HE 染色	凍結切片	FFPE 蛍光抗体間接法		非特異反応 blocking
			炎症程度	蛍光抗体直接法	Alexa	FITC	Alexa
1	IgA 血管炎	skin	2+	+	2+	1+	2+
2	IgA 血管炎	skin	2+	+	1+	-	1+
3	IgA 血管炎	skin	2+	+	2+	+-	2+
4	IgA 血管炎	skin	3+	+, weak	3+	1+	3+
5	IgA 血管炎	skin	1+	+, weak	+-	+-	
6	IgA 血管炎	skin	3+	+	3+	+-	1+
7	IgA 血管炎	skin	-	+	2+	+-	1+
8	IgA 血管炎	skin	-	+	+-	-	
9	IgA 血管炎	skin	1+	+	2+	-	
10	IgA 血管炎	skin	-	+	-	-	
11	IgA 血管炎	skin	-	+	2+	1+	2+
NC1	血管炎	skin	-	n.d.	-	-	
NC2	PR3-ANCA 血管炎	skin	-	n.d.	-	-	
NC3	EGPA	skin	-	n.d.	-	-	
PC1	IgA 腎症	kidney	n.d.	1+	1+	1+	
PC2	IgA 腎症	kidney	n.d.	3+	2+	1+	

表： 結果一覧