

Silver methenamine and Masson's trichrome 重染色による 腎糸球体の観察(基底膜変化を中心に)

奈良県立医科大学小児科学教室

岡島 馨, 山下 隆司, 松永 健司, 河原 信吾
中島 充, 平 康二, 上辻 秀和

DEMONSTRATION OF GLOMERULAR LESIONS ON LIGHT MICROSCOPY WITH SILVER METHENAMINE AND MASSON'S TRICHROME STAINING

KAORU OKAJIMA, TAKASHI YAMASHITA, TAKESHI MATSUNAGA, SHINGO KAWAHARA,
MITSURU NAKAJIMA, KOJI TAIRA and HIDEKAZU KAMITSUJI

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received January 29, 1992

Summary: In order to observe the precise morphological changes of glomeruli on light microscopic level, silver methenamine and Masson's trichrome (SM-MT) staining was employed on renal biopsy sections from children with various glomerular diseases. With the SM-MT staining, basement membrane stains black, red blood cells red, fresh fibrinoid material bright red and protein deposits are stained red in various shades depending on the composition and age of the deposits. There was a good contrast between basement membrane and other materials. These light microscopic changes reflected well the ultrastructural changes which were investigated simultaneously in several cases. Therefore, it is suggested that this staining provides valuable information about glomerular changes on routine light microscopy.

Index Terms

silver methenamine and Masson's trichrome staining, glomerular disease, renal biopsy, light microscopy, electron microscopy

緒 言

腎生検組織の組織学的検査は主に光学顕微鏡(光顕), 蛍光抗体法, 及び電子顕微鏡(電顕)によって観察されるが, 中でも光顕による観察が基本であり最も多くの情報を提供してくれる。一般に光顕ではHE染色の他にPAS¹⁾, PAM²⁾, Masson's trichrome³⁾等の特殊染色を施して, メサングイウムの増殖性変化や基底膜病変, depositsの観察を行なっている⁴⁾。しかし膜性腎症, 膜性増殖性腎炎など基底膜変化を主に来す疾患に於いては, 電顕による観察を必要とすることがしばしばである。電顕では, 観察できる糸球体が限られていること, また視野が非常

に狭いことなどの欠点があり, あくまで補助的手段にすぎない。今回我々は, 上記の欠点を補うため, 基底膜変化が詳細に観察出来るとされる silver methenamine and Masson's trichrome 重染色(SM-MT 染色)を用い腎生検組織を観察し, 電顕所見と対比したので報告する。

対 象

奈良医大小児科及びその関連病院で腎生検を施行し得た14例で, その内訳はネフローゼ症候群[微少変化型]3例, 膜性腎症(MN)Stage I 2例, Stage II 2例, 膜性増殖性腎炎(MPGN)Type I 1例, Type II 2例, ループス腎炎(WHO分類IV型)2例, IgA腎症3例である。

方 法

腎生検は経皮的に Tru-cut 針を用い、細片採取法により施行した。

1. 光顕組織：生検組織は formol mercury で5分間、Duboscq-Brasil 液で5-15時間固定し、通常のごとくパラフィン包埋の後 HE, PAS, PAM, Masson's trichrome, SM-MT, により染色した。SM-MT 染色は Allen 等の方法⁵⁾に基いた。つまり腎組織片を1 μ mに薄切し、50%, 70%, 95%, 100%エタノールで脱パラフィン後、2% Iodine 70%アルコールで水銀を除去した。0.5% Periodate 処理の後、3% hexamine solution, 5% silver nitrate, 5% sodium tetraborate 溶液にて加熱しながら silver 染色を行った。その後光学顕微鏡下に、油浸にて1000倍で観察した。

2. 電顕組織は、half Kornovsky's solution で2時間固定後、1%オスミウム酸で2時間固定した。型のごとくエタノールで脱水後 Epon または L. R. White Resin に包埋し、pale gold に薄切し、日本電子 1200 EX 透過型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. ネフローゼ症候群[微小変化型]：SM-MT 染色では、基底膜は茶色から黒、間質やメサンギウム基質は緑、核は紫に染まった。赤血球は赤く染まった。

2. MN Stage I：PAS, PAM だけでなく SM-MT 染色に於いても、微小変化型と明らかには区別できなかった。電顕写真では小さい散在性の electron dense deposits が基底膜上皮側に見られ、その部の足突起は癒合していた。

3. MN Stage II：PAS 染色では基底膜の瀰漫性の肥厚が見られ、PAM 染色ではいわゆる spike が見られた。SM-MT 染色では PAM と同様に基底膜に spike が見られ、spike にはさまれた部位の上皮側に蛋白様物質が赤染して見られた(Fig. 1 a)。電顕写真では基底膜の上皮下に electron dense deposits があり、基底膜様物質の増成が見られた(Fig. 1 b)。

4. MPGN Type I：PAS 染色では、メサンギウム細胞の増殖、基質の増加、糸球体の分葉傾向、基底膜の double contour が見られた。PAM 染色でも double contour が観察された。SM-MT 染色では黒く染まった基底膜に double contour が見られ、その内皮側に蛋白様物質が淡紅色に染まって見られた(Fig. 2 a)。電顕写真では mesangial interposition とともに同部位の基底膜内皮下に electron dense deposits が見られた(Fig. 2 b)。

5. MPGN Type II：PAS 染色では、メサンギウム細胞の増殖や基底膜の肥厚が見られた。PAM 染色でも基底膜の肥厚が見られた。SM-MT 染色では、基底膜内に連続性に蛋白様物質が淡紅色に染まって見られた(Fig. 3 a)。2例中1例ではメサンギウム領域に蛋白様物質が強く染まって見られた。電顕写真では、基底膜内の lamina densa に一致して連続性に electron dense deposits が見られた(Fig. 3 b)。

6. ループス腎炎：PAS 染色ではメサンギウムの増殖、基底膜の肥厚、ならびにいわゆる wire-loop lesion が見られ、PAM 染色では double contour, mesangial interposition が見られた。SM-MT 染色でも silver で黒く染まった基底膜に double contour が見られ、さらに緑色調に染色されて mesangial interposition が認められた。その基底膜の内皮側及び上皮側、またメサンギウム領域にも蛋白様物質が淡紅色に見られた。電顕写真では mesangial interposition や、基底膜の内皮下及び上皮下の electron dense deposits, wire-loop lesion に一致すると思われる subendothelial deposits が見られた。

7. IgA 腎症：PAS 染色では3例とも mild mesangial proliferation の像が見られ、Masson's trichrome 染色では3例中1例に於いてメサンギウム領域に蛋白様物質が淡紅色に見られた。SM-MT 染色ではその1例に於いてメサンギウム領域に、メサンギウムの増殖部位即ち silver で黒く染まった部位の中に、蛋白様物質が均一に鮮紅色に見られた。他の1例ではボーマン腔内や半月体内でフィブリン様物質が赤染して見られた。また3例とも基底膜内には蛋白物質は見られなかった。電顕写真では3例ともメサンギウム基質の増成とともにメサンギウム領域に electron dense deposits が見られたが、2例においては SM-MT 染色で明らかな赤く染まる蛋白様物質は無かった。他の1例に於ては hemispherical deposits が見られた。また基底膜病変としては全例に splitting, attenuation が見られたが、electron dense deposits は見られなかった。

考 察

腎生検組織の光顕像の観察には、HE 染色に加え、PAS¹⁾, PAM²⁾, Masson's trichrome³⁾などの特殊染色がルーチンに行われている。PAS 染色ではおもにメサンギウムの増殖性、硬化性変化が、PAM 染色では糸球体基底膜、毛細血管が、Masson's trichrome 染色ではメサンギウム領域や基底膜に於ける deposits 等の蛋白様物質が観察される。しかし基底膜と deposits との位置関係などの詳細な観察には、それぞれ単独の染色では困難なこと

が多い。また腎生検により得られる限られた腎組織片より出来るだけ多くの情報を得る必要がある。今回我々が施行したSM-MT染色はPAM染色とMasson's trichrome染色を組み合わせたもので、Allenら⁵⁾、Kincaid-Smithら⁶⁾によりすでに実用化されている。黒染した基底膜に、赤染した蛋白様物質が良いコントラストとなり、その蛋白様物質の基底膜に於ける詳細な局在を識別し易いとされている。本法は従来のMasson's trichrome染色と銀染色を併重したものであるが、特に基底膜病変を観察するにあたり、まず薄い切片で観察することが重要である⁵⁾⁶⁾。我々はFormol mercuryとDuboscq-Brasil液を用い、通常の10%ホルマリンより強い固定を行い、1 μmに薄切りして染色を施し、すべての糸球体を1000倍で観察した。

今回ネフローゼ候群[微小変型]の光顕組織像を、その定義に従い光顕上の正常組織所見として使用したが、SM-MT染色では、基底膜の多糖体がsilverにより茶色から黒、膠原線維は緑、核は紫、赤血球は赤く染まることを確認した。

MNの特徴的光顕像は、PAS染色で基底膜の肥厚、PAM染色では基底膜のスパイクが、Masson's trichrome染色では基底膜に赤色調のdepositsの存在である。SM-MT染色では、スパイクなど基底膜病変と、淡紅色に染まった蛋白様物質とのコントラストが明らかとなりこの所見は電顕でも確認されたことより、SM-MT染色単独でのMNの診断が可能と思われた。

MPGN Type IのSM-MT染色では糸球体の分葉化、基底膜の二重化、mesangial interpositionの他、基底膜内皮側に淡紅色に染まる蛋白様物質が観察された。さらにType IIでは、SM-MT染色では黒色の基底膜内にType Iとは異なる連続性の淡紅色の蛋白様物質が観察された。このものは電顕ではlamina densaに一致したelectron dens depositsであり、SM-MT染色ではType I、Type IIの診断も可能であった。

ループス腎炎のSM-MT染色では、基底膜の二重化、基底膜上皮下及び内皮下の蛋白様物質、基底膜内の蛋白様物質などが明確に観察され、電顕にて一致した所見を得た。ループス腎炎でもSM-MT染色は種々の糸球体基底膜病変の観察に有用であると思われた。

IgA腎症のSM-MT染色ではメサンギウム領域内の蛋白物質の観察は、黒く染まったmatrixにマスクされる為、Masson's trichrome染色に比し劣っていた。しかしhemispherical depositsや、ポーマン腔内や半月体内での赤染するフィブリン様物質の存在がよく観察された。

近年、宇都宮はPAS法の変法であるPATS-chromotrope法を用いて腎生検の光顕レベルでのdepositsの検出について報告している⁷⁾。同法ではMNに於けるdepositsの存在が明確に観察されたものの、MPGNではmesangial interpositionとdepositsが同系色に染まることからMPGNのTypeの区別は不可能であったと述べている。我々が用いたSM-MT染色では、赤く染まるdepositsが黒く染まる基底膜の内側か外側かが明瞭に観察され、特にMPGNに於けるType分けに有用であった。

以上のごとく、SM-MT染色では、基底膜病変、特にdepositsの有無、及びその詳細な局在が光顕レベルで観察可能であり、従来では電顕に組織診断を頼らざるを得なかったMN、MPGN等に於て有用であった。またfocalな病変を来すIgA腎症でも本法を用いることにより多くの糸球体の基底膜病変を観察することが可能であり、その組織診断に多大な情報を提供してくれるものと思われる。

結 語

Silver-methenamine and Masson's trichrome(SM-MT)染色より各種腎疾患の腎生検組織を観察した。本法では基底膜病変、特にdepositsの有無及びその詳細な局在が光顕レベルで観察可能であり、腎生検の組織診断に非常に有用であった。

(本論文の要旨は1991年3月2日、第3回近畿小児腎臓病研究会に於て報告した。)

文 献

- 1) McManus, J. F. A. : Am. J. Pathol. 24 : 1259, 1948.
- 2) Jones, D. B. : Am. J. Pathol. 29 : 33, 1953.
- 3) Masson, P. : J. Tech. Methodes 2 : 75, 1929.
- 4) 坂口 弘・北本 清 : 腎生検の病理-腎臓病アトラス。改訂第2版、診断と治療社、東京、p7, 1986.
- 5) Allen, D. E. and Dowling, J. P. : Techniques for Nephropathology. CRC press, Florida, p8, 1981.
- 6) Kincaid-Smith, P., Dowling, J. P. and Mathews, D. C. : Atlas of Glomerular Disease. ADIS Health Science Press, Sydney, p85, 1985.
- 7) 宇都宮靖 : 腎糸球体の新しい染色法(PATS-chromotrope法)による光顕レベルでのdepositsの検出。日腎誌。33 : 949, 1991.

Explanation of figures

- Fig. 1. Light micrograph (a) of the glomerulus in the patient with membranous nephropathy. Silver methenamine and Masson's trichrome (SM-MT) staining demonstrates subepithelial deposits in pink color and spike formation in black color. Electron micrograph (b) of the glomerular basement membrane (GBM) in the same patient shows subepithelial electron dense deposits and thickening of the GBM. Bar= $1\mu\text{m}$.
- Fig. 2. Light micrograph (a) of the glomerulus in the patient with membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN) type I. SM-MT staining demonstrates double contour of the GBM in black color and subendothelial deposits can be seen in pink to red color. Electron micrograph (b) of the GBM in the same patient shows circumferential mesangial interposition and subendothelial electron dense deposits. Bar= $1\mu\text{m}$.
- Fig. 3. Light micrograph (a) of the glomerulus in the patient with MPGN type II. Intramembranous continuous deposits can be seen in pink color with SM-MT staining. Electron micrograph (b) of the GBM in the same patient shows intramembranous electron dense deposits. Bar= $1\mu\text{m}$.



