

## 主 論 文

### Simultaneous immunostaining with anti-S100P and anti-SV40 antibodies revealed the origin of BK virus-infected decoy cells in voided urine samples

#### (S100P,SV40 混合抗体を用いた同時染色による 尿中 BKvirus 感染デコイ細胞の由来解析)

#### [緒言]

これまで、尿中に出現する BK virus (BKV) 感染細胞のほとんどは尿細管由来と言われているが、その由来は明らかにされていない。BKV は免疫能の低下に伴い、膀胱、尿管の尿路上皮細胞から上行し、腎の集合管上皮細胞、尿細管上皮細胞の順に感染を広げるとされるため、尿中の BKV 感染細胞には尿路上皮由来の細胞も存在すると予測される。

また、感染細胞が出現する病的状態には、骨髄移植患者の出血性膀胱炎のように感染が尿路上皮細胞に限局した状態と、腎移植患者の BKV 腎症のような腎尿細管上皮細胞に及ぶ状態があり、感染部位の推定は治療方針を決定する要素になる。一般的な BKV 感染スクリーニングには、尿細胞診によるデコイ細胞検出のほか、polymerase chain reaction (PCR)法による尿中、血中ウイルス DNA もしくは RNA の検出がある。PCR 法でのウイルス証明は感度、特異度が高い検査であるが、感染の範囲や部位の推定は難しい。同様に尿細胞診による感染部位の推定も難しいとされてきた。今回我々は、近年尿路上皮マーカーとして特異性を評価されている抗 Placental S100 (S100P)抗体と、simian virus 40 (SV40)と BKV の LT 抗原相同性を利用し BKV 感染を証明する抗 SV40 抗体を混合抗体として使用する同時二重免疫染色にて、BKV 感染細胞の由来解析を試みた。

#### [方法]

##### 1.対象

2012 年 9 月から 2013 年 6 月に岡山医療センター病理検査室に提出された尿細胞診検体のうち、パパニコロウ染色標本でデコイ細胞の形態を示し、かつ、SV40 陽性を示す BKV 感染細胞を認めた 66 症例を対象とした。なお、デコイ細胞の形態基準には、これまで報告されているデコイ細胞の 4 型いずれかに当てはまるものを抽出した。実験前段階として、抗 S100P 抗体の染色性の確認に、解剖材料 3 症例の正常膀胱および腎臓を用いた。また、組織標本での二重免疫染色法の染色性確認には BKV 感染腎組織を用い

た。

## 2. S100P 染色性の確認

未固定の正常膀胱粘膜および腎実質を綿棒で擦過し、それぞれ生理食塩水に浮遊させ、尿細管上皮細胞および尿路上皮細胞浮遊検体を作製した。これらを遠心沈殿させ、CytoRich Red (B.D) で固定後、BD SurePath™法 (B.D) にて細胞診標本を作製した。一次抗体は抗 S100P 抗体(Atlas antibodies, polyclonal, rabbit)を希釈倍率 1:3000 で単独使用した。一次抗体以外は次に行う同時二重染色と同条件で行った。それぞれの標本において 100 個の上皮細胞をカウントし陽性率を算出した。なお、同一材料のホルマリン固定パラフィン標本を作製し、抗 S100P 抗体染色を行い細胞診標本と比較した。

### 1.カクテル抗体による同時二重免疫染色

検討対象の 66 症例について、尿検体を遠心沈殿後、CytoRich Red (B.D) で固定し、BD SurePath™法 (B.D) にて細胞診標本を作製し、同時二重免疫染色を行った。

一次抗体は S100P 抗体(Atlas antibodies, polyclonal, rabbit, 1:3000)と抗 SV40 抗体 (Calbiochem, clone; Ab-2, Mouse, 1:200)を等量混合し使用した。二次抗体は動物種別に horseradish peroxidase (HRP)と alkaline phosphatase (ALP)が標識された MACH2 double stain 2 (Biocare Medical, Concord, CA)を用い同時に反応させ、発色は 3,3'- diaminobezidine (DAB)と Vulcan Fast Red Chromogen Kit 2 (Biocare Medical, Concord, CA)で行った。

## [結果]

### 1. S100P 染色性の確認

S100P は膀胱組織標本では尿路上皮細胞の細胞質が陽性であり、腎実質組織標本の尿細管上皮細胞は陰性であった。同部位より作製した細胞浮遊標本でも組織標本と同様の結果であった。膀胱粘膜擦過細胞浮遊標本では上皮細胞 100 個中 97 個(97%)が陽性を示した。腎実質擦過細胞浮遊標本では上皮細胞はすべて陰性であった。ごく少数見られた陽性細胞は LCA (Leuko common antigen) 陽性を示す白血球であった。

### 2.カクテル抗体による同時二重免疫染色

BKV 感染腎組織では腎盂尿路上皮細胞の細胞質は S100P 陽性を示し、BKV 感染尿細管上皮細胞の核は SV40 陽性、細胞質は S100P 陰性を示した。尿細胞診標本では SV40 陽性を示す BKV 感染細胞は、S100P 陽性を示す細胞と、陰性の細胞に染め分けられた。また、今回の 66 例中、S100P 陽性 BKV 感染細胞のみの症例が 55 例 (83.4 %)、S100P 陰性 BKV 感染細胞のみの症例は 2 例 (3.0 %) であった。両者が混在する症例が 9 例 (13.6 %) 存在した。

## [考察]

S100P は S100 蛋白ファミリーの一つで、腎盂尿路上皮の 94%、膀胱尿路上皮の 86% で陽性を示す尿路上皮の最新のマーカーの一つとされている。今回の検討では、擦過尿路上皮細胞の 97%が S100P 陽性を示し、擦過尿細管上皮細胞は陰性であった。尿路において尿細管上皮細胞と同じく S100P 陰性を示す上皮細胞に扁平上皮細胞があるが、両者は細胞形態から鑑別可能である。S100P は尿中の剥離細胞においても組織標本と同様に、尿路上皮細胞と尿細管上皮細胞の鑑別に有用なマーカーとなりえる。

S100P, SV40 二重免疫染色法では、尿中の BKV 感染細胞には S100P 陽性を示すものと陰性を示すものが存在し、前者は尿路上皮由来、後者は尿細管上皮由来と考えられた。この方法は、BKV 感染症のスクリーニングツールとして、細胞診検査に付加価値を与えられると思われる。腎移植経過観察患者の BKV 腎症推定は、主に PCR 法による血中 BKvirus コピー数で判断される。PCR 法はウイルス増殖の判断に適した検査法だが、感染部位の推定には向かない。ウイルス増殖が疑われた場合、本法を併用し感染部位を推定できれば、腎組織生検の必要性を判断する材料になりえ、侵襲性の高い検査の実施を最低限におさえられると期待される。

これまで、デコイ細胞は尿細管上皮細胞由来と推測する報告が多かったが、今回の研究で尿路上皮由来感染細胞や両者が混在する症例が存在することが証明できた。BKV による出血性膀胱炎に見られるデコイ細胞は、これに相当する尿路上皮由来 BKV 感染細胞と考えられる。本研究では、尿路上皮由来 BKV 感染細胞のみの症例 (3.0%)、混在症例 (13.6%) に比べ、尿細管由来 BKV 感染細胞のみの症例 (83.4%) が多かった。このことは尿中に出現する BKV 感染細胞のほとんどは尿細管由来と考えられてきたこれまでの報告とよく一致する結果である。Ruomei らによる *in vitro* での尿路上皮細胞の BKV 感染に関する報告で、尿路上皮細胞は BKV 感染に寛容であるが、ウイルスの複製サイクルは尿細管上皮細胞での複製に比べ遅いと述べている。また、尿路上皮細胞は身体の中でもっとも回転率の遅い上皮の一つであり、尿中への感染細胞の排出は尿細管上皮細胞に比べ少なくなると考えられる。このことは尿細管由来 BKV 感染細胞が多くを占めた今回の結果を説明するものと考えられる。

## [結論]

抗 S100P 抗体と抗 SV40 抗体による二重免疫染色法により、尿中の BKV 感染細胞は、尿路上皮由来感染細胞と尿細管由来感染細胞に分類することができた。尿細胞診においてデコイ細胞を検出し BKV 感染を疑う時、細胞由来を判別できる本法は、移植患者の経過観察や治療方針の決定などに今後の応用が期待できる。