

尿細胞診による腎移植急性拒絶反応と シクロスポリン腎障害の鑑別診断

兵庫県立西宮病院泌尿器科 (主任: 永野俊介部長)

京 昌 弘

パーゼル大学病理学教室

M.J. Mihatsch

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF KIDNEY TRANSPLANT REJECTION AND CICLOSPORIN NEPHROTOXICITY BY URINE CYTOLOGY

Masahiro Kyo

From the Department of Urology, Hyogo Prefectural Nishinomiya Hospital

M. J. Mihatsch

From the Institute of Pathology, Basel University

To make the differentiation of kidney transplant acute rejection and ciclosporin (CS) nephrotoxicity urine cytology by classical Papanicolaou with immunocytochemical stain has been performed. Increased numbers of renal tubular cells with lymphocytes and monocytes were found in both rejections and CS toxicities. CS toxicities were associated with increased numbers of proximal tubular cells. In immunocytochemical stain, increased numbers of CD25 and CD 8 positive cells as well as increased ratio of HLA-DR/cytokeratin positive cells were typically found in rejections.

It is concluded that the proposed analysis of urine cytology is a non-invasive and reliable method for daily graft monitoring of acute rejection and CS toxicity.

(Acta Urol. Jpn. 37: 1153-1158, 1991)

Key words: Kidney transplantation, Rejection, Ciclosporin nephrotoxicity, Urine cytology, Immunocytochemistry

緒 言

免疫抑制剤シクロスポリン (CS) は、移植腎の生着率は飛躍的に向上¹⁾させたものの、その副作用である腎障害により、拒絶反応との鑑別診断が問題となっている。腎生検は拒絶反応、CS 腎障害の確定診断を行う上で最も有効な手段であるが、日常的にこれらを鑑別する非侵襲的な診断法が望まれる。われわれは、急性拒絶反応と CS 腎障害を非侵襲的に鑑別することを目的とした尿細胞診を、Papanicolaou 染色、免疫細胞化学染色を用いて行った。

対象と方法

1988年から1989年にかけてパーゼル大学で行われた腎移植37症例、および1989年から1990年に兵庫県立西

宮病院にて行われた7症例、計44症例に発症した急性拒絶反応17例、CS 腎障害20例を対象とした。急性拒絶反応17例中14例、CS 腎障害20例中6例は腎生検により診断し、その他は臨床的検査、症状により診断した。腎生検により診断した急性拒絶反応14例中13例は間質型拒絶反応、1例は間質型+血管型拒絶反応であり、CS 腎障害は5例が尿細管性腎障害、1例が尿細管型+血管性腎障害であった。

新鮮な早朝第2尿を入院中は隔日に、退院後は外来診察日ごとに検査した。50 ml の尿を 700 g にて 10 分間遠沈し、Hank 液にて洗浄後、Tripandblue 染色液にて染色し、計算盤にて尿中細胞数を測定した。さらに、同様に遠沈した後、尿中細胞数を 10,000/ml に調整し、サイトスピン (Shandon, Cytospin 2) を用いて Papanicolaou 染色 (55 g, 2 分間)、免疫

細胞化学染色 (55 g, 6分間) 用のプレパラートを作成した。Papanicolaou 用プレパラートは速やかに、固定用スプレー CYTOSTAT 400 (SimatAG, Switzerland) あるいはメタノールにて固定し、Papanicolaou 染色を行い検鏡した。数を測定した細胞はリンパ球, 単球, 尿細管細胞, 集合管細胞 (Fig. 1 a/b/c) で扁平上皮細胞や膀胱由来の移行上皮細胞は測定しなかった。最終的に尿 1 ml あたりの細胞数を計算した。

免疫細胞化学染色は、以下の通り行った。サイトスピンで作製したプレパラートを、1時間冷風乾燥し、室温にて10分間のアセトン固定を行い、直ちに免疫細胞化学染色を行うか、後日行う際はプラスチックにて密封し、 -70° にて保存した。染色法は、alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) 法を用いた。モノクローナル抗体は、T11 (CD11, Dako 1 20), T4 (CD4, Dako, 1 2), T8 (CD8, Dako, 1 20), Tac (CD25, Dako, 1 10), Lu5 (cytokeratin, 1:200, Loche), HLA-DR (HLA class II antigen, Dako, 1 20) である。使用の際は、0.05 M Tris-NaCl buffer 液で上記の濃度に希釈した。

サイトスピンプレパラートは、湿室内で1次抗体と室温にて30分反応させ、0.05 M Tris-NaCl buffer 液で洗浄し、続いて2次抗体 (rabbit anti-mouse globulin, ヒト血清で1:30に希釈) と30分反応させ、再洗浄後、APAAP-complex (Dako, 0.05 M Tris-NaCl buffer 液で1:80に希釈) と30分反応させ、洗浄後 New-Fuchsin との反応を20分間行った。洗浄後、Hemalaun 液にて対比染色を行い、封入した。400個の単核細胞中の陽性細胞 (Fig. 2) を数え、尿 1 ml あたりの陽性細胞数を求めた。統計処理は、急性拒絶反応時、CS 腎障害時の値を、全症例と Wilcoxon's U-test を用いて行った。

結 果

1) Papanicolaou 染色による結果

急性拒絶反応, CS 腎障害等の認められなかった症例では、尿中の単核細胞数, すなわちリンパ球, 単球, および尿細管細胞, 集合管細胞等の腎由来細胞は、術後4~5日目の早期に増加, その後減少し、術後13日以後に 2,000/ml 以下となる。同一症例においても日々の変動が大きいので、術後12日以前については今回の検討より除外した。

急性拒絶反応, CS 腎障害あるいは閉塞性尿路系合併症を持つ場合は、ほとんどの症例において、臨床的

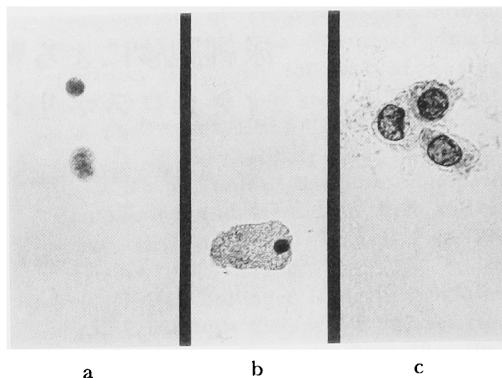


Fig. 1. Photomicrograph of lymphocyte and monocyte (a), tubular cell (b) and collecting duct cells (c). Papanicolaou stain.

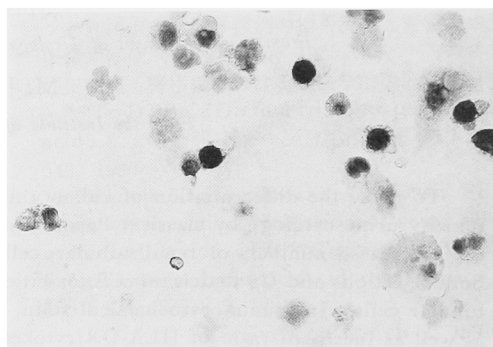


Fig. 2. Photomicrograph of CD2 positive cells. Immunocytochemical stain.

Table 1. The increase of urinary mononuclear cells in rejection, CS nephrotoxicity and obstructive complication

	The Increase of Total Mononuclear Cells in Urine ($\times 10^2$ cells/ml urine)	
	before the episode	day of diagnosis
acute rejection (n=17)	18.2 \pm 14.7	→ 83.9 \pm 75.0
CS nephrotoxicity (n=20)	16.5 \pm 24.1	→ 61.4 \pm 90.8
obstructive complication (n=2)	2.6 \pm 1.1	→ 231 \pm 44

診断時には尿中単核細胞数が増加していた (Table 1)。急性拒絶反応症例の方が CS 腎障害症例よりも、増加の傾向がやや大きいものの個体差が大きく、細胞数のみではその特徴を捉えるのは困難であった。CS 腎障害例では、臨床的診断前後とも細胞数が 1,000/ml 以下で、ほとんど変化がなかった例も 1 例あった。閉

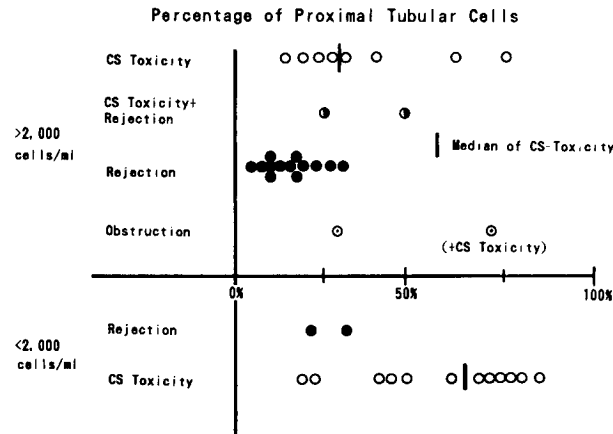


Fig. 3. The percentage of proximal tubular cells in total urinary mononuclear cells

Table 2. Mean (m), standard deviation (SD), median (M) and 75% value of the positive cells for each antigen

		CD2 ($\times 10^2/ml$)	CD4 ($\times 10^2/ml$)	CD8 ($\times 10^2/ml$)	CD25 ($\times 10^2/ml$)	Lu5 ($\times 10^2/ml$)	HLA-DR ($\times 10^2/ml$)	HLA-DR/Lu5 (ratio)
All cases day >12 n=190	m	4.7	2.0	2.2	1.6	18.0	18.5	1.27
	SD	6.0	3.0	3.1	3.3	36.3	32.7	0.72
	Med	2.4	0.9	0.9	0.0	6.2	7.0	1.15
	75%	6.2	3.0	3.4	2.4	16.6	21.8	1.56
CS-Tox n=20	m	4.2	1.6	1.9	0.5	19.5	19.8	1.19
	SD	5.9	2.2	3.1	1.3	44.4	42.6	0.50
	Med	2.0	0.5	0.2	0.0	4.2	6.4	1.05
RX n=17	m	12.3**	4.9***	7.0***	6.3***	14.2	24.2**	2.04*
	SD	18.2	7.6	10.5	6.0	12.6	21.7	1.53
	Med	6.4	2.9	2.9	6.8	9.8	23.1	1.67
Control n=17	m	1.4	0.6	0.5	0.1	4.1	4.8	1.31
	SD	1.6	0.7	0.8	0.3	6.5	7.3	0.67
	Med	0.7	0.2	0.3	0.0	1.3	1.6	1.17

(*p<0.05, **p<0.025, ***p<0.005 wilcoxon's U tests)

塞性尿路合併症の時にも尿中単核細胞数は著明に増加し、そのほとんどは尿路上皮由来の尿細管細胞、あるいは集合管細胞であった。

CS 腎障害の際の、尿細胞診の特徴は、尿細管細胞、特に近位尿細管細胞が全単核細胞の中で優位性に認められることであった。この傾向は尿中細胞の数によって若干異なり、尿中単核細胞数が 2,000/ml 以上であった 8 例では、拒絶反応例よりも近位尿細管細胞の優位性はやや高いが、50%をこえたのは 2 例のみであり、その傾向は比較的軽度であった。これに対し、単核細胞数が 2,000/ml 未満であった 12 例については、8 例が 50%をこえ、近位尿細管細胞の優位性はより顕著であった (Fig. 3)。このことから、近位尿細管細胞が

尿中単核細胞の 50%以上を占める場合は、CS 腎障害を疑う必要があると思われる。

一方、尿中単核細胞数が 2,000/ml 以上であっても、臨床的に急性拒絶反応、CS 腎障害、あるいはその他の合併症が認められない症例が 7 例あり、これらの症例の尿細胞診は多数の好中球が存在し、尿路感染症様のパターンを呈した。

2) 免疫細胞化学染色による結果

17 例の急性拒絶反応症例、20 例の CS 腎障害症例について、免疫細胞化学染色により染色した尿中の各抗原陽性細胞数を検討した。急性拒絶反応例の値は、各拒絶反応中の最高値を検討の対象とした。尿 1 ml あたりの平均 (m)、標準偏差 (SD)、中央値 (Med)、およびすべてのサンプルの 75% 値を Table 2 に示す。

Table 3. Sensitivity, specificity and positive and negative predictive value of the antigens for the diagnosis of rejection

		CD2	CD4	CD8	CD25	Lu5	HLA-DR	HLA-DR /Lu5
RX	SE	0.52	0.47	0.52	0.88	0.25	0.41	0.58
(n=17)	SP	0.84	0.83	0.84	0.93	0.84	0.86	0.76
	PVp	0.28	0.24	0.29	0.60	0.11	0.20	0.17
	PVn	0.93	0.93	0.93	0.98	0.93	0.94	0.95

SE=sensitivity; SP=specificity; PV=predictive value of positive (p) or negative (n) cases

急性拒絶反応時には、CD2, CD4, CD8, CD25 ($p<0.005$), HLA-DR ($p<0.025$), HLA-DR/cytokeratin ($p<0.05$) が、優位の差をもって全症例群より高値を示した。急性拒絶反応群とコントロール尿群との比較ではその差はさらに著明であった。一方、CS 腎障害症例では、全症例群と比較してどの抗原陽性細胞に対しても、優位の差は認めなかった。急性拒絶反応診断に対する感受性と特殊性の統計計算をする上で、全症例での75%値を正常値の上限とした。感受性、特殊性は、それ以外の抗原が25~58%の感受性、76%~86%の特殊性を示すのに対し、CD25 抗原に対する陽性細胞は88%の感受性、93%の特殊性を示し、すべての抗原の中で最も良好な成績を示した。CD25 以外では、HLA-DR Lu 5 (cytokeratin) 陽性細胞比 CD 8, CD2 が比較的良好な感受性、特殊性を示した (Table 3)。

考 察

移植腎の急性拒絶反応は、血清クレアチニン値、BUN 値の上昇、尿所見、移植腎の腫脹等の臨床的検査、症状に基づいて診断されることが多いが、臨床症状のない場合でも後から拒絶反応と診断されたり、あるいは、拒絶反応と診断され治療された腎機能低下が、後に他の原因によると判明することもしばしばある。それゆえ、拒絶反応と他の原因、特に主免疫抑制剤として日常的に使用されているシクロスポリンによる腎機能低下とを、日常的、非侵襲的に鑑別する手段が望まれる。

客観的鑑別診断法としては、腎生検、針吸引腎生検 (FNAB)、尿細胞診がある。腎生検は最も診断価値があり、生検組織はすべての腎細胞内容、すなわち糸球体、血管、小血管、間質尿管領域を含むので、再発あるいは新たに発生した病変の診断が可能である。FNAB は、主に浸潤細胞、尿管細胞により間質尿管領域の病変診断に有効であるが、吸引された細胞

が血液由来である可能性もあり、この点が問題となる⁹⁾。また、細い吸引針を使ったとしても、やはり患者に対して侵襲的で不快な検査である。第3の方法は、尿細胞診で、移植腎における細胞浸潤を、日常的にモニターするのに最も適した方法である。しかしながら、尿細胞診も FNAB 同様、間質尿管領域しか評価できないという限界がある。また、時には尿中細胞の保存が問題になることもあるが、この点については新鮮な尿を用い、すみやかに処理することにより解決する。

腎移植患者の尿細胞診について、Papanicolaou^{3,4)}, Giemsa⁵⁾ などの一般染色を用いた Conventional 療法下における検討はすでにされており、尿中リンパ球⁶⁾、あるいは集合管細胞⁴⁾ が、拒絶反応の診断に対し、有用であることは既に報告されている。CS を主とした免疫抑制療法下においても、前リンパ球⁶⁾、あるいは集合管細胞⁷⁾ の拒絶反応の診断に対する有用性が、同様に報告されている。一方、CS 腎障害の時は、変性した近位尿管細胞の尿中への出現が特徴的である⁸⁾。われわれの経験でも、尿中単核細胞中の尿管細胞の比率が50%以上の時は CS 腎障害の可能性が高く、同様の傾向を示した。尿中における尿管細胞の形態は、腎生検と同様に isometric vacuolization や tubular inclusion body⁹⁾ が認められることもあるが、一般的には形は大きく、細胞質は細顆粒状で膨化し、核は濃縮、偏心性に存在し、これらの所見についても Stella ら⁸⁾ の報告とほぼ同様であった。そこで、尿中のこのような近位尿管細胞の割合が、CS 腎障害を診断する上で重要であり、50%をこえる時は CS による腎障害を疑う必要がある。しかしながら、尿中単核細胞数が 2,000/ml 以上では時に細胞の混在性が認められ、その場合は近位尿管細胞の割合は50%未満のことが多く、判断が難しくなる。そこで、われわれはさらに免疫細胞化学染色による検討を行った。

免疫細胞化学染色でモノクローナル抗体を使つての単核球の同定は、特に移植腎の浸潤細胞については、いくつかの報告がある^{9,10)}。急性拒絶反応の際には、CD8 陽性細胞が、CD4 陽性細胞に対し優位になるとの報告が多い^{9,10)}が、その解釈については一定していない。Tac 抗原 (CD25, IL2 receptor) は、活性型 T 細胞を示す細胞表面マーカーであるが¹¹⁾、この抗原に対する陽性細胞が、強い拒絶反応を示す腎生検中に認められている^{10,11)}。もう1つの重要なマーカーは、HLA-DR 抗原の発現性である。正常組織において HLA-DR 抗原はマクロファージ、 dendrocyte

ック細胞, B 細胞, 血管内皮に限られる¹⁴⁾が, 拒絶反応においては HLA-DR 抗原は, 腎尿管細胞にも発現し¹⁵⁾, 興味もたれるところである。

腎移植症例における尿中細胞のモノクローナル抗体を使つての検討では, Vangelista ら¹⁶⁾ は, Flow cytometry を用いて解析を行い, 急性拒絶反応時には尿中に CD2 および CD8 陽性細胞の増加が認められたと報告している。

また, Simpson ら¹⁷⁾ は, 溶解性尿中 IL2 および IL2 receptor が, 腎移植患者の急性拒絶反応時に増加するのに対し, CS 腎毒性時には検出されなかったと述べている。われわれの検討でも, 急性拒絶反応の診断に対し, 最も良好な感受性, 特殊性を示したのは, CD25 陽性細胞, ついで CD8, CD2 陽性細胞であった。活性化 T 細胞マーカーである CD25 は, 急性拒絶反応を CS 腎障害から鑑別する上で最も有用であると思われる。HLA-DR 陽性細胞については, 症例によっては尿細管細胞が尿中に非常に多く逸脱することがあるため, 陽性細胞を指摘することだけでは拒絶反応の診断にそれほど有用ではなかった。しかし, 尿細管細胞の HLA-DR 抗原発現性増加を, ほぼ相対的に示すと考えられる HLA-DR/cytokeratin 陽性細胞比は, HLA-DR 陽性細胞の絶対的な数よりも, 拒絶反応の診断に対してより有用であった。Cytokeratin 抗原としては, われわれは Lu-5¹⁸⁾ を用いた。Lu-5 は pan-cytokeratin マーカーで, 拒絶反応, CS 腎障害を含むあらゆる腎障害に際して尿細管細胞に強く表現されるが, HLA-DR 抗原は拒絶反応の時に発現され, CS 腎障害時には発現されない。このことより, HLA-DR/cytokeratin 比は拒絶反応の診断に対して有用であると考えられる。

Papanicolaou 染色, 免疫細胞化学染色両方の結果より, 以下のように急性拒絶反応を診断しうる (Fig. 4)。まず, Papanicolaou 染色により, 尿中細胞の鑑別, 同定を行う。リンパ球, 単球, 尿細管細胞, 集合管細胞等の全単核細胞数が 2,000/ml 以下なら, 拒絶反応の可能性はほとんどない。尿細管細胞が全単核細胞の50%を示した場合は, CS による腎障害が考えうる。細胞数が 2,000/ml 以上の時も, 近位尿細管細胞が優位であれば, 同様に CS 腎障害の可能性が高い, 細胞数が 2,000/ml で尿中細胞が混在している場合には, 免疫細胞化学染色を施行する。CD25 陽性細胞が 25/ml 以上, CD8 陽性細胞が 350/ml 以上, そして HLA-DR/cytokeratin 比が1.6以上の場合には急性拒絶反応が強く疑われる。

われわれの17の急性拒絶反応例中15例が3条件の2つを満たした。以上のごとく, Papanicolaou 染色, 免疫細胞化学染色による尿細胞診法は, 腎移植後の急性拒絶反応とシクロスポリン腎障害を日常的, 非侵襲的に鑑別しうる方法である。

結 語

1. 急性拒絶反応17症例, CS 腎障害20症例について, Papanicolaou 染色, 免疫細胞化学染色による尿細胞診を行い, その結果を解析した。
2. CS 腎障害時には, 尿中の近位尿細管細胞の優位性が認められた。
3. 急性拒絶反応時には, 尿中単核細胞の増加に加え, 免疫細胞化学染色で CD25, CD8, CD2 陽性細胞の増加, HLA-DR/cytokeratin 陽性細胞比の上昇が認められた。

本論文の要旨は, 第40回日本泌尿器科学会中部連合総会にて発表した。

文 献

- 1) Calne RY and Wood AI: Cyclosporin in cadaveric renal transplantation: 3-year follow-up of a European multicenter trial. *Lancet* 8454: 549, 1985
- 2) Droz D, Campos H, Noel LH, et al.: Renal transplant fine needle aspiration cytology. Correlations to renal histology. In *Renal Transplant Cytology. Proceedings of the second international workshop.* pp. 59-65, Paris, Milan, Italy, Wichtig, 1984
- 3) Taft PD and Flax MH: Urinary cytology in renal transplantation. *Association of renal tubular cells and graft rejection. Transplantation* 4: 194-204, 1966

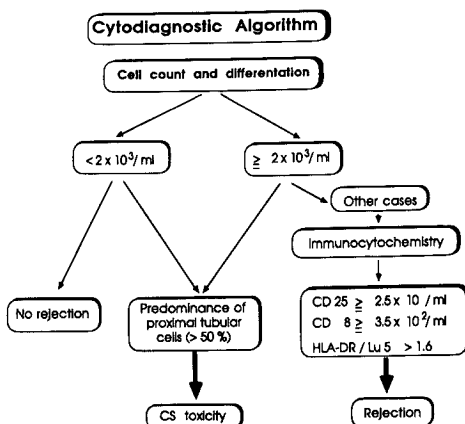


Fig. 4. Cytoalgorithm for the diagnosis of rejection and CS nephrotoxicity

- 4) Schumann GB, Palmieri LJ, Jones DB : Differentiation of renal tubular epithelium in renal transplantation cytology. *AM J Clin Pathol* **67**: 580-584, 1977
- 5) Spencer ES and Petersen VP : The urinary sediment after renal transplantation. Quantitative changes as an index of the activity of the renal allograft reaction *Acta Med Scand* **182**: 73-82, 1967
- 6) Sandoz PF, Biemann D, Mihatsch M, et al.: Value of urinary sediment in the diagnosis of interstitial rejection in renal transplants. *Transplantation* **41**: 343-348, 1986
- 7) Eggensperger D, Schweitzer S, Ferriol E, et al.: The utility of cytodiagnostic urinalysis for monitoring renal allograft injury. *Am J Nephrol* **8**: 27-34, 1988
- 8) Stella F, Stella C, Battistelli S, et al.. Monitoring of ciclosporin toxicity by exfoliative urinary cytology in renal transplantation. *Contr Nephrol. Karger Basel* **51**: 152-155, 1986
- 9) Mihatsch MJ, Thiel G, Basler U, et al. Morphological patterns in cyclosporin-treated renal transplant recipients. *Transplant Proc* **17**: 101-116, 1985
- 10) Hancock WW, Gee D, Moerloose PD, et al.: Immunohistological analysis of serial biopsies taken during human renal allograft rejection. *Transplantation* **39**: 430-438, 1985
- 11) Sanfilippo F, Kolbeck PC, Vaughn WK, et al.: Renal allograft cell infiltrates associated with irreversible rejection. *Transplantation* **40**: 679-685, 1985
- 12) Uchiyama T, Bröder S, Waldmann TA : A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. *J Immunol* **126**: 1393-1397, 1981
- 13) Seron D, Alexopoulos E, Raftery MJ, et al.. Diagnosis of rejection in renal allograft biopsies using the presence of activated and proliferating cells. *Transplantation* **47**: 811-816, 1989
- 14) Hall BM, Bishop GA, Duggin GG, et al.: Increased expression of HLA-DR antigens on renal tubular cells in renal transplants: relevance to the rejection response. *Lancet* **3397**: 247-251, 1984
- 15) Henny FC, Weening JJ, Baldwin WM, et al.: Expression of HLA-DR antigens on peripheral blood T lymphocytes and renal tubular epithelial cells in association with rejection. *Transplantation* **42**: 479-483, 1986
- 16) Vangelista A, Nanni-Costa A, Fatone F, et al. Flow cytometry analysis of urinary cytology in renal transplantation. *Transplant Proc* **19**: 1665-1666, 1987
- 17) Simpson M, Madras P, Cornaby AJ, et al.: Sequential determination of urinary cytology and plasma and urinary lymphokines in the management of renal allograft recipients. *Transplantation* **47**: 218-223, 1989
- 18) Franke WW, Winter S, von Overbeck J, et al.: Identification of the conserved, conformation-dependent cytokeratin epitope recognized by monoclonal antibody (lu-5). *Virchows Arch A* **411**: 137-147, 1987

(Received on March 1, 1991)
 (Accepted on April 22, 1991)