

May 2021 White paper

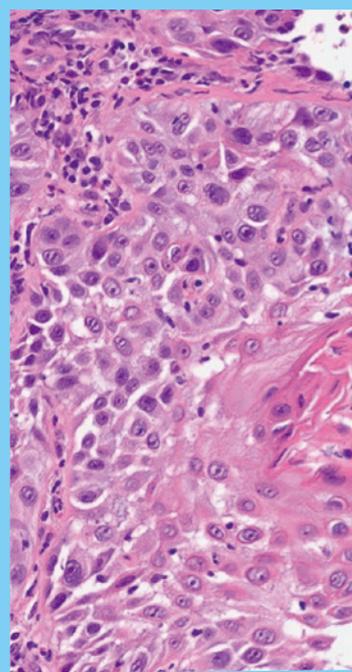
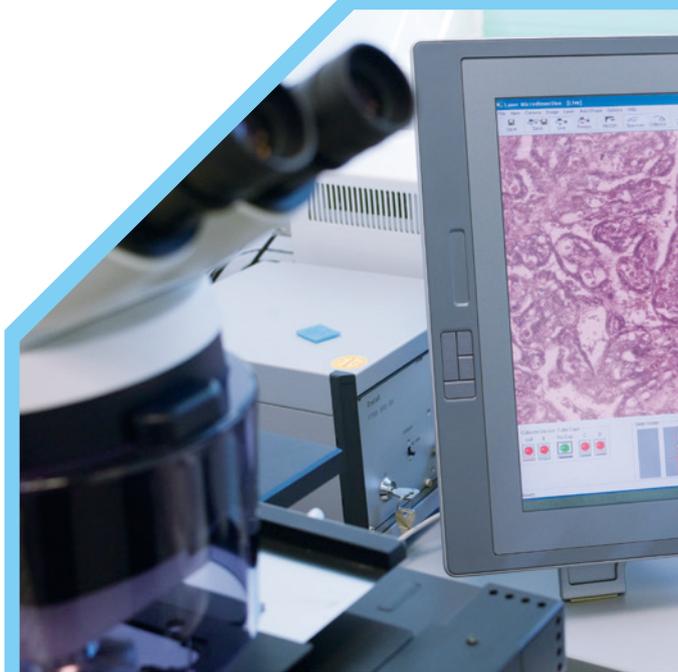
# ベンタナHE600と 用手法による HE染色標本の比較



執筆

**笹野 公伸先生**

東北大学大学院  
医学系研究科 教授  
東北大学病院  
病理部部長



## はじめに

17世紀のイギリスを代表する科学者であるロバート・フック (Robert Hooke) は顕微鏡を発明し、コルクの切片に“小さな部屋”が多数あるのを発見し、これをcell (小部屋の意味) と名付けたことは有名な話である (1)。このフックにより発明された顕微鏡は現在でも世界中の様々な分野で使用されている。

この顕微鏡を用いて病理学ばかりでなく近代医学の基盤の概念を細胞病理学 (Cellular Pathology) を通して築いたのが、ドイツのルドルフ・ウィルヒョー (Rudolf Virchow) である。ウィルヒョーは全ての細胞は細胞から生じ ("omnis cellula e cellula")、また細胞の異常が疾患を引き起こすことを提唱した (2,3)。しかし意外と知られていない事として、当時はまだ組織や細胞の染色法が確立されておらず、標本/切片は“透明”であり顕微鏡の焦点を上下させることによって細胞の形態を見て判断していた事である。その後種々の染色液が導入され、細胞や組織を真の意味で可視化出来たのは19世紀後半以降である。特に従来用いられてきた天然の染料に加えて、ドイツその他で目覚ましい発達があった有機化学の成果から化学合成染料が生まれ、それが病理の分野に応用され現在でも用いられている染色液が導入された背景がある。

さて世界中の病理検査室において日常的に実施されている染色は、ヘマトキシリン-エオジン染色

## HE染色に影響を及ぼす要因

ヘマトキシリン-エオジン/HE染色は

- ①化学的親和性：色素と組織/細胞成分中の化学的官能基との結合状態
- ②濃度：色素が結合する組織成分中の化学的官能基の濃度
- ③透過性：色素の大きさと組織構築の密度関係の3要素が密接に関連して染色の結果が生み出される (7)。

また、前処理や検査室側での標本作成段階の要因としては、

- ①固定条件
- ②切片の厚さ
- ③色素、試薬のロット番号や状態 (古さ)、室温、試薬調整、水洗に使用する蒸留水や水道水の状態など、標本や染色時の条件がHE染色標本の結果に大きな影響を与えることはよく知られている。病理組織診断においてはエオジン (好酸性：eosinophilic) 染色も重要ではあるが、特にヘマトキシリンの核への染色動態 (好塩基性：basophilic) で病理組織診断が全く異なる場合

である。この染色法は全ての疾患における病理組織学的分類の基本的な染色法となっている事はよく知られている。この染色に使われる染色液であるヘマトキシリンはメキシコのユカタン半島の近くにあるCampeche州のみで採れるマメ科の植物ヘマトキシリン (Hematoxylin Campechianum) のチップの芯材から作成されている。1865年にBohmerがこの植物由来の色素にアルミニウムを入れて初めてヘマトキシリン染色に成功した(4,5)。その後Ehrlichが1886年、Harrisが1990年、続いてMeyerが1903年に改良法を提唱し、現在のヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色に至っている(4)。すなわちこの染色法は100年以上の歴史を有しており、現在でも病理診断学の領域では基本中の基本となっている染色法である(6)。

さてこのHE染色の染色性はヘマトキシリンとエオジン間の微妙なバランスやコントラストにより顕微鏡下で観察される組織／細胞が「見やすい」かどうかで評価される。すなわち極めて主観的な評価になりやすく、その個人差も大きく客観的な評価は極めて難しい。そこで今回我々は複数の観察者により、異なる技法で染色されたHE標本の染色性の評価を一種の“Delphian approach”により定めた項目を用い初めて試みた。このアプローチは客観性、再現性などの面で種々のご批判はあるかとは思われるが、今後のHE染色標本の評価の参考としていただければ幸いである。

もあり、日常的に行われているHE染色の均てん化が現在何よりも求められている。

そこで今回開発されたペンタナ HE600では、調整済みの試薬が各スライド毎個別に滴下されるので常に新しい状態の試薬で染色され、用いる水道水の水質変化や染色液調整の作業精度、経時的な劣化などの影響を全く受けない。この点で技術的にはかなり均てん化に向けて進歩があるが、従来病理検査室で長年用いられてきた手法との染色性は違うのか、また更に重要な事としてこの両者の差異

が実際の病理組織診断そのものを含む評価にどのような影響を与えるかについて検討する事が極めて重要になる。以上より今回我々は以下に示す複数の観察者による比較評価を試みた。

## 評価方法

評価方法の概要は以下の通りである。

評価標本：30例（表1）

脂肪織炎	子宮内膜(正常)	子宮頸部(正常)	子宮筋腫	真珠腫性中耳炎
前立腺過形成	子宮頸部異形成 (CIN3)	非浸潤性乳頭状尿路上皮癌 (TURBT)	リンパ節(正常)	大腸癌
淡明型腎細胞癌	Bowen病	胎盤(正常)	卵管(正常)	前立腺癌
胆嚢炎	胸壁血管腫	歯肉壊死組織	胃癌	胃癌リンパ節転移
脂漏性角化症	石灰化上皮種	小腸びまん性大細胞性 B細胞リンパ腫	外耳道乳頭腫+真菌	Barett 食道
浸潤性乳管癌	前立腺針生検 (腫瘍なし)	乳腺線維腺腫	唾液腺炎	歯肉癌

表1. 評価標本の一覧

表中の赤字は悪性腫瘍 (n=11) (ICD code 3 or 2)、黒字は非悪性疾患 (n=19) を示す

評価方法：5段階（1低評価⇒5高評価）

評価者：4名

病理医3名（経験年数30年、15年、7年）

と臨床検査技師1名（医学博士、助教）

各症例の連続切片をベンタナHE600（プロトコール設定 H2A1E5 Option1）と用手法（病理標本作製経験30年超の臨床検査技師による染色）にて標本を比較評価した。染色法の差異や他の評価者の評価結果による先入観を出来るだけ無くするために、全ての標本はブラインドで、すなわち別々に独立して評価を実施した。

ヘマトキシリン-エオジン染色の客観的な評価軸（すなわち何を評価すべきか）については、上述の

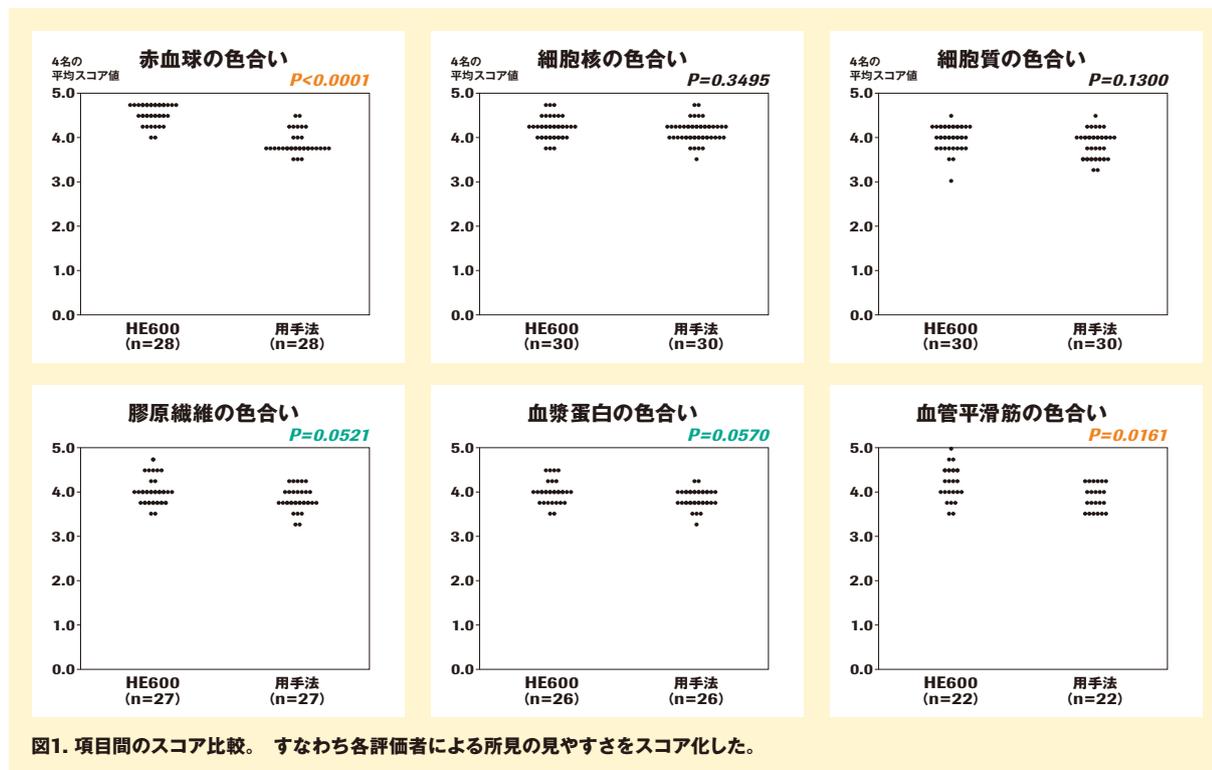
ように明確な基準は存在していない。この事から本検討では様々な疾患・症例に関して観察/検討が可能であり、かつ病理診断で差異が重要になりうる項目に関し評価者に別々に問い合わせ、最も一致が認められた以下の6項目を抽出した。そしてこれら6項目全てで色調の判定しやすさなど主観的ではあるが、個々の今までの経験に基づき5段階評価を実施した。そしてこれらの評価が4名の観察者間でどのくらい一致するかによりHE染色の均てん性を評価する事とした。

### 評価項目

- |       |       |        |
|-------|-------|--------|
| ①赤血球  | ②細胞核  | ③細胞質   |
| ④膠原繊維 | ⑤血漿蛋白 | ⑥血管平滑筋 |

## 評価結果の分析

各項目の評価結果を分析した結果を図1 (Mann-Whitney 検定) に示す。



この比較検討の結果から、膠原繊維や細胞核、細胞質、血漿蛋白の見やすさについては、ベンタナHE600と用手法間では有意差のない評価が得られた。しかし、赤血球、平滑筋の色合い、すなわち見やすさはベンタナHE600による染色がより評価が高い結果が得られた。いずれも好酸性の組織（エオジン好性組織）であり、エオジンに染まりやすい組織においてHE600を用いたHE染色がより見やすいことが今回の検討からは推察された。また、各評価項目の評価の相関性を2つの染色法で比較検討した（表2；Spearman順位相関係数）。その結果、用手法では膠原繊維の色合いvs血管平滑筋の色合いで有意な相関が認められた。一方

ベンタナHE600では膠原繊維の色合いvs血管平滑筋の色合いに加えて、赤血球の色合いvs血管平滑筋の色合い、膠原繊維の色合いvs細胞質の色合いの3つの組み合わせで有意な相関が認められた。（ $p < 0.05$ ）以上のようにベンタナHE600染色標本では特にエオジン好性組織でスコアが相関する、すなわちより一致する結果が得られた。しかし何故このような結果となったのか、すなわちHE600の試薬の組成の違い、染色機構の違い、染色条件の違い等、いずれの要因によるものなのかの特定には至っておらず今後の検討が必要と判断された。

## 評価結果の分析

	赤血球の色合い	細胞核の色合い	細胞質の色合い	膠原繊維の色合い	血漿蛋白の色合い	血管平滑筋の色合い
<b>用手法</b>	赤血球の色合い					
	細胞核の色合い	P=0.1757 p=0.2633				
	細胞質の色合い	P=0.1547 p=0.2763	P=0.1628 p=0.2615			
	膠原繊維の色合い	P=0.1954 p=0.2624	P=0.1258 p=0.3020	P=0.8096 p=0.0487		
	血漿蛋白の色合い	P=0.4856 p=0.1431	P=0.7869 p=0.0557	P=0.3443 p=0.1932	P=0.9445 p=0.0144	
	血管平滑筋の色合い	P=0.1695 p=0.3113	P=0.1166 p=0.3443	P=0.7176 p=0.0818	<b>P=0.0005**</b> <b>p=0.6785</b>	P=0.4082 p=0.1905
<b>HE600</b>	赤血球の色合い					
	細胞核の色合い	P=0.3854 p=0.1706				
	細胞質の色合い	P=0.1774 p=0.2644	P=0.7377 p=0.0638			
	膠原繊維の色合い	P=0.4388 p=0.1587	P=0.9059 p=0.0239	<b>P=0.0041**</b> <b>p=0.5342</b>		
	血漿蛋白の色合い	P=0.0885 p=0.3408	P=0.2402 p=0.2387	P=0.5496 p=0.1229	P=0.2280 p=0.2448	
	血管平滑筋の色合い	<b>P=0.0056**</b> <b>p=0.5822</b>	P=0.6495 p=0.1026	P=0.1071 p=0.3530	<b>P=0.0150*</b> <b>p=0.5114</b>	P=0.3962 p=0.1953

表2. 各HE染色法における評価スコアの相関性

次に重要な事としては、このような「HE染色の見やすさの違い」が悪性腫瘍 (n=11) (ICD code 3 or 2) と、非悪性疾患 (n=19) の病理組織診断に及ぼす影響があるのかどうかの検討があげられる。そこで今回対象とする組織の特性による染色性スコア

の比較・相関性を分析した。その結果 **図2** および **図3** に示すとおり、スコアの傾向 (HE600染色で赤血球など好酸性組織が見やすい) は、組織の特性 (悪性腫瘍 vs 非悪性組織) には一切依存しなかった。

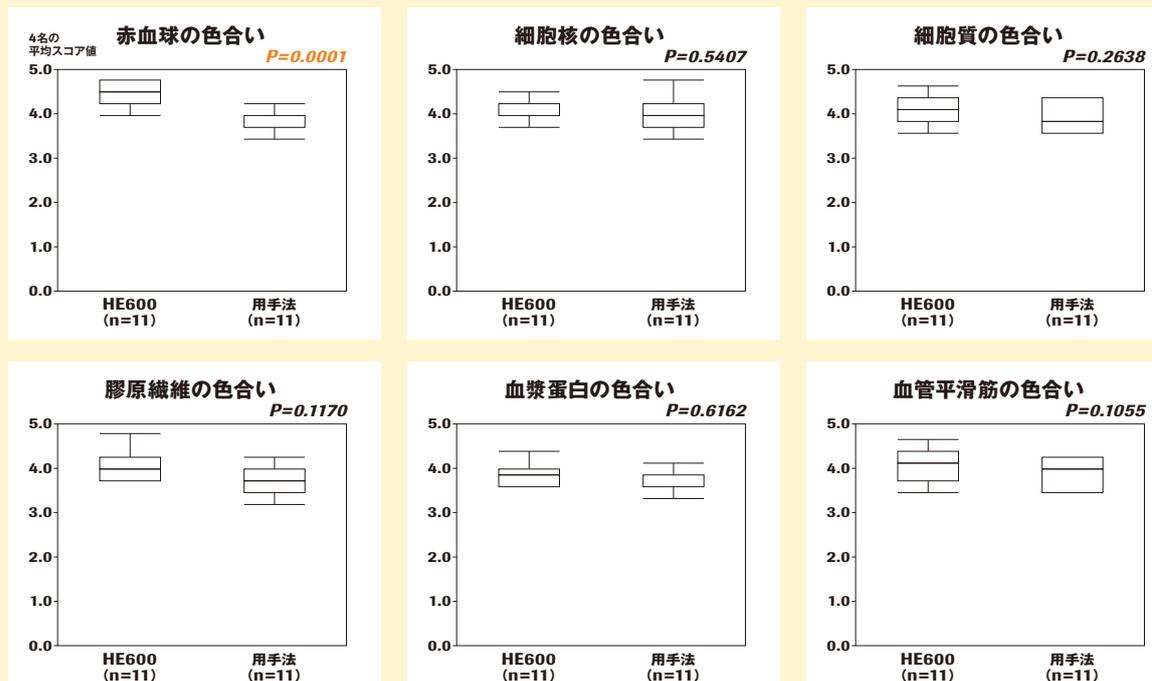


図2. 各項目スコアの比較 (悪性腫瘍組織: n=11)



図3. 各項目スコアの比較(非悪性組織:n=19)

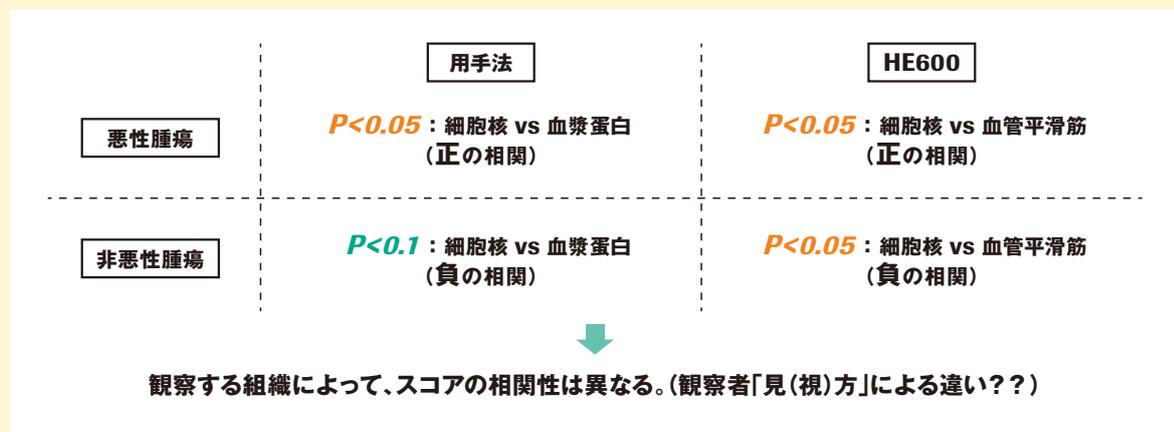


図4. 各HE染色法における評価スコアの相関性(悪性腫瘍 vs 良性疾患)

図4に観察する組織(悪性腫瘍vs良性疾患)の差異と、評価スコアの相関性をまとめた。観察する組織によって得られたスコアの相関性は異なっていたが、全体を通してHE染色標本における「見やすさ」という評価軸が主観的なものであることから、この結果をもって明確に染色性の良し悪しを決定づけるものではな

い事をここに強調したい。しかし、評価結果全体として、ベンタナHE600の染色性が東北大学で30年以上の病理組織標本作成の経験を有する臨床検査技師の用手法の染色性と比べても遜色ないレベルであったと思われる。

## 染色標本の比較

### 症例 1 大腸癌



図5. 大腸癌マクロ像

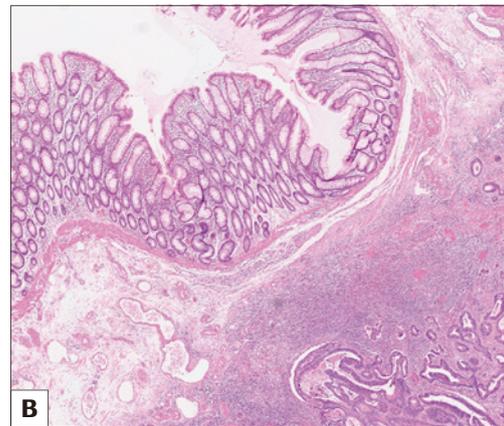
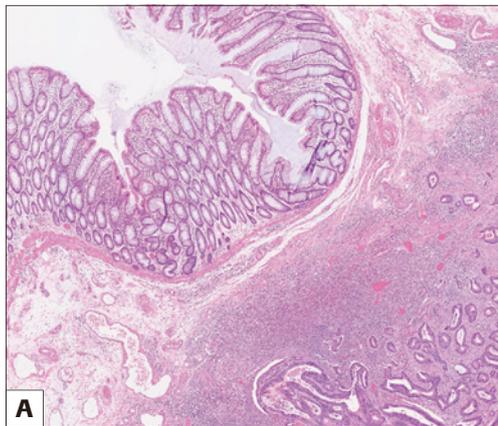


図6. 大腸癌HE染色(弱拡大)(A: ベンタナ HE600染色、B: 用手法染色)

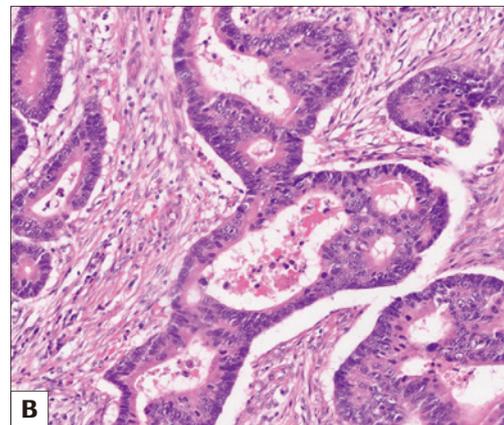
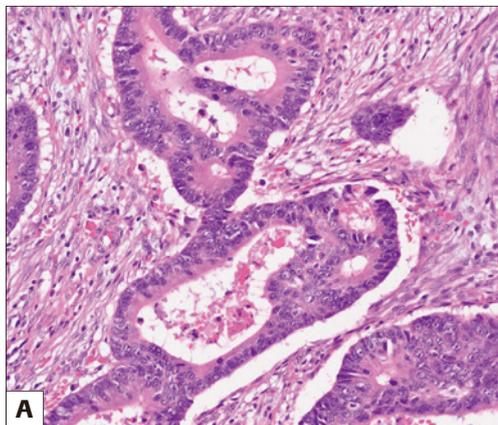


図7. 大腸癌HE染色(強拡大)(A: ベンタナ HE600染色、B: 用手法染色)

症例2 歯肉癌



図8. 歯肉扁平上皮癌マクロ像

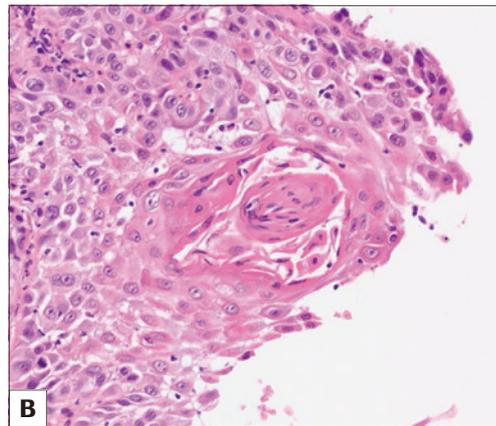
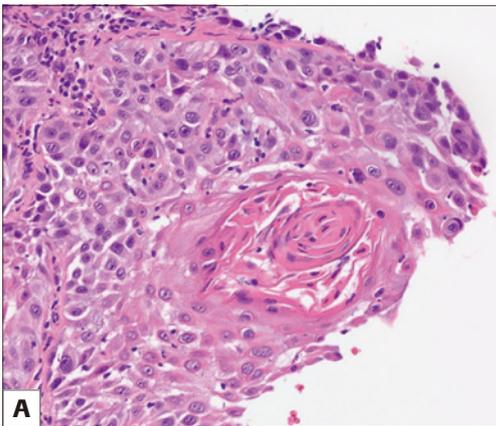


図9. 歯肉扁平上皮癌HE染色(A: ペンタナ HE600染色、B: 用手法染色)

症例3 胎盤(正常)



図10. 胎盤(正常)マクロ像

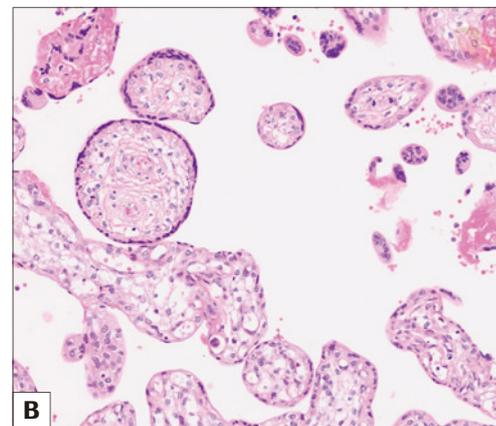
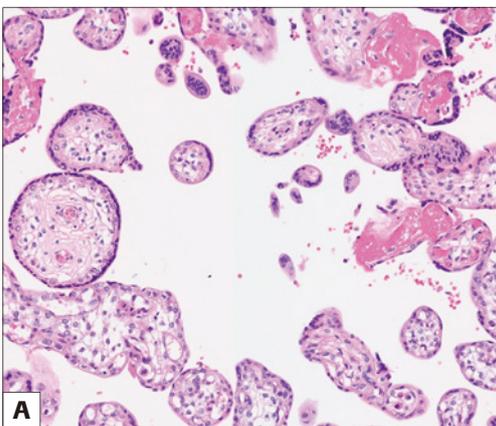


図11. 胎盤(正常)HE染色(A: ペンタナ HE600染色、B: 用手法染色)

## 染色標本の比較

### 症例4 胆嚢炎

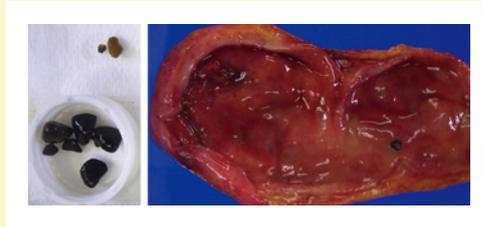


図12. 胆嚢炎マクロ像

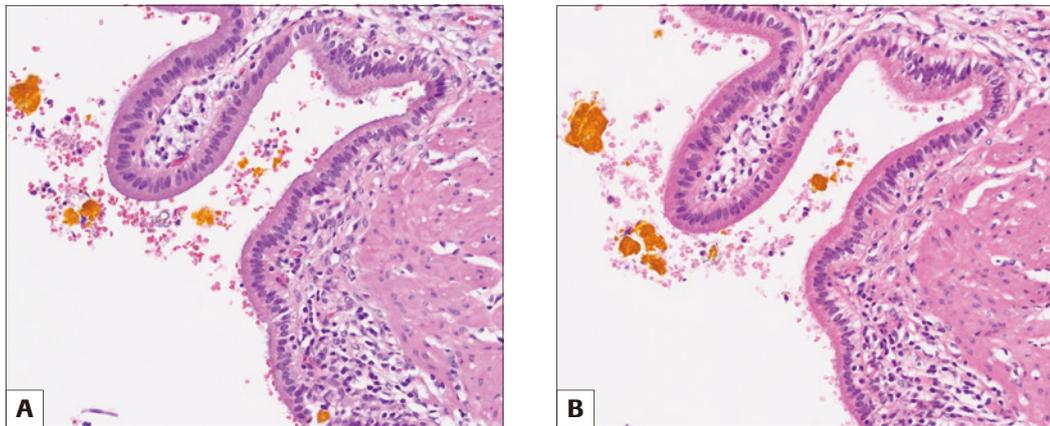


図13. 胆嚢炎HE染色(弱拡大) (A: ベンタナ HE600染色、B: 用手法染色)

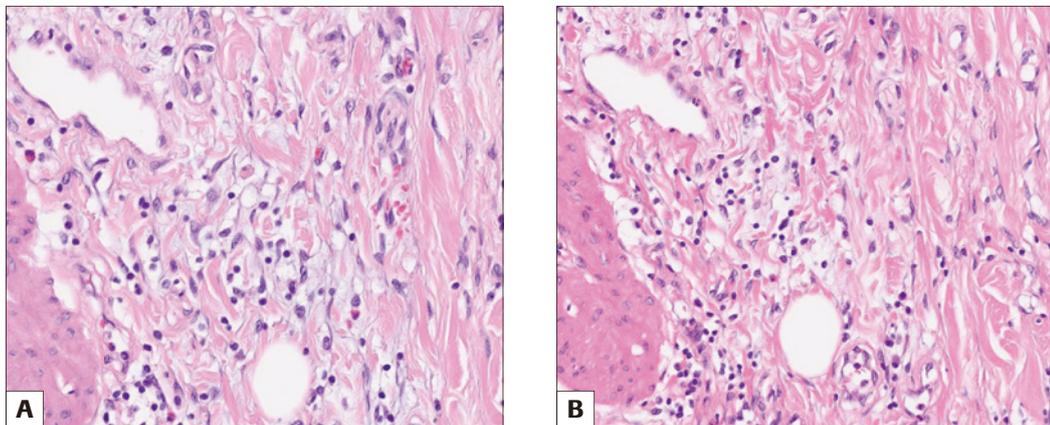


図14. 胆嚢炎HE染色(強拡大) (A: ベンタナ HE600染色、B: 用手法染色)

## 各症例の比較

**症例1.** 大腸癌HE染色(図6,7)で比較してみると、核や核小体、核膜、クロマチンの密度については、両染色法の標本において大きな違いは無いことが分かる。一方、赤血球や線維を比べてみると好酸性の色合いがペンタナHE600染色標本のほうが強く出ている傾向が認められた。

**症例2.** 扁平上皮癌では図9のように癌真珠が見られることがある。主観的な評価ではあるが、ペンタナHE600染色のほうが異常角化や癌真珠が浮き上がって見えることが分かる。

**症例3.** 胎盤において、塩基性の強い細胞質や核の見え方はほとんど変わっていない。

やはりペンタナHE600染色では好酸性の色合いが強く出ている傾向が認められた。(図11)

**症例4.** 胆嚢炎のHE染色像を比較してみても核自体の染色性は変わっていないが、炎症部位で見られる好塩基性の形質細胞の色合いは用手法のほうが若干強く出る傾向があるようにも見える。好酸性の好酸球などはペンタナHE600染色でより強くでることが確認された。

## コメント

- ペンタナHE600によるHE染色の自動化によりスタッフの手技・経験によらず安定した染色性が得られ、試薬調整等の手間や管理に要する労力も軽減される事が期待される。また、ペンタナHE600では1260通りのプロトコールの微調整が可能であり、個々の病理医の“好み”によりプロトコールを微調整することができる。
- ペンタナHE600のHE染色は、宮城がんセンターの佐藤先生にご協力いただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

## 参考文献

1. Gest H The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society Notes Rec Royal Society of London 2004 58 (2) :187-201. doi: 10.1098/rsnr.2004.0055.
2. Shultz M Rudolf Virchow Emerg Infect Dis. 2008 Sep; 14 (9) : 1480-1481.
3. Reese, DM Fundamentals--Rudolf Virchow and modern medicine. The Western Journal of Medicine. 1998 169 (2) : 105-108. PMC 1305179. PMID 9735691
4. Ortiz-Hidalgo C, Pina-Oviedo S Hematoxylin: Mesoamerica's Gift to Histopathology. Palo de Campeche (Logwood Tree) , Pirates' Most Desired Treasure, and Irreplaceable Tissue Stain. Int J Surg Pathol. 2011 27 (1) : 4-14.
5. Titford M The long history of hematoxylin. 2005 Biotechnic & Histochemistry. 80 (2) : 73-80.
6. Rosai J Why microscopy will remain a cornerstone of surgical pathology. Lab Invest. 2007 87 (5) : 403-8
7. Larson K, Ho HH, Anumolu PL, Chen TM Hematoxylin and eosin tissue stain in Mohs micrographic surgery: a review. Dermatol Surg. 2011, 37 (8) : 1089-99.



ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 〒108-0075 東京都港区 港南1-2-70  
カスタマーソリューションセンター ☎0120-600-152 <http://www.roche-diagnostics.jp>