愛媛県立医療技術大学紀要
第21巻　第1号　P.1-6　2024

原　著（査読あり）

核分裂像の視認において，なぜ，免疫細胞化学染色はパパニコロウ染色よりも容易なのか？ -色素学的な要因からの考察-

近藤ゆめの*，鈴木久恵**，小田千寛*，細川翔*，
入野了士***，祇園由佳*，西川武****，則松良明*

Immunocytochemical Staining versus Papanicolaou Staining for Mitotic Figure Clarity -Considerations based on Chromatological Factors-

Yumeno KONDO*, Hisae SUZUKI**, Chihiro ODA*,
Sho HOSOKAWA*, Satoshi IRINO***, Yuka GION*,
Takeshi NISHIKAWA****, Yoshiaki NORIMATSU*

Abstract

This study aimed to investigate the reasons for discrepancies in terms of chromatological factors between Papanicolaou staining (Pap) and immunocytochemistry (ICC) in the visual identification of mitotic figures using a microscope.Pap and ICC were compared in 10 squamous cell carcinoma cases diagnosed by cervical cytology in terms of the following factors: 1) the frequency of appearance of two or more mitotic figures per high-power field of view, 2) classification of mitotic figure detection patterns in the same field of view, and 3) the hue and brightness of mitotic figures and their cytoplasm in the same field of view. This study revealed that the frequency of ICC (69.8% ± 0.3%) was significantly higher than that of Pap (2.4% ± 0.04%; p = 0.0023). Additionally, the frequency of mitotic figures that were unrecognized by all four examiners in Pap was as high as 93.1% (p = 0.0005), which confirmed that ICC is superior to Pap in visualization of mitotic figures. Furthermore, the hue and brightness difference between the mitotic figures and their cytoplasm was greater in ICC than in Pap, causing higher contrast and thus facilitating the recognition of mitotic figures.

Keywords：核分裂像, 視認, 免疫細胞化学染色, パパニコロウ染色, 色素学的な要因

序　　文

子宮頸部細胞診におけるベセスダシステム[1]での高度扁平上皮内病変〈high-grade SIL(squamous intraepithelial lesions:SIL): HSIL〉は，正常，反応性子宮頸管細胞，萎縮扁平上皮細胞，扁平上皮化生，修復細胞等の反応性変化との鑑別が困難な場合がある。その原因として，液状検体化細胞診(liquid-based cytology: LBC) で作製された標本で頻繁に遭遇するHyperchromatic crowded groups (HCG) の出現がある(図1)[2,3]。

HCG は過染性クロマチン核を有する細胞が立体的に密な集塊(合胞状集団)であるため，正常または反応性変化でのHCGがHSILを除外できない異型扁平上皮細胞(atypical squamous cells - cannot exclude HSIL; ASC -H)と判定された場合，その臨床管理にて生検による精査が必要となり，より注意深い観察と適切な判定が求められる[4,5]。

したがって，HCGが腫瘍か非腫瘍かの鑑別は重要であり，HCGからHSIL細胞集塊を鑑別するための判定基準の確立は迅速に解決されるべき問題である。われわれは新たな判定基準の確立のために核分裂に着目した検討を行い，HSIL症例に認められるHCGには高率に核分裂細胞が含まれ，対物40倍視野あたり2個以上の核分裂が観察された場合，HSIL以上の病変の推定が示唆された。さらに核分裂像のスクリーニングにおいては，核分裂マーカーである抗リン酸化ヒストンH3(anti-phosphohistone H3:PHH3)抗体を用いた免疫細胞化学(immunocytochemistry:ICC)染色

*愛媛県立医療技術大学大学院保健医療学研究科医療技術科学専攻　**奈良県立医科大学附属病院 病院病理部
***愛媛県立医療技術大学大学院保健医療学研究科看護学専攻　****天理大学医療学部臨床検査学科

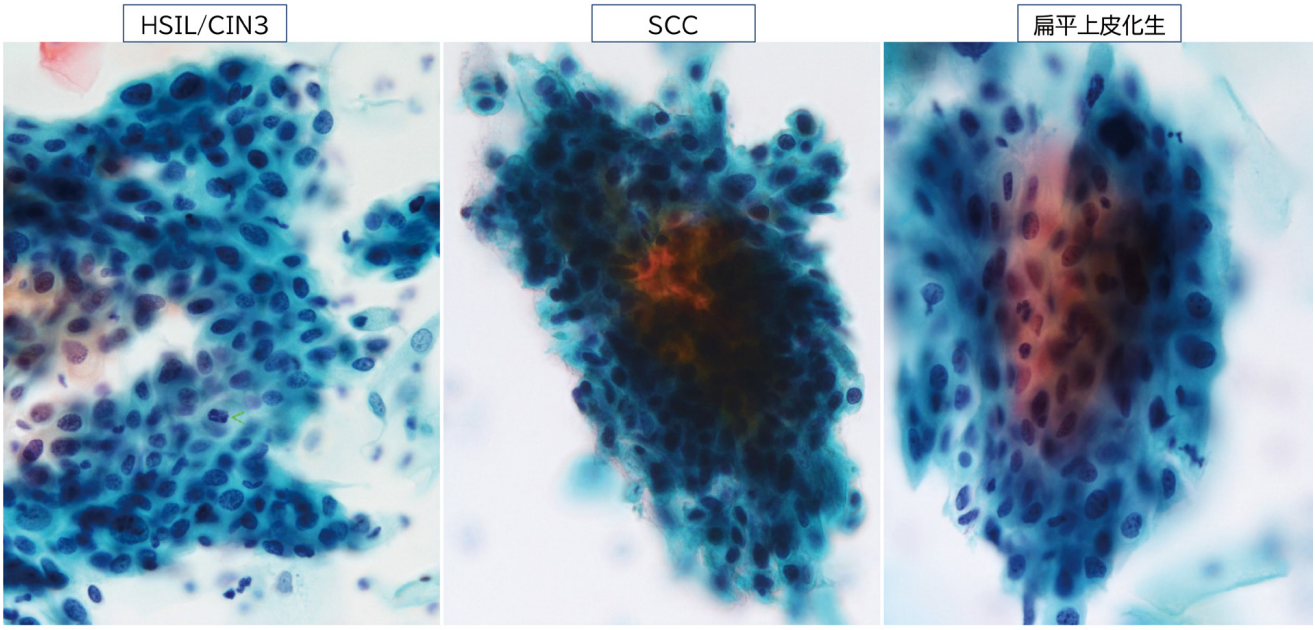

図1

シュアパス-LBC法で作製された標本において，頻繁に過染性クロマチン核を有する細胞が立体的に密な集塊であるHCGに遭遇する。HCGが腫瘍性か非腫瘍性か，Pap染色標本での鑑別はしばしば困難な場合がある。(HCG例，Pap染色，図左:HSIL，図中:SCC，図右:扁平上皮化生，倍率:左，中，右×400)

(PHH3-ICC染色)の方がパパニコロウ(Papanicolaou:Pap)染色よりも，短時間で正確な判別が可能であることが明らかになった[6,7]。

上述のことより，Pap染色標本とICC染色標本の間において，核分裂像の視認による判別に差があるのは何故なのか，色素学的な要因である「色相」と「明度」に着目して検討を行った。

方　　法

1.対象

本研究は，奈良県立医科大学附属病院で，2016年1月から2019年12月の期間において，子宮頸部擦過細胞診および組織診断が施行され，扁平上皮癌(Squamous cell carcinoma: SCC)と診断された10例を対象とした。年齢中央値は57.5歳(28～79歳)である。細胞診標本に対応するすべての組織標本は，細胞診採取以降，3か月以内の標本を選択した。また，子宮頸部生検および円錐切除から得られた組織検体でのヘマトキシリン・エオジン(Hematoxylin-Eosin: HE)標本は，WHO分類に従って分類した[8]。

本研究は奈良県立医科大学研究倫理審査委員会の承認を受け(承認番号2887)，患者に説明を行い，同意を得た。

2.細胞採取およびLBC標本作製手順

子宮頸部細胞の採取はRovers® Cervex-Brush® (Rovers Medical Devices B.V. Oss, Netherlands)を使用し，採取後，直ちにブラシ先端をBDシュアパス™コレクションバイアル(日本ベクトン・ディッキンソン社，東京)に落とし込み，すべての細胞を回収・固定した。次にBDトータリス™ マルチプロセッサーおよびBDトータリス™ スライドプレップ(日本ベクトン・ディッキンソン社，東京)でLBC標本を作製し，Pap染色を実施した。細胞診判定はベセスダシステム2014に準拠し，3名の細胞検査士が評価した[1]。

3.ICC染色手順

ICC染色は脱染色したPap染色標本を用い，標識酵素ポリマー法を用手法で実施した。1次抗体はPHH3抗体(Phosphohistone H3 rabbit polyclonal antibody, Ready-to-use;cat.no.760-4591, Cell Marque Co., CA USA)を，2次抗体はヒストファイン®シンプルステイン™ MAX-PO(MULTI) (ニチレイバイオサイエンス社，東京)を，発色基質にはシンプルステインDAB溶液(ニチレイバイオサイエンス，東京)を用いた。その後，ヘマトキシリンで核染色を行った。

4.核分裂像の評価

Pap染色標本において，核膜がなく，凝縮染色体が明瞭に認められ，各周期(前期，中期，後期および終期)として明瞭な形態を示す細胞のみを計数した。核が濃染している疑わしい細胞やアポトーシスが疑われる細胞は除外した[9]。Pap染色標本での観察において，4名の観察者全員が合意した核分裂像には緑矢印を付加し，全員の合意は得られないが，核分裂像を疑う場合は黄色矢印を付けた(図2)。PHH3-ICC染色標本では，各周期における核分裂の陽性核のみを計数した。不規則な顆粒状の陽性所見(間期像)は除外した[10]。

5.検討項目

1) Pap染色標本における核分裂の出現数

Pap染色標本の全視野中に認められるHCGを観察し，対

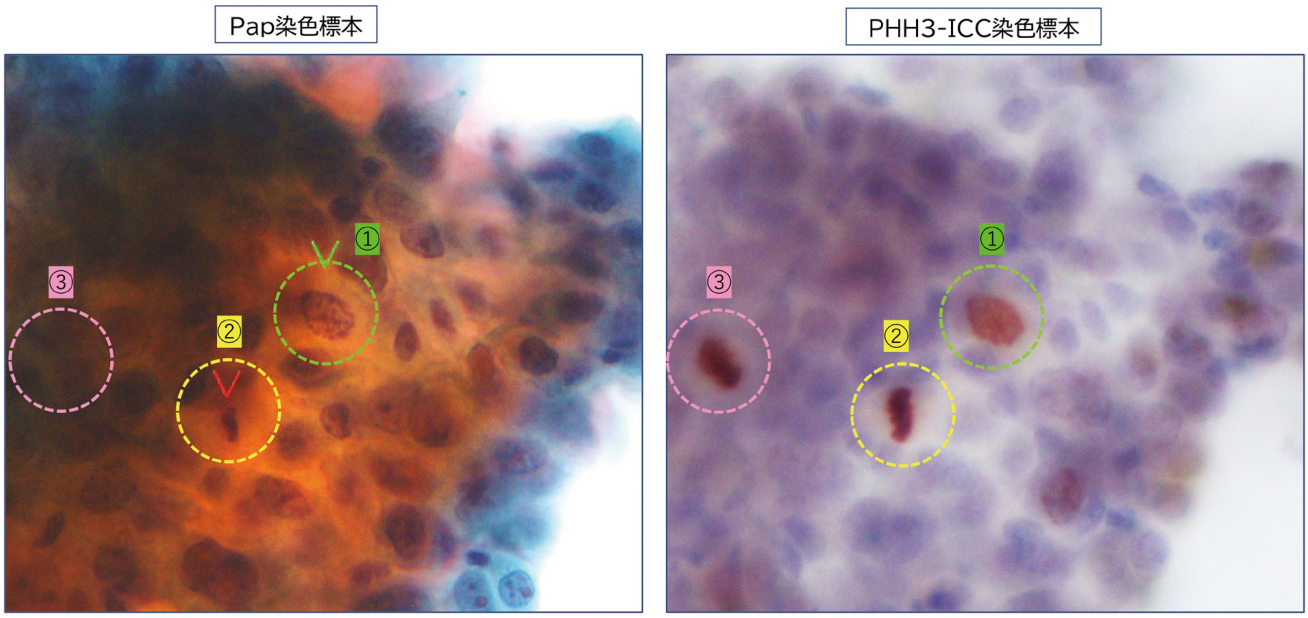

図2

①緑色囲い:Pap染色標本およびPHH3-ICC染色標本ともに4名全員が核分裂像に合意した。②黄色囲い:Pap染色標本では全員の合意を得られなかったが, PHH3-ICC染色標本で全員が合意した。③桃色丸囲い:Pap染色標本では全員が認識できなかったが, PHH3-ICC染色標本では全員が合意した。
(扁平上皮癌例, 図左:Pap染色, 図右:同一標本のPHH3-ICC染色, 倍率:左, 右×400)

物40倍視野(High power field: HPF)あたりに出現する核分裂数を計数した。次に,「2個以上の核分裂数/ HPF」(核分裂2個+)の判定基準を満たす視野数の頻度を算出した。

2) PHH3-ICC染色標本における核分裂の出現数

1)で使用したPap染色標本を脱染色し, PHH3抗体を用いてICC染色を行った。Pap染色標本と同一のHCGを観察し, HPFあたりに出現する核分裂数を計数した。次に, 核分裂2個+の判定基準を満たす視野数の頻度を算出した。

3) Pap染色標本とPHH3-ICC染色標本での同一部位における核分裂像認識のパターン分類(図2)

4名の判定者が核分裂像をそれぞれ観察し, ①Pap染色標本およびPHH3-ICC染色標本ともに全員が核分裂と合意した場合, Pap(○)-PHH3(○)とし, その核分裂を緑色で囲んだ。②Pap染色標本では全員の合意を得られなかったが, PHH3-ICC染色標本で全員が合意した場合, Pap(△)-PHH3(○)とし, その核分裂を黄色で囲んだ。③Pap染色標本では全員が認識できなかったが, PHH3-ICC染色標本では全員が合意した場合, Pap(×)-PHH3(○)とし, その核分裂を桃色で囲んだ。

4) Pap染色標本とPHH3-ICC染色標本での同一部位における核分裂像の色相と明度の比較(図3)

Pap染色標本とPHH3-ICC染色標本での同一核分裂像について, 5症例, 10細胞の色相と明度を下記の手順にて比較した。

(1)Microsoft PowerPointにおいて, [挿入]より図を挿入し, [描画ツール-書式]タブで[図形の塗りつぶし]を選択し, [スポイト]を選択するとマウスポインターがスポイトツールに変わる。

(2)スポイトを目的とする核分裂細胞内の核分裂部分とその背景(細胞質)部分にそれぞれ合わせると, 色が抽出される。

(3)[図形の塗りつぶし]から[塗りつぶしの色]を選択, 次に[ユーザー設定]を選択すると, RGB値, 色相スケールと明度スケールでの色の位置が示される。

(4)ITSakura Blog for business and developmentカラーコードの一覧表[11]において, RGB値を入力すると, Hexカラーコード(RGB値を16進数で表現したもので、#(ハッシュ)記号で始まり,6桁の16進数で表される)が示される。

(5)ぱふぅ家のホームページ[12]において, Hexカラーコードを入力し、色相環(色は光の波長の違いによって赤、橙、黄、緑、青、紫というように連続的に変化し, これを連続的に円環状にしたもの)に描画する。

6.統計学的解析

核分裂数の相関関係の統計解析は, Mann-Whitney U検定を行った。各統計解析検査の有意差は, 統計ソフト「IBM SPSS Statistics 28」(日本IBM社, 東京)を用いて判定した。p値が0.05未満は統計学的に有意と判断した。

結　　果

1.「核分裂2個+」の出現頻度(%) の比較(表1)

「核分裂2個+」の出現頻度(平均値±SD値)について, Pap染色標本では2.4±0.04%, PHH3-ICC染色標本では69.8±0.3%であり, PHH3-ICC染色標本がPap染色標本よりも, 有意に多く認められた(p=0.0023) 。

2. 同一部位における核分裂像認識でのパターン分類の比較(表2)

表1　「核分裂2個+」の出現頻度(%) の比較

症例No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均±SD
PHH3-ICC	53.8	79.0	0	100	100	90.0	75.0	33.3	66.7	100	69.8±0.3%
Pap	7.7	5.3	0	0	0	0	0	11.1	0	0	2.4±0.04%

*1

Mann-Whitney U Test (p<0.05)　*1:PHH3-ICC染色標本がPap染色標本よりも有意に高値(p=0.0023)

表2　同一部位における核分裂像認識でのパターン分類の比較

症例No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	合計
①PHH3(○)- Pap(○)	6	3	0	0	0	0	0	3	1	1	14 (2.2%)
②PHH3(○)- Pap(△)	4	3	0	0	5	7	2	4	2	2	29 (4.7%)
③PHH3(○)- Pap(×)	16	222	1	100	87	56	50	17	17	14	580 (93.1%)

*2
*1

Mann-Whitney U Test (p<0.05)　*1:③は①と比較して有意に高値(p=0.0005)　*2:③は①と②を合計したものと比較して有意に高値(p=0.0015)

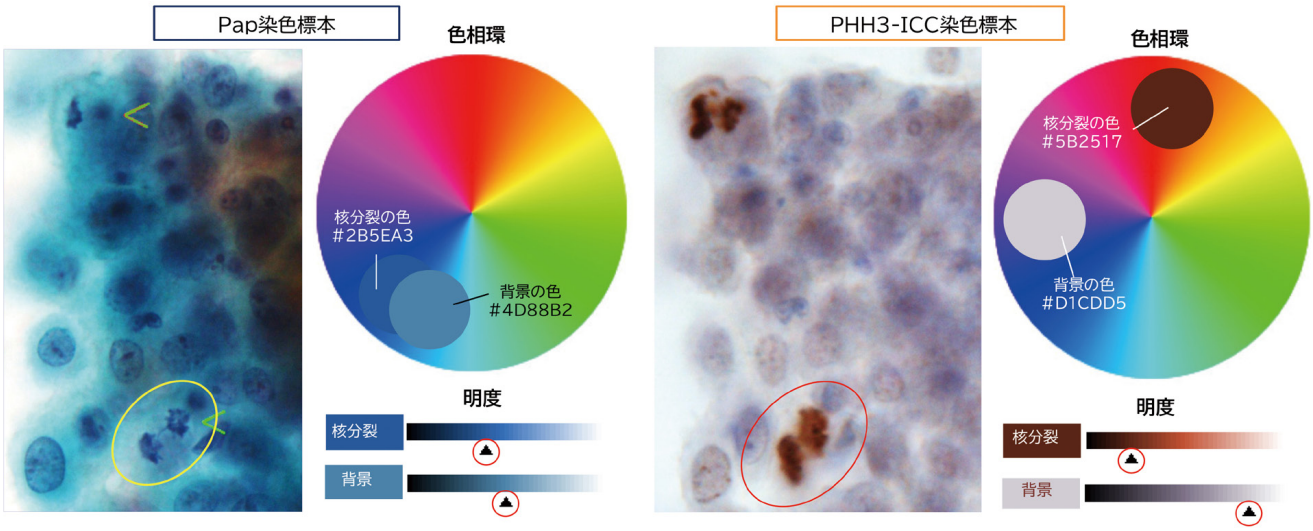

図3

核分裂細胞中の核分裂部分とその背景(細胞質)部分の色について, Pap染色標本(黄色囲い)では, 色相差と明度差が小さく, Hexカラーコードを入力し、色相環に描画すると, 色相の位置が重なっていた。一方, PHH3-ICC染色標本(赤色囲い)では, 色相差と明度差があり, 色相の位置が離れているのがわかる。(扁平上皮癌例, 図左: Pap染色, 図右:同一標本のPHH3-ICC染色, 倍率:左, 右×400)

核分裂総数623個の内, ①Pap(○)-PHH3(○)は14個(2.2%), ②Pap(△)- PHH3(○)は29個(4.7%), ③Pap(×)-PHH3(○)は580個(93.1%)であり, ③は①(p=0.0005)および①と②を合計したもの(p=0.0015)と比較して, それぞれ有意に多くの核分裂像が認識可能であった。

3. 同一部位における核分裂像の色相と明度の比較(図3)

核分裂細胞内の核分裂部分とその背景(細胞質)部分の色は, 場所によって若干の違いが認められたが, Pap染色標本では, 色相差と明度差が小さく, 核分裂部分と背景部分での色(Hexカラーコード)の位置が重なっていた。PHH3-ICC染色標本では, 色相差と明度差があり, 核分裂部分と背景部分での色の位置が離れていた。

考　　察

梅澤ら[13]は, HSIL病変の判定において異常HCGの出現率が69.3%と高頻度であり, 核分裂やアポトーシスを含む異常HCGがHSIL発見の重要な細胞所見であると指摘した。

しかし, Leeら[3]やThrall[5]は, HCGの中心部はクロマチンが過染した核の密集に伴い濃く暗くなり, 核の詳細な評価が難しくなることから, 比較的平面な集塊辺縁部での観察を勧めている。また, Guptaら[2]は, Pap染色標本では細胞の大部分を占める青/緑色が色差を認めないため, 低コントラストを招き, 視覚的検索を困難にすると述べた。それらのことから, Pap染色標本でのHCG中の核分裂の観察においても, その認識が集塊辺縁部に限定される。一方, PHH3-ICC染色標本では核分裂期の核に特異的に発現し[6,9,10], 視覚的に薄い青～紫色(ヘマトキシリン)を背景に褐色の陽性所見を示すため, コントラストが高く, 視認が容易と推定した(図2)。

上述のことは, Pap染色標本とPHH3-ICC染色標本間での核分裂2個+の出現頻度の比較(表1)において, 後者が前者よりも有意に多く認められたこと(p=0.0023)に加えて, 同一部位での核分裂像の認識パターン分類の比較(表2)において, Pap染色標本では, 全員が認識できなかった核分裂像が93.1%(p=0.0005)にも上ったことからも裏付けられる。松井ら[14]も子宮肉腫におけるHE染色標本とPHH3-免疫組織化学染色標本間での核分裂指数を比較した結果, 後者がより高感度な発現を示したと報告している。

以上のことより核分裂像の視認において, PHH3-ICC染色標本がPap染色標本よりも優れている(容易である)ことが確認できた。ではなぜ, ICC染色がPap染色よりも認識が容易なのか。Guptaら[2]が述べた次のこと:「Pap染色標本では細胞の大部分を占める青/緑色が色差を認めず, 低コントラストを招き, 視覚的検索を困難にする」より, 色素学的な要因、とくに、色相と明度に関連しているのではと推測した。伊師ら[15]は, 有彩色影文字の印象評価に影響を与える色素学的要因について,「目立ち感」,「見やすさ感」,「立体感」の印象強度が, 全般的に色相差や明度差の大小によって決定されると述べた。槙ら[16]も, 文字色と背景色の組み合わせにより, 読みやすさと配色の良さの評定がどう変化するか探った結果, 文字色と背景色の明度差が大きいほど評価が高くなることを報告した。

それらのことより, 同一症例でのPap染色標本とPHH3-ICC染色標本で観察される同一部位における核分裂細胞の核分裂部位とその背景(細胞質)部分の色相と明度の比較を行った。その結果, Pap染色標本では両者の色相差と明度差がそれぞれ小さく, 核分裂の色が目立たないが, PHH3-ICC染色標本では核分裂部位と細胞質部分の色相差と明度差がそれぞれ大きくコントラストが高いため, 核分裂像が認識しやすいことが判明した(図3)。

以上のことより, 細胞診判定における核分裂像認識のツールとして, PHH3-ICC染色標本がPap染色標本よりも, 有用であることが判明した。

引 用 文 献

1) Henry RM, Russell KD, Luff DR, et al. (2015): Epithelial Cell Abnormalities: Squamous, The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology-definitions, Criteria and Explanatory Notes. 3rd ed. Nayar R, Wilbur DC (eds), 135-192, Springer.

2) Gupta N, John D, Dudding N, et al. (2013): Factors contributing to false-negative and potential false-negative cytology reports in SurePath™ liquid-based cervical cytology. Cytopathology, 24, 39-43.

3) Lee Y, Lee C, Park IA, et al. (2019): Cytomorphological features of hyperchromatic crowded groups in liquid-based cervicovaginal cytology: A single institutional experience. J Pathol Transl Med, 53, 393-398.

4) Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MSR, et al. (2021): Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. Cytojournal, 18, 16.

5) Thrall MJ. (2023): A practical approach to squamous abnormalities on cervical cytology: Overview of interpretive criteria and guidance for altering thresholds in response to quality assurance findings. Acta Cytol, 67, 129-142.

6) Suzuki H, Kondo Y, Oda C, et al. (2024): “Can mitotic figures in hyperchromatic crowded groups be a cytodiagnostic criteria for high-grade squamous intraepithelial lesions?”. J Cytol, 41, 116-122.

7) 鈴木久恵, 小田千寛, 近藤ゆめの, 他 (2024): 核分裂像2個以上/対物40倍視野」に注目したHCGの観察はHSIL診断の手がかりになり得るか? 医学検査(Accepted).

8) Herrington CS, (2020): Tumor of the uterine cervix. WHO Classification of Tumours・5th edition Female Genital Tumours. WHO Classification of Tumours Editorial Board (eds), 335-389, WORLD HEALTH ORGANIZATION.

9) Al-Janabi S, van Slooten HJ, Visser M, et al. (2013): Evaluation of mitotic activity index in breast cancer using whole slide digital images. PLOS ONE, 8, e82576.

10) Timme S, Sillem M, Bronsert P, et al. (2017): Anti-phosphohistone H3-positive mitoses are linked to pathological response in neoadjuvantly treated breast cancer. Breast Care (Basel), 12, 244-250.

11) ITSakura Blog for business and development (2024/06/25):カラーコードの一覧表(色を調べる/色を作る). https://itsakura.com/html-color-codes

12) ぱふぅ家のホームページ(2024/06/25):PHPで補色関係

を色相環に描画. https://www.pahoo.org/e-soul/webtech/phpgd/phpgd-20-01.shtm
13) 梅澤敬, 梅森宮加, 堀口絢奈, 他 (2018): BDシュアパス™法で高度扁平上皮内病変と評価した250例のhyperchromatic crowded cell groupsの出現頻度と細胞診断上の意義. 日臨細胞誌, 57, 13-18.
14) 松井成明, 梶原博, 川島真人, 他 (2015): 子宮体部原発間葉系腫瘍における Phospho-histonH3（PHH3）発現の検討-特に平滑筋肉腫, 癌肉腫について-. 医学検査, 64, 272-280.
15) 伊師華江, 片山一郎, 鈴木友里(2010):有彩色影文字の印象評価に影響を与える測色学的要因. 日本感性工学会論文誌, 10, 35-43.
16) 槙究, 田中奈苗, 留目真由香(2005) :読みやすさと配色の良さの両立-文字色と背景色の組み合わせの評価-. 日本色彩学会誌, 29, 2-13.

要　　旨

パパニコロウ(Pap)染色と免疫細胞化学(ICC)染色の間において, 核分裂像の視認による判別に差があるのは何故なのか, 色素学的な観点から検討を行った。子宮頸部細胞診で扁平上皮癌と診断された10例について, Pap染色とICC染色での, ①核分裂数2個以上/高倍視野における視野数の頻度を算出, ②同部位における核分裂像認識のパターン分類, ③同一部位における核分裂部分とその細胞質部分での色相と明度の比較を検討した。その結果, 検討①では, ICC染色での頻度(69.8±0.3%)がPap染色(2.4±0.04%)よりも有意に高く(p=0.0023), 検討②では, Pap染色において, 4名の判定者全員が認識できなかった核分裂像が93.1%(p=0.0005)にも上ったことより, 核分裂像の視認において, ICC染色がPap染色よりも優れていることが確認できた。さらに, 検討③より, ICC染色ではPap染色よりも, 核分裂部位と細胞質部分の色相差と明度差がそれぞれ大きくコントラストが高いため, 核分裂像が認識しやすいことが判明した。

利　益　相　反

本研究に開示すべき利益相反はない。