



# ONE POINT MEMO No.194

## 臨床検査ひとくちメモ

# Q

*Helicobacter pylori* の感染診断法としての病理組織検査の方法について説明してください。

# A

信州大学医学部保健学科  
検査技術科学専攻

羽山正義  
太田浩良

浮遊、あるいは表層粘液細胞表面に接着して棲息しています。腺窩の深部ほど菌数は減少し、腺頸部より深層にはほとんど見られなくなります<sup>1)</sup>。*H.pylori* の胃内分布は不均一で、腸上皮化生上皮には認められません。

## Ⅱ. *H.pylori* 感染胃粘膜の組織病変

### はじめに

病理組織検査における*Helicobacter pylori* (*H.pylori*) の感染の有無は、*H.pylori* の感染する胃粘膜に特徴的な病理組織所見と菌体を確認することによって判断されます。除菌治療後のように菌数が少ない場合や菌形態が変形してみられる場合には、H&E染色標本のみでの判定は困難で、免疫染色などの特殊染色法による追加検索を必要とします。したがって、病理組織での*H.pylori* 感染診断および除菌判定は、病理医の診断能力と優れた特殊染色技術によるところが大きいと言えます。

### Ⅰ. *H.pylori* の胃粘膜分布

*H.pylori* は表層粘液細胞の分泌する粘液ゲル中に

*H.pylori* 感染胃粘膜の組織像は、表層粘液細胞像の変化と粘膜固有層の炎症性細胞浸潤像に特徴的な所見を示します。*H.pylori* 感染粘膜表面は表層粘液細胞の一つひとつが丸みを帯びて突出（ドーム状の盛り上がり）し、細胞膜は不明瞭となり、細胞の脱落がみられるようになります（写真1）。一方、粘膜固有層では粘膜の深部ではリンパ球の浸潤が主体で、しばしばリンパ濾胞の形成がみられ、表層部では形質細胞を主体として、リンパ球、形質細胞、マクロファージなどの単核球浸潤を伴った慢性胃炎の像を示します（写真2）。慢性胃炎の活動期には、好中球浸潤が腺頸部周囲に多くみられます<sup>2, 3)</sup>。

その他、*H.pylori* 感染胃粘膜に特徴的な病変としては、胃粘膜表層細胞が脱落してびらんが生じたり、増殖細胞の分布する腺頸部（増殖帯）では細胞

増殖能が高められ著しい拡大がみられます。また、十二指腸粘膜においては球部に活動性炎症がみられ、幽門粘膜への化生である胃上皮化生を伴う像がみられることがあります<sup>2)</sup>。

なお、*H.pylori* の感染胃粘膜にみられる病理組織所見の評価については、Updated Sydney System が提唱されています<sup>3)</sup>。

### Ⅲ. 病理組織標本における *H.pylori* の検出方法

#### 1) 材料採取

前述したように *H.pylori* の胃内分布が不均一で、腸上皮化生上皮には認められないので、腸上皮化生の頻度の高い日本人の胃では幽門前庭大弯と胃体上部～中部大弯の2カ所からの採取が推奨されています<sup>4)</sup>。

#### 2) 固定方法

組織材料の固定方法は、通常 10～20% 中性緩衝ホルマリン液（非緩衝でもよい）でもかまいませんが、除菌治療後のように菌数が少ない場合にはカルノア液による固定が推奨されます。カルノア固定を行うと粘液ゲル中に浮遊する菌体がよく保持され、検出精度が向上します<sup>1)</sup>。

#### 3) 染色方法

*H.pylori* は通常の H&E 染色標本でヘマトキシリンに淡染するため、菌数が多い場合には菌体の確認は容易にできますが、除菌治療後の検体のように菌数が少なく菌形態が変化している場合には、特殊染色法による検索が必要となります。一般的に用いられる特殊染色法としては、鍍銀法（Genta 法）、Giemsa 染色、Gimenez 染色（MuMullen 変法）、酵素抗体法などがあります。Giemsa 染色は菌量が少ない検体には適しませんが、スクリーニング的に用いる方法として簡便な方法です。酵素抗体法はこれらの染色法のうち最も感度がよく、他の診断法との一致率も 98% と良好です（表 1）<sup>5)</sup>。

ここでは *H.pylori* の基本的な染色法となる H & E 染色法、Giemsa 染色法、酵素抗体法について紹介しておきます。

#### (1)ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色法

*H.pylori* は通常の H&E 染色でもヘマトキシリンで好塩基に淡染してみえるのですが、ヘマトキシリンの染色時間を延長すると、いっそう濃く染色され

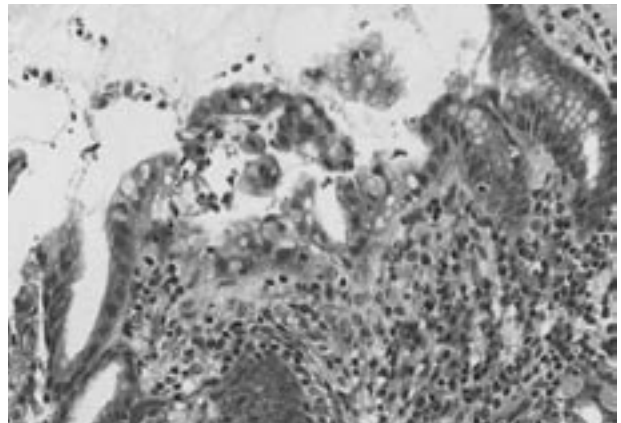


写真1 *H.pylori* 慢性活動性胃炎  
(ホルマリン固定・H&E 染色)

粘膜固有層の表層部では、形質細胞が主体の細胞浸潤がみられる。粘膜表面には、好塩基性に淡染する菌体や脱落過程にある表層粘液細胞の集塊がみられる。

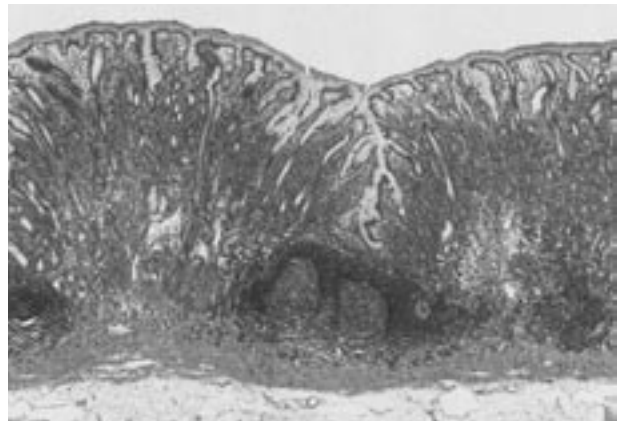


写真2 *H.pylori* 慢性活動性胃炎  
(カルノア固定・H&E 染色)

リンパ濾胞の形成と炎症性細胞浸潤による固有層の拡大がみられる。

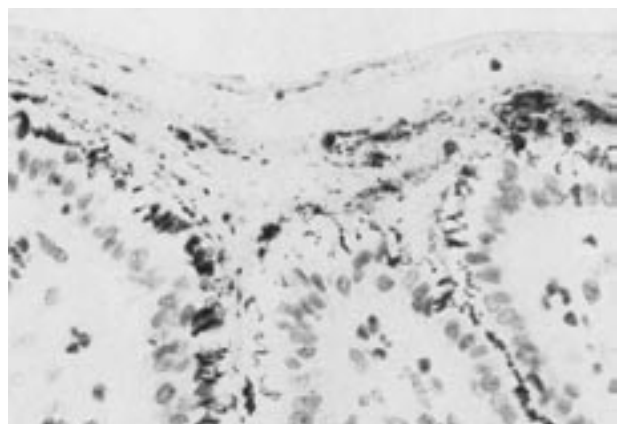


写真3 *H.pylori* 感染胃粘膜  
(カルノア固定・*H.pylori* 免疫染色)

表層粘液細胞の表面に接着および粘液ゲル中に浮遊して存在する *H.pylori* が茶褐色に染色されている。

表1 各種 *H.pylori* 特殊染色法の比較

| 染色法                  | 一致率 (%) | $\kappa$ 係数 | 95%信頼限界     | 評価    |
|----------------------|---------|-------------|-------------|-------|
| 酵素抗体法                | 98      | 0.97        | 0.71 ~ 1.00 | 優れている |
| McMullen 法変法         | 90      | 0.80        | 0.55 ~ 1.00 | 優れている |
| Giemsa 染色法           | 87      | 0.73        | 0.49 ~ 0.98 | 良い    |
| <i>H.pylori</i> 鍍銀染色 | 85      | 0.70        | 0.45 ~ 0.94 | 良い    |

て観察しやすい標本になります。カルノア固定組織の H & E 染色では、通常ホルマリン固定組織よりも赤味の強い標本となるため、切片を脱パラフィン後、数時間から1晩ホルマリン液で再固定します<sup>6)</sup>。

### (2)Giemsa 染色法

【固定方法】10 ~ 20%中性緩衝ホルマリン（非緩衝ホルマリン）液で数時間から1晩固定（1晩以上でもかまわない）する。

【染色方法】①脱パラフィン後、水洗、②2%ギムザ液（メルク社製 Giemsa 液を脱イオン水で50倍希釈）で30分染色、③軽く水洗、④純アルコールで分別・脱水（手早く）、⑤キシレン透徹、封入。

【染色結果】*H.pylori* は紫青色。同系色の背景染色が残るため菌量が少ない検体では菌体の検出は難しい。

### (3)酵素抗体法

【固定方法】通常ホルマリン固定材料でかまわないが、生検組織の除菌判定ではカルノア固定の冷固定時間が推奨される。固定不十分なホルマリン固定材料やカルノア固定材料を用いる場合は、切片を脱パラフィン後ホルマリン液で再固定するとよい<sup>6)</sup>。

【染色方法】切片の厚さはやや厚めの4 ~ 5 $\mu$ mが適している。菌形態をより鮮明に観察するためには間接法が望ましい<sup>6)</sup>。①脱パラフィン後、水洗、②20%中性緩衝ホルマリン液（非緩衝ホルマリン液）で30分再固定する（カルノア固定の場合は必須）、③流水洗5分、④1%過酸化水素水を含むメタノール液30分（DAB発色の場合）、⑤流水洗後、脱イオン水で3回洗う、⑥トリプシン処理：処理条件は、材料、固定方法、トリプシン液の力価によって異なる

るので施設ごとの検討が必要、\*）⑦流水洗5分後、脱イオン水で洗浄、⑧0.85%塩化ナトリウムを含む0.05M トリス・塩酸緩衝液（TBS）、pH7.6、5分、⑨抗*H.pylori* ウサギポリクローナル抗体（DAKO-B0471）、20 ~ 30倍希釈、室温30分反応、⑩TBSで5分、3回以上交換して洗浄（サクラ振動器上で）、⑪HRP標識抗ウサギ免疫グロブリン（DAKO-P0399）、50倍希釈、室温30分反応、⑫TBSで5分、3回以上交換して洗浄（サクラ振動器上で）、⑬DAB発色液に、7 ~ 10分浸漬 [DAB液:DAB (3, 3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) (同仁堂化学)20mg/100ml 0.05M トリス・塩酸緩衝液（塩化ナトリウムを含まない）+過酸化水素水5 $\mu$ l]、⑭流水洗5分、⑮マイヤー・ヘマトキシリン液で核染色30秒、⑯余分なヘマトキシリン液を洗い流してからTBSに浸漬して色出し、5分以上、⑰脱水、透徹、封入。

【染色結果】：菌体は茶褐色に染色され、菌形態（らせん構造、鞭毛）の観察も可能である。(写真3)\*\*)

### おわりに

以上、*H.pylori* 感染胃粘膜にみられる病理組織所見と *H.pylori* の染色手技について解説させていただきました。組織標本での *H.pylori* 感染診断は、病理組織所見に特殊染色を組み合わせて行うため、他の感染診断と同等の精度が期待できます。必要に応じて他の感染診断法を併用することにより、診断はますます正確なものとなります。本法は結果報告までに要する時間、コスト面、検査時期などについて

\*）Trypsin250 (Difco215240) を使用した場合の目安は、ホルマリン固定材料では、生検材料、手術材料とも37 $^{\circ}$ C、45 ~ 50分（恒温槽使用）、カルノア固定後のホルマリン再固定材料では、生検材料で8分前後、手術材料で10 ~ 12分 [トリプシン液の調整：Trypsin250 (Difco215240) (0.2g) + 塩化

カルシウム（無水）(0.1g) + 0.05M トリス・塩酸緩衝液 (TB)、pH7.6 (100ml)]。

\*\*）アルカリフォスファターゼ・ニューフクシン発色系を用いると、ゴミなどの識別が容易になる。

は、他の検査法に比べると不利な面がありますが、病理組織所見が同時に得られるメリットは大きいと言えます。

## 文 献

- 1) Shimizu, T., Akamatsu, T., Ota, H., et al.: Immunohistochemical detection of *Helicobacter pylori* in the surface mucous gel layer and clinicopathological significance. *Helicobacter*. 1: 197-206, 1996.
- 2) Dixon, M. F., Genta, R.M., Yardkey, J.H., Correa, P., and the Participants in the International Workshop on the Histopathology of gastritis, Huston 1994. Classification and grading of gastritis: The updated Sydney System. *Am. J. Surg. Pathol.* 20: 1161-1181, 1996.
- 3) 羽山正義, 清水俊樹, 勝山 努, 他: H. pylori 感染の存在ならびに除菌判定—病理学的診断法—. *Prog. Med.* 15: 1783-1790, 1995.
- 4) Yabki, N., Sasano, H., Tobita, M., et al.: Analysis of cell damage and proliferation in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa from patients with gastric adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 151: 821-829, 1997.
- 5) Rotimi, O., et al.: Histochemical identification of *H.pylori*: comparison of staining method. *J. Clin. Pathol.* 53: 756-759, 2000.
- 6) 羽山正義, 太田浩良, 勝山 努: カルノア固定を用いた *Helicobacter pylori* の免疫組織化学的検索方法。病理と臨床 15: 553-555, 1997.