

Bromchlorphenol Blue を用いた 血液標本の迅速鉄染色法の検討

高宮 脩¹⁾, 松本登貴夫²⁾, 田中恒二³⁾

A Rapid Method of Iron-Staining on Blood and Bone Marrow Smears Using the Dye Bromchlorphenol Blue

A representative evaluation of the iron status of patients with refractory anemia, characterized by ineffective erythropoiesis and abnormal iron metabolism, is possible by detecting bone marrow and blood smears stained for iron. For iron-staining on bone marrow and blood smears, Prussian blue reaction has been conventional. We clinically evaluated the rapid method which Kass et al. had developed the cytochemical iron-staining using bromchlorphenol blue (dibrom-dichlorphenol sulfonphthalein). This new method may be useful for iron-staining on bone marrow and blood smear. It is much more simple and rapid requiring only about one minute. The positive ratio and scoring for this iron-staining on bone marrow and blood smears from patients with various blood diseases correlated well with those for the traditional method by prussian blue reaction. It seemed to be kept strictly pH. 3.2 in the stain solution for the best effect.

Key Words :

iron-staining (鉄染色), bromchlorphenol blue (ブロムクロルフェノールブルー), rapid detection (迅速測定), blood smear (血液標本), bone marrow smear (骨髄標本)

細胞化学的に染色される可染鉄は鉄イオンとなるうる非ヘモグロビン鉄で、骨髄造血能や鉄代謝異常に関わる疾患の病態解析に有用である。

現在、末梢標本ならびに骨髄標本の鉄染色は McFadzean と Davis が開発したペルリ

ン青法¹⁾が汎用されている。一方、Kass らは bromchlorphenol blue (dibromdichlorphenolsulfonphthalein) を用いた迅速鉄染色法 (ブロム青法) を開発した²⁾。

著者らは各種血液疾患10症例の末梢血標本ならびに骨髄標本を用いてブロム青法の有用

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科; Osamu Takamiya, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

2) 国立東静岡病院臨床検査科; Tokio Matsumoto, Division of Clinical Laboratory, National Tosei Hospital

3) 国立大阪病院臨床検査科; Kouji Tanaka, Division of Clinical Laboratory, National Osaka Hospital

性についての評価・検討を行ったので報告する。

材料と方法

材料：急性骨髄性白血病(AML：M1, M6) 2例，慢性骨髄性白血病(CML) 1例，鉄欠乏性貧血 2例，再生不良性貧血 2例，溶血性貧血 1例，骨髄腫 1例および真性多血症 1例の骨髄標本ならびに末梢血標本を用いた。

方法：プロム青法は Kass らの方法²⁾に準拠して，bromchlorphenol blue (東京化成工業) を染色液として用いた。ベルリン青法は McFadzean と Davis の方法¹⁾に準じた。鉄芽球の分類は Dacie らの分類法を一部修正したもの³⁾を用いた。

表1 プロム青法とベルリン青法による骨髄標本の鉄顆粒の分類，スコアーおよび陽性率の比較

| 患者 | 疾患名 | 鉄染色法 | 分類 | | | | スコアー | 陽性率 (%) |
|------|----------|-------|----|----|----|-----|------|---------|
| | | | 0 | I | II | III | | |
| T. K | 骨髄腫 | BCP 法 | 18 | 29 | 50 | 3 | 138 | 82 |
| | | BB 法 | 15 | 29 | 52 | 1 | 139 | 82 |
| H. M | AML (M6) | BCP 法 | 28 | 29 | 31 | 3 | 109 | 72 |
| | | BB 法 | 18 | 34 | 44 | 4 | 134 | 82 |
| K. M | CML | BCP 法 | 47 | 53 | 0 | 0 | 53 | 53 |
| | | BB 法 | 56 | 43 | 1 | 0 | 45 | 44 |
| M. M | 再生不良性貧血 | BCP 法 | 53 | 41 | 4 | 2 | 55 | 47 |
| | | BB 法 | 46 | 34 | 16 | 4 | 78 | 54 |
| M. M | 再生不良性貧血 | BCP 法 | 40 | 51 | 2 | 7 | 76 | 60 |
| | | BB 法 | 38 | 46 | 10 | 6 | 84 | 62 |
| Y. Y | 鉄欠乏性貧血 | BCP 法 | 96 | 4 | 0 | 0 | 4 | 4 |
| | | BB 法 | 91 | 9 | 0 | 0 | 9 | 9 |
| M. K | 鉄欠乏性貧血 | BCP 法 | 90 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | | BB 法 | 88 | 12 | 0 | 0 | 12 | 12 |
| H. I | AML (M1) | BCP 法 | 32 | 68 | 0 | 0 | 68 | 68 |
| | | BB 法 | 40 | 52 | 8 | 8 | 68 | 60 |

プロム青法：BCP 法，ベルリン青法：BB 法

成績

A. 各種金属塩と bromchlorphenol blue との反応

bromchlorphenol blue の10%溶液の5 ml に塩化第1鉄，塩化第2鉄，塩化カルシウム，塩化リチウム，硝酸銀，硫酸銅，硫酸マグネシウム，硫酸アルミニウムの各金属含有物質を100 mg をくわえて放置した。鉄含有

物質のみが微細な褐色沈殿物を生じ，bromchlorphenol blue が鉄と特異的に反応することを確認した。

B. 末梢血標本ならびに骨髄標本の固定

ベルリン青法で可鉄顆粒が多く認められた末梢血標本ならびに骨髄標本の5標本をメタールおよびホルマリンを用いて固定した。80%メタノールで1分間の固定が最も高値の陽性率を得た。

C. 染色液の pH, 濃度および染色時間について

ベルリン青法で既知高値例の AML1 例を用いて染色液の pH, 濃度および染色時間について検討した. bromchlorphenol blue を精製水に溶解後, 0.1N の塩酸と水酸化ナトリウム液で bromchlorphenol blue 溶液の pH を 1 から 8 まで調整した. pH3.2 の染色液が最も良く染まり, ベルリン青法で染色した陽性率とほぼ同率の成績を示した. pH2 より酸性側, pH4.5 よりアルカリ側では鉄顆粒は認められなかった (図 1).

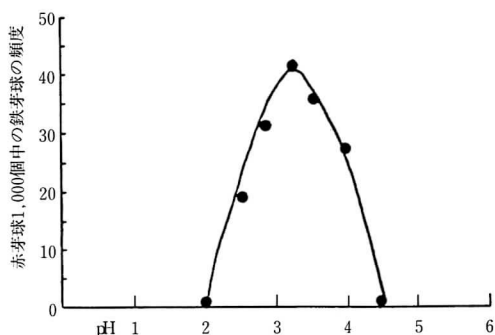


図 1 bromchlorphenol blue 染色液の pH 効果

染色液の濃度は 0.1% が陽性率も高く, 染色性も良好であった. また, 標本は 1 分間で十分に染色された. 作成した染色液は冷所暗室保存にて 3 カ月間は染色性に変化が見られなかった. ブロム青法の染色標本は 1% のサフラン溶液で後染色をすることにより鉄顆粒の鑑別が容易となった. 以下の検討には上記の条件にて染色した. 図 2 の矢印 (↑) に本法で染色した赤芽球に見られた鉄顆粒を示す.

D. 染色の再現性と染色標本の退色性

同一骨髄標本の 10 枚を染色して陽性率を算定したところ, 再現性は CV=4.7% と良好であった. 同じ標本を 3 カ月間保存して染色標

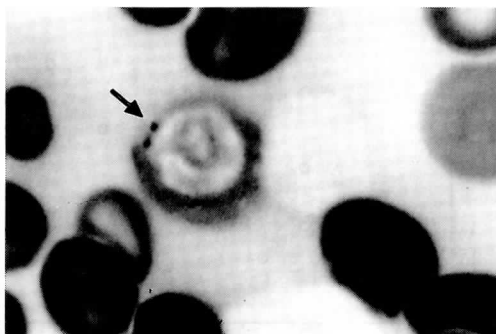


図 2 ブロム青法によって染色した赤芽球中の鉄顆粒. 矢印 (↑) は骨髄標本上の赤芽球中の鉄顆粒を示す.

本の退色性をみたが, 10 日以降に多少の退色はあるも, 陽性率はほとんど変化が見られなかった.

E. 各種血液疾患の末梢血および骨髄標本におけるブロム青法とベルリン青法との比較

骨髄腫 1 例, AML 2 例, CML 1 例, 再生不良性貧血 2 例, 鉄欠乏性貧血 2 例の骨髄標本を用いて, ブロム青法とベルリン青法との成績を比較した. 表 1 に 2 つの方法で分類した成績を示す. ブロム青法は分類成績, スコアおよび陽性率ともにベルリン青法の成績と差異は見られなかった.

上記の症例に加えて, 真性多血症 1 例, 溶血性貧血 1 例の骨髄ならびにそれらの末梢血 59 検体から各々 2 枚の標本を作成し, ブロム青法とベルリン青法を用いて鉄染色した. 両法によって得られた陽性率の成績は良好な相関関係 ($r=0.873$) を示した (図 3).

考察

末梢血および骨髄標本の鉄染色はベルリン青法¹⁾, ターンブル青法⁴⁾, アリザニンレッド S 法⁵⁾などがあるが, 一般的にはベルリン青法がよく用いられている. Kass³⁾はアリザニンレッド S を応用して bromchlorphenol blue

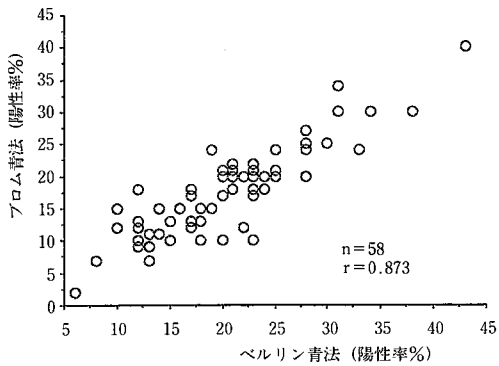


図3 プロム青法とベルリン青法の比較

を用いた迅速鉄染色法を開発した²⁾。彼等はプロム青法は約1分間で鉄顆粒が染色され、核周に瀰漫性に染まるフェリチン鉄が散在顆粒状に局在すると述べた²⁾。著者らも本染色液は鉄イオン含有物質と特異的に反応し、血液標本上では散在顆粒状に染まることを確認した。また、固定ならびに染色は従来のベルリン青法に比べて、簡便迅速であった。しかしながら、染色液のpH領域が狭く、染色溶液のpHを厳密に調整することが必要であると考えられた。血液細胞化学染色は種々の血液疾患の診断や予後の判定に有用な情報をもたらすが、安定した染色成績が要求される。本法の再現性は良好であると言える。染色後の標本も3カ月間は陽性率にほとんど変化は見られなかった。各種血液疾患の骨髓標本を用い

たベルリン青法との比較では分類成績、スコアおよび陽性率ともに互換性があるものと考えられた。また、末梢血標本を含めた陽性率の比較でも良好な相関関係があり、本法は迅速簡便鉄染色法として有用であると考えられた。

文献

- 1)McFadzean AJS and Davis LJ: Iron-stain erythrocytic inclusions with especial reference to acquired hemolytic anemia. Glasgow Med J 28: 237, 1947.
- 2)Kass L and Eickholt MM: Rapid detection of ringed sideroblasts with bromochlorophenol blue. Am J Clin Pathol 70: 738, 1978.
- 3)渡辺清明: 鉄染色, 臨床病理 特集34: 102, 1978.
- 4)Koszewski BJ: Zur Methodik des Hemosiderinnachweisses in den Blut-und Knochenmarksausstrichen. Klin Wschr 30: 926, 1952.
- 5)Kass L: Rapid demonstration of ringed sideroblasts in erythremic myelosis. Arch Pathol 98: 225, 1975.

受付日: 1994年9月22日

受理日: 1994年11月22日