3, 3′, 5, 5′-テトラメチルベンジジンによるペルオキシダーゼ染色法 第3報

小 穴 こず枝*
野 本 昭 三*

はじめに

急性白血病の鑑別診断の上でペルオキシダーゼ（以下PODと略す）染色は，欠くことのできない検査のひとつとして古くから用いられている。このPOD染色には，従来 benzidine が色原体として利用されてきたが，benzidine に発癌性のあることが指摘され，すでに発売および使用が禁止されているため，benzidine に代わるものとして diaminobenzidine[1]，4-chloro-1-naphthol[2]，3-amino-9-ethylcarbazol[3] などの利用が報告されている。

筆者らは，発癌性がないと認められている 3, 3′, 5, 5′-tetramethylbenzidine（以下TMBと略す）[4] をこのPOD染色に応用することを検討し，鮮明な青色陽性顆粒を得ることを認め，すでに報告した[5,6]。しかしその後，染色に用いる試薬のうちリン酸緩衝液を新しい Lot No. のもので調製した時点から，全く陽性顆粒が得られなくなり，また，数施設から筆者らの処方，方法で染色を行っても POD 陽性顆粒が得られないという問い合わせもあって，その原因解明の責任を強く感じさせられることになった。

その検討にあたって，まず，リン酸緩衝液を構成する Na_2HPO_4 と KH_2PO_4 についてそれぞれ製造会社，品位，Lot No. の異なる数種（表1）を用いて 1/15mol/l リン酸緩衝液（pH6.4）を作製し，また 1/15mol/l リン酸緩衝液粉末キット試薬（pH6.4 ヤトロン）より作製した緩衝液も同時に用いて，染色性を比較した結果，KH_2PO_4 の方には関係なく，Na_2HPO_4 を検討の初期に用いた和光特級 Lot No. KIO 1162 を用いて作製したものによってのみ染色され，他の Na_2HPO_4 では全く染色されないことが確認され，原因解明のカギは Lot No. KIO 1162 の Na_2HPO_4 の中にあると断定され，この Na_2HPO_4 中の不純物の分析とその効果に関する実験から原因解明がなされたと同時に，すでに報告したものより更に鮮明な染色性を有する処方を得ることができたので報告する。

方法および材料

I Na_2HPO_4 中の不純物の分析とその POD 染色におよぼす効果の検索

1. 原子吸光分光々度計による金属分析

表1の Na_2HPO_4 のうち，染色性を与えないもの Lot No. DPE 2421（試料A）と染色性を与えるもの Lot No. KIO 1162（試料B）の2種について，それぞれ水に溶解し

* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

表1　Na_2HPO_4 と KH_2PO_4

Na_2HPO_4	規格		Lot No.		備　考
和光	特級	無水	DPE	2421	新規購入
〃	一級	〃	LTG	5221	〃
半井	特級	〃	MIT	8793	〃
〃	一級	〃	〃	1001	〃
メルク		2水塩	0149090		〃
半井	特級	12水塩	MOK	9462	信大医学部生化学教室から
和光	〃	〃	KLP	5039	〃　附属病院中検から
〃	〃	無水	TCE	4546	〃　〃
〃	一級	〃	WAL	0931	〃　〃
〃	特級	〃	OWP	2765	本学
〃	〃	〃	KIO	1162	〃　以前から使用している瓶

KH_2PO_4	規格	Lot No.		備　考
和光	特級	DPE	1417	新規購入
〃	一級	〃	2383	〃
半井	特級	MIP	8443	〃
〃	一級	〃	8791	〃
和光	特級	TCE	5259	本学　以前から使用している瓶

て 30g/l 溶液とし，これを日立518型原子吸光分光々度計で Cu, Fe, Ni, Zn, Cd, Mn, Pb, Cr, Ca, Mg の含有量に差がみられるかどうか比較測定し，有意に高値を示した Cr, Ca, Mg について，Ⅰ－3に示す方法でそれぞれ試薬に添加してその効果をみた。

2.　イオンクロマトグラフによる分析

Ⅰ－1と同様，試料AとBをそれぞれ1g/l 溶液とし，これを横河電機製作所製イオンクロマトアナライザⅠC－100型（プレカラム4.6ϕ×50mm，分解カラム4.6ϕ×250mm，サプレッサ陽イオン交換膜チューブ形，40°C，試料100μl，溶離液30mmol/l Na_2CO_3 2ml/min）で分析し，有意差を示した陰イオン $P_2O_7^{4-}$，PO_3^- について，Ⅰ－3に示す方法でそれぞれ試薬に添加してその効果をみた。

3.　Na_2HPO_4 中不純物の染色性におよぼす効果に関する実験

a. 染色用試薬

① 0.2%TMB 溶液：TMB（半井）0.2gを80%メタノール100ml に溶解した。

② 3% H_2O_2 溶液：約30%H_2O_2 溶液（三菱瓦斯化学）を水で10倍にした。

③ 10% $ZnSO_4$ 溶液：$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$（和光特級）10gを水に溶解し 100ml にした。

④ リン酸緩衝液：Na_2HPO_4（和光特級 Lot No. DPE 2421）と KH_2PO_4（和光特級 Lot No. DPE 1417）より 1/15mol/l, pH 6. 4 を作製した。

b. 不純物として検出された物質の溶液

Cr, Ca, Mg, $P_2O_7^{4-}$, PO_3^- は $K_2Cr_2O_7$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$, HPO_3 をそれぞれ水に溶解して 0.1mol/l 溶液とした。

c．試料

血液塗抹標本は健常人の採血直後の EDTA-2K 加静脈血から作成した。

d．染色操作

原法[5]の染色操作をそのまま用い，bにあげた対象物質の溶液をリン酸緩衝液 10ml に対してそれぞれ1～2滴添加して，染色性の変化（陽性顆粒出現の有無）を検索した。後染色は行わなかった。

II　$P_2O_7^{4-}$ を添加したリン酸緩衝液を用いた染色方法における最適条件の検討

I-3-dの検討結果より $P_2O_7^{4-}$ を添加したリン酸緩衝液を用いる場合の至適染色条件を検討した。

a．試薬

染色用試薬はI-3-a をそのまま，また $P_2O_7^{4-}$ は I-3-b と同様に用い，これにサフラニンO（クロマ）の1％水溶液を後染色用に加えた。

b．試料

I-3-c と同様のものを用いた。

1．$Na_4P_2O_7$ と $ZnSO_4$ の添加量

0.2％TMB 溶液 10ml に3％ H_2O_2 溶液 30μl を加えたものに 10％ $ZnSO_4$ 溶液の添加量を 0.6～1.4ml まで変化させた系と，一方，1/15mol/l リン酸緩衝液（pH 6.4）10ml に対する 0.1mol/l $Na_4P_2O_7$ 溶液の添加量を 0.1～1.0ml まで変化させた系を作り，各系を縦横に組み合わせたシリーズで，I-3-d の染色操作で染色して陽性顆粒の鮮明度を比較した。

2．サフラニンOによる後染色の至適条件

半量法によるPOD染色（II-1の検討より得られた至適処方すなわち，TMB 溶液 10ml に $ZnSO_4$ 溶液 1.0ml と3％H_2O_2 溶液 30μl を加えたものと，リン酸緩衝液 10ml に $Na_4P_2O_7$ 溶液 0.45ml を加えたものを用い，原法の半量による染色，すなわち塗抹標本上に TMB 溶液 0.5ml を滴下し30秒後にリン酸緩衝液 1.0ml を追加，混和して5分間染色する）後，1％サフラニンO水溶液を用いて後染色する場合の条件を下記の4法で比較検討した。

① POD 染色後，水洗，乾燥してからサフラニンO水溶液で1分間染色

② POD 染色後，水洗して直ちにサフラニンO水溶液で1分間染色

③ POD 染色後，標本上の液を捨て，水洗は行わずにサフラニンO水溶液で1分間染色

④ POD 染色後，標本上の液は捨てずにサフラニンO水溶液 0.5ml を追加，混和して1分間染色

3．TMB 溶液への H_2O_2 溶液添加量

$ZnSO_4$ と $Na_4P_2O_7$ の添加量はそれぞれ II-2 と同じ処方にし，0.2％TMB溶液 10ml に対する3％ H_2O_2 溶液添加量を 5，10，20，30μl と変化させ，染色操作は II-2 で検討した半量法で行い，POD 染色後，液を捨てずに，サフラニンO水溶液を追加，混和し，

1分後に水洗し，結果を比較した。

4．TMB 濃度

TMB 濃度を 0.05，0.1，0.15，0.2%と変化させ比較した。H_2O_2 溶液添加量は Ⅱ−3 の検討結果より TMB 溶液 10ml に 20μl とし，その他の条件は Ⅱ−3 と同様に行った。

5．染色時間

Ⅱ−4 の検討結果より 0.15%TMB 溶液を用い，その他の試薬は Ⅱ−4 と同じ処方で，標本上に TMB 溶液 0.5ml 滴下し30秒後にリン酸緩衝液 1.0ml を追加，混和し，その染色時間を 1，2，3，5分間と変化させ，さらにサフラニンO水溶液 0.5ml を加えてからの後染色時間を1，2，3，5分間と変化させ比較した。

6．試薬の保存性

H_2O_2 溶液と $ZnSO_4$ 溶液を添加した TMB 溶液，$Na_4P_2O_7$ 溶液を添加したリン酸緩衝液の室温放置による保存性を検討した。

結　果

Ⅰ　Na_2HPO_4 中の不純物の分析とそのPOD染色におよぼす効果の検索

1．原子吸光分光々度計による金属分析

Cu，Fe，Ni，Zn，Cd，Mn，Pb の7種については両者に差はみられず，Cr，Ca，Mg の3種で試料Bが試料Aより若干含有量が多いことを認めた。

2．イオンクロマトグラフによる分析

図1に示すように，試料B中に試料Aにはみられないピークがみられ，そのリテンションタイムにおける標準物質との対比から $P_2O_7^{4-}$ あるいは PO_3^- と推定された。

3．Na_2HPO_4 中不純物の染色性におよぼす効果に関する実験

リン酸緩衝液に Cr，Ca，Mg を添加した実験からは POD 陽性顆粒は得られなかったが，リン酸緩衝液に $P_2O_7^{4-}$ または PO_3^- を添加した実験では，$P_2O_7^{4-}$ を添加した方にのみ明らかな陽性顆粒が得られ，添加量が1滴より2滴の方が強く染色された。PO_3^- 添加からは全く陽性顆粒は得られなかった。

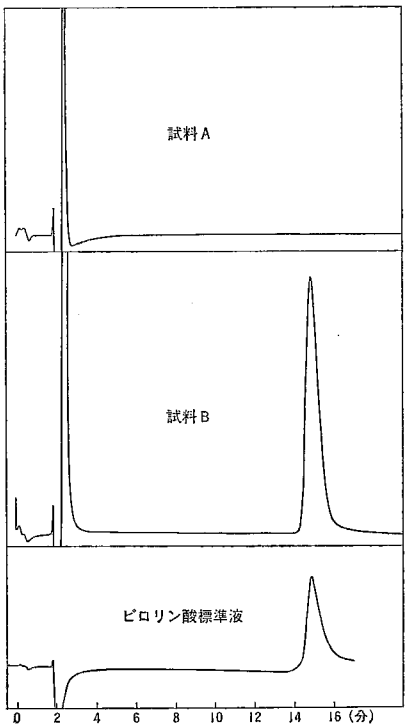

図1　イオンクロマトグラム

Ⅱ　$P_2O_7^{4-}$ を添加したリン酸緩衝液を用いた染色方法における最適条件の検討

1．$Na_4P_2O_7$ と $ZnSO_4$ の添加量

リン酸緩衝液 10ml に対する 0.1mol/l $Na_4P_2O_7$ 溶液の添加量が 0.3～0.5ml の場合は，TMB 溶液 10ml に対する10% $ZnSO_4$ 溶液添加量を 0.8～1.0ml としたときが最適となり，$Na_4P_2O_7$ 溶液添加量を 0.5～0.8ml と増加させた場合は，$ZnSO_4$ 溶液の添加量も1.2～1.4ml と増加させた場合に結晶の析出がなく鮮明な陽性顆粒が得られた。その中から $Na_4P_2O_7$ 溶液添加量0.45ml，$ZnSO_4$ 溶液添加量 1.0ml を最適と判定した。

2．サフラニンOによる後染色の至適条件

①法（水洗，乾燥してから後染色を行う）では若干陽性顆粒の消失傾向がみられたが，他の②，③，④の3法はいずれも良好であった。そのうちから操作のもっとも簡便な④法を最良と判定した。

3．TMB 溶液への H_2O_2 溶液添加量

TMB 溶液 10ml に対し3% H_2O_2 溶液添加量は 10μl から良好で，20，30μl になると強陽性に染った。以後，20μl とすることにした。

4．TMB 濃度

0.1% TMB 溶液は若干弱く，0.15，0.2% で良好であった。以後，0.15% を用いることにした。

5．染色時間

リン酸緩衝液を追加，混和し放置する時間は2分で充分と判定され，サフラニンO水溶液を加えてからの後染色は1分間では核の染まりが若干弱く，2分間行えば充分であった。

6．試薬の保存性

H_2O_2 溶液と $ZnSO_4$ 溶液を添加した TMB 溶液は調製後1ケ月まで使用可能であった。$Na_4P_2O_7$ 溶液を添加したリン酸緩衝液はさらに長期間保存可能であった。

考　察

筆者らが今までに報告してきた TMB を色原体とした白血球の POD 染色法[5,6]は，従来用いられていた手法（試薬と操作）[7,8]にほぼ準拠して，単に色原体を TMB に代えて行ったもので，たまたま検討の初期に使用していた和光特級 Lot No. KIO 1162 の Na_2HPO_4 によってのみ染色され，Lot No. の異なる他の Na_2HPO_4 ではいずれも染色されないという事実が発端となって，TMB-$ZnSO_4$ による POD 染色のシステムには，$P_2O_7^{4-}$ が必須イオンであることが発見されることになったわけであるが，もし，本検討の最初に用いた Na_2HPO_4 の中に $P_2O_7^{4-}$ のコンタミがなかったら，本染色法は誕生しなかったであろうと考えると，たまたまそこに不良試薬のあったことが幸運をもたらしたということになろう。

一方，原因究明のために行った不純物の分析において，イオンクロマトグラフィーが異常物質としての $P_2O_7^{4-}$ の検出に著しい威力を示してくれたわけで，もし，我々にこのイオンクロマトグラフを用いる機会が与えられなかったら，おそらくこの原因物質の検出は極めて困難であったろうと考えられる。

また，結果的には極めて貴重な試薬となった Lot No. KIO 1162 の Na_2HPO_4 (1974年製造) がどのようにして $P_2O_7^{4-}$ を含有するに至ったかその由来についても関心が持たれたが，製造後すでに10年を経て，同一 Lot No. のものを入手することが不可能であったため確かめることはできなかった。

$Na_4P_2O_7$ を添加したリン酸緩衝液を用いた染色方法の検討の中で，良好な染色結果を得る上で $Na_4P_2O_7$ 添加量と TMB 溶液に添加する $ZnSO_4$ 量にほぼ比例的関係が認められたが，$Na_4P_2O_7$ 添加量を多くすると染色能は高まるが陽性細胞上に結晶の析出がみられるようになり，この場合，$ZnSO_4$ 添加量を増してやると結晶析出が抑えられ良好に染色され，さらに $ZnSO_4$ 量を増すと遂には陽性顆粒は得られなくなった。この場合の相互作用の原理については不明であるが，$ZnSO_4$ 以外の金属塩として $Zn(NO_3)_2$, $Mn(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $Ni(NO_3)_2$ などの硝酸塩を用いると $P_2O_7^{4-}$ が存在しなくても陽性顆粒が得られることを，すでにその後の実験で確認しており，今後そのメカニズムについての検討を続ける予定である。

まとめ

TMB を色原体とするPOD染色法の可能性を検討した際に使用した試薬のうち Na_2HPO_4 の中にたまたま混入していたひとつの不純物が TMB-POD 染色法を生み出し，イオンクロマトグラフィーによってその不純物が $P_2O_7^{4-}$ であることを突き止め，この $P_2O_7^{4-}$ を添加した新しい POD 染色用試薬の処方を作ることができた。これによると，極めて簡単に鮮明な青色陽性顆粒を得ることができることを認めた。試薬の処方および染色操作は次の通りである。

a．染色用試薬

①	TMB 溶液	0.15% TMB 80%メタノール溶液	10ml
		10% $ZnSO_4$ 溶液	1.0ml
		3% H_2O_2 溶液	20μl
②	緩衝液	1/15mol/l リン酸緩衝液 (pH6.4)	10ml
		0.1mol/l $Na_4P_2O_7$ 溶液	0.45ml

③ 1%サフラニンO水溶液

b．染色操作

① 塗抹標本上に TMB 溶液 0.5ml 滴下，30秒間放置

② 緩衝液 1.0ml 追加，混和，2～3分間放置

③ さらにサフラニンO水溶液 0.5ml 追加，混和，2分間放置

④ 水洗，乾燥

最後に，イオンクロマトグラフによる分析において，多大な協力をたまわった横河電機製作所科学機器センターの野末，速水の両氏に深甚なる謝意を表します。

参考文献

1) 伊藤恵子，他：Hydroperoxidase-Positive Phi Bodies の有用性について．臨床血液，22（補）：323，1981.

2) 佐野欣一，他：4-クロロ-1-ナフトールによる法．血液と脈管，8：516～519，1977.

3) 秋山淑子，他：カルバゾール誘導体による白血球ペルオキシダーゼ染色．血液と脈管，8：512～515，1977.

4) Holland, V. R., et al : A safer substitute for benzidine in the detection of blood. Tetrahedron, 30 : 3299～3302, 1974.

5) 小穴こず枝：3,3′,5,5′- テトラメチルベンチジンによるペルオキシダーゼ染色法．信州大学医療技術短期大学部紀要，6(2)：1～7，1980.

6) 小穴こず枝，他：3,3′,5,5′- テトラメチルベンチジンによるペルオキシダーゼ染色法第2報．信州大学医療技術短期大学部紀要，7(2)：29～35，1981.

7) Kaplow, L. S. : Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood, 26 : 215～219, 1965.

8) 猪子恵司，他：o-トリジン使用による白血球ペルオキシダーゼ反応について．血液と脈管，8：503～506，1977.

（1984年9月30日　受付）