

## 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

小 穴 こそ枝\*  
老野生 聡 美\*\*

### I はじめに

白血球特殊染色のうちで、ペルオキシダーゼ染色は古くから急性白血病の病型鑑別などに広く用いられてきた。従来、この染色には、操作が簡単で安定した結果が得られるなどの点よりベンチジンが最もよく利用されてきた。しかし、ベンチジンの発癌性が指摘され、わが国でも昭和47年10月以降その製造、使用が禁止された。以来、ベンチジンを用いない種々の方法<sup>1-5)</sup>が報告されてきた。我々は発癌性のないとされる3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(以下TMBと略す)を用いた結果、鮮明なペルオキシダーゼ陽性顆粒を得ることができ、既に報告した(以下原法と略す)<sup>6)</sup>。原法では欠点として陽性細胞上に柱状結晶を形成しやすく、そのため、結晶析出のない良好な染色標本を得るためには、染色液の調整が面倒であった。その後更に検討を行い、後染色に用いていたサフラニンO溶液をあらかじめリン酸緩衝液と混和して染色することにより、結晶析出のない良好な結果を得たのでここに報告する。

### II 方 法

#### 1 試薬

TMBは半井化学薬品製を、過酸化水素水は三菱瓦斯化学製を、サフラニンOはChroma製を、その他の試薬は和光純薬製特級を用いた。

- 1) 染色液：0.2% TMB 80%メタノール液 10ml  
3% 過酸化水素水 1滴  
5% 硫酸亜鉛液 0.4ml
- 2) サフラニンO・緩衝液混合液：1% サフラニンO溶液と 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.4) を 1:3 の割合に混和

なお、本法との比較染色として、2,7-フルオレンジアミンを基質とした武藤化学のPO染色キット(以下FDA法と略す)を用いた。

\* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

\*\* 聖マリアンナ医科大学病院臨床検査部

## 2 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。また、FDA 法との比較染色に際しては健常人の耳朶血と、諸種疾患者の EDTA-2K 加静脈血より塗抹標本を作成した。

## 3 染色方法

- 1) 血液塗抹標本上に染色液 1 ml を滴下し、30秒間放置。
- 2) サフラニン O・緩衝液混合液 2 ml を追加、混和し、5分間放置。
- 3) 流水水洗、乾燥、鏡検。

なお、FDA 法は指定の操作法に従った（表 1）。

表 1 FDA 法染色方法

1	標本上に基質液滴下、30秒間固定 標本面に一様に拡がる程度
2	反応液を基質液の 2 倍量追加し、軽く混和し、10分間放置
3	流水水洗、乾燥
4	ギムザ染色、10~20分間
5	流水水洗、乾燥、鏡検

## 4 検討

### 1) 試薬調整法の検討

染色液の TMB 濃度は、原法での検討結果<sup>6)</sup>より、0.2g/dl として、次の 2 点について検討した。

- ① 染色液は 0.2% TMB 80%メタノール液 10ml に対し、3%過酸化水素水は 1 滴として、5%硫酸亜鉛液添加量を 0~1.0ml と変化させた。
  - ② サフラニン O・緩衝液混合液は、1%サフラニン O 溶液と 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.4) を 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:9 の 5 種類の割合に混和した。
- ①, ②のそれぞれの染色液、混合液を用いて染色したときの染色効果を検討した。

### 2) 染色時間の検討

3, 5, 8, 10, 15分間で比較した。

### 3) 試薬の保存性

染色液、混合液調整後室温保存で、1週間毎に染色し、染色性の差をみた。

### 4) FDA 法との比較

健常人、諸種疾患者各 35 例計 70 例の標本について FDA 法との比較検討を行った。

## 5 染色効果の判定

好中球のみを対象に、青色の顆粒として染色されるものを陽性とし、染色の度合によって強度に染まるものをⅢ型、中等度Ⅱ型、軽度Ⅰ型、全く染色されないものを 0 型と分類し、以下のように陽性率、陽性指数を算出した。

陽性率(%) = 陽性好中球の百分率

陽性指数 = I (出現率) × 1 + II (出現率) × 2 + III (出現率) × 3

また、FDA 法との比較検討においては、白血球100個に対する陽性細胞の比率を求めて、これを染色率とした。

### III 結 果

#### 1) 試薬調整法の検討

表2に示すように、染色液の硫酸亜鉛液添加量は  $0.2\sim 0.6\text{ml}/10\text{ml}$  の範囲において、また混合液は1:2~1:4の割合に混和したときに、陽性率100%、陽性指数も高く、核染

表2 各種サフラニンO・緩衝液混合液および5%硫酸亜鉛液添加による陽性指数の変化

硫酸亜鉛液 ml/10ml	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
混 合 化							
1 : 1	0	196	263	182	96	0	0
1 : 2	0	292	289*	294*	269	82	0
1 : 3	0	290	294*	293*	288*	275	167
1 : 4	0	278	297*	295*	298*	297*	168
1 : 9	0	287	295	296	299	297	297

\* 良好な染色性

表3 5%硫酸亜鉛液添加による染色性の変化  
(サフラニンO溶液:緩衝液=1:3)

硫酸亜鉛液 ml/10ml	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
染 色 度							
III 型	0	91	94	93	89	76	13
II 型	0	8	6	7	10	23	56
I 型	0	1	0	0	1	1	16
O 型	100	0	0	0	0	0	15
陽 性 率(%)	0	100	100	100	100	100	85
陽 性 指 数	0	290	294	293	288	275	167

色も良好であった。表3は1:3の混合液を用いたときの染色性の変化を詳しく示した。硫酸亜鉛液未添加では陽性顆粒は出現しなかった。添加量  $0.1\text{ml}/10\text{ml}$  で鮮明な青色陽性顆粒がみられたが、若干結晶が析出した。更に添加量が多くなると結晶の析出はみられなくなり、 $0.2\sim 0.6\text{ml}/10\text{ml}$  において染色度III型が90%前後を占め陽性指数が高く、核染色も良好であった。 $0.8\text{ml}/10\text{ml}$  以上になると染色性の低下がみられた。

#### 2) 染色時間の検討

3分間で陽性率100%となるが、染色度II型が約15%あり陽性指数が若干低かった。5分間染色で染色度III型が95%以上を占めるようになり、それ以後は変化はみられなかった。ただ、8分間以上となると赤血球の染まりが強くなった。

#### 3) 試薬の保存性

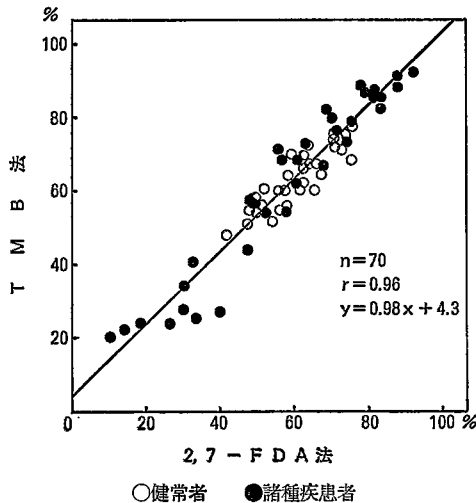


図1 2,7-フルオレンジアミン法との比較

染色液は、調整後次第に黄褐色を呈するようになるが染色効果に変化は認めず、染色液、混合液調整後室温保存で1か月後でも染色性に変化はなかった。なお、TMB液その他試薬は分けて保存すると更に長期間安定であり、TMB液では、1年経った後でも使用可能であった。

#### 4) FDA法との比較

本法とFDA法との比較検討は、図1に示すように相関係数  $r = 0.96$ 、回帰直線  $y = 0.98x + 4.3$  と良好な相関性を示した。

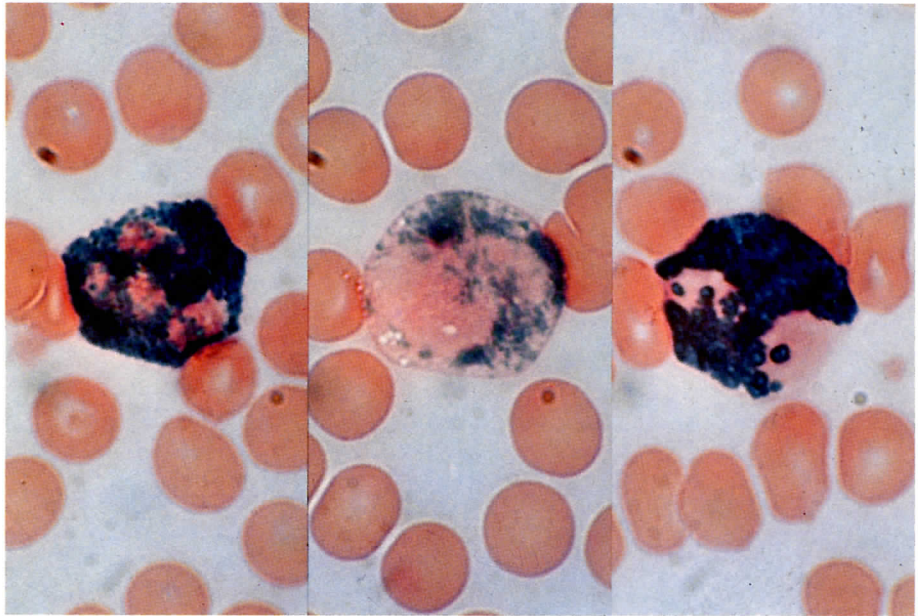
## IV 考 察

TMBを基質とするペルオキシダーゼ染色について、結晶析出のない安定した染色標本を得ることを目的として検討を行った。

Liemらにより3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン・二塩酸塩を用いたペルオキシダーゼ染色<sup>7)</sup>が報告されており、この方法に準じ検討したが、我々が用いたTMBとは性状が違いためか、陽性顆粒は得られなかった。

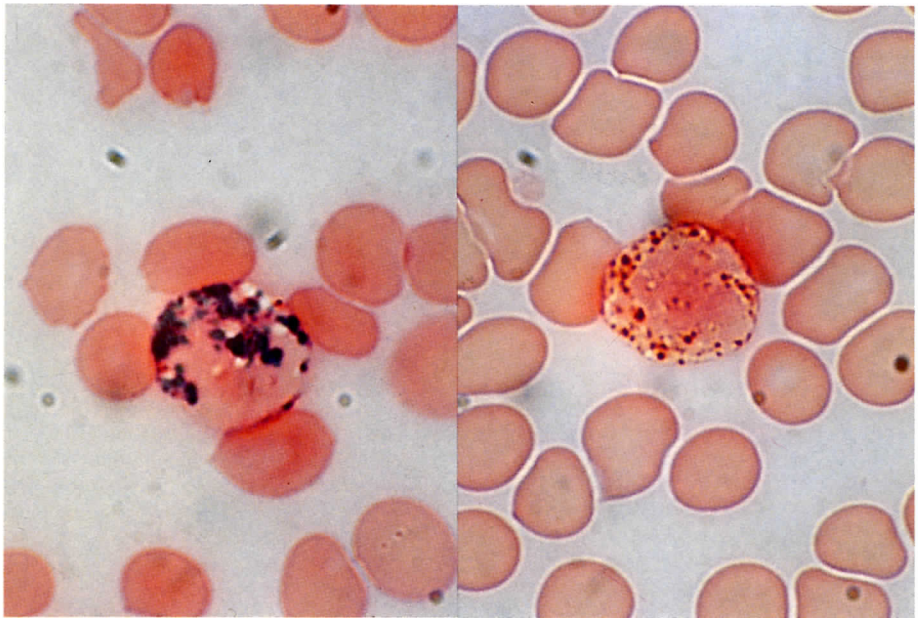
TMBを基質とする染色の明確な原理については不明であるが、Liemらの方法、および我々の検討からも、この反応には反応液が酸性側であること、および金属イオンの存在が必要であると推定される。成績は省略したが、他の金属塩、および緩衝液についても検討したが、良好な結果は得られなかった。鮮明な陽性顆粒を得るには、結晶析出という欠点を有するが、添加する金属塩としては硫酸亜鉛、緩衝液としてはリン酸緩衝液を用いる方法しかないと考えられ、次に染色方法を変えてみた。

核染色に用いていたサフラニンOをリン酸緩衝液に混和し、ペルオキシダーゼ染色と核染色を同時に行ったところ、陽性顆粒は鮮明に染色され、核染色も良好、結晶の析出もみられなくなった。陽性顆粒の鮮明度、および核の染色性などを考慮して、染色液および混合液の調整法を検討した結果、染色液への5%硫酸亜鉛液添加量は微量であれば若干結晶を形成するが、0.2~0.6ml/10mlの範囲において良好な染色が得られた。混合液についてはサフラニンOを直接リン酸緩衝液に溶解した場合、安定した染色結果が得にくく、また、保存性も不良であったため、サフラニンOは1%水溶液として用いた。混合液のサフラニンO溶液の割合が少ないと、陽性顆粒は澄んだ青色となるが結晶が析出しやすくなり、核の染まりも弱くなった。一方、サフラニンO溶液の割合が多くなると、陽性顆粒の色に紅味が重なり、硫酸亜鉛液添加量の至適範囲が狭くなることから、1:2~1:4の割合が適当と思われた。以後、染色液への硫酸亜鉛液添加量は0.4ml/10ml、混合液は1:3の割合



① 好中球                      ② 単球                      ③ 好酸球

図2 本法による各種血球の染色性



① 陽性    ② 陰性

図3 好塩基球の染色性

に混和したものを用いることとした。染色液、および混合液は調整が容易であり、室温保存下で1か月後でも使用可能であった。

図2は本法により染色された各種血球の写真である。陽性細胞は鮮明な青色顆粒状を呈し、単球のような弱陽性細胞においても見落す可能性が少ないと思われた。好塩基球については、図3—②に示すように健常者の血液塗抹標本を検索した限りでは陰性であった。4-クロルー1-ナフトールによる方法<sup>4)</sup>では、好塩基球の陽性率が高いことが注目されているが、比較染色に用いたFDA法においても本法と同様に健常者では陰性を示し、これは染色操作中に流出してしまうことが考えられる。また、図3—①に示すように慢性骨髄性白血病(以下CMLと略す)の血液塗抹標本で陽性を示した例があることより、健常者の好塩基球は活性が弱く、病的な場合、例えばCMLのような場合に活性が強くなるということも考えられる。

ペルオキシダーゼ染色の重要な意義は、急性白血物の病型鑑別にある。成熟血球は普通染色で充分鑑別可能であり、問題となるのは芽球と判定された細胞であり、そのためにも核染色は重要で、ギムザ染色などが用いられることが望ましい。本法ではサフラニンOであるため、細胞鑑別にやや難がある。細胞鑑別を容易にするために、陽性顆粒が黒紫色に変色する点はあるが、本法により染色後更にギムザ染色を重ねることも可能と考えられる。

## V 結 語

TMBによるペルオキシダーゼ染色法の基礎的事項について検討を行った。試薬の調整、染色方法が簡単で、染色時間も短く、鮮明な青色陽性顆粒を得ることができた。本法とFDA法との相関は良好であったが、実用のために今後更に検討が必要と思われる。

## 参 考 文 献

- 1) 重松 武, 他: 2-7 fluorendiamine による血球 peroxidase 染色改良法とその検討. 医学のあゆみ, 99: 570, 1976.
- 2) 稲垣 彬, 他: フルオレン誘導体によるペルオキシダーゼ染色法. 血液と脈管, 8: 507, 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, 1977.
- 4) 佐野欣一, 他: 4-クロルー1-ナフトールによる法. 血液と脈管, 8: 516, 1977.
- 5) 永野貞明, 他:  $\alpha$ -ナフトール・ブリリアントクレシル青を用いた白血球ペルオキシダーゼ染色法の評価. 衛生検査, 28: 558, 1979.
- 6) 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, 1980.
- 7) Liem, H. H., et al: Quantitative determination of hemoglobin and cytochemical staining for peroxidase using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, a safe substitute for benzidine. Anal. Biochem., 98: 388, 1979. (1981年9月30日 受付)