

3, 3', 5, 5'-テトラメチルペンチジンによる ペルオキシダーゼ染色法

小 穴 こそ枝*

I 目 的

白血球のペルオキシダーゼ（以下 POD と略す）の染色法において、ペンチジンに代わる基質として、既にフルオレン誘導体、カルバゾール誘導体、ナフトール誘導体による方法など^{1), 2)} 種々検討がなされている。今回、Standefer & Vanderjagt (1977)^{3), 4)} がヘモグロビンの検出に使用した、発癌性のない3, 3', 5, 5'-テトラメチルペンチジン（以下 TMB と略す）（図1）を血液塗抹標本の POD 染色法に应用することを検討した。

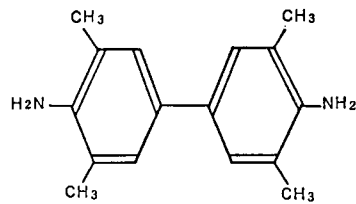


図1 3, 3', 5, 5'-テトラメチルペンチジン

II 方 法

1 試料

健康人の EDTA-2K 加静脈血から作製した新鮮塗抹標本について染色を試みた。

2 試薬

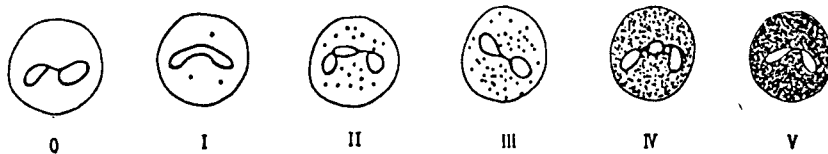
TMB (半井化学薬品株式会社製) はメタノールに溶解後、蒸留水を加え80%メタノール液とし、使用時に過酸化水素水、硫酸亜鉛液を添加して染色液とした。

3 染色法

試料に染色液 1 ml を滴下し、30秒間固定。緩衝液 2 ml を追加、混和後、室温で5分間染色した。後染色はサフラニンO溶液を用いた。

4 判定

染色度の分類には朝長らのアルカリフォスファターゼの分類⁵⁾ を基準とし、これを応用



0型：陽性顆粒なし I型：5個まで II型：容易に数えうる程度、約30個まで
III型：不平等に分布 IV型：平等に分布するが間隙あり V型：平等に密に分布

図2 判定基準

* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

した。好中球のみを対象とし、O～V型に分類し、Ⅲ型以上の染色度を示す好中球の全好中球に対する比率を求め染色率とした。(図2)

Ⅲ 成 積

1 緩衝液および硫酸亜鉛液

TMB 0.25 gをメタノール 80mlに溶解後、蒸留水 20mlを加えた。この溶液 10mlに対し3%過酸化水素水 1滴、10%硫酸亜鉛液を添加して染色液とした。染色には試料 1枚にこの染色液 1mlを用いた。最初に、緩衝液の種類および硫酸亜鉛液添加量の変化による染色性を検討した。表1は染色率の変化である。図3は各緩衝液を用いた場合の良好な染

表1 緩衝液の種類および10%硫酸亜鉛液添加による染色率の変化

硫酸亜鉛液 ml/TMB液10ml	0	0.05	0.1	0.2	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0
1/10M トリス塩酸 pH7.0	0				80	81	80	81	80	82	30	26	0
1/15M リン酸 pH6.6	0				56 (44)	92 (8)	100	29	0				
希釈リン酸 pH6.6	0	68 (10)	81 (9)	44	0								

()内は結晶形成のため判定不能の細胞数

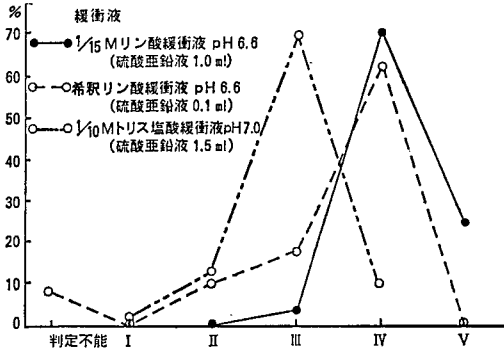


図3 緩衝液の種類による染色度

色条件における染色度である。いずれの緩衝液を用いても硫酸亜鉛液未添加では陽性顆粒の出現はみられなかった。1/10M トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) では、TMB液 10mlに対し10%硫酸亜鉛液 0.25~2.5ml (染色液と緩衝液混和時の最終 pH6.3~6.7) で、針状結晶形成の比較的少ない、鮮明な青色陽性顆粒を得ることができたが、染色度Ⅲ型が約70%を占め、染色率80%とや

や不良であった。硫酸亜鉛液3.0ml以上 (最終 pH6.2以下) では染色率が低下した。1/15M リン酸緩衝液 (pH6.6) を用いた場合、硫酸亜鉛液0.5ml (最終pH6.8) までは細胞上に柱状結晶を生じ、判定不能となる細胞があった。1.0ml (最終pH5.5) では結晶が比較的少なく、緑味青色の陽性顆粒鮮明、染色度はⅣ型70%、Ⅴ型25%と最も高く、染色率100%であった。硫酸亜鉛液1.5ml (最終pH4.5) では染色度、染色率ともに不良となり、2.0ml (最終pH4.2) で染色率0%となった。1/15Mの10倍希釈リン酸緩衝液 (pH6.6) を用いた場合も陽性顆粒の出現のしかたは同様のパターンを示したが、顆粒はやや不鮮明で染色率は低かった。したがって緩衝液としては、結晶形成という難点はあるが、1/15Mリン酸緩

表2 各pHの1/15Mリン酸緩衝液および10%硫酸亜鉛液添加による染色率の変化

硫酸亜鉛液 ml/TMB液10ml	0	0.1	0.2	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
pH5.8	0 (9)	70	89*	54*	0										
6.0	0 (5)	95		99*	96	0									
6.4	0			59 (41)	95* (5)	71 (1)	25	0							
6.6	0			56 (44)	92 (8)	100*	29	0							
6.8	0			0 (100)	94 (6)	91 (9)	100*	65	14	0					
7.2	0					0 (100)	97 (3)	99 (1)	100*	100*	34	40	0		
7.6	0						0 (100)	67 (33)		65 (5)	72* (1)	65*		19	0

() 内は結晶形成のため判定不能の細胞数 * 最終pH5.0~6.0

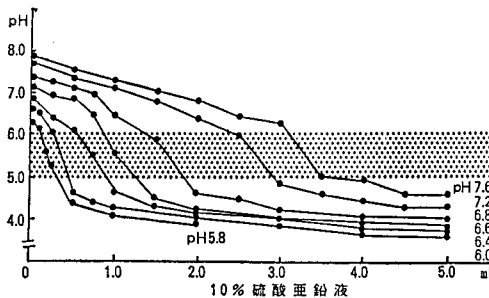


図4 染色液と各pHの1/15Mリン酸緩衝液混和時の最終pHの変化

衝液が最適と思われた。

次に各種pH (5.8, 6.0, 6.4, 6.6, 6.8, 7.2, 7.6)の1/15Mリン酸緩衝液を用いそれぞれの硫酸亜鉛液添加量の変化による染色性を検討した。表2は染色率の変化である。図4は10%硫酸亜鉛液添加による染色液と緩衝液混和時の最終pHの変化である。全ての緩衝液で硫酸亜鉛液添加量の違いはあるが、最終pH6.0以上では細胞上に結晶

を生じ、そのために判定不能となる細胞もあった。添加量を増し最終pH5.0~6.0の範囲内では結晶形成は比較的少なく、染色率は高かった。特にpH6.0~7.2のリン酸緩衝液の場合、染色率95%以上、顆粒は鮮明であった。pH5.8および7.6のリン酸緩衝液は染色率が低く、顆粒不鮮明であった。更に硫酸亜鉛液添加量を多くし最終pHが低下すると染色率は低下し、やがて0%となった。したがって、緩衝液としては1/15Mリン酸緩衝液(pH6.0~7.2)を用い、染色液と緩衝液混和時の最終pH5.0~6.0に達するように10%硫酸亜鉛液を添加すると良好な染色が得られた。以後、緩衝液はpH6.6とし、TMB液10mlに対する10%硫酸亜鉛液添加量は1.0mlとした。

2 TMB濃度

TMB 0.02~0.3g/dlの種々の濃度の染色液について検討した。0.02g/dlでは陽性顆粒はみられず、0.1g/dlで緑味青色陽性顆粒が出現、0.15g/dlで染色率100%となるが染色度はやや不良であった。0.2~0.3g/dlで染色度は良好となった。したがって、TMB至適濃度は0.2~0.3g/dlであり、以後0.2g/dlの溶液を用いた。

3 過酸化水素濃度

TMB液10mlに対し、3%過酸化水素水を添加して検討を行った。その結果、0.02～0.1mlで染色率、染色度ともに良好であり、0.2mlで軽度であるが標本に青染傾向がみられ、更に高濃度になると顆粒不鮮明となった。したがって、以後、TMB液10mlに対し3%過酸化水素水1滴(0.04ml)とした。

4 染色時間

上記の染色液を用い0.5～15分間で比較した。時間と共に染色率は高くなり、3分間で98%、5分間で100%となり、それ以後は変化がみられないので、染色時間は5分位が適当と思われた。

5 後染色

試料を5分間POD染色後、1%サフラニンO溶液を用いて核染色を行った。水洗、乾燥後、核染色を行うと時間の経過と共に染色率が若干低下する傾向がみられたので、染色液を捨てた後、水洗せずにサフラニンO溶液で染色したところ染色率、染色度に変化はなく、また細胞上に生じていた柱状結晶は消失傾向を示した。染色時間は1分間で充分であった。

また、後染色を含めて全ての染色過程で、長時間水染を行った場合には陽性顆粒の退色がみられた。

今回はサフラニンO溶液を用いたが細胞鑑別が難しい点がある。そこでギムザ染色を施してみたところ、陽性顆粒は緑味青色から黒紫色に変わるが、細胞鑑別は容易となった。この場合、POD染色後の水洗の有無にかかわらず陽性顆粒は鮮明であるが、水洗を行ったほうが後染色はきれいであった。

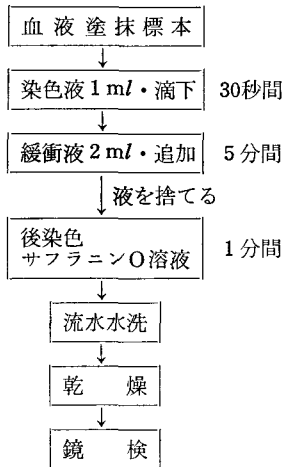


図5 染色法

6 染色法

上記の結果に基づき、TMBを用いるPOD染色法は図5の如く行った。緩衝液は1/15Mリン酸緩衝液(pH6.6)を用い、染色液は以下の如く調整した。

0.2% TMB	80%メタノール液	10ml
溶解後	TMB	0.2g
	メタノール	80ml
	蒸留水	20ml
3%過酸化水素水		1滴
10%硫酸亜鉛液		1ml

使用時に混合調整

染色液と1/15Mリン酸緩衝液(pH6.6)混和時の最終pH6.0になるように硫酸亜鉛液で調整。

7 試薬の安定性

TMB液、硫酸亜鉛液はそれぞれ長期間保存可能である。3%過酸化水素水は冷暗所であればかなり保存が効くが、染色毎に新調することが望ましいと思う。染色液は使用時混

合調整を原則とするが、室温保存で約10日まで良好な染色が得られた。

8 染色標本の保存性

本法による染色標本では、ビオライト封入により陽性顆粒の退色がみられたが、油浸オイルを用いた場合、3か月後でも顆粒は鮮明に残存しており、キシロールで清拭を行っても1か月後、染色率数%程度の低下であった。

9 POD反応の証明

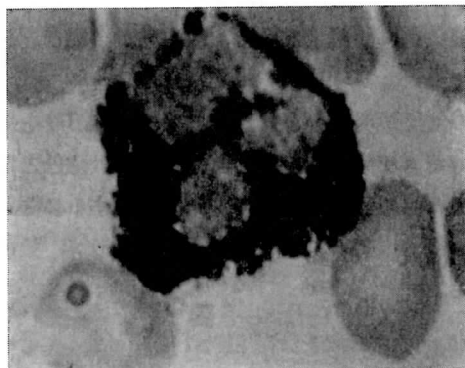
TMBによるPOD染色法が真のPOD反応によるものであるかが問題である。その

ために以下の実験を行った。仮性PODは耐熱性であり180°C、30分加熱した時でも完全に保存されるが、真のPODは全て120°Cで破壊される点で区別できる。そこで、標本を120°Cで処理したところ陽性顆粒の出現はみられなかった。また、POD

表3 ペルオキシダーゼ反応の証明

染 色 液	染 色
TMB 染色液	+
+KCN (10^{-2} M)	-
+NaN ₃ (10^{-2} M)	-
標本を120°C 20分加熱	-

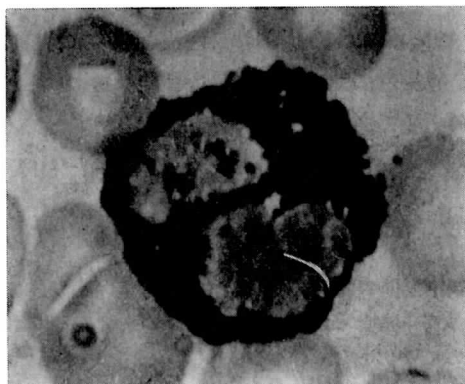
阻害剤である KCN, NaN₃ を染色液に加えたところ同様な結果が得られ、TMBによる染色がPOD反応によるものであることを示した。



①



②



③

写真1 POD 強陽性の好中球

写真2 POD 弱陽性の単球

写真3 POD 強陽性の好酸球

IV 考 察

TMB を基質とする POD 染色は、染色液に硫酸亜鉛を添加することにより緑味青色陽性顆粒を得ることができた。この反応の明確な原理については不明であるが、他の基質による POD 染色法、たとえば重松らの 2,7-FDA を用いた POD 染色改良法⁶⁾と同様な反応によるものと考えられる。

著者の方法によれば、陽性顆粒が鮮明であり、キシロールを使用しても長期間の保存および検索に十分耐えうる特徴を認めたが、欠点として柱状結晶を形成しやすく、特に染色液とリン酸緩衝液との混和時の最終 pH6.0 以上で多数出現した。しかし最終 pH6.0~5.0 の範囲内では比較的少なくなり、更に pH5.0 以下ではほとんど出現しなくなるが、染色率の低下がみられた。またこの形成された結晶は、サフラニン O 溶液による後染色の段階で消失する傾向を示した。著者の方法による染色では、最終 pH5.0~6.0 で良好な染色標本が得られ、中でも最終 pH6.0 近くが最も良好と思われた。その際形成された柱状結晶は、前述した如く後染色の段階で消失する傾向にあり、鏡検上ほとんど障害を感じなかった。また全ての染色過程で水洗を長時間行った場合、退色がみられたことより、各段階での水洗はできるだけ短時間に止めるべきであり、その他にも高濃度のアルコールによっても退色がみられ、したがってライト液等を後染色に使用する場合には注意が必要と思われる。

後染色については、陽性顆粒の緑味青色との対比が明らかとなるサフラニン O 溶液を用いた場合には細胞鑑別に難しい点があり、一方ギムザ染色を施すと陽性顆粒は黒紫色となるが、細胞鑑別は容易となる。後染色については他の色素についても今後検討する必要がある。ピオライト封入時における退色の原因についても現段階では不明であるが、染色標本の保存性と関連して今後検討の必要がある。

V 結 語

発癌性のない 3,3',5,5'-テトラメチルベンチジンによる POD 染色法を試み、鮮明な緑味青色陽性顆粒を得ることができた。しかし後染色について、あるいは結晶を形成しやすいなど問題点を有するため、今後更に検討が必要である。

参 考 文 献

- 1) 新谷和夫：新しいペルオキシダーゼ染色法。臨床検査，21：700，1977.
- 2) 永野貞明，他：4 アミノアンチピリンと α -ナフトールを用いた白血球のペルオキシダーゼ染色法。臨床病理，26：615，1978.
- 3) Standefer JC and Vanderjagt D: Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. Clin Chem, 23: 749, 1977.

- 4) Lijana RC and Williams MC : Tetramethylbenzidine—a substitute for benzidine in hemoglobin analysis. J Lab Clin Med, 94 : 266, 1979.
- 5) 朝長正允, 他 : 白血球 Alkaline Phosphatase の研究, I. Naphthol AS—MX Phosphate を基質とする白血球 Alkaline Phosphatase の証明法. 日血会誌, 26 : 179, 1963.
- 6) 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.

(1980年9月30日 受付)