4-クロロ-1-ナフトールによる法*

佐野 欣一** 新谷 和夫**

Key words: cytochemistry, methodology, comparison with
Sato-Sekiya and McJunkin method

はじめに

最近、フルオレン誘導体¹⁾、カルバゾール誘導体²⁾による新しい方法が報告されているが、著者らはさらに、テクニコン社の全自動血液像分析装置“ヘマログD”のペルオキシダーゼ反応に用いられている4-クロロ-1-ナフトール³⁾が、血液塗抹標本におけるペルオキシダーゼ染色に応用できるか否か検討を行ったのでその結果を報告する。

I. 実験材料

4-クロロ-1-ナフトールは東京化成販売株式会社から購入した。

塗抹標本は検査室に提出された骨髓血、およびEDTA-2K加静脈血から作製し実験に供した。

II. 実験方法

4-クロロ-1-ナフトールによる方法はMcJunkin法を基本として検討を行った。

佐藤・関谷法、McJunkin法⁴⁾は常法に準じ実施した。

III. 実験成績

1. 染色液の作製

80%エチルアルコール100mlを溶媒とし、これに4-クロロ-1-ナフトールを0.002より1.0gまで適当な間隔でそれぞれ溶解し、さらに新鮮な局方過酸化水素水8滴を加えた種々の濃度の

染色液で染色を行い、好中球と単球の染色状態をみると、添加量が0.002~0.004gでは陽性の細胞はみられず、0.005~0.06gでは好中球と単球の一部は弱陽性を示し、黒褐色の顆粒が出現した。0.07~1.0gでは好中球は強陽性で、単球の多くは弱陽性~陽性を示したが、陽性顆粒の色、数、大きさなどとの間には明らかな差はみられなかった。しかし0.5g以上では後染色が不良であった。したがって4-クロロ-1-ナフトール濃度は、0.07~0.4g/dlの範囲が適当であり、以後0.2g/dlの染色液を用いることとした。

なお80%メチルアルコールは、4-クロロ-1-ナフトールを加えると白濁し沈澱を生ずるので使用できなかった。

2. 過酸化水素濃度

染色液100mlに対し新鮮な局方過酸化水素水を駒込ピペットにて1~10滴加えて検討を行なった。その結果、添加量1滴ではまったく反応がみられないが、2滴では十分な反応が出現し、以後7滴まではほとんど差がみられなかった。しかし8滴以上加えると軽度ながら、標本の青染傾向がみられ、陽性顆粒もやや不鮮明となるので、酸素供与体としての過酸化水素水の添加量は、染色液100mlに対し、数滴が適当と思われた。

3. pHの影響

蒸溜水の代わりに、反応系に種々のpHのリン酸緩衝液を染色液の2倍量加えpHの変化による影響をみると、pH 6.0以下、および7.0以

* Peroxidase stain, 4-chloro-1-naphthol method.

** 昭和大学病院中央研究検査所〔〒142 東京都品川区旗の台1-5-8〕, Kinichi SANO: Central Clinical Laboratory, Showa University Hospital, Tokyo, Japan.

*** 関東通信病院血液学検査科〔〒141 東京都品川区東五反田5-9-22〕, Kazuo NIITANI: Hematology Laboratory, Kanto Teishin Hospital, Tokyo, Japan.

※染色液の調整

80%エチルアルコール100mlに4-クロロ-1-ナフトール0.2gを溶かし、新鮮な局方過酸化水素数滴を加える。

図1 ペルオキシダーゼ染色法
(4-クロロ-1ナフトール法)

上では陽性顆粒が不鮮明で胞体内に局限する傾向がみられ、不適当と思われた。しかし、6.2~6.8の範囲では、陽性顆粒が鮮明で、後染色も良好であった。したがって普通染色に用いられる便利さもあり、染色時、反応系にpH 6.4のリン酸緩衝液を添加すると良いと考える。

4. 染色時間

上記の染色液を用い、好中球の染色状態を15秒、30秒、1分、2分、3分、5分および10分で比較すると、15秒で弱陽性の顆粒が出現し、30秒~3分までは徐々に発色が増強するがそれ以後はあまり変化がみられなかった。よって染色時間は5分位で良いと思われる。しかし、有核細胞数、脂肪滴の多い骨髓標本などでは染まり難いことがあるのでその場合は少し長めに染色すると良い。

5. 後染色

ライト、ギムザ、サフラニンO、ケルンエイトロート液で染色を行い比較した。その結果何れの染色液を用いても、陽性顆粒と核のコントラストも良く使用できる。しかしライトまたはギムザ染色を施した場合の方が、陽性顆粒が

表1 染色液の保存と陽性率

染色液		症例										平均 値
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
使用時作製	陽性 率%	50	74	55	97	56	79	76	80	82	71	72
4℃50日保存	陽性 率%	59	64	54	94	51	78	86	85	88	71	73

* 白血球100個につき検索

表2 単球についての陽性率の比較

方法	4-クロロ-1-ナフトール法		McJunkin 法		佐藤・関谷法	
	判定%	判定%	判定%	判定%	判定%	判定%
症例	+	-	+	-	+	-
1	86	14	86	14	80	20
2	82	18	90	10	94	6
3	96	4	92	8	96	4
4	90	10	88	12	92	8
5	92	8	98	2	92	8
6	98	2	92	8	96	4
7	92	8	86	14	84	16
8	96	4	94	6	88	12
9	98	2	96	4	96	4
10	94	6	92	8	92	8
平均値	92	8	91	9	91	9

* 各症例の単球50個につき検索

より強調され、細胞の同定が容易な点から最も良いと考える。

6. 染色方法

上記の結果に基づき、最終的に4-クロロ-1-ナフトールを用いるペルオキシダーゼ染色法は図1の如く行った。すなわち、乾燥血液・骨髓塗抹標本に染色液を標本面に一様に拡がる程度滴下し、30秒間固定する。次いでpH 6.4のリン酸緩衝液を染色液の2倍量追加し、軽く混和後5分間放置し、その後流水水洗し、直ちに、あるいは乾燥させてから、ライトまたはギムザ染色を10~15分間行ない流水水洗後乾燥、鏡検する。

以下、本染色を施した標本について検討を加えた。

7. 標本の保存について

本法による染色標本は、キシロールや油浸オイルにより陽性顆粒の退色がおこるので注意が必要である。しかし油浸オイルの場合にはキシロールで清拭を行なわなければ約1カ月は保存可能である。また標本の長期保存が必要な場合には、陽性顆粒と核のコントラストはやや劣る

図2 佐藤関谷法との相関（陽性率）

図3 Mc Junkin 法との相関（陽性率）

表3 骨髓芽球についての陽性率の比較

方法	判定%	
	+	-
4-クロロ-1-ナフトール法	96.6	3.4
McJunkin 法	97.1	2.9
佐藤・関谷法	96.2	3.8

* 症例：AML（1,000個につき検索）

表4 好塩基球についての陽性率の比較

方法	症例		判定%	
	1	2	+	-
4-クロロ-1-ナフトール法	82	18	30	70
McJunkin 法	64	36	13	87
佐藤・関谷法	55	45	11	89

* 症例1：CML（200個につき検索）

2：〃（100〃）

が、マイヤーのヘマトキシリンで後染色を行い、グリセリンゼラチンで封入すれば良い結果がえられる。

8. 染色液の保存性

使用時作製したものと、褐色ビンに入れ、4℃に50日間保存した試薬で染色を行い、10例の標本の白血球100個についての陽性率を比較すると、平均値が72％、73％とまったく差が認められず、染色液はかなり安定であることがわかった（表1）。

9. 佐藤・関谷法、McJunkin 法との比較

諸種疾患50例の白血球100個についての陽性率の相関をみると、多少のバラツキはあるが、佐藤・関谷法との相関係数は0.85で、McJunkin 法とも0.84と良好な相関がみられた（図2、3）。また10例の標本の単球について50個数え、その陽性率を比較しても、平均値がそれぞれ、92、91、91％と良く一致した値が得られた（表2）。

次にペルオキシダーゼ染色陽性を示した急性骨髄性白血病症例の骨髓芽球を各法それぞれ、1,000個ずつ数え、その陽性率を比較しても同

様な値がえられ、病的細胞に関しても、ほぼ満足できる結果であった（表3）。

さらに慢性骨髄性白血病2例の好塩基球について、各法とも症例1は200、症例2は100個を数え、その陽性率を比較すると、本法による値は2例とも、佐藤・関谷法、McJunkin 法の値よりも明らかに高値を示した（表4）。

IV. 考 按

従来、広く行われていた佐藤・関谷法、McJunkin 法と比較してみると、本法は陽性顆粒が大きく、しかも鮮明な黒褐色を示し、McJunkin 法の場合の如く微細な顆粒の判定に困難を感じることはない。したがって初心者でも弱陽性細胞を見落す可能性が少い。また佐藤・関谷法よりも核の判別に優れている。これらの点は著者らの成績のうち慢性骨髄性白血病2例の好塩基球についての陽性率の比較で本法による値が、佐藤・関谷法ならびに McJunkin 法

の値よりも高値を示したことからもうかがわれる。

次に本法における染色標本はキシロールや油浸オイルにより陽性顆粒が退色する欠点があるが、油浸オイルの場合には、オイルを塗布した状態で約1カ月は保存可能である。また長期保存が必要な場合にはノーカバーレンズを用いて鏡検するか、標本2枚を染色し一方を保存するしか現在のところ良い方法はない。いずれにしても顆粒と普通染色を施した場合の後染色の退色のおこらない適当な封入剤の開発が望まれるところである。

次に本法が真のペルオキシダーゼ反応であるかどうかの問題であるが、仮性ペルオキシダーゼ⁵⁾は一般に活性が低く、耐熱性であり、180°C、30分加熱後も完全に保存されるが、真のペルオキシダーゼは120°Cで処理すると不活化されるという。著者らの検討では、成績は省略したが、120°Cで処理すると活性が完全に阻害され、ペルオキシダーゼ阻害剤であるKCNでも同様の成績がえられ、本法が真のペルオキシダーゼ反応であることが示された。

結 論

4-クロロ-1-ナフトールによるペルオキシダーゼ染色法の術式制定に関する実験成績と臨床

材料に関する成績の一部を報告した。

本法は試薬がやや高価ではあるが、試薬の調整、染色手技がきわめて簡単であるばかりでなく、染色液も安定でかつ従来の方法とも良く一致した値を示し、特に弱陽性細胞の同定が容易であるなど長所も多く、日常検査におけるペルオキシダーゼ染色法として推奨できるものである。

稿を終わるに臨み、ご校えついただいた石井 暢教授に感謝します。

文 献

- 1) 大川欣一, 稲垣 杉, 菅原 耕: 2,7-Fluorenediamine (2, 7-diaminofluorene) および 2, 5-fluorenediamine (2, 5-diaminofluorene) による白血球顆粒ペルオキシダーゼ活性の新しい組織化学的証明法, 医学のあゆみ, **87**; 617~618, 1973.
- 2) 後藤 清, 他: 3-Amino-9-Ethylcarbazole による白血球ペルオキシダーゼ染色の検討, 衛生検査, **25**; 365, 1976.
- 3) Mansberg, H. P. et al.: The Hemalog D white cell differential system, J. Histochem. & Cytochem., **22**; 711~724, 1974.
- 4) 金井 泉: 臨床検査法提要, 金原出版.
- 5) 小田琢三: 細胞化学 B, 血球の酸化還元酵素の組織化学と細胞化学, 日本血液学全書, 6-I, 術式, 226, 丸善, 東京.

カルバズール誘導体による白血球ペルオキシダーゼ染色

(p. 512, 秋山淑子, 他)

写真1 Kaplow 変法による染色

写真2 ヘマトキシリン・ギムザ染色（後染色）
幼若細胞（ペルオキシダーゼ陰性）と
好中球が認められる。

写真3 ヘマトキシリン・ギムザ染色（後染色）
幼若細胞（ペルオキシダーゼ陰性）と
好中球が認められる。

4-クロロ-1-ナフトールによる法

(p. 516, 佐野欣一, 他)

写真1 ペルオキシダーゼ染色弱陽性の単球

写真2 ペルオキシダーゼ染色陽性の骨髓芽球と陰性のリンパ球

写真1 |
写真2 | 写真3

写真3 ペルオキシダーゼ染色陽性の好塩基球（右）と好中球