

サル白血球の分類と細胞化学による同定

—血液塗抹標本による観察—

佐藤 晶子

筑波大学医学系技術室

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

サル(カニクイザル)の末梢血液塗抹標本を作製し、血液細胞の同定や鑑別に活用されている普通染色(ロマノフスキー染色)および3種類の特殊染色(ペルオキシダーゼ染色、ナフトール AS-D クロロアセテート エステラーゼ染色、 α ナフチルブチレート エステラーゼ染色)を行い、カニクイザル白血球の染色性およびその染色法の有用性について検討をした。

普通染色標本におけるサル末梢血液の染色性は良好であり、白血球の鑑別に有用であった。

また、特殊染色では、ペルオキシダーゼ反応は、ヒト白血球と類似の染色性を示したが、エステラーゼ染色では一部違った反応所見が認められ、細胞の同定の際には、これらのことを考慮しながら有用すべきと思われた。

キーワード: サル、白血球、ペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ染色

1. はじめに

今回、カニクイザル血液の貴重な検体を測定する機会に恵まれ、ヒト血液細胞の形態学的観察や血球の鑑別に用いられている普通染色および特殊染色の手法を用いて、カニクイザル白血球の染色性やその染色法の有用性について検討を行った。

通常、普通染色は、ライト染色液、ギムザ染色液、メイグリュンワルド染色液などの染色液を用いた単染色あるいはライトーギムザ染色、メイグリュンワルドーギムザ染色(パッヘンハイム染色)などのような二重染色がある。また、普通染色は、ロマノフスキー染色と総称されるように、染色液に混在している塩基性色素(メチレン青、アズール)、酸性色素(エオジン)、メチレンアズールによるロマノフスキー効果等により、各血球の核や顆粒や細胞質が多彩な固有の色調に染色され、血球の鑑別に広く用いられている^[1]。現在は、これらの二重染色法が推奨されているが、ライト染色法単染でも末梢血球の観察には十分に優れていると思われるため、今回は、ライト染色標本を用いて白血球の観察および白血球比率の検討を試みた。

特殊染色では、各血球の酵素や非酵素物質を検出するために、各種の細胞化学染色法がある^[2]。酵素系の検出に、ミエロペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ染色、アルカリホスファターゼ染色、酸性ホスファターゼ染色などが用いられ、また非酵素物質では、PAS 染色、鉄染色、脂肪染色、トルイジンブルー染色などが行われて血液細胞の同定、疾患や病態鑑別に活用されている。

今回は、顆粒球・単球系細胞とリンパ球系細胞および他の血球系の鑑別に威力を発揮しているペルオキシダーゼ染色^[2,3,4]と、特に単球系細胞と顆粒球系細胞の識別に活用されているエステラーゼ染色の2つの染色法^[2,3,4,5]を用いて、各血球の染色性を比較しながら有用性について検討をした。

2. 対象および方法

EDTA 採血液を用いて、ウェッジ法でカニクイザル末梢血液塗抹標本を作成し、普通染色および特殊染色を行った。

普通染色はライト染色を行い、酵素活性を検討する特殊染色は、塗抹標本作成後シリカゲルを入れた容器に密封させて速やかに冷凍保存をした。染色時に、冷風で解凍させ、ペルオキシダーゼ染色^[3]、ナフトール AS-D クロロアセテート エステラーゼ染色^[4](クロロアセテート Es 染色)、 α ナフチルブチレート エステラーゼ染色^[5](ブチレート Es 染色)を行った。

2.1 普通染色 (ライト染色法)

- 1、血液塗抹標本上にライト染色液(武藤化学株式会社) 1.5ml を滴下して 2 分間反応させ、固定染色をする。
- 2、その標本上に、リン酸緩衝液(1/150 M, pH 6.5) 2 ml を追加し、室温で 5 分間染色をする。
- 3、標本を流水で水洗し、乾燥させ、観察用標本とした。

2.2 ペルオキシダーゼ染色 (2,7- fluorene-diamine 法)

- 1、血液塗抹標本上に基質液を滴下し、30 秒間反応させる。

基質液(4 °C 保存) :

- 80 %メチルアルコール 25 ml
- 2,7-fluorenediamine 5 mg 溶解後に
- H₂O₂ 2 滴

- 2、その標本上に、基質液の 2 倍量のトリス塩酸緩衝液(pH 8.0~9.0)を追加し、室温で 10 分間反応させる。
- 3、標本を流水で水洗する。

- 4、ギムザ希釈液 3 ml を標本上に滴下し 10 分間染色をする。

ギムザ希釈液：

- ・ギムザ染色液(武藤化学株式会社) 5 滴
- ・リン酸緩衝液(1/150M, pH 6.5) 3 ml

- 5、標本を流水水洗して、乾燥させ、観察用標本とした。

2.3 ナフトール AS-D クロロアセテート エステラーゼ染色 (Yam 法)

- 1、血液塗抹標本を冷緩衝ホルマリン・アセトン液で 30 秒間固定し、蒸留水で 3 回洗い、乾燥する。

緩衝ホルマリン・アセトン液(pH 6.6, 4~10 °C)：

- ・Na₂HPO₄ 20 mg
- ・KH₂PO₄ 100 mg
- ・蒸留水 30 ml
- ・アセトン 45 ml
- ・37 %ホルムアルデヒド 25 ml

- 2、反応液 A 液の 2 溶液を 25 μl ずつ取り、振盪混和し、1 分後に全量 50 μl を B 液緩衝液に加えて、さらに C 液を追加して混和する。濾過をして標本に滴下し、室温で 10~20 分間反応させる。

反応液(約 pH 7.4)

A 液：hexazotized new fuchsin 50 μl (染色時調整)

- ・4% new fuchsin (sigma) 2N 塩酸液 25 μl
- ・4% 亜硝酸ナトリウム液 (新鮮) 25 μl

B 液：リン酸緩衝液(1/15 M, pH 7.6) 9.5 ml

C 液：

- ・Naphthol AS-D chloroacetate (sigma) 1 mg
- ・N-N' dimethyl formamide 0.5 ml

- 3、標本を流水で水洗する。

- 4、ヘマトキシリン液で 10 分間染色し、色出し(希釈アンモニア液で数秒間)をして、乾燥させ観察用標本とした。

2.4 αナフチル ブチレート エステラーゼ染色 (Li 法)

- 1、血液塗抹標本を冷緩衝ホルマリン・アセトン液(クロロアセテート ES 染色と同様)で 30 秒間固定し、蒸留水で 3 回洗い、乾燥する。

- 2、反応液 A 液の 2 溶液を 25 μl ずつ取り、振盪混和し、1 分後に全量 50 μl を B 液緩衝液に加えて、さらに C 液を追加して混和する。濾過をして標本に滴下し、室温で 45 分間反応させる。

反応液：

- A 液：hexazotized pararosanilin 50 μl (染色時調整)
- ・4% pararosanilin hydrochloride 25 μl

- ・pararosanilin hydrochloride (sigma) 1 g
- ・蒸留水 20 ml
- ・濃塩酸液 5 ml
- ・4% 亜硝酸ナトリウム液(新鮮) 25 μl

B 液：リン酸緩衝液(1/15 M, pH 6.3) 9.5 ml

C 液：

- ・α-naphthyl butyrate (sigma) 10 mg
- ・ethylene glycol monomethyl ether 0.5 ml

- 3、標本を流水で水洗する。

- 4、ヘマトキシリン液で 10 分間染色し、色出しをして、乾燥させ観察用標本とした。

3. 結果

3.1 末梢血液標本における普通染色 (ライト染色)

カニクイザル末梢血液塗抹標本を作製して、ライト染色を行った。

ライト染色標本では、顆粒球、リンパ球、単球のそれぞれの核の特徴が分り易く、血球の特殊顆粒についても、好酸性顆粒(好酸球)、好塩基性顆粒(好塩基球)、好中性顆粒(好中球)、リンパ球や単球のアズール顆粒はよく染色されており、末梢血液における白血球の識別は良好であった(図 1)。

ときに、好中球の顆粒が好酸性顆粒に近い色調で染色されることがあったが、好酸球の顆粒は好中球顆粒に比較し大きく一様の形態であるため、顆粒のサイズを考慮することにより鑑別が可能であった。

また、リンパ球の核は、類円形が多く観察されたが、不整形の核も時折認められた。

単球と豊富な細胞質をもつ大型リンパ球の鑑別では、リンパ球の細胞質の淡青色な色調に比較し、単球の細胞質にはリンパ球のアズール顆粒より微細なアズール顆粒が多数あり、比較的くすんだ色調を呈していた。また、単球の繊細なクロマチン網工はリンパ球のクロマチン網工の染色性と異なっており、両者の識別にはこれらの所見を注意深く比較観察することが重要であった。

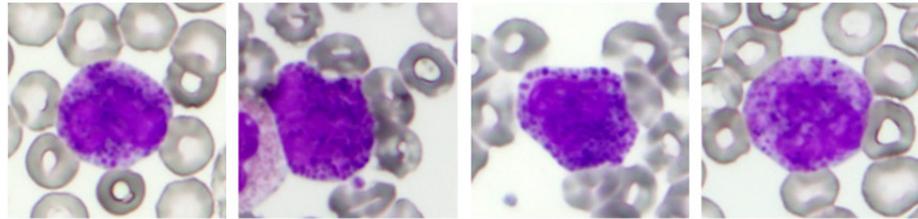
3.2 末梢血液標本における白血球の比率

ライト染色による末梢血液塗抹標本(n=10)を用いて、白血球を観察し、白血球比率を算出した。

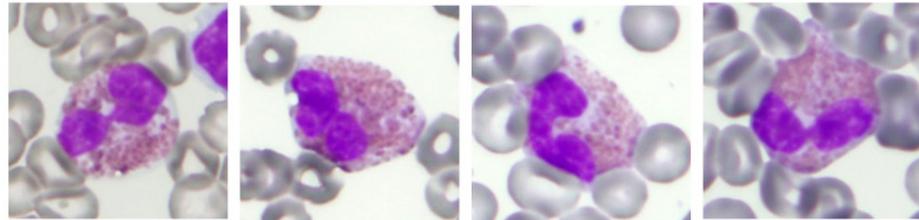
好中球の桿状核と分葉核の分類は、核の最小部分が最大幅部分の 1/3 以下を分葉核とする分類法と、核間がクロマチン構造の見えない核糸でつながったものを分葉核球とする分類法がある。サル好中球の桿状の核は、ときにヒト桿状核の長径よりも長く、曲がっていたり、また、一部が重なっているような時は桿状核球と分葉核球の判定が難しく、このような場合は分葉核球に分類した。

カニクイザル 10 匹(4~26 歳)の白血球分画の平均比率は、桿状核好中球 2.9 ± 1.4 %、分葉核好中球 38.8 ± 13.3 %、好酸球 1.9 ± 1.4 %、好塩基球 0.2 ± 0.2 %、リンパ球 48.8 % ± 13.4 %、単球 7.4 ± 2.7 %であった(表 1)。

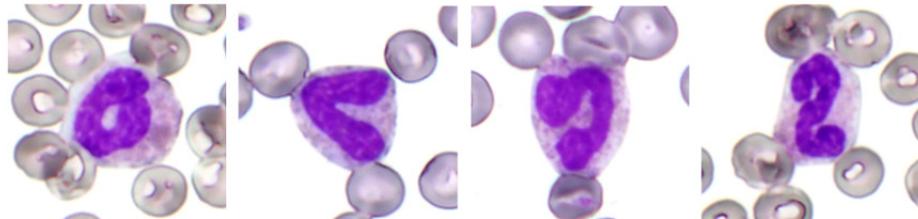
好塩基球



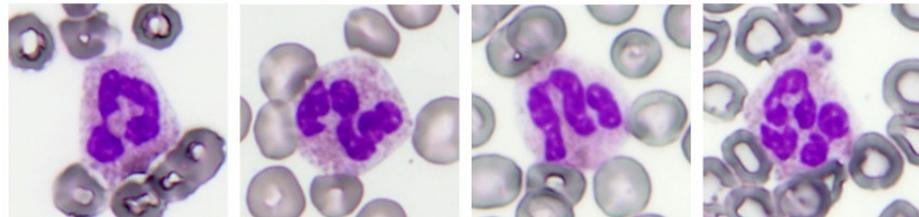
好酸球



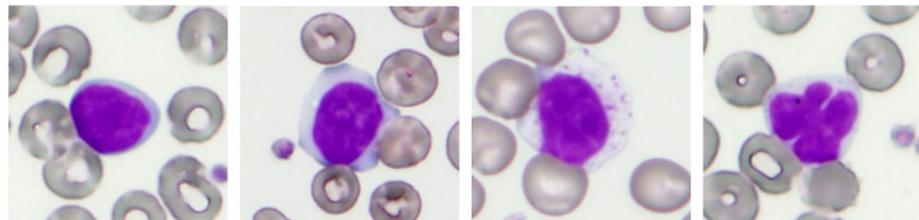
好中球
(桿状核)



好中球
(分葉核)



リンパ球



単球

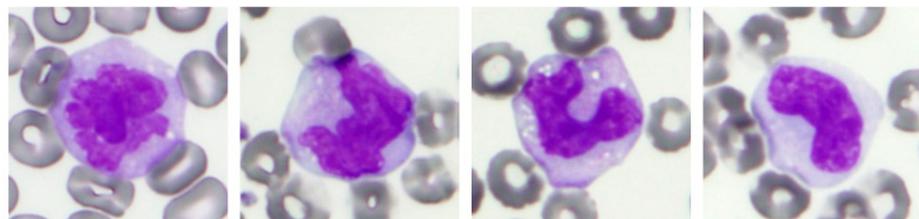


図 1. カニクイザル末梢血液像 ライト染色 (×400)

好塩基球と好酸球は、細胞質に特徴的な粗大な顆粒を持ち、それぞれ好塩基性顆粒、好酸性顆粒を持つ。好中球は、核の形態で桿状核球と分葉核球に分類され、細胞質には好中性顆粒が充満している。リンパ球は、多くは類円形の核を持ち、細胞質は澄んだ青色を呈する。細胞質にアズール顆粒を持つリンパ球も認められ、また、不整形の核のリンパ球も認められた。単球は、不規則な形態の核を持ち、クロマチン網工は網目状で、細胞質は広く、微細なアズール顆粒が多数認められることが多く、くすんだ色調を呈している。時に細胞質に空胞を認める。

表 1. カニクイザル末梢血液の白血球分類

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均値	SD
白血球数 / μ l	7700	4800	3300	8000	7900	7100	11200	6100	10400	5500	7200	2420
赤血球数 $\times 10^4$ / μ l	568	459	474	617	520	501	528	584	631	617	550	62.2
血小板数 $\times 10^4$ / μ l	25.1	25.5	25.5	37.0	40.8	23.4	45.8	25.7	25.5	37.1	31.1	8.2
白血球分画比率 %												
好中球 桿状核球	1.0	4.8	2.0	2.2	1.8	5.0	3.5	4.3	3.0	1.4	2.9	1.4
好中球 分葉核球	27.4	27.2	44.0	31.8	42.8	27.3	44.8	32.8	39.2	70.8	38.8	13.3
好酸球	0.6	3.2	3.6	0.8	3.2	2.0	0.8	4.0	0.3	0.8	1.9	1.4
好塩基球	0	0	0.3	0.6	0	0.2	0.4	0.4	0.0	0.4	0.2	0.2
リンパ球	65.0	62.4	38.8	54.6	43.0	61.0	41.5	50.5	50.2	20.8	48.8	13.4
単球	6.0	2.4	11.3	10.0	9.2	4.5	9.0	8.0	7.3	5.8	7.4	2.7

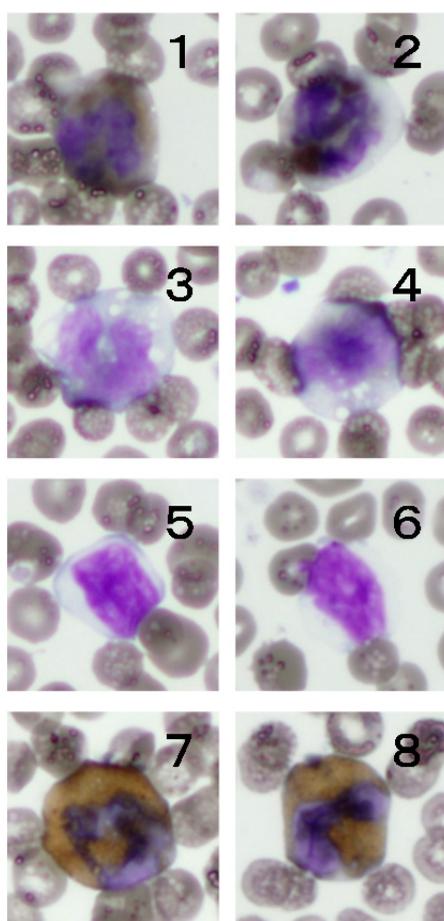


図 2. カニクイザル白血球
ペルオキシダーゼ染色 (×400)

- No. 1, 2 好中球 (び漫性、強陽性)
- No. 3, 4 単球 (び漫性、弱陽性)
- No. 5, 6 リンパ球 (陰性)
- No. 7, 8 好酸球 (顆粒状、強陽性)

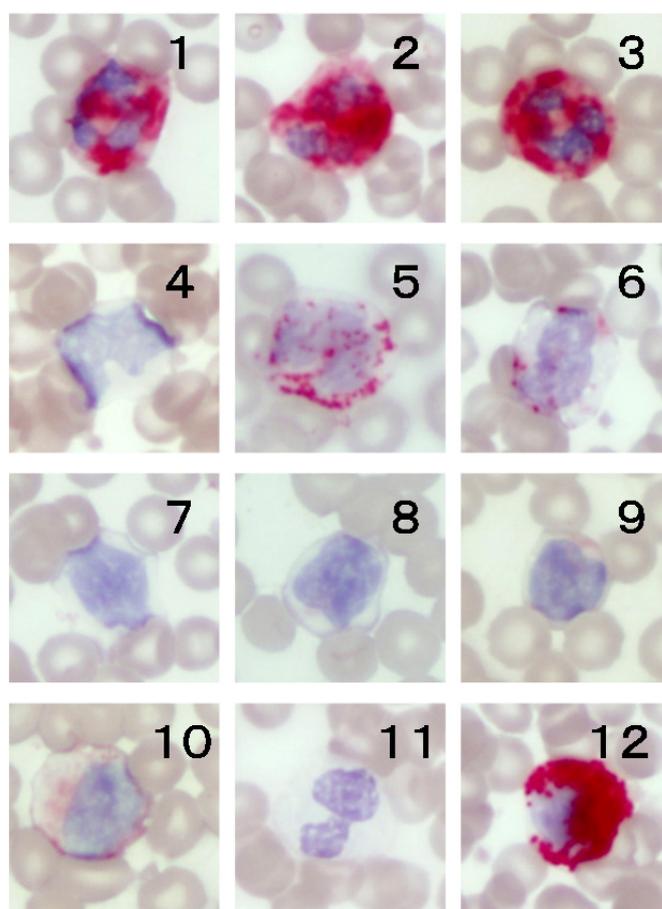


図 3. カニクイザル白血球
ナフトール AS-D クロロアセテートエステル
ゼ染色 (×400)

- No. 1~3 好中球 (び漫性、強陽性)
- No. 4 単球 (陰性)
- No. 5, 6 単球 (顆粒状、弱陽性)
- No. 7, 8 リンパ球 (陰性)
- No. 9, 10 リンパ球 (顆粒状、弱陽性)
- No. 11 好酸球 (陰性)
- No. 12 好塩基球 (顆粒状、強陽性)

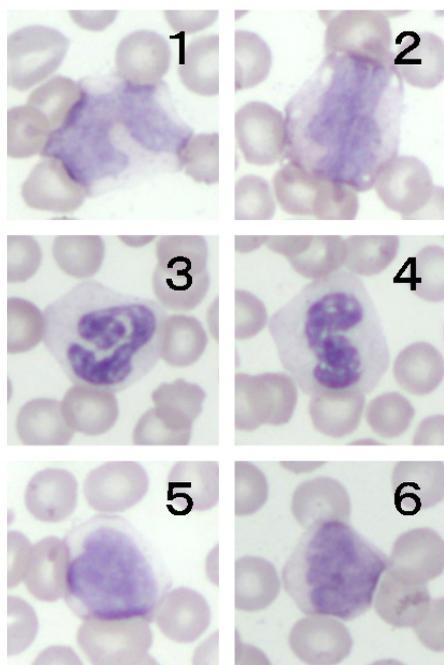


図 4. カニクイザル白血球
 α ナフチル ブチレートエステラーゼ染色
($\times 400$)

- No. 1, 2 単球 (陰性 \sim ±)
- No. 3, 4 顆粒球 (陰性)
- No. 5, 6 リンパ球 (陰性)

3.3 末梢血液標本における白血球のペルオキシダーゼ反応

ペルオキシダーゼ染色の陽性反応は、暗緑褐色 \sim 暗黄緑色を呈する。

今回のカニクイザル白血球の観察では、好中球は、細胞質全体が陽性に染まり、散在してさらに強く染色されている所も認められた(図 2-1,2)。

単球は、び漫性に陽性に染色されたが好中球よりも活性が弱く(図 2 -3,4)、また、陰性の単球も認められた。

リンパ球は、すべて陰性であった(図 2-5,6)。

好酸球は、好中球よりも強陽性に顆粒状に染色され(図 2-7,8)、また、数が少ない好塩基球については観察することが困難であった。

3.4 末梢血液標本における白血球のナフトール AS-D クロロアセテート エステラーゼ反応

クロロアセテート Es 染色の陽性反応は、鮮紅色を呈する。

今回のカニクイザル白血球の観察では、好中球は、細胞質全体に強く染まり、部分的にとくに強く染色された箇所も認めた(図 3-1 \sim 3)。

単球は、陰性(図 3 -4)から散在性に陽性顆粒(図 3-5,6)を認め、弱陽性の単球を数多く認めた。また、

好中球のび漫性の強陽性の染色態度とは異なって、散在性の顆粒状であり両者の染色性の違いは識別可能であった。

リンパ球は、ほとんどが陰性であったが(図 3 -7,8)、ごく稀に弱陽性反応のリンパ球が認められた(図 3-9,10)。

白血球の核の上まで強陽性の顆粒が充満している血球が認められ(図 3 -12)、その染色態度の白血球比率は、ライト染色標本による好塩基球の比率とほぼ一致していた。

また、陰性の白血球(図 3 -11)も認められ、その染色態度の白血球比率は、ライト染色標本による好酸球の比率とほぼ一致していた。

3.5 末梢血液標本における白血球の α ナフチル ブチレート エステラーゼ反応

ブチレート Es 染色の陽性反応は、暗紅色 \sim 褐色を呈する。

今回のサル白血球の観察では、単球は、細胞質がび漫性に弱陽性のような色調にもとれるものが一部観察されたが、陰性に限りなく近い色調のため、陰性血球との区別ができず、単球は陰性(一 \sim ±)と判定した(図 4 -1,2)。また、強陽性の単球は認められなかった。

顆粒球系およびリンパ球は、ともに陰性であった(図 4-3,4)(図 4-5,6)。

4. 考察

カニクイザル末梢血液では、ヒト健常人の末梢血液と同様に、好中球・好酸球・好塩基球・リンパ球・単球の 5 種類の白血球が認められ、普通染色(ライト染色法)による白血球の核や顆粒や細胞質の色調は良好であり、ヒト白血球と同様の染色性であった。

また、カニクイザル末梢血液の白血球分類では、10 匹の観察であったが、健常人(成人)の好中球優位に比較し、リンパ球の比率がやや高値であった。

特殊染色を用いた白血球同定の有用性については、カニクイザルの顆粒球では、ペルオキシダーゼ反応と 2 種類のエステラーゼの反応は、ヒト顆粒球の染色性に類似していた。

好中球では、ペルオキシダーゼとクロロアセテート Es 染色はび漫性の強陽性を呈し、ブチレート Es 染色は陰性であった。

好酸球は、ペルオキシダーゼ反応強陽性で、2 種類のエステラーゼ反応は陰性と思われた。

また、好中球の普通染色で顆粒の色調が好酸性と類似した色調に観察される時があったが、ヒト白血球のミエロペルオキシダーゼ研究では、好酸球ペルオキシダーゼは好中球と異なりシアン化ナトリウム抵抗性(10^{-2} M)であり両者の鑑別法になっている^[4]。今回は、顆粒の大きさの所見で識別ができたため、シアン添加染色による確認は行わなかった。

好塩基球は、白血球の中で一番少なく、3 種類の特殊染色を確認することは難しかったが、核の上まで陽性顆粒が認められたクロロアセテート Es 染色強陽性細胞は、好塩基球と思われた。

表 2. カニクイザル 顆粒球・単球・リンパ球の細胞化学所見

	Peroxidase	naphthol AS-D chloroacetate	α naphthyl butrase
好中球	+~+++	++~+++	—
好酸球	+++	—	—
好塩基球		+++	—
単球	—~++	—~+	—~±
リンパ球	—	—*	—

* まれに弱陽性のリンパ球をみる。

単球は、ペルオキシダーゼとクロロアセテート Es 染色は、ともに陰性~弱陽性であり、陽性率もほぼ同等であった。

ヒト単球の場合は、クロロアセテート Es 染色は、一部弱陽性の場合があるがほとんどの単球は陰性である。逆に、ブチレート Es 染色は一部陰性単球も認められるが一般的には強陽性(NaF で活性が阻害 1.5 mg/ml)のため、ブチレート Es 染色は単球系細胞に特異性が高いと評価されている^[2,3,4,5]。

しかし、今回のカニクイザルの単球では、ブチレート Es 染色の強陽性像は認められず、陰性に近い色調であった。また、クロロアセテート Es 染色は、逆に顆粒状の弱陽性単球の割合が高く、ヒトの場合と異なった所見であった。

ヒト白血球のエステラーゼでは、各血球によって特有のアイソタイプパターンが報告されており^[5]、エステラーゼ染色もそれに対応して、基質や反応条件(pH)等が違う多種類の染色法がある。その中のエステラーゼ染色の一つに、単球や巨核球が強く反応するαナフチルアセテート エステラーゼ染色法^[4]がある。今回、カニクイザル単球のブチレート Es 染色での反応が弱かったため、今後このアセテート染色法を用いて単球の反応性や特異性について検討して行きたい。

なお、カニクイザル単球の同定法として、ヒト単球と同様に抗ヒト CD14 抗体(Serotec 社および Miltenyi Biotec 社)によるフローサイトメトリー測定は良好であり、蛍光強度も高く、広く用いることができると思われた(データは示さず)。

リンパ球では、ペルオキシダーゼ反応は陰性であった。2種類のエステラーゼ反応は、ともに多くのリンパ球は陰性であったが、ごく一部のリンパ球ではあるがエステラーゼ反応がヒトリンパ球の反応と異なって観察された。

ヒトリンパ球では、クロロアセテート Es 染色は陰性、ブチレート Es 染色も多くは陰性であるが T リンパ球の一部で NaF 抵抗性の粗大顆粒状(dot like)に染色されることが報告されている^[3]。

今回のカニクイザルリンパ球のエステラーゼ染色では、クロロアセテート Es 染色で、ごく一部のリンパ球ではあるが繊細な陽性像が認められた。また、ブチレート Es 染色では、単球においても鈍い反応

性のためか、リンパ球においても粗大顆粒状の陽性リンパ球像は確認できなかった。

5. まとめ

- 1、普通染色(ライト染色)標本におけるカニクイザル末梢血液の染色性は良好であり白血球の鑑別に有用であった(表 1)。
- 2、顆粒球の 3 種類の特殊染色は、ヒト顆粒球の染色性と類似しており、好中球は、ペルオキシダーゼ染色およびクロロアセテート Es 染色反応は細胞質全体にび漫性に強陽性、ブチレート Es 染色は陰性であった(表 2)。
また、好酸球は、ペルオキシダーゼ染色は顆粒状強陽性で、2 種類のエステラーゼ染色は陰性であった。好塩基球のクロロアセテート Es 染色は顆粒状強陽性、ブチレート Es 染色は陰性であった(表 2)。
- 3、単球では、ペルオキシダーゼ染色は、び漫性弱陽性~陰性を呈し、ヒト単球と類似であったが、エステラーゼの反応はヒト単球と違って、ブチレート Es 染色の強陽性像は認められず反応が弱く陰性に近い色調であった。逆に、クロロアセテート Es 染色は、顆粒状弱陽性の単球が数多く認められた(表 2)。
- 4、リンパ球では、ペルオキシダーゼ反応陰性、クロロアセテート Es 染色も多くは陰性であったが、ごく僅かの一部のリンパ球に弱陽性反応の染色性が認められた。ブチレート Es 染色は陰性であった(表 2)。

謝辞

本報告の作成にあたり、筑波大学医学医療系 後藤行延先生をはじめ平松祐司教授、佐藤幸夫教授に深く御礼申し上げます。また、サル採血にご協力を頂きました霊長類医学研究センターの方々にも深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] 渡辺明朗, 亀井喜恵子, 血球染色 1 普通染色, 血球カラーアトラス, 寺田秀夫編, 武藤化学株式会社, 東京 (2001) 71-84.
- [2] 小池正, 血液細胞化学, 特集第 15 回シスメックス血液学セミナー 血球形態学の新しい展望, 東亜医用電子株式会社, 神戸 (1992) 43-69.
- [3] 小宮正文, 標本の見方 2. 標本の染色, 血球のみかた 第 8 版, 南山堂, 東京 (1985) 16-27.
- [4] Yam, L. T., Li, C. Y., and Crosby, W. H., Cytochemical identification of monocytes and granulocytes, Amer. J. Clin. Path. 55 (1971). 283-290.
- [5] Li, C. Y., Lam, K. W., D. Yam, L. T., Esterases in human leukocytes, J. Histochem. Cytochem. 22 (1973) 1-12.

Differential Leukocyte Count and Identification by Cytochemistry - Observation of Monkey Blood Smears -

Shoko Sato

Technical Service Office for Medical Sciences, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

Monkey blood smears were prepared, with Romanowsky stains, peroxidase stains, naphtol AS-D chloroacetate esterase stains, and α naphthyl butrate esterase stains. These stains provided various information concerning neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes, and lymphocytes, proving useful for cell identification.

Keywords: Monkey, Leukocyte, Peroxidase Stain, Esterase Stain