

# 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

## 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 (ロマンフスキー染色) 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、 $\alpha$ 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異なった反応所見が認められた。血液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る。

## 目的

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たため、ヒト血液細胞の形態学的観察や白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。

## 染色方法 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、乾燥させる。

## 血液塗抹標本の作製

カニクイザルのEDTA 採血液を用いて、ウエッジ法で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。染色時には、冷風で解凍させ、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、 $\alpha$ ナフチルブチレート エステラーゼ染色を行った。

## 染色方法 2 ペルオキシダーゼ染色 (2,7- fluorenediamine 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  
・ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、標本を流水で水洗し、ギムザ希釈液 3 ml を標本上に滴下し 10 分間染色する。  
**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
- 4、標本を流水水洗して、乾燥させる。

## 染色方法 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)**  
・Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mg  
・KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 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  $\mu$ l ずつ取り、振盪混和し、1 分後に全量 50  $\mu$ l 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**  
A 液 : hexazotized new fuchsin 50 $\mu$ l (染色時調整)  
・4% new fuchsin (sigma) 2N 塩酸液 25  $\mu$ l  
・4% 亜硝酸ナトリウム液 (新鮮) 25  $\mu$ l  
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) をして乾燥させる。

## 染色方法 4 $\alpha$ ナフチル ブチレート エステラーゼ染色 (Li 法)

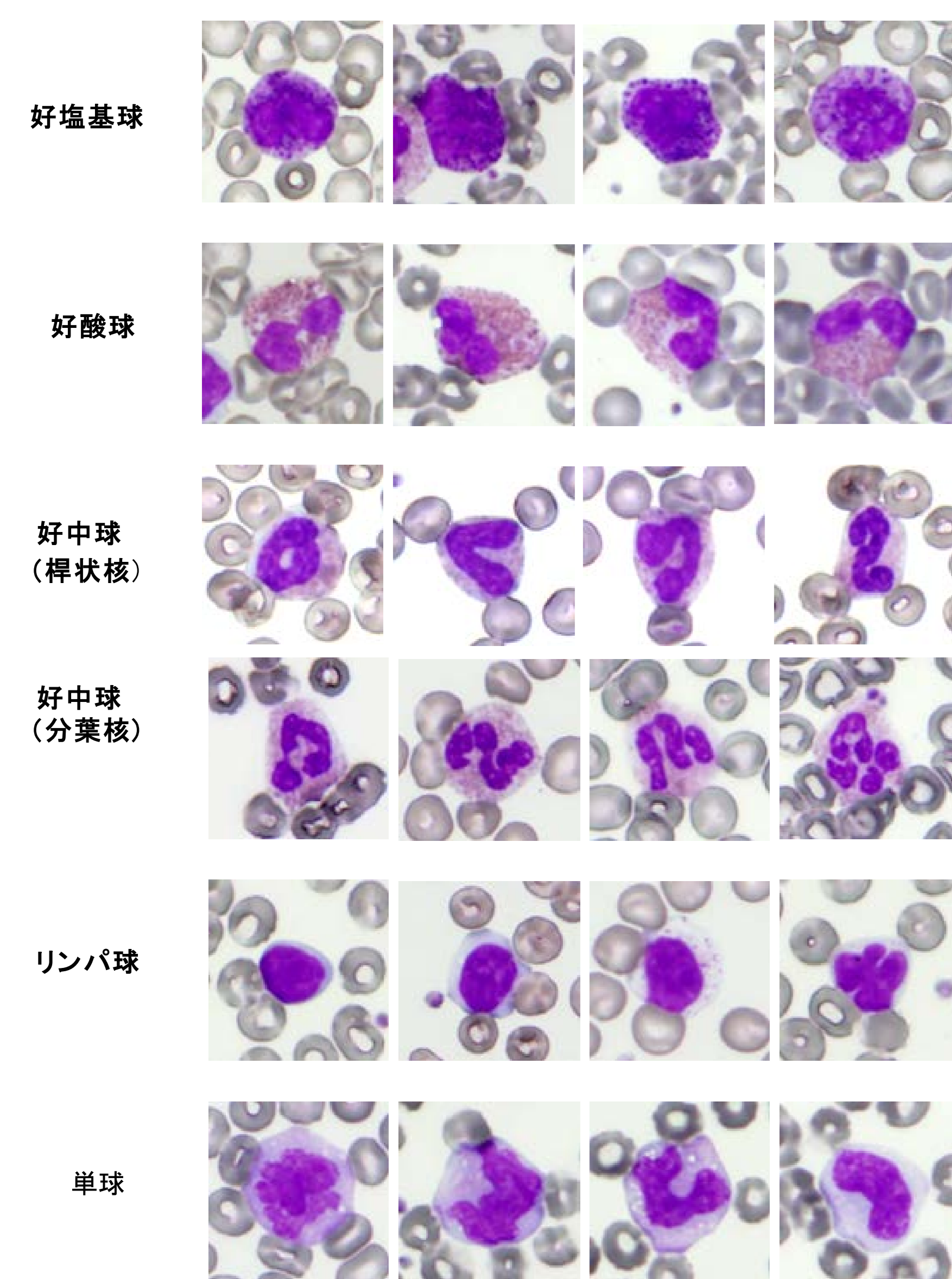
- 1、血液塗抹標本を冷緩衝ホルマリン・アセトン液で 30 秒間固定し、蒸留水で 3 回洗い、乾燥する。  
**緩衝ホルマリン・アセトン液(pH 6.6, 4~10°C)**  
・Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mg  
・KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 100 mg  
・蒸留水 30 ml  
・アセトン 45 ml  
・37%ホルムアルデヒド 25 ml

- 2、反応液 A 液の 2 溶液を 25  $\mu$ l ずつ取り、振盪混和し、1 分後に全量 50  $\mu$ l 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 $\mu$ l (染色時調整)  
・4% pararosanilin hydrochloride 25  $\mu$ l  
・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  $\mu$ l  
B 液 : リン酸緩衝液(1/15 M, pH 6.3) 9.5 ml  
C 液 :  
・ $\alpha$ - 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、乾燥させる。

## 結果 1 末梢血液標本における普通染色 (ライト染色)

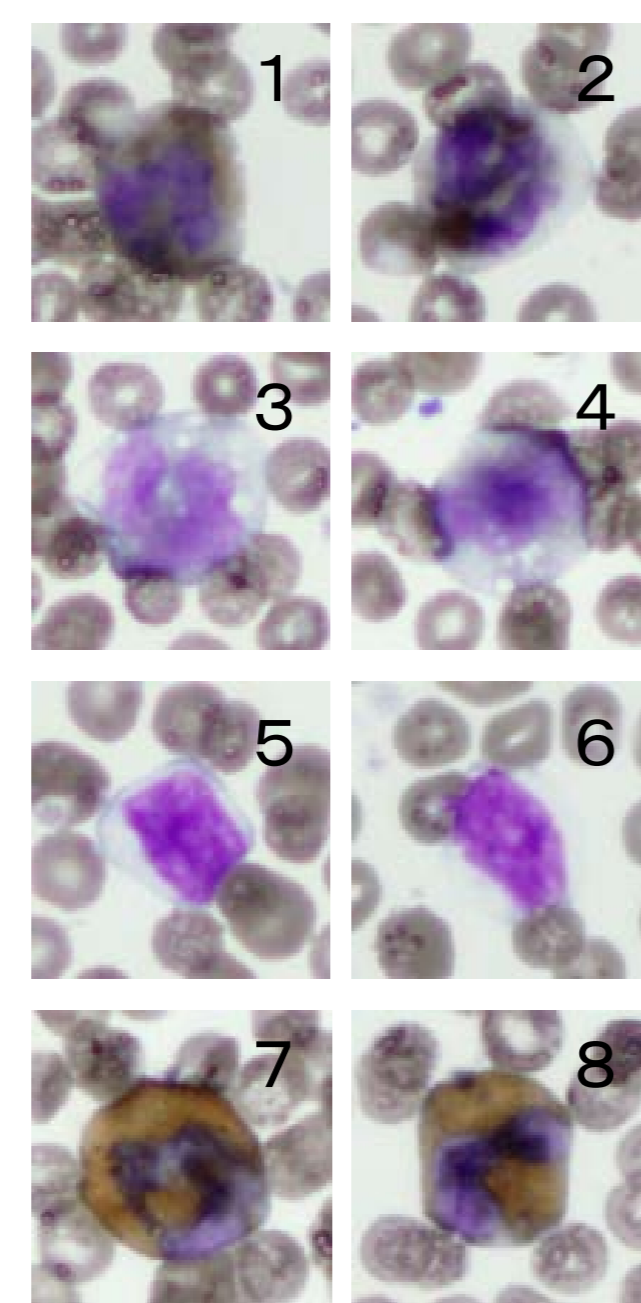


- 1 好塩基球と好酸球は、細胞質に特徴的な粗大な顆粒を持ち、それぞれ好塩基性顆粒、好酸性顆粒を持つ。
- 2 好中球は、核の形態で桿状核球と分葉核球に分類され、細胞質には好中性顆粒が充満している。
- 3 リンパ球は、多くは類円形の核を持ち、細胞質は澄んだ青色を呈する。細胞質にアズール顆粒を持つリンパ球も認められ、また、不整形の核のリンパ球も認められた。
- 4 単球は、不規則な形態の核を持ち、クロマチン網工は網目状で、細胞質は広く、微細なアズール顆粒が多数認められることが多く、くすんだ色調を呈している。時に細胞質に空胞を認める。

## 結果 2 末梢血液標本における白血球分類

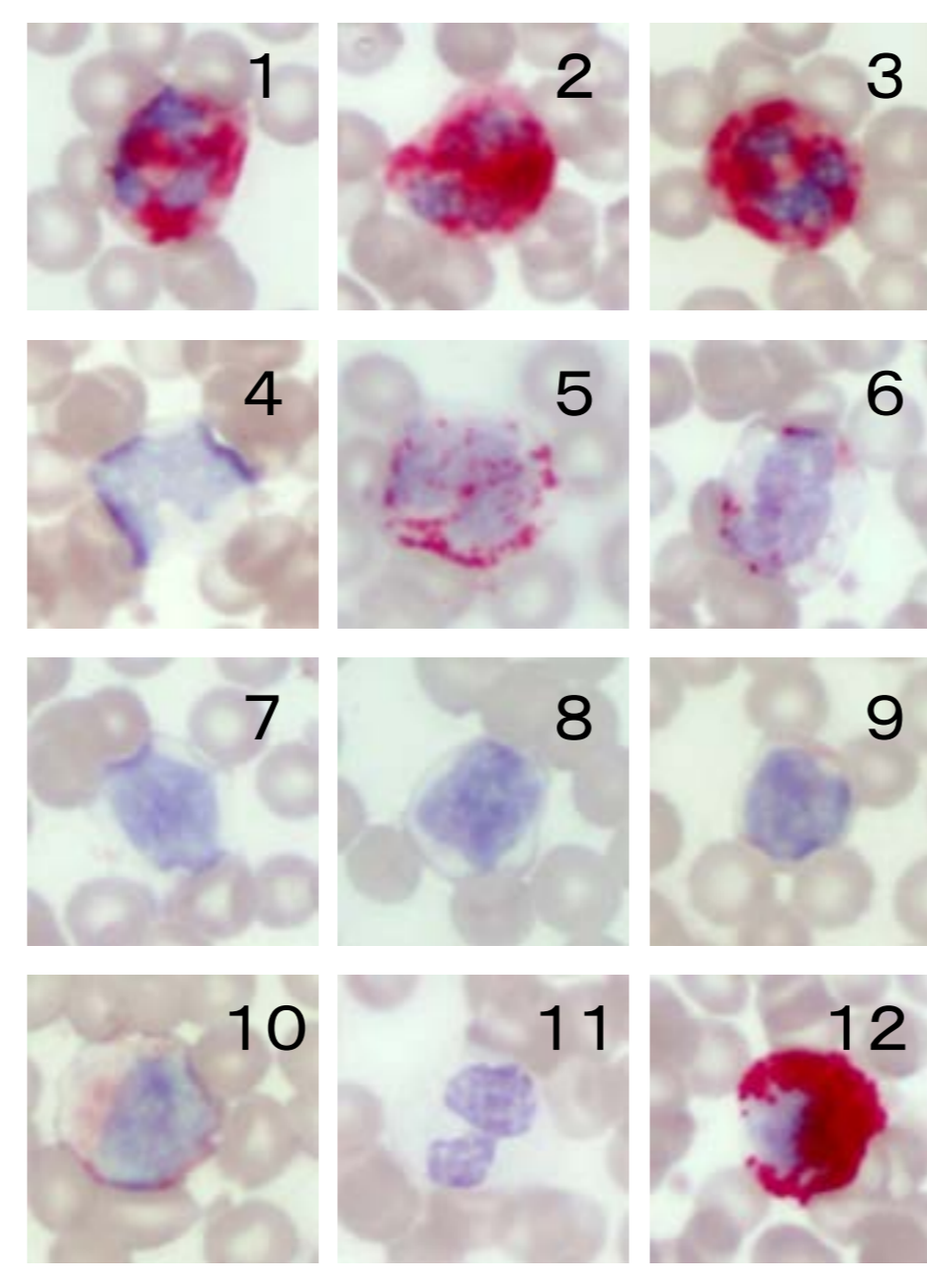
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均値	SD
白血球数 / $\mu$ l	7700	4800	3300	8000	7900	7100	11200	6100	10400	5500	7200	2420
赤血球数 $\times 10^4$ / $\mu$ l	568	459	474	617	520	501	528	584	631	617	550	62.2
血小板数 $\times 10^4$ / $\mu$ l	25.1	25.5	25.5	37.0	40.8	23.4	45.8	25.7	25.5	37.1	31.1	8.2
白血球分類比率 %												
好中球	1.0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

## 結果 3 ペルオキシダーゼ染色 ( $\times 400$ )



- 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)

## 結果 4 ナフトールAS-Dクロロアセテート エステラーゼ染色 ( $\times 400$ )



- 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)

## 結果 6 顆粒球・単球・リンパ球の細胞化学所見

	Peroxidase	naphthol AS-D chloroacetate	$\alpha$ naphthyl butyrase
好中球	++~+++	++~+++	-
好酸球	+++	-	-
好塩基球	-	+++	-
単球	-~++	-~+	-~±
リンパ球	-	-*	-

## 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。
- 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観察された。好中球では、ペルオキシダーゼおよびクロロアセテートエステラーゼ染色反応は、ともに細胞質全体にび漫性に強陽性を示し、ブチレートエステラーゼ染色は陰性であった。好酸球では、ペルオキシダーゼ染色は顆粒状の強陽性反応で、2 種類のエステラーゼ染色は陰性であった。好塩基球では、クロロアセテートエステラーゼ染色は顆粒状強陽性、ブチレートエステラーゼ染色は陰性であった。
- 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異なり、ブチレートエステラーゼ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、クロロアセテートエステラーゼ染色は、顆粒状弱陽性の単球が数多く認められた。
- 4、リンパ球では、ペルオキシダーゼ反応陰性、クロロアセテートエステラーゼ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。ブチレートエステラーゼ染色は陰性であった。

No. 1, 2 単球 (陰性~±)

No. 3, 4 顆粒球 (陰性)

No. 5, 6 リンパ球 (陰性)