

パパニコロウ染色における 赤血球の染色性について

安 松 弘 光

(東洋工業附属病院臨床病理)

Letter to Editor

パパニコロウ染色(以下 Pap 染色)において、赤血球がしばしば緑色に染まることを経験するが、その原因についてはまだ十分解明されていないようである。

Pap 染色の原法では、核染色のためにハリスのヘマトキシリンが退行性染色として使用されているため、塩酸水による分別操作が必要である。しかし、我々が用いている Pap 染色法では、通常マイヤーのヘマトキシリンが使用されているので、分別操作を必要としない。そして、この方法を用いる限りは赤血球が緑色に染色される現象はほとんど見られないことに気が付いた。そこで我々は Pap 染色における赤血球の緑色染色の傾向は分別操作に使用される塩酸水に関係があるのではないかと考え、検討を行った。

材料は正常人の静脈血を用いて型のごとく塗抹標本を作製し、湿潤固定を行った。染色法は Pap の原法に従って染色し、0.25% 塩酸水に6回浸して分別操作を行った。

まず、95% アルコールの固定時間と赤血球の染色態度とを追跡観察した結果、固定時間が24時間以内では赤血球は緑色に染色される傾向を示したが、48時間以上固定したものではすべて赤色に染色された。また、緑色に染色された標本の分別に使用した塩酸水の潜血反応は陽性を示したが、赤色に染色された塩酸水のそれは陰性であった。更に、溶血液の沈渣をマイヤーのヘマトキシリンを用いて Pap 染色すると、赤血球が緑色に染色された。つまり、赤血球が塩酸により溶血を起こし、ヘモグロビンが塩酸水中に溶出したとき、赤血球が緑色に染色されると推測した。

このように、Pap 染色の原法において赤血球が塩酸の影響を受けなくなるには、少なくとも2日間以上の固定が必要であろうと思われる。したがって、塗抹後固定が不十分であると、多くの赤血球は緑色に染色されることが判明した。

それでは同一標本において赤血球が赤染したり緑染したりするのは一体なぜだろうか。それには次の要因が推測される。すなわち、①塗抹標本では粘液などが不均等に塗抹されて、赤血球がその粘液内、あるいは粘液外に存在する、②それぞれの赤血球の乾燥状態が異なる、③新鮮な赤血球や古い赤血球が存在する、などが考えられる。このような状態においては各々の赤血球の固定度合いが異なり、したがって塩酸による影響もそれぞれ異なってきた、同一標本内で赤染したり緑染したりするものと考えた。

そこでこのような塩酸の影響を防ぐため、95% アルコールに各濃度のホルマリンを加えて、赤血球の染色性を検討してみた。その結果、ホルマリン濃度が0.1%で赤血球が赤染するためには、7時間以上の固定が必要であるが、ホルマリン濃度の上昇に伴って固定時間は短縮され、ホルマリン濃度が5%以上ではわずか5分間で完全に固定され赤染した。我々はホルマリンが有害であることからその濃度を1%とし、30分間固定するという条件を設定した。この濃度であればほとんど刺激臭はなく、またホルマリンによる各種細胞の染色性も全く変化は認められない。

実際に各種検体を1%ホルマリンアルコールで30分間以上固定して Pap の原法により染色した結果、赤血球はすべて赤色に染色され、安定した染色結果が得られた。

以上の検討より次のように結論が得られた。

(1) 赤血球が緑色に染色されるのは、赤血球の固定が不十分なため分別操作に用いられる塩酸によりヘモグロビンがヘマチンとなって溶出するためである。

(2) Pap 染色において1%ホルマリンアルコールで30分間以上標本を固定すると、赤血球がより急速に固定され、もはや塩酸により溶血が起こらなくなり、赤血球がすべて赤色に染色されることが明らかとなった。

ご指導、ご校閲を賜った広島大学医学部第2内科宮西通博助教授(細胞診指導医)及び近畿大学医学部臨床病理大場康寛教授に感謝の意を表します。

(受稿: 1977.9.6, 受理: 1977.9.26)

安松氏の“手紙”に対する意見

山 田 喬

(獨協医科大学教授・病理)

大変興味深いご意見です。特に赤血球中のヘモグロビ

ンが塩酸によりヘマチンとなりこれがライトグリーンと選択的に結合することにより緑色に赤血球が染まるのではないかという意見はたいへん魅力的です。そのように定性的に赤血球の染色性が変化するために赤血球が緑色に染まるのでしたら答えはたいへん明快になるからです。

しかし、あなたが行われた実験の条件には問題があります。①まず赤血球が赤く染まったり緑色に染まったりするのは日常の染色操作によって出現するのですから、実験条件もそれに合わせて行わないと、その結果がいかならうと日常の現象を説明するための成績にはなりません。通常固定操作は数時間行うのが普通ですから、固定を24時間以上行わないと十分ではないというのは実際に合いません。②ヘモグロビンが上清に出現するからといって、直ちに赤血球の膜の透過性が增強したと言えるかどうか——通常、赤血球には抵抗の強いものと弱いものがあり、弱い赤血球の幾つかが lysis を起こせばヘモグロビンは上清に出るでしょう。したがって赤血球の膜の透過性が亢進していることの直接証明がないと、あなたの意見に説得力がないでしょう。③ヘマチンとライトグリーンが、ヘモグロビンとエオジンがそれぞれ選択的に染まるという直接物質のオーダーでの証明も必要でしょう。

いずれにしても論より証拠です。あなたの手紙を見てから、あなたの実験条件をそれぞれ設定してヒトの赤血

球をマイヤーのヘマトキシリンとハリスのヘマトキシリンで染めて、その後パパニコロウ染色をしてみました。更にヘマトキシリンの染色の後に1%及び0.25%塩酸で分別した後にパパニコロウ染色を行ってみました。そしてエーテル、アルコールによる固定の条件も、30分間、1、28、48時間とそれぞれ行ってみました。その結果はどうもあなたが言うようには必ずしもなりませんでした。

(1) 3分間固定した赤色球を塩酸で分別しても、赤く染まり、決してライトグリーンには染まりません。

(2) 逆に塩酸で分別する前(染色前)に48時間固定しても部分的にグリーンに染まる所があります。

(3) 塩酸で分別しない場合でも赤血球がグリーンに染まる標本があります。

(4) 溶血(水により)させてヘモグロビンを赤血球外に出すと、一般に染色性は低下しますが、それに塩酸を加えても加えなくとも染色性は変わりないようです。

これはほんの試みの実験ですからはっきりしたことは言えませんが、どうもこの結果からみると、にわかあなたの説を信ずるわけにいかなくなりました。

しかしなお結論は保留します。私の前回書いた説明(臨床検査, 21, 461, 質疑応答欄)もなお仮説でして完全な証明がまだないからです。どうかもう少し細かく追試が可能であるような条件をお示しください。一緒に更に考えていきましょう。

トピックス

PHA 活性化 E-ロゼット形成試験

ヒツジ赤血球と正常な末梢リンパ球とを混合すると両者がロゼットを形成するが、これは E-ロゼット形成試験(E)と呼ばれ、Tリンパ球機能検査として知られる。4°Cでは安定であるが、37°Cで反応させると分離する、非常に不安定な反応である。

著者らは、リンパ球をPHAで処理してEを行うと37°Cでも安定なロゼットを形成することを発見した。すなわち赤血球を凝集させな

い濃度のPHAをリンパ球浮遊液に添加し、0~120時間反応させEを行ったところ、4°Cでは通常のEと同様の成績を得た。しかし37°Cでは通常の方法でのロゼット形成率は3%以下であるのが、PHA処理6時間では10%以上、96時間処理では4°Cでの通常のEのそれとほぼ同様の60%近いロゼット形成率を得た。各時間PHA処理したリンパ球をよく洗った後、培養して³H-thymidine 摂取率(T)からPHA

の効果をみたところ、処理時間に相関してTも増加したことから、PHAの一定時間の処理のみでmitogenとして効果が持続することが分かった。しかも本法はTとの相関もよく、T cell 機能を24時間以内に知りうる簡便な方法であると結んでいる。

(Charoensiri, S. et al.: J. Immunol., 118, 2291, 1977)

(帝京大学 松田 重三)