

技 術

温度変化に伴うメイグリユンワルド・ギムザ染色の染色性の検討

齋藤 泰智 高橋 一人 吉田 愛美
丸岡 祐子 佐藤 正幸

Examination of the stainability of the May-Grünwald Giemsa stain with the temperature change

Yasutomo SAITO, Kazuto TAKAHASHI, Manami YOSHIDA
Yuko MARUOKA, Masayuki SATO

Key words : May-Grünwald — Giemsa — Temperature

はじめに

血球形態の鑑別に用いられているメイグリユンワルド・ギムザ染色は広く普及している染色法であるが、その染色性は施設によって幅があり、施設間差が問題となっている。染色性に影響を与える主な要因として、染色液メーカー、染色液の濃度や染色時間があげられるが、同一染色条件においても、再現性の高い染色性を得ることが難しかった。そこで今回我々は、染色性に与える要因として温度に着目し、メイグリユンワルド（以下 May）希釈液の温度変化に伴う染色性の変化について検討したので報告する。

対象と方法

対象は健常人10名の EDTA2K 採血塗抹標本を使用した。

染色条件は50mLの染色バットを使用して、1槽目を固定3分（May 原液50mL）、2槽目を May 希釈液5分（1:1 = May 液25mL:pH6.4リン酸緩衝液（1/150M）25mL）、3槽目をギムザ希釈液15分（1:9 = ギムザ液5mL:pH6.4リン酸緩衝液（1/150M）45mL）、水洗を1分に設定した（表1）。そして2槽目の May 希釈液の温度を30℃から5℃まで5℃ずつ下げ、染色性の変化を比較評価した。

May 液はメルク社、武藤化学社、シスメックス社の3社を使用した。pH6.4リン酸緩衝液は三菱化学メディエンス社、武藤化学社の2社をイオン交換水にて10倍希

表1 染色条件

染色液	時間 (分)	染色液量 (mL)	リン酸緩衝液量 (mL)
1槽目 メイグリユンワルド液原液	3	50	0
2槽目 メイグリユンワルド希釈液	5	25	25
3槽目 ギムザ希釈液	15	5	45
水洗	1		

釈し、1/150Mとして使用した。

評価法は北海道臨床衛生検査技師会の評価基準法（表2）に準じ、白血球5分画、赤血球、血小板の各細胞を10個以上観察して染色性をスコアリングした。同時にホリバ社製 pH メーター H-7にて各温度における May 希釈液の pH も測定した。

結 果

温度変化による染色性の変化を血球ごとに観察すると、白血球5分画では温度が下がるにつれて核の輪郭や細胞質の顆粒が明瞭になり、15℃以下になると非常に明瞭なコントラストとなった。赤血球は25℃から30℃では青みが増強されていたが、白血球と同様に温度が下がるにつれて良好な染色性となった。しかし、5℃まで低下すると黄色調が増し、輪郭不明瞭となった。血小板も温度の低下に伴い染色性が良好となり、細胞質の顆粒と輪郭が明瞭になった（表3・図1）。

May 液3社の比較では、スコアリング上は明らかな差にならなかったが、メルク社製染色液は他社と比べ、核網や好中性顆粒、好塩基性顆粒が明瞭に染色される反面、高温下では染色性が不安定となる傾向があり、至適

表2 北海道臨床衛生検査技師会の各血球の評価基準法

*各細胞で3項目揃うと優=5点, 2項目は普通=3点, 1項目以下は今一つ=1点とする

細胞	評価のポイント	補足
赤血球	<ul style="list-style-type: none"> 細胞の中央が周囲に比べて淡く染まっている 溶血していたり、形がいびつではないこと 適度な濃さに染まっていること 	<ul style="list-style-type: none"> Central pallor, 多染性や異染性, 赤血球の構造物などが染め分けられていれば「普通=3」と評価する。 染色ムラや染色過剰, 形態不良は「今一つ=1」と評価する。
血小板	<ul style="list-style-type: none"> 顆粒が染まっている 濃すぎず, 薄すぎないこと 凝集を起こしていないこと 	<ul style="list-style-type: none"> 血小板は中心部の顆粒が染まっていれば「普通=3」と評価する。 染まっていなければ「今一つ=1」と評価する。 明瞭に染まっていれば「綺麗=5」と評価する。
単球	<ul style="list-style-type: none"> クロマチン構造がみえること 細胞質と核の対比が良いこと 細胞質の淡青色が綺麗なこと 	<ul style="list-style-type: none"> 白血球は顆粒と核クロマチンが見分けられる染色は「普通=3」と評価する。
リンパ球	<ul style="list-style-type: none"> 細胞質に適度な塩基性があること 細胞質と核の対比が良いこと 顆粒があれば綺麗に染まっていること 	
顆粒球 注1)	<ul style="list-style-type: none"> 顆粒が綺麗に染まっていること (好塩基球は顆粒の大小不同があるので解ればよい) 細胞質と顆粒と核の対比が良いこと 核クロマチンがべったりと染まっていないこと 	<ul style="list-style-type: none"> 好塩基球の粗大状・微細状の顆粒の染色性の良いもの, 核クロマチン網と顆粒の染色性のバランスの良いものは「綺麗=5」と評価する。
好塩基球に 限定 注2)	<ul style="list-style-type: none"> 顆粒が乏しくても, 目で好塩基球と判断出来るものは普通(3点)評価とする。 但し, 顆粒が細胞周辺に溶出しているものは不可とする。 	

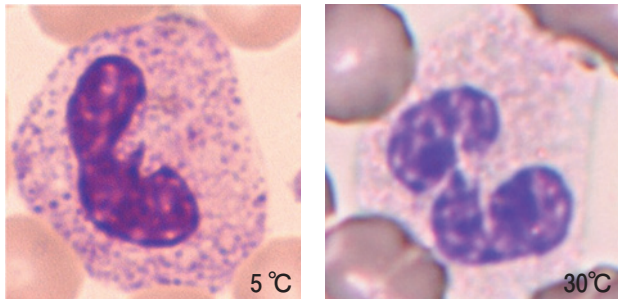
注1) 顆粒球は好中球・好酸球・好塩基球の3種類とも同じ基準で行う

注2) H22年度の評価変更により加えられた評価項目

表3 メイグリュンワルド液各メーカーのスコアリング結果

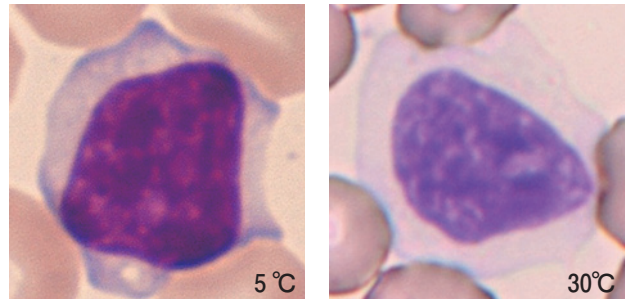
		A メルク						C シスメックス							
リン酸緩衝液 1/150M	項目	30℃	25℃	20℃	15℃	10℃	5℃	リン酸緩衝液 1/150M	項目	30℃	25℃	20℃	15℃	10℃	5℃
三菱化学	好中球	3.8	4.0	4.6	4.8	5.0	5.0	三菱化学	好中球	3.8	4.0	4.4	4.4	5.0	5.0
	好酸球	3.8	4.2	4.6	4.8	5.0	5.0		好酸球	3.6	3.8	4.4	4.8	5.0	5.0
	好塩基球	3.4	4.0	4.8	4.8	5.0	5.0		好塩基球	3.2	3.2	3.2	3.4	4.8	5.0
	単球	2.8	3.4	4.4	4.6	5.0	5.0		単球	3.0	3.6	4.6	4.4	5.0	5.0
	リンパ球	3.0	3.8	4.6	4.8	5.0	5.0		リンパ球	3.0	3.4	5.0	5.0	5.0	5.0
	赤血球	2.6	3.4	4.4	4.6	4.6	3.4		赤血球	2.8	3.4	4.0	4.2	4.4	3.6
	血小板	3.4	3.8	4.4	4.4	4.8	4.8	血小板	3.4	4.0	4.2	4.4	4.8	4.8	
武藤化学	好中球	3.8	4.0	4.4	5.0	5.0	5.0	武藤化学	好中球	4.2	4.2	4.4	4.6	5.0	5.0
	好酸球	3.6	3.8	4.2	4.8	4.8	5.0		好酸球	3.8	3.8	4.0	4.8	5.0	5.0
	好塩基球	3.4	3.4	4.0	4.2	4.8	5.0		好塩基球	2.6	3.4	3.4	4.4	4.8	4.8
	単球	2.6	2.8	4.2	4.4	5.0	5.0		単球	3.2	3.2	4.4	4.6	4.8	4.8
	リンパ球	3.0	3.2	4.6	4.4	5.0	5.0		リンパ球	3.4	3.4	4.4	4.6	5.0	5.0
	赤血球	2.4	3.4	4.2	4.6	4.6	3.2		赤血球	3.0	4.2	4.4	4.2	4.4	3.6
	血小板	3.4	4.0	4.6	4.4	4.8	4.8	血小板	3.4	4.2	4.6	4.6	4.6	4.8	
		B 武藤化学													
リン酸緩衝液 1/150M	項目	30℃	25℃	20℃	15℃	10℃	5℃								
三菱化学	好中球	3.6	4.0	4.2	4.2	4.8	4.8								
	好酸球	4.0	3.8	4.0	4.6	5.0	5.0								
	好塩基球	3.2	3.4	3.8	3.6	4.8	4.8								
	単球	3.0	3.2	4.0	4.2	5.0	5.0								
	リンパ球	3.0	3.4	4.2	4.2	5.0	5.0								
	赤血球	3.2	3.8	4.0	4.0	4.4	3.6								
	血小板	3.0	4.0	4.2	4.2	4.6	4.8								
武藤化学	好中球	3.8	4.2	4.4	4.6	4.8	5.0								
	好酸球	3.6	3.2	4.4	4.6	5.0	5.0								
	好塩基球	2.8	3.2	3.4	4.4	4.6	5.0								
	単球	3.0	3.2	4.2	4.4	5.0	5.0								
	リンパ球	3.4	3.2	4.4	4.6	5.0	5.0								
	赤血球	3.8	4.0	4.2	4.4	4.6	3.6								
	血小板	3.2	4.0	4.2	4.2	4.8	4.8								

※4.6以上を点線で, 3.0未満を薄い灰色で表記した。



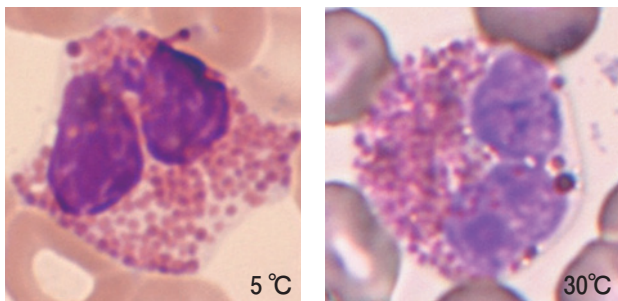
好中球

5℃ (左) の核網, 顆粒は染色性が良好で輪郭も鮮明であるが, 30℃ (右) の核網, 顆粒共に染色性不良になり輪郭も不明瞭である。



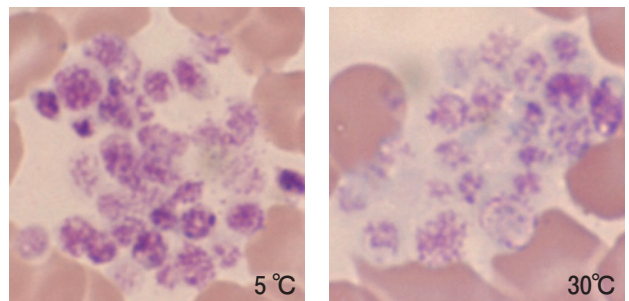
リンパ球

5℃ (左) の核網, 細胞質の染色性は良好で輪郭も明瞭であるが, 30℃ (右) は核網構造がやや不明瞭になり, 細胞質の輪郭もやや不明瞭である。



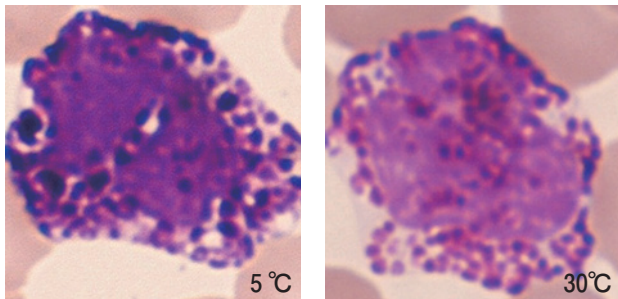
好酸球

5℃ (左) の核網, 顆粒は染色性が良好で輪郭も明瞭であるが, 30℃ (右) の顆粒は薄暗く, 核網構造も不明瞭である。



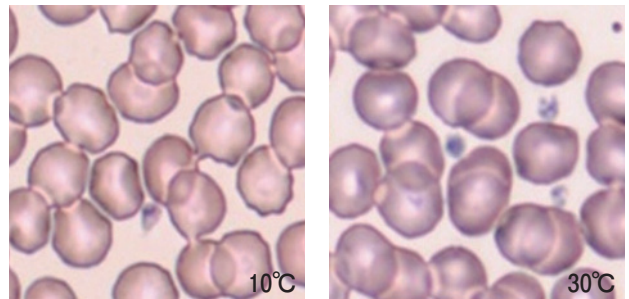
血小板

5℃ (左) は顆粒の染色性が良好で輪郭も明瞭であるが, 30℃ (右) は顆粒の染色性がやや不良になり輪郭も不明瞭である。



好塩基球

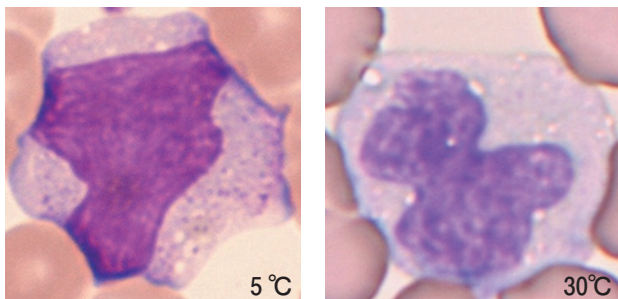
5℃ (左) の核網, 顆粒は染色性が良好で輪郭も明瞭であるが, 30℃ (右) は核網, 顆粒共に染色性不良になり, 輪郭も不明瞭である。



赤血球

10℃ (左) の染色性は良好で Central pallor も明瞭であるが, 30℃ (右) は全体的に青みがかり, 多染性赤血球との鑑別が困難で輪郭も不明瞭である。

図1 各血球の染色性の比較



単球

5℃ (左) の核網, 顆粒は染色性が良好で細胞質の二重構造及び輪郭も明瞭であるが, 30℃ (右) は核網, 顆粒共に染色性が不良になり核の輪郭もやや不明瞭である。

温度域が狭かった。

pH6.4リン酸緩衝液はメーカーによる明らかな染色性の違いは見られなかったが, May 液をメルク社製, リン酸緩衝液を三菱化学メディエンス社製で染色した白血球5分画が他社の組み合わせよりスコアが若干高かった。

各温度における May 希釈液の pH は3社共にほとんど変化が認められなかった (表4)。

表4 メイグリユンワルド希釈液の各温度における pH (ホリバ社 pH メーター H-7)

メイグリユンワルド液	リン酸緩衝液 1/150M	30℃	25℃	20℃	15℃	10℃	5℃
		pH					
メルク	三菱化学	7.5	7.3	7.4	7.3	7.5	7.6
	武藤化学	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.4
武藤化学	三菱化学	7.4	7.5	7.5	7.4	7.3	7.3
	武藤化学	7.4	7.3	7.3	7.3	7.4	7.2
シスメックス	三菱化学	7.5	7.4	7.6	7.4	7.5	7.4
	武藤化学	7.4	7.5	7.5	7.6	7.4	7.3

考 察

メイグリユンワルド・ギムザ染色は、ロマノフスキー効果を基本原理とする代表的な染色法である^{1) 2) 5)}。May 原液は純メタノール中に塩基性色素のアズール B と酸性色素のエオジン Y が存在し、両色素は結合したままの中性色素として存在しているが、May 原液に水を加えることで両色素は解離し、多彩な色調を生むロマノフスキー効果を生じる¹⁾。染色のはじめに、May 原液へ2～3分浸漬することで細胞を固定し、May 希釈液及びギムザ希釈液の調整に pH6.4～6.8 のリン酸緩衝液を用いることで染色性を安定させている¹⁾。

今回の検討によって、May 希釈液が25℃を超えると、明らかな染色性の低下が認められ、10℃から20℃の温度域で最も良い染色性が得られた。May 希釈液を調整する際、May 原液にリン酸緩衝液を加えると、メタノールの吸水反応によって発熱し、May 希釈液の温度が上昇する。室温環境下で調整した May 希釈液は30℃を超えることもあり、これが染色性の低下と不安定さを招く要因の1つと考えられた。

温度変化によって May 希釈液のイオン均衡が変動し、ロマノフスキー効果の程度に影響があることや、室温が染色性に影響を与えることが知られているが^{1) 2) 4) 5)}、May 希釈液調整時の温度変化は、より直接的に染色性を左右する可能性が示唆された。また、アズール B の濃度によって顆粒の染色性に差がみられると報告があるが³⁾、少なくとも、May 希釈液調整直後の染色は避け、可能であれば20℃以下に冷却してから染色を開始することで、再現性の高い良好な染色性が得られると思われた。

3社の染色液メーカーに染色性の違いは明らかではなかったが、メルク社製染色液は他社よりも塩基性色素が強めに染色される傾向がみられた。これにより赤血球を染める酸性色素と白血球を染める塩基性色素とのコントラストが明瞭になることで白血球の鑑別が容易になったものと考えられた。しかし、至適な染色条件以外では他

社よりも染色性がやや不良になることから、染色液の管理が重要であると考えられた。

武藤化学社やシスメックス社の染色液は外的要因の影響を受けにくいことから、全自動標本作製染色装置で迅速かつ大量の検体を処理する施設で扱いやすく、メルク社製染色液は各血球の微細構造の把握を重視する施設に向いていると考えられた。

今回検討した条件で染色を行うと細胞数が少ない末梢血では核網がやや濃染することがあった。このことから濃度や温度以外に細胞数も考慮して染色をする必要があると思われた。

May 希釈液の至適温度の範囲は比較的広く、それほど厳密な温度管理を必要としないことから、日常検査では May 希釈液を作製後、4℃の冷蔵庫にて保管し、15分程度室温に放置してから染色を開始することで特に問題のない染色性が得られている。

May 希釈液を温度管理する以前は、骨髓異形成症候群の脱顆粒細胞等の鑑別に苦慮することが多く、染色時間の延長や染色液濃度を上げるなどの対処を行っていた。May 希釈液の温度を管理することで、再現性の高い安定した染色性が得られ、微細な形態異常を見逃さず、重要な情報を迅速に提供することが可能となった。

ま と め

メイグリユンワルド・ギムザ染色において、再現性が高く安定した染色性を得るためには May 希釈液の温度管理が不可欠であった。

文 献

- 1) 寺田秀夫：普通染色（ギムザ・ロマノフスキー染色）の基礎 普通染色（ギムザ・ロマノフスキー染色）の実際、渡辺明朗 亀井喜恵子編、血球カラーアトラス、1版、武藤化学株式会社、東京、2001、p71-84.
- 2) 野中恵美：各科領域におけるギムザ染色の有用性
1) 血液・骨髓. Medical Technology, 2008 ; 36 : 459-465.
- 3) 巽典之, 近藤弘, 秋山利行：ギムザ染色による血液細胞観察. 生物試料分析, 2003 ; 26 : 384-389.
- 4) 村上直己, 奈良信雄：骨髓穿刺検査 標本作製から報告まで 第2回染色と細胞判定法. Medical Technology, 1997 ; 25 : 627-632.
- 5) 西国広, 阿南健一, 須田正洋：染色法 普通染色または Romanowsky 染色による形態の違いについて. Medical Technology, 1991 ; 19 臨時増刊 : 630-636.