

気管支喘息における末梢血単球の 動態に関する研究

第 1 編

末梢血単球直接算定法の考案

岡山大学医学部第2内科（主任：木村郁郎教授）

赤 木 克 己

（昭和56年3月18日受稿）

Key words: blood monocytes
nonspecific esterase
alpha-naphthyl butyrate
hexazonium pararosaniline

緒 言

近年末梢血単球—組織貪食細胞系の機能は、特に免疫反応との関連においてしだいに明らかにされつつある。しかし未だ不明な点も多く、殊にアレルギー疾患と末梢血単球との関連については、詳細な観察がほとんど行われていない。末梢血単球は通常の May-Giemsa 染色等では、一部のリンパ球と鑑別困難なことがしばしばあり、従って単球を特異的に染色することが、その役割を研究する上で重要となりつつある。

末梢血単球の特異的染色法は、1958年 Wachstein および Wolf¹⁾ が naphthol-AS acetate を用いて、末梢血および骨髓中の単球の nonspecific esterase 活性を検討したことに端を発している。その後 Löffler²⁾ は同様の検討を行っているが、1964年 Fisher および Schmalzl³⁾ は、単球中に高い nonspecific esterase 活性が認められかつ sodium fluoride (NaF) により本活性は阻害されることを見出した。また Schmalzl および Braunsteiner⁴⁾ は、1968年種々の細胞化学的染色を末梢血および骨髓中の単球に試み、単球中では NaF-sensitive な esterase 活性が最も高いことを示した。そして1971年、Ansley および Ornstein⁵⁾ は、alpha-naphthyl butyrate を substrate として、また coupler と

して Davis および Ornstein⁶⁾ の見出した hexazonium pararosaniline を用い、白血球自動分類に応用した。

現在ひろく行われている単球の特異的染色法⁷⁾ は、上に述べたような方法を modify したものであるが、いずれも塗抹標本を作製し、固定、染色を2段階に分けて行うため、その手技は煩雑であり、末梢血単球の絶対数を算定するには不適當であり、自動分類では高価な算定器を必要とする。

そこで、アレルギー疾患（特に気管支喘息）における末梢血単球の役割を検討するため、著者は Ansley, Braunsteiner らの方法を modify し、通常の白血球数算定と同様の手技で、固定、染色を同時にかつ短時間に行いうる、簡易な末梢血単球の直接算定法を考案し、また健康人において従来の May-Giemsa 染色標本さらに Peroxidase (McJunkin 法) 染色標本による間接法との比較により、本法の信頼性について検討したので、その概略を報告する。

対象ならびに方法

対象：40名のアレルギー性疾患、感染症等を有しない健康人（男女各々20名、年齢20～65才、平均 35.7 ± 14.3 才）よりヘパリン加静脈血2 ml を採取した。

Direct Count of Blood Monocytes

Staining solutions:

- | | |
|--|------------|
| 1) 2% Alpha-naphthyl butyrate
in diethylene glycol |0.2ml |
| 2) Hexazotized pararosaniline in K ₂ HPO ₄ |2.2ml |
| 3) 1.0g Saponin white pure in 20ml of 0.9%
saline solution |0.5ml |
| 4) 10% Formaldehyde |0.5ml |
| 5) 0.1 M Phosphate buffer (pH6.0) |5.0ml |

Solutions 1)-5) are mixed together and for staining

Staining method:

Peripheral blood is diluted with the staining solution in a proportion of 1:10 in a standard leucocyte pipette

Blood monocytes stained with red-brown are counted in a Fuchs-Rosenthal chamber

(the magnitude of a microscope: ×200)

Fig. 1 Procedures for the direct count of blood monocytes

方法：本法の染色液は Fig. 1 に示すごとくである。基質となる alpha-naphthyl butyrate 溶液は、Sigma Chemical 社製 alpha-naphthyl butyrate (1.0gm=1.0ml) を diethylene glycol 50ml に溶解し、stock solution として遮光瓶中に保存した。hexazonium pararosaniline は、算定時毎に以下のごとく作製した。1.0gm sodium nitrite (NaNO₂) を蒸留水 10ml に溶解し 10% stock solution とす。また 1.0gm pararosaniline (Merk 社製) を、2 N HCl 10ml に溶解し 10% stock solution とし遮光瓶中に保存する。そして pararosaniline 溶液を加温し完全に溶解した後、Saunders の著書⁸⁾にみられる Schwalbe の方法⁹⁾を modify し、0.1ml を短試験管にとり freezer 中で凍結させたのち、ただちに等量の sodium nitrite 溶液とよく混和、振盪した。この混和液に 0.1M K₂HPO₄(pH6.0) 2.0ml を加えた。一方他の短試験管に alpha-naphthyl butyrate 溶液 0.2ml をとり、0.1M phosphate buffer (pH6.0) 5.0ml を加えよく混和する。以上 2 本の短試験管中の溶液を混和し、これに saponin 溶液、formalin 溶液をおのおの 0.5 ml 加え、ろ紙にてろ過後直接算定に用いた。なお saponin 溶液は Merck 社製 Saponin white pure[®] 1.0gm を 20ml の生理食塩水に溶解し stock solution とした。

また本染色液の pH は 5.8—6.2 であることを必要とするが、一般に pH はほぼ 6.1 でありそのまま使用可能であり、HCl あるいは KOH による pH の修正は不要であった。

染色法：一般の白血球算定法に準じ、白血球算定用メランジュールに被検血液を 1 の目盛まで採り、直接算定用染色液を 11 の目盛まで吸い、数分間室温に放置後、Fuchs-Rosenthal 計算盤上にて、200 倍光顕下に赤褐色に染色された細胞数を算定し、その値に 3.125 を乗じて 1 cmm 当りの単球数を算出した。なお被検血液は算定まで silicon 加工試験管に入れ 4℃ にて保存した。

従来の間接法による算定：白血球数は型のごとく Bürker-Turk 計算盤にて算定した。一方塗抹標本は、空気乾燥後 May-Giemsa 染色（うち 20 例では peroxidase 染色も施行）し、また比較のため白血球は 100, 500, 1,000, 1,500 個の 4 種の分類を行ない、以上の白血球数およびその分類から 1 cmm 当りの単球数を算出した。

成 績

1) 末梢血単球 esterase 染色の特徴

単球は、被検血液および染色液をメランジュールにとればただちに染色されるが、算定前に 1 ないし 2 分メランジュール内に置いた場合に、色調がより強まる傾向が観察された。Photo 1, 2 および 3 は、染色された単球の 200, 400 および 1,000 倍光顕下でのそれぞれの像である。写真に示されるごとく、好中球、リンパ球、好酸球は全く染色されず、好塩基球も全く染色されない。一方単球は赤褐色に濃染され、他の白血球から容易に鑑別可能である。低倍率の像では、単球はび慢性に染色されて見えるが、高倍率では細胞質が淡くび慢性に染色された中に、さらに濃染された顆粒が散在性に認められ、この顆粒が lysosome 顆粒に一致するものと考えられる。なお一度染色された単球の色調は、12 時間以上の長時間にわたり不変であった。

2) 直接算定法と間接法との相関

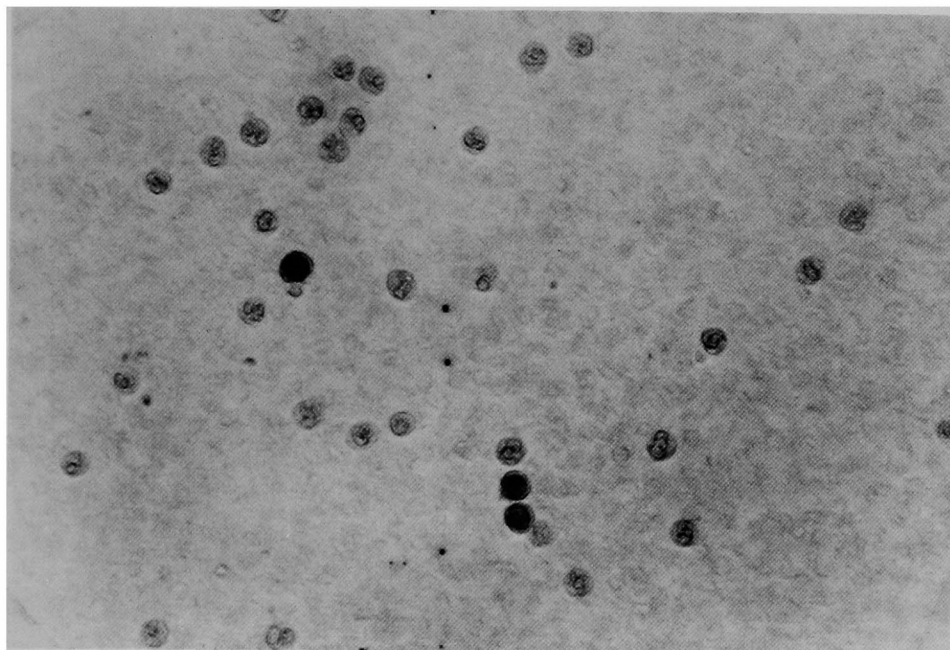


Photo 1 Microscopic view of stained monocytes ($\times 200$)

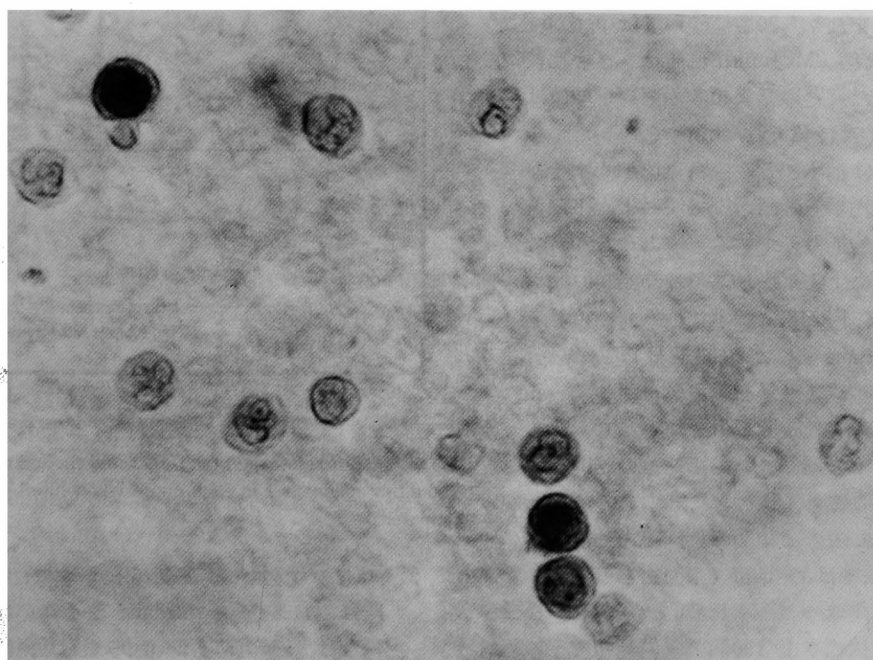


Photo 2 Microscopic view of stained monocytes ($\times 400$)

Photo 3 Microscopic view of stained monocytes ($\times 1,000$)

40名の健康人において、本法により算定した単球数と、May-Giemsa染色標本より間接的に算定した単球数を比較検討した。またうち20名については peroxidase 染色 (McJunkin法) 標本とも比較検討した。その結果40名の平均単球数は、直接法では $245 \pm 91/\text{cmm}$ であった。

Fig. 2 に示すごとく、白血球 100 個分類時の平均単球数は、直接法による平均値と比較的近似している。一方うち20名の直接法による平均単球数は $258 \pm 96/\text{cmm}$ であり、Fig. 3 に示すごとく、この群を peroxidase 法により100個分類した場合の平均単球数は、やや高値を示しているが、これも比較的近似していると言える。次に個々の例について単球数の相関を検討してみると、Fig. 4 に示すごとく May-Giemsa 法では相関係数 $r=0.69$ 、peroxidase 法では $r=0.80$ と、両法ともばらつきが大きく、単球のごとく比較的数の少ない白血球では、塗抹標本上 100個のみの分類でその絶対数を算定すると、非常な誤差を生じ信頼性に乏しい値になると考えられる。白血球 500 個まで分

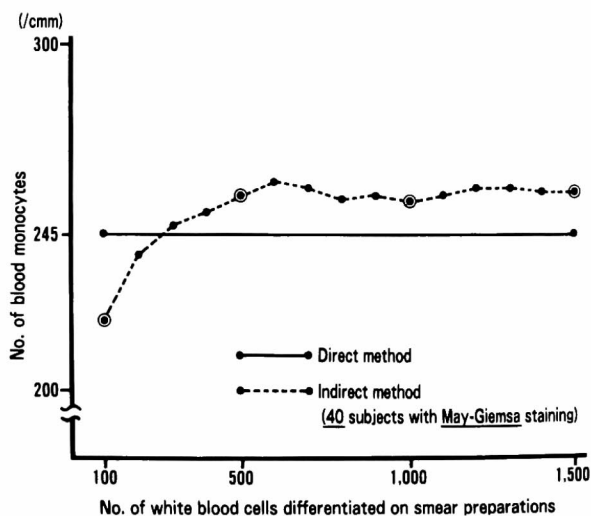


Fig. 2 Correlation between the direct and the indirect method of counting monocytes in each number of white blood cells calculated

類した場合には、Fig. 6 に示す様に May-Giemsa 法および peroxidase 法それぞれとの相関係数は、 $r=0.87$ 、 $r=0.95$ であり、100個分類時に比べかなり良好な相関が認められるが、May-Giemsa 法ではまだかなりのばらつきがみられ

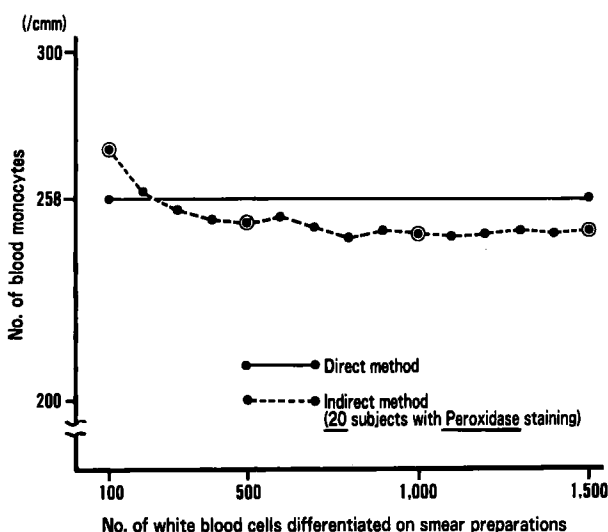


Fig. 3 Correlation between the direct and the indirect method of counting monocytes in each number of white blood cells calculated

えられる。なお本法による単球数は、May-Giemsa法および peroxidase 法による単球数のほぼ中間的な値をとることが、Fig. 2 および Fig. 3 より示唆される。

3) 染色性の経時的変化の検討
採血および染色液の調製をほぼ同時に行い、その直後および1時間毎に10時間後まで、5症例について単球の被染色性を検討した。Fig. 8 に示すごとく、5症例の平均単球数は直後では267/cmm であり、その後次第に色調の淡くなる傾向が認められたが、平均単球数としては7時間後位までほぼ一定しており、その後8, 9, 10時間後には急速に減少傾向が認めら

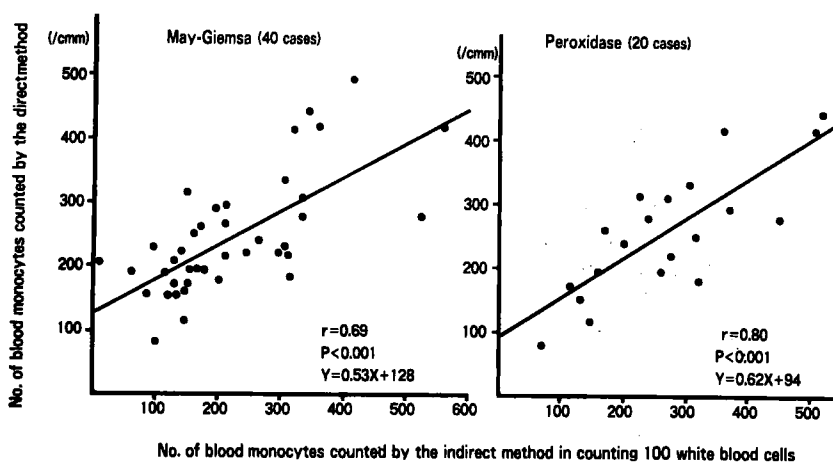


Fig. 4 Correlation between the direct and the indirect method of counting monocytes

る。一方白血球1,000個分類時には、Fig. 6に示すごとく各々 $r=0.93$, $r=0.98$ であり、ほぼ信頼しうる値であろうと考えられる。最後に、白血球1,500個まで分類した場合、両者の相関係数は各々 $r=0.97$, $r=0.99$ であり、非常に良好な相関関係が認められた (Fig. 7)。

以上示したごとく、今回著者の考案した末梢血単球の直接算定法は、一般に白血球を塗抹標本上少なくとも1,000個ないし1,500個分類した場合に匹敵する信頼性の高い方法であると考

れた。この次第に色調の淡くなる傾向は、被検血液を室温に放置した場合には、4℃保存の場合よりやや著明であったが、7時間を過ぎてよりの染色性の急速な低下は、双方の場合で認められた。この染色性の急速な低下の原因が、血液すなわち単球中の esterase 活性の低下にあるのか、あるいは染色液にあるのかを検討した。その結果を Table 1 に示しているが、調製直後の染色液であれば採血後8時間以後でも染色状態は良好であり、一方染色液調製後の時間の経

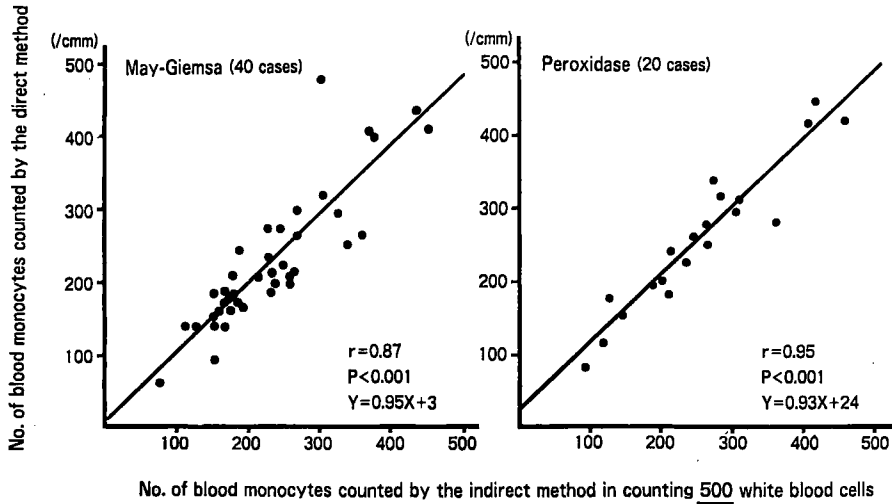


Fig. 5 Correlation between the direct and the indirect method of counting monocytes

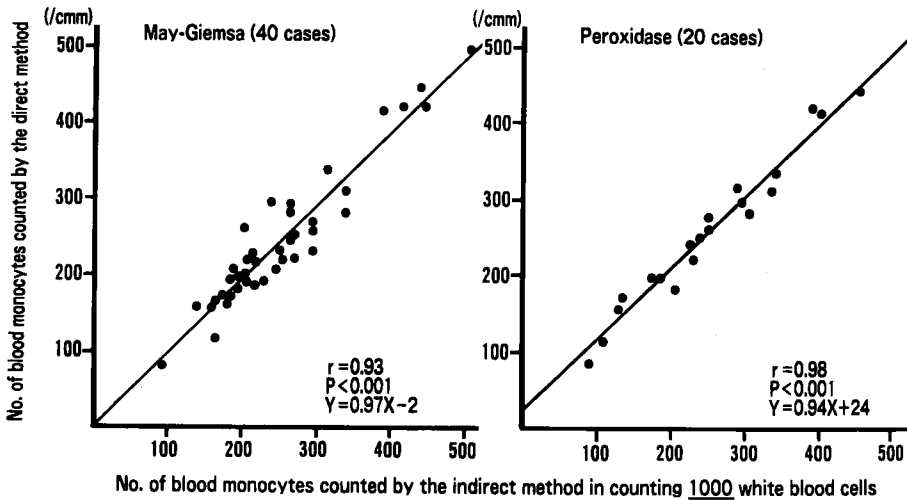


Fig. 6 Correlation between the direct and the indirect method of counting monocytes

過とともに、採血直後であっても次第に染色能力が低下し、8時間以上経過するとその傾向は特に著明であった。すなわち、染色性の低下の原因は主として染色液の側にあり、比較的不安定であるとされる hexazonium pararosaniline に起因するものと考えられた。以上の結果より、被検血液は4℃保存の場合かなり長時間(約10時間)算定可能であるが、染色液調製後は可及的すみやかに算定することが必要であると考えられた。

考 案

組織、細胞化学的方法は、今日基礎医学、臨床医学の分野でひろく用いられている。そしてその一領域であるところの酵素化学的方法は、1939年 Gomori¹⁰⁾や同時期に高松¹¹⁾が、sodium glycerophosphate および calcium nitrate を用いた alkaline phosphatase 検出の組織化学的テクニックを開発したことにまでさかのぼる。1944年 Menten ら¹²⁾は、alkaline phosphatase

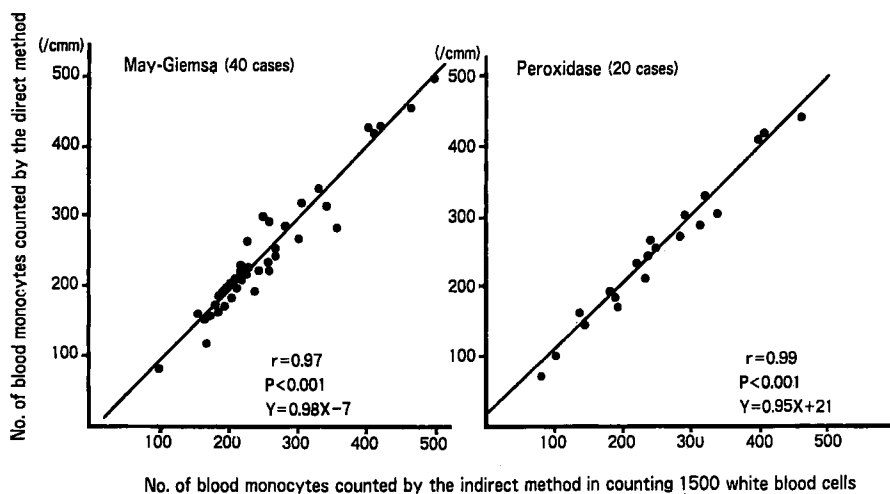


Fig. 7 Correlation between the direct and the indirect method of counting monocytes

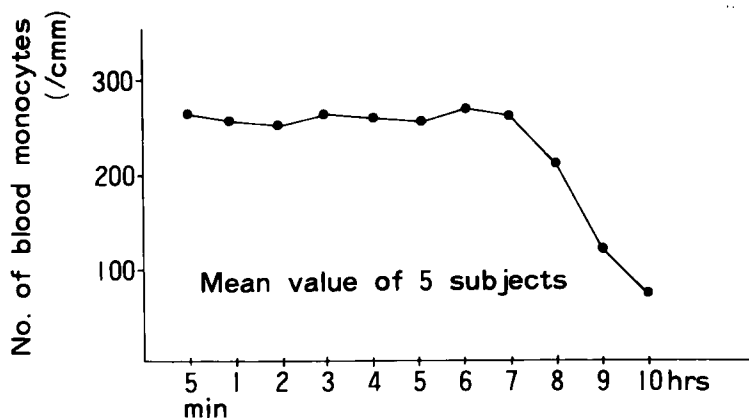


Fig. 8 Changes in the number of stained monocytes by the time after drawing blood and preparation of the staining solution

Table 1
Staining conditions of monocytes regarding solution and blood samples

Peripheral blood	Staining solution	Staining ability
Immediately	Immediately	Well stained
Immediately	Over 7 hours	Poorly stained
Over 7 hours	Immediately	Well stained

の検出に naphthol の燐酸エステルおよび diazonium salt を導入した。一方 nonspecific

esterase に関する研究は、1949年 Nachlas および Seligman¹³⁾ が beta-naphthyl acetate と diazonium salt を導入したことに始まると考えられる。その後、基質として種々の naphthol 化合物が合成され応用されたが、1958年 Wachstein および Wolf¹⁴⁾ が、血液単球が他の細胞に比較して著しく強い naphthol-AS-acetate esterase 活性

を示すことを報告し、3年後 Löffler²⁾ は同様の検討を行っている。1964年 Fisher と Schmalzl³⁾ は、単球の強い naphthol-AS-acetate esterase 活性が、sodium fluoride (NaF) により著明に抑制されることを見出した。また Schmalzl および Braunsteiner⁴⁾ は、1968年種々の酵素化学的染色を末梢血および骨髓中の単球に試み、単球中では NaF-sensitive な esterase 活性が最も高いことを示した。そして1971年、Ansley および Ornstein⁵⁾ は、alpha-naphthyl butyrate を基質とし、また coupler として Davis および Ornstein⁶⁾ の見出した hexazonium pararo-

saniline を用い、単球中のみ強い esterase 活性を認めることを見出した。

今回の末梢血単球の直接算定法でも彼らの方法に従い、substrate として alpha-naphthyl butyrate を、coupler として hexazonium pararosaniline を用いた。彼らの方法では alpha-naphthyl butyrate を用いた、彼らの方法では alpha-naphthyl butyrate は 0.5%、hexazonium pararosaniline は 3.0% の濃度のものを用いたが、著者はこれらの濃度をそれぞれ 2.0% および 10.0% に上げより強い染色性を得た。また hexazonium pararosaniline を作るに当っては特に注意を払った。これは 10% pararosaniline 溶液と等濃度の sodium nitrite (NaNO₂) より作るのであるが、室温ではほとんど反応せず、末梢血単球は全く染色されなかった。そのため Schwalbe の方法^{8,9)}に準じ、pararosaniline 溶液、sodium nitrite 溶液を氷水中で冷却すると、より安定した hexazonium pararosaniline を得ることが可能であり、単球は良好に染色された。しかしこの手技はかなり煩雑であるため、短試験管に pararosaniline 溶液を採り freezer にて凍結させた後、sodium nitrite 溶液とよく振盪させながら反応させることにより、安定した化合物を得ることが可能であった。

血液細胞の直接算定法は、末梢血好塩基球について、Moore¹⁴⁾、Kovačs¹⁵⁾、Shelley¹⁶⁾らによりなされ、さらに木村ら¹⁷⁾は容易に臨床に用いることの出来る好塩基球及び好酸球の同時直接算定法を考案した。彼らは、視野中の白血球に干渉する赤血球の影響を除くため、溶血毒である saponin を用いている。Saponin はまた monocyte esterase の inhibitor を inactivate する¹⁸⁾と考えられており、著者も溶血のため saponin を用いた。しかし alcohol は esterase にとってきわめて有害である¹⁹⁾ため、彼らのしばしば用いた alcohol saponin 溶液は使わず、生理食塩水に溶解して用いた。また染色液をより安定とするため、pH 6.0 の phosphate buffer を加え、このため直接算定用染色液の pH は 6.1 前後となり、調製後の pH の修正は不要となっている。固定には型どおりの 10% formalin を用いた。

本法の染色原理は以下のごとくに考えられる。すなわち、基質である alpha-naphthyl butyrate は単球中の nonspecific esterase により加水分解され、alpha-naphthol と butyric acid となる。その結果生じた alpha-naphthol は hexazonium pararosaniline と結合し、細胞内で不溶性の化合物を作り赤褐色を呈する。これは低倍率光顕下では、細胞質があたかも homogeneous に染ったかに見えるが、高倍率では細胞質が淡く染った中に、さらに識別可能な褐色の顆粒が散在性に認められ、これが lysosome 顆粒に一致するものと考えられる。

この様な組成および染色原理よりなる本染色法の信頼性を、従来の塗抹標本による間接法との比較により検討した。その結果、本法による単球数は、塗抹標本上で少なくとも白血球 1,000 個以上分類した値に近似しており、本法の信頼性は非常に高いと考えられた。ところで本法による単球数は May-Giemsa 染色標本より算出した単球数よりわずかに少い傾向にあり、一方 peroxidase 法による単球数よりやや多い傾向が示唆された。これは、本法により染色された単球の一部には、200倍光顕下で観察しても、被染色性の低い単球が認められ、ごく一部には全く染色されない単球もあるであろうためと考えられる。Kaplow²⁰⁾も、alpha-naphthyl acetate, fast blue BB を用いた nonspecific esterase 染色と peroxidase 染色、acid phosphatase 染色の combination stain による検討で、6% の単球では nonspecific esterase 活性が認められず、peroxidase 活性は 11% の単球で検出されなかったとしている。この様な理由により、本法による単球数は May-Giemsa 法と peroxidase 法による単球数との中間的な値をとるものと考えられる。

また通常の esterase 染色では、単球が慢性に染まる以外に、一部リンパ球で染色顆粒がみられる^{5,21)}とされているが、本法では確認し得なかった。

一方、今回対象とした健康人 40 名の本法による単球数は 245 ± 91/cmm であり、Meuret ら²²⁾、Munan ら²³⁾の示した値よりやや低値であるが、これはヘパリン加血液であること、静脈血であ

ること、わずかではあるが染色されない単球があること等によるものと考えられる。

本染色液の染色性についての検討では、染色性は主として hexazonium pararosaniline の安定性に依存するものと考えられる。diazonium salt は不安定なものである^{19,24)}ことは、ひろく知られており、安定な化合物を必要とするため、調製時毎に作る必要があるとされ、かつ低温下での反応が肝要である。そのため今回は、freezer 中で pararosaniline 溶液を凍結させたのち、sodium nitrite 溶液と反応させた。この手技により hexazonium pararosaniline は安定なものとなり、臨床上問題は無いと考えられた。しかし染色液調製後約7時間が critical point であり、調製後は可及的すみやかに使用することが望ましいと考えられた。

また alpha-naphthyl butyrate 溶液は、古くなるにつれ phosphate buffer と結晶を作り易くなり、染色性も低下する傾向が認められるため、5~6ヶ月毎に新たに作り変えることが推められる。

なお本法は、末梢血だけでなく、分離した単核球中の単球、気管支・肺領域ないし腹腔 macrophage の同定にも応用しうるものと考えられる。

結 語

alpha-naphthyl butyrate および hexazonium pararosaniline を用いた簡易な末梢血単球の直接算定法を考案した。本法では、単球のみ赤褐色に染色され、他の白血球との鑑別は容易であり、通常の白血球数算定法と同様の方法で、短時間に末梢血単球数の算定が可能であった。

本法による健康人40名の末梢血単球数は、 $245 \pm 91/\text{cmm}$ であり、May-Giemsa 染色標本および peroxidase 染色標本より間接的に求めた単球数との比較では、前者よりやや低値、後者よりやや高値である傾向が認められたが、一般に塗抹標本上、少なくとも白血球 1,000個以上分類時に匹敵する信頼性の高い方法であると考えられた。

本法は、日常臨床に充分応用可能であり、さらに macrophage の検索にも応用し得るものと考ええる。

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深謝いたします。さらに直接ご指導、ご教示いただいた谷崎勝朗講師（現三朝分院講師）に深謝いたします。

なお本論文の要旨は、第41回日本血液学会総会（昭和54年4月6日）において発表した。

文 献

1. Wachstein, M. and Wolf, G.: The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears. *J. Histochem. Cytochem.* **6**, 457-457, 1958.
2. Löffler, H.: Cytochemischer Nachweis von unspezifischer Esterase in Ausstrichen. *Klin. Wschr.* **39**, 1220-1227, 1961.
3. Fischer, R. and Schmalzl, F.: Über die Hemmbarkeit der Esteraseaktivität in Blutmonocyten durch Natriumfluorid. *Klin. Wschr.* **47**, 751-751, 1964.
4. Schmalzl, F. and Braunsteiner, H.: On the origin of monocytes. *Acta Haematol.* **39**, 177-182, 1968.
5. Ansley, H. and Ornstein, L.: Enzyme histochemistry and differential white cell counts on the Technicon® Hemalog D. *Adv. Automated Anal.* **1**, 437-446, 1971.
6. Davis, B.J. and Ornstein, L.: High resolution enzyme localization with a new diazo reagent, "Hexazonium pararosaniline". *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 297-298, 1959.
7. Yam, L.T., Li, C.Y. and Crosby, W.H.: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* **55**, 283-290, 1971.
8. Saunders, K.H.: The formation of diazo-compounds. In *The Aromatic Diazo-Compounds and Their Te-*

- chnical Applications*, Edward Arnold & Co., London pp. 1—9, 1949.
9. Schwalbe: *Zeit. Farb. Ind.* 4, 433—433, 1905.
 10. Gomori, G.: Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 42, 23—26, 1939.
 11. Takamatsu, H.: Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase. Histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. *Trans. Jpn. Pathol. Soc.* 29, 492—498, 1939.
 12. Menten, M.L., Junge, J. and Green, M.H.: A coupling histochemical azo dye test for alkaline phosphatase in the kidney. *J. Biol. Chem.* 153, 471—477, 1944.
 13. Nachlas, M.M. and Seligman, A.M.: Evidence for the specificity of esterase and lipase by the use of three chromogenic substrates. *J. Biol. Chem.* 181, 343—355, 1949.
 14. Moore, J.E. and James, G.W.: A simple direct method for absolute basophil leucocyte count. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 82, 601—603, 1953.
 15. Kovács, G.S.: A simple direct method for absolute basophil and eosinophil counts from the same blood sample. *Folia Haematol Neue Folge.* 5, 166—175, 1961.
 16. Shelley, W.B. and Parnes, H.M.: The absolute basophil count. *J. Am. Med. Assoc.* 192, 368—370, 1965.
 17. 木村郁郎, 谷崎勝朗: 好塩基球及び好酸球の適切な同時直接算定法の考案とその臨床的評価. 医学のあゆみ 69, 25—28, 1969.
 18. Mansberg, H.P., Saunders, A. M. and Groner, W.: The Hemalog D white cell differential system. *J. Histochem. Cytochem.* 22, 711—724, 1974.
 19. Lison, L. (今泉正訳): 酵素類. *In Histochemie et Cytochemie Animales*, Gauthier-Villars & Co. (白水社), Paris (東京) pp. 523—526, 1960(1962).
 20. Kaplow, L.S.: Cytochemical heterogeneity of human circulating monocytes. *Acta Cytologica* 19, 358—365, 1975.
 21. Horwitz, D.A., Allison, A.C., Ward, P. and Kight, N.: Identification of human mononuclear leucocyte populations by esterase staining. *Clin. Exp. Immunol.* 30, 289—298, 1977.
 22. Meuret, G., Bremer, C., Bammert, J. and Ewen, J.: Oscillation of blood monocyte counts in healthy individuals. *Cell Tissue Kinet.* 7, 223—230, 1974.
 23. Munan, L. and Kelly, A.: Age-dependent changes in blood monocyte populations in man. *Clin. Exp. Immunol.* 35, 161—162, 1979.
 24. 小田良平: アゾ染料. 染料化学, 共立全書, 東京 pp. 8—56, 1954.

**Studies on paranumerical changes of blood monocytes
in bronchial asthma**

**Part 1. Studies on the direct counting method of blood
monocytes**

Katsumi AKAGI

Second Department of Internal Medicine, Okayama University

Medical School

(Director: Prof. I. Kimura)

A new, simple method for direct count of blood monocytes, was developed using alpha-naphthyl butyrate and hexazonium pararosaniline. This method enables us easily to differentiate monocytes specifically stained red-brown from other white blood cells in the same manner of enumeration of WBC.

The average of absolute monocyte count in 40 healthy volunteers was 245 ± 91 /cmm, slightly less than the number indirectly calculated from May-Giemsa stained smears and slightly greater than the number from peroxidase stained smears. In general, this new method seemed to be as reliable as the indirect method differentiating 1,000 leukocytes or more in blood smears. Thus, the method described in this paper can be used in ordinary laboratories and is also applicable to identification and enumeration of macrophages.