

# 平成26年度第1回血液検査研修会

## 特殊染色を見直そう！ ペルオキシダーゼ染色について



千葉県がんセンター  
長津 知嗣



# ペルオキシダーゼ染色の原理

ペルオキシダーゼ(POD)は、水素供与体の水素を水素受容体である過酸化化物に移行させる過程に作用する酸化還元酵素の一種

水素受容体に過酸化水素を用い、PODの作用により水素供与体が酸化・重合することにより発色することで存在を確認

染色法のすべて 医歯薬出版(株)



# 原理 図解

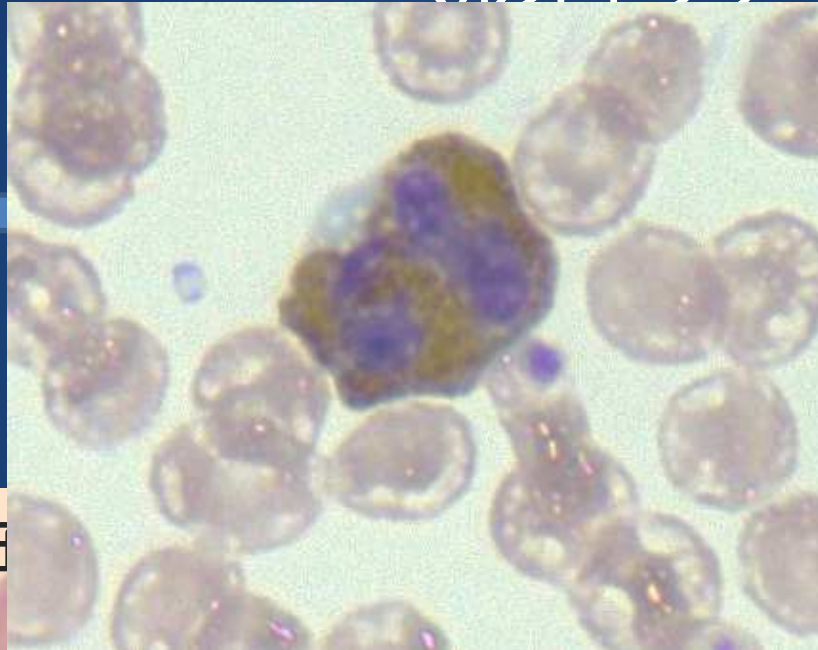
ペルオキシダーゼ反応

発色性  
基質



AH<sub>2</sub>

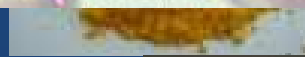
細胞質内に存在



基質から水素が  
奪われる→発色

(発色) 2H<sub>2</sub>O

ペルオキシダーゼ  
反応



CHIBA CANCER CENTER

# 臨床的意義

## • 細胞鑑別

→特に骨髄(顆粒球)系細胞とリンパ球系細胞との鑑別. 非リンパ性白血病の鑑別に有用

※FAB分類では白血病細胞の3%以上陽性  
→顆粒系白血病由来とする

## • 殺菌作用

→生体防御に関わるペルオキシダーゼ酵素の有無の確認

# ペルオキシダーゼ染色の種類

# ベンチジン誘導体

- benzidine base
- 3,3' -diaminobenzidine (ICSH推奨法)
- benzidine dihydrochloride (ICSH推奨法)

方法：Mc Junkin法, DAB法, BDH法…

陽性色調：黄褐色, 黄～茶褐色

ICSH推奨法は他にも…

カルバゾール誘導体

3-amino-9-ethylcarbazole:3AC法



# フルオレイン誘導体

- 2,7-diaminofluorene

方法：FDA法，重松らの変法…

陽性色調：黄緑色，緑褐色，青緑色



# ナフトール誘導体

- $\alpha$ -naphthol
- 4-chloro-1-naphthol

方法：4-chloro-1-naphthol法

陽性色調：青色(暗青色)





# DAB染色 手順 (ICSH 推奨法)



水洗  
約30秒

冷風乾燥させ、鏡検

# 固定時の注意点

- (DAB法の場合) 固定液は室温に戻してから
- 固定不十分：赤血球が溶血し見にくい標本に
- 固定液の劣化：陽性顆粒がきれいな顆粒状を呈さない
- 固定液の水洗：残らないようによく水洗する

# DAB染色 手順 (ICSH 推奨法)



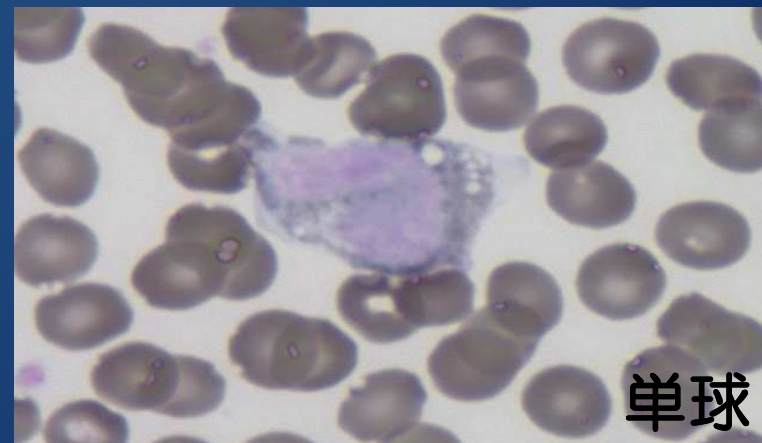
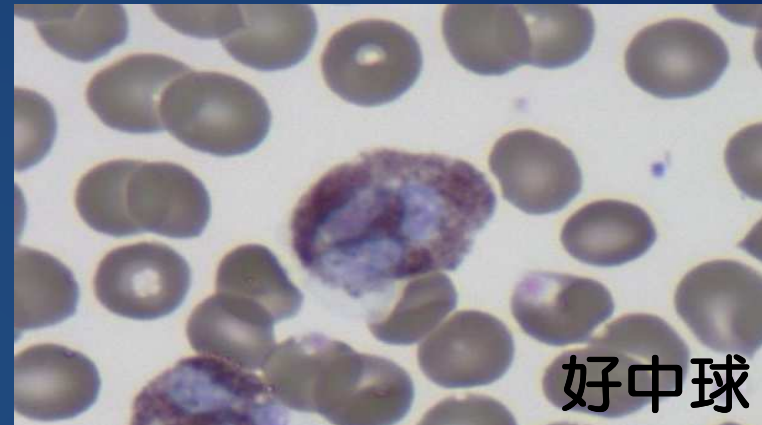
水洗  
約30秒

冷風乾燥させ、鏡検

# 染色時（反応液）の注意点

- 反応液：調整直後は無色透明。時間経過とともに濁り・茶褐色調に着色  
→調整後数時間は良好に反応
- 3%過酸化水素水の添加は忘れずに  
過剰添加もNG

# 過酸化水素の不添加と過剰添加



過酸化水素不添加 ×1000

過酸化水素過剰添加 ×1000

# DAB染色 手順 (ICSH 推奨法)



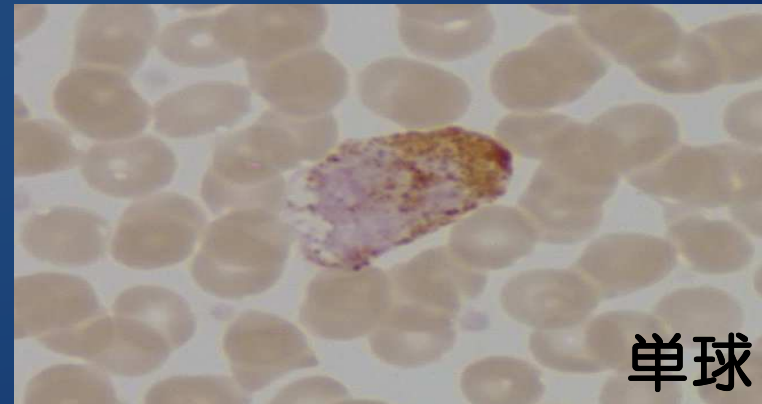
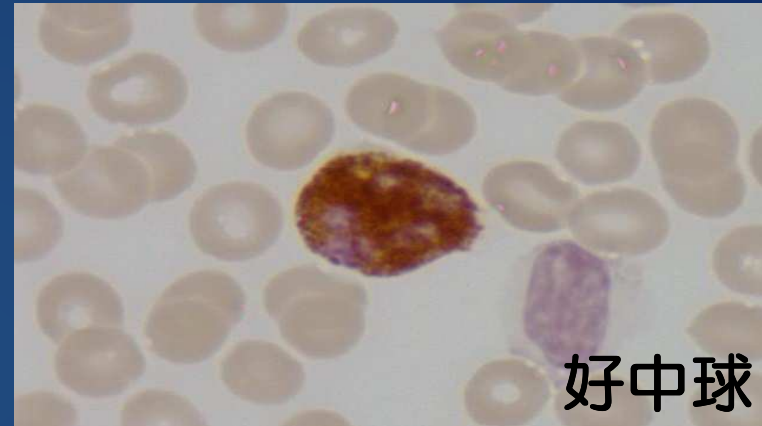
水洗  
約30秒

冷風乾燥させ、鏡検

# 後染色（核染色）時の注意点

- ギムザ染色，メイ・ギムザ染色といった普通染色で行う
- （マイヤー，カラッチなど）ヘマトキシリンでも後染色は可能
- 弱陽性細胞の観察時はヘマトキシリン染色の方が判定しやすい場合もある

# 後染色の違い

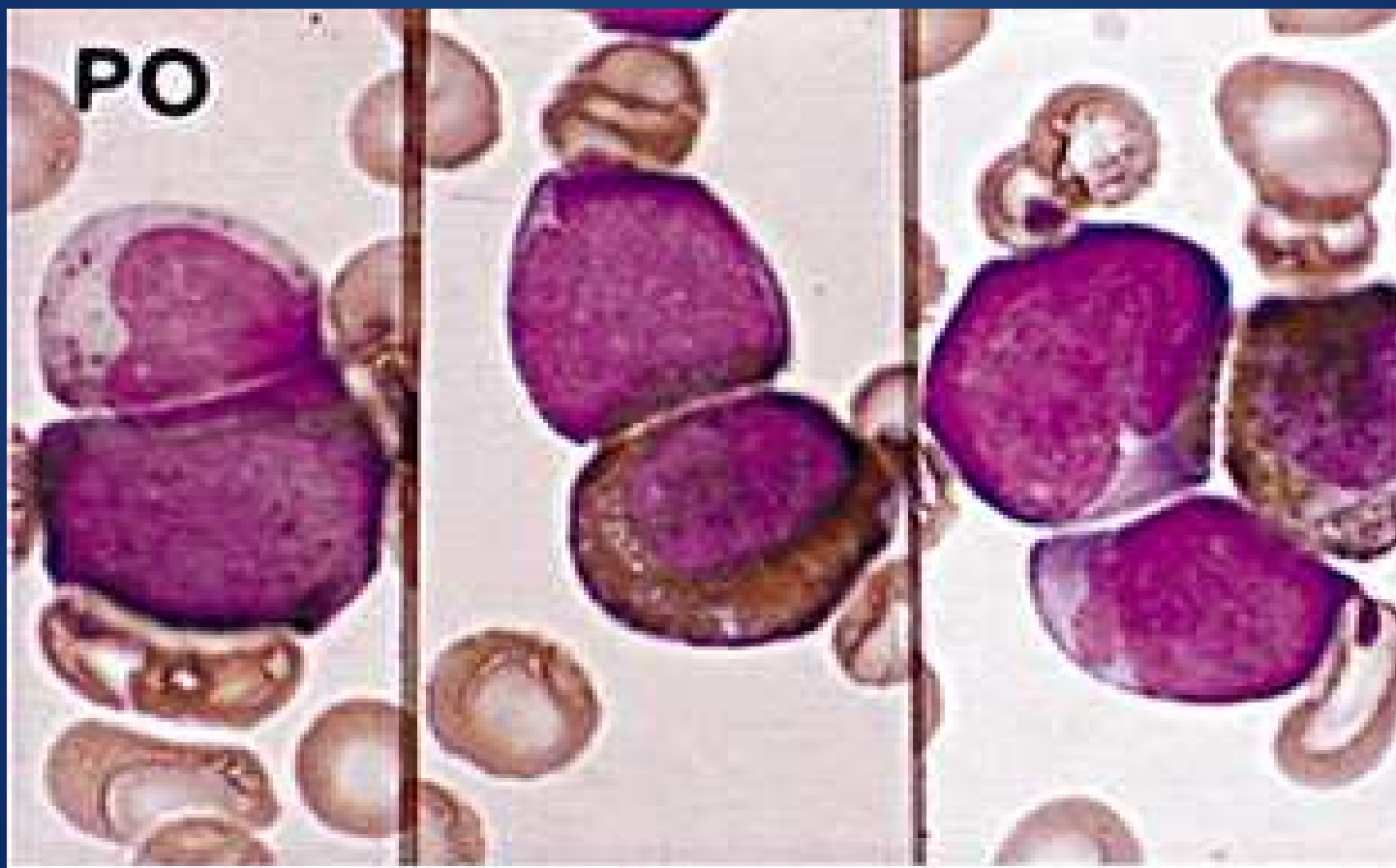


ギムザ染色 ×1000

マイヤー・ヘマトキシリン染色  
×1000



# 偽陽性について



ホームページより転載

# 当センターでの ペルオキシダーゼ染色法

## • Mc Junkin法

Benzidin（在庫分のみ） 0.8g

過酸化水素（2%過酸化水素水） 10ml

メタノール（80%メタノール） 200ml

調整

（500ml調整時）

調整したものは遮光ビンに入れ冷蔵庫保存

# 当センターでの染色手順 Mc Junkin法

反応液を標本の上に満載させる

3分

反応液:蒸留水=1:2の割合で蒸留水を加える

3分

一度水洗し、蒸留水を標本に載せる

3分

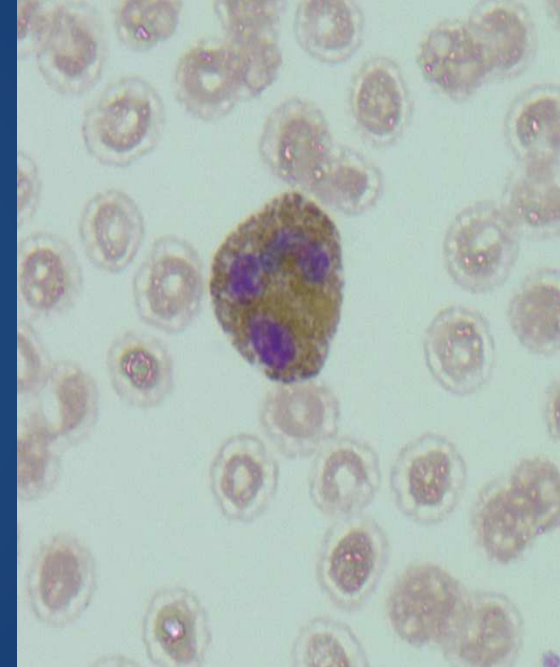
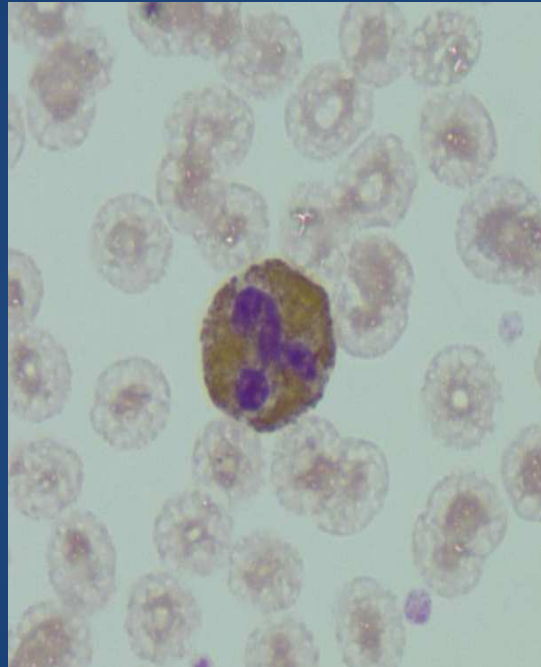
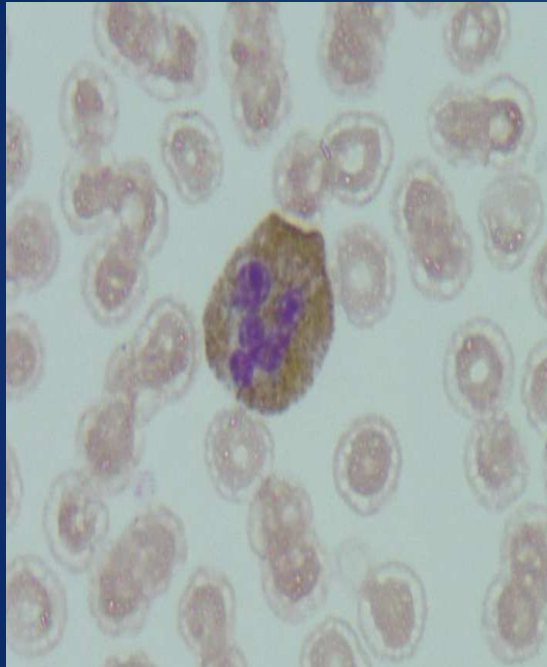
ギムザ染色 約15分

# 当センターでの染色の注意点

- 反応液と追加蒸留水の量を1:2の割合にする  
→反応が不十分になるため
- 反応液添加時間が長い  
→ベンチジン結晶の析出，赤血球の仮性ペルオキシダーゼ出現し判定困難に
- 後染色の染まりが薄い場合  
→3～5分追加染色し，評価する

# 蒸留水の割合での染色態度

(反応液：蒸留水)



×1000

1 : 1

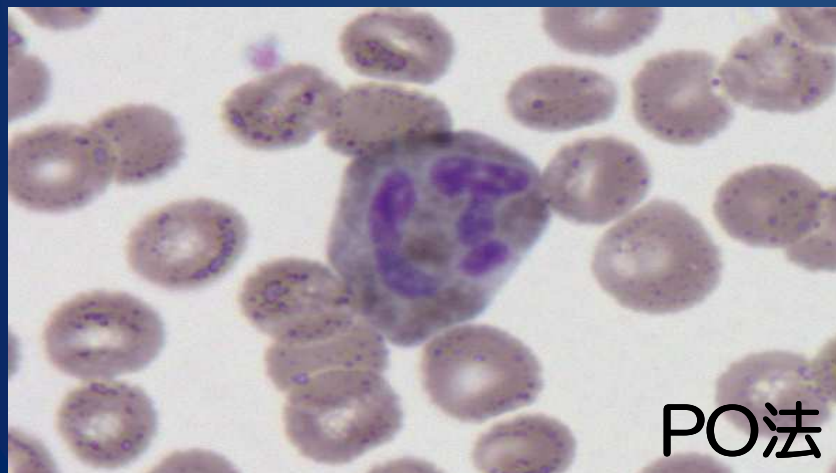
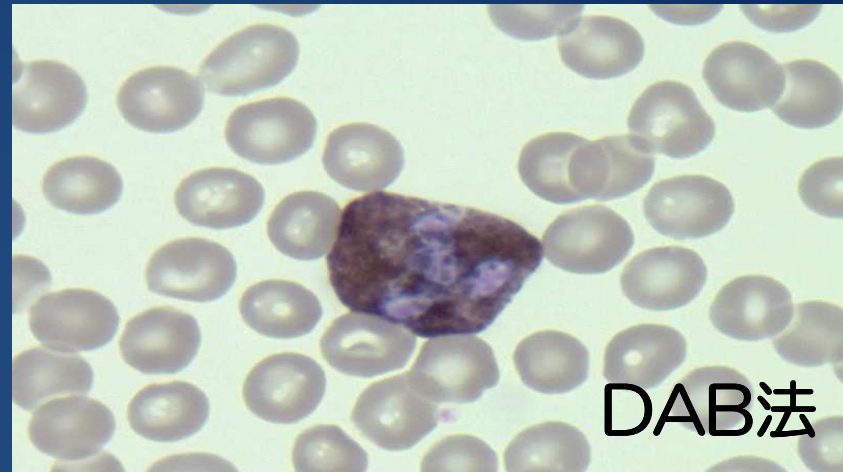
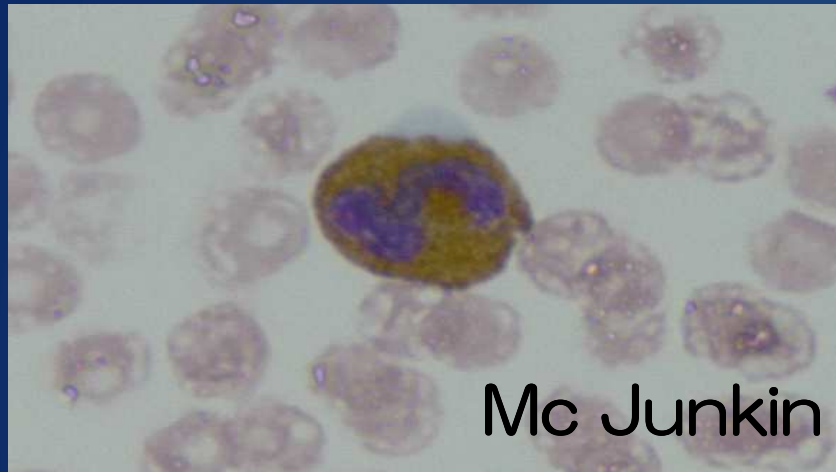
1 : 2

1 : 4

# 各細胞の染色態度

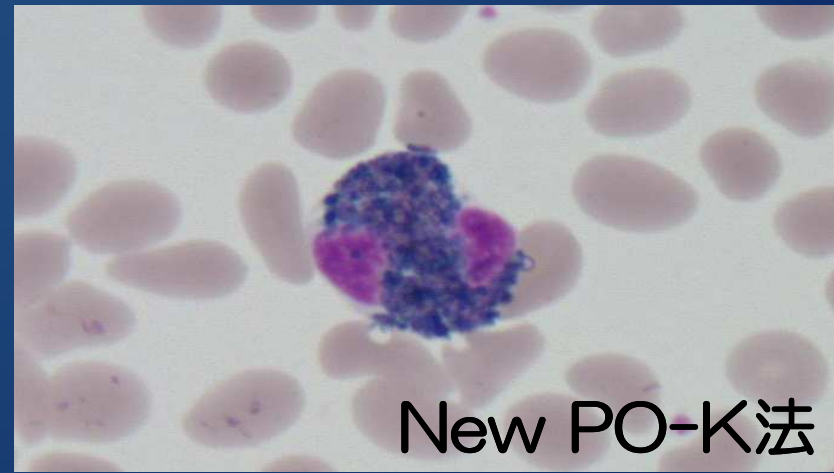
血球の種類	染色態度
骨髓芽球	(-) ~ (+)
好中球系 (前骨髓球~成熟好中球)	(+) ~ (++)
好酸球	(++)
好塩基球	(-) ~ (+)
単芽球	(-) ~ (±)
単球	(±) ~ (+)
リンパ球	(-)
形質細胞	(-)
赤芽球	(-)
骨髓巨核球	(-)
血小板	(-)

# 各細胞の染色態度の比較 好中球



× 1000

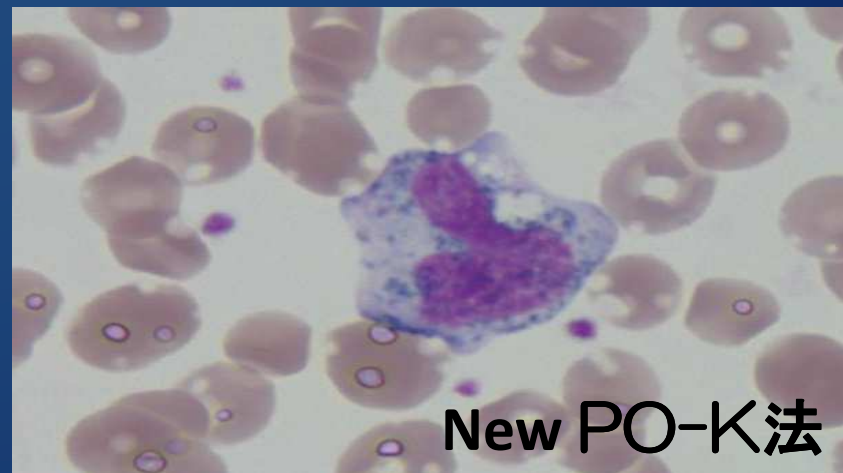
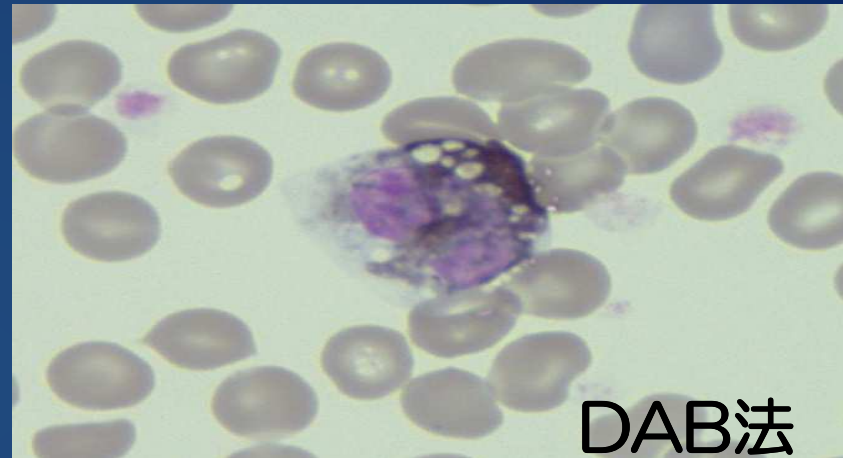
# 各細胞の染色態度の比較 好酸球



×1000



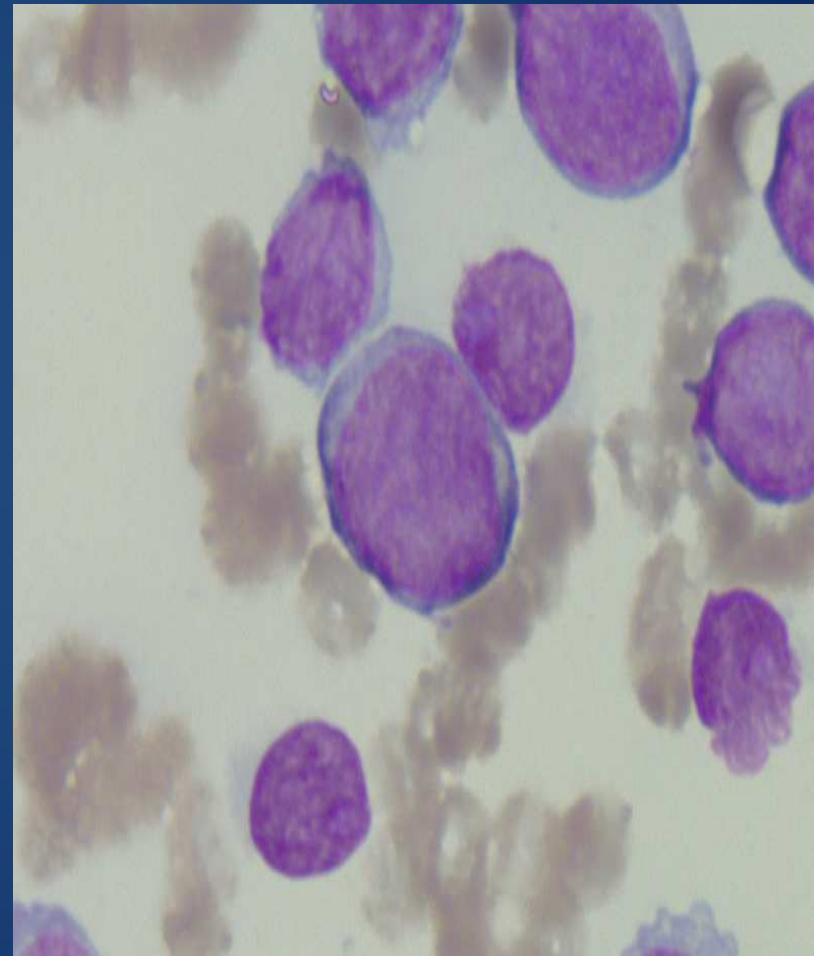
# 各細胞の染色態度の比較 単球



×1000

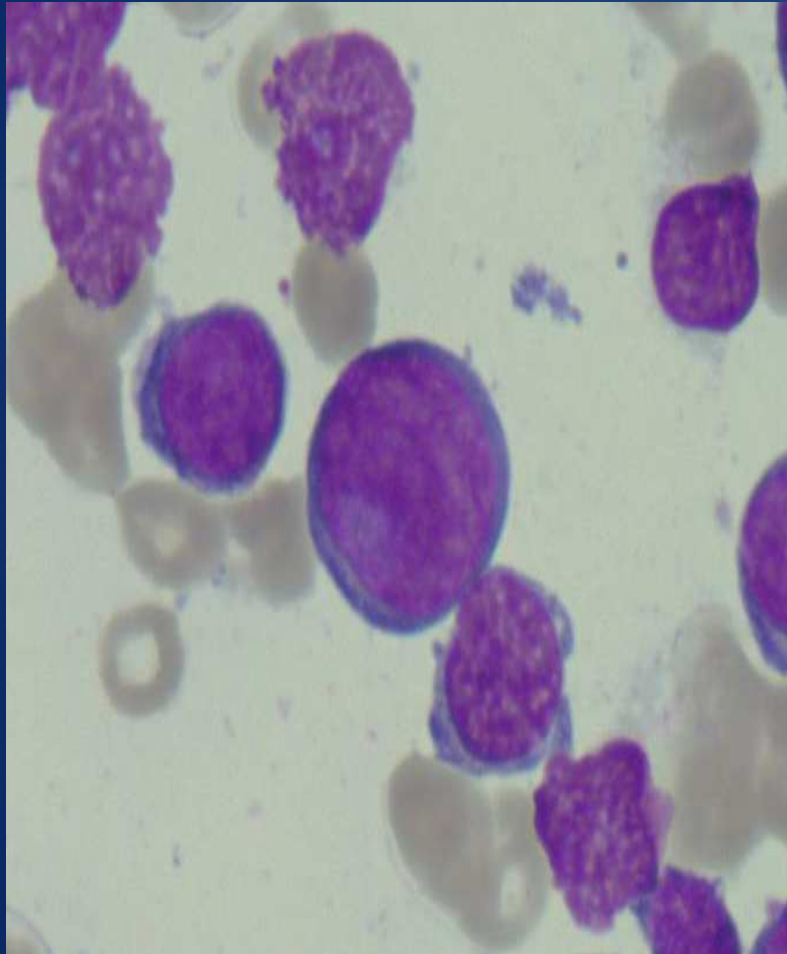
# 症例でのペルオキシダーゼ 染色の染色態度

# 症例 1



ペルオキシダーゼ染色  
×1000

# 症例 1



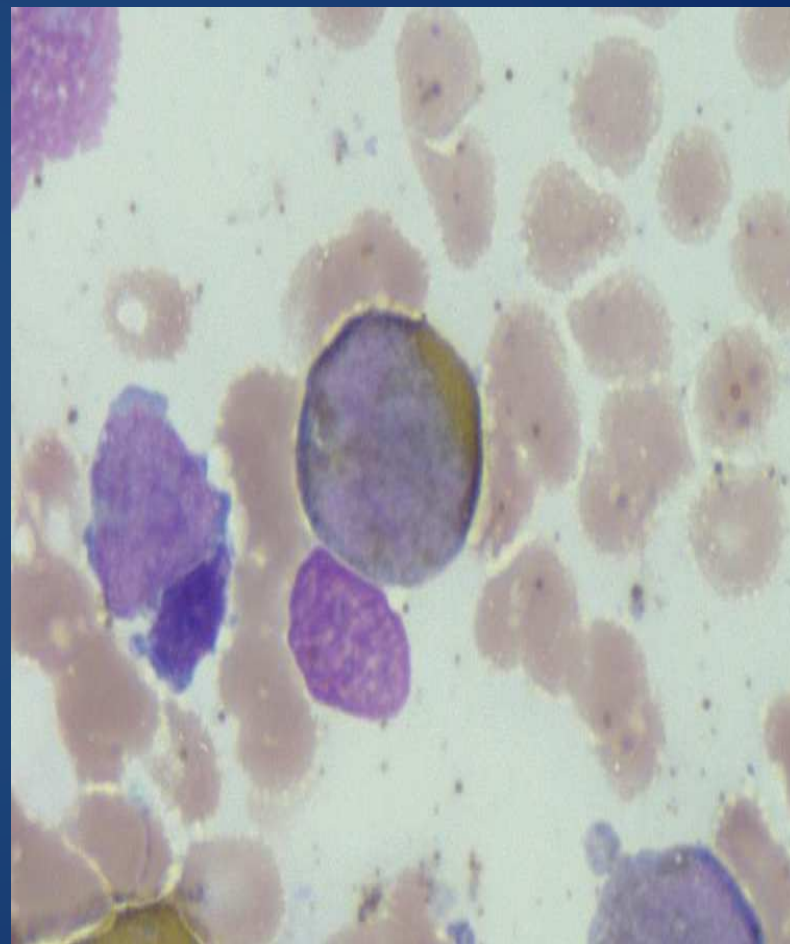
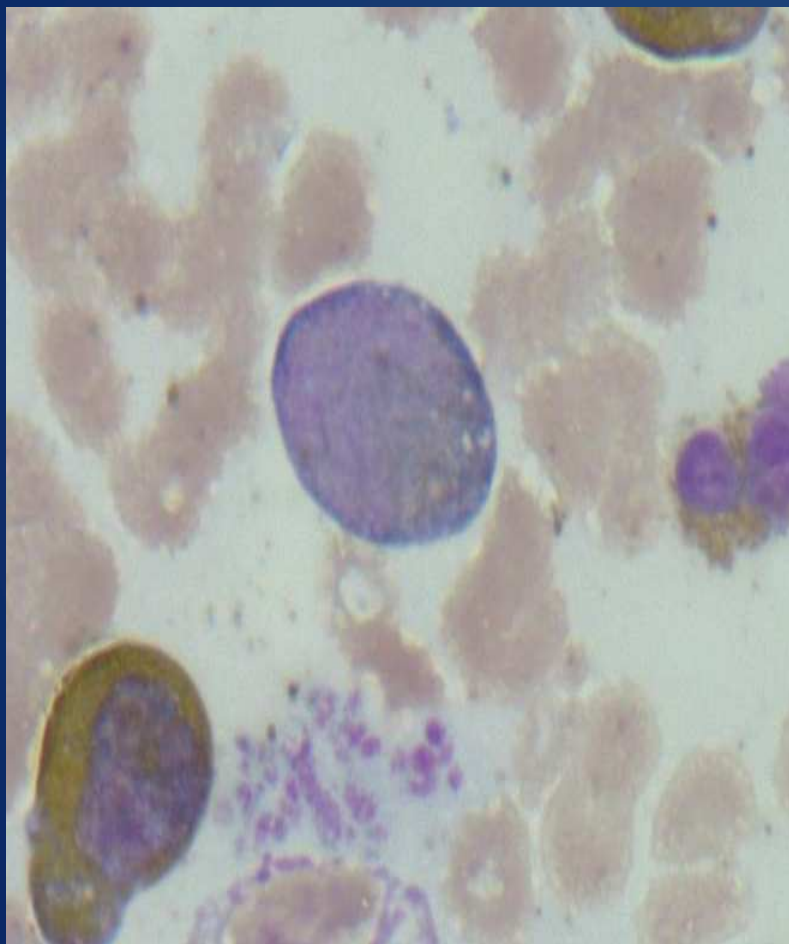
メイ・ギムザ染色  
×1000

FCM  
CD4,11c,13,33,34  
HLA-DR : 陽性

骨髓像  
Blast:95.8%

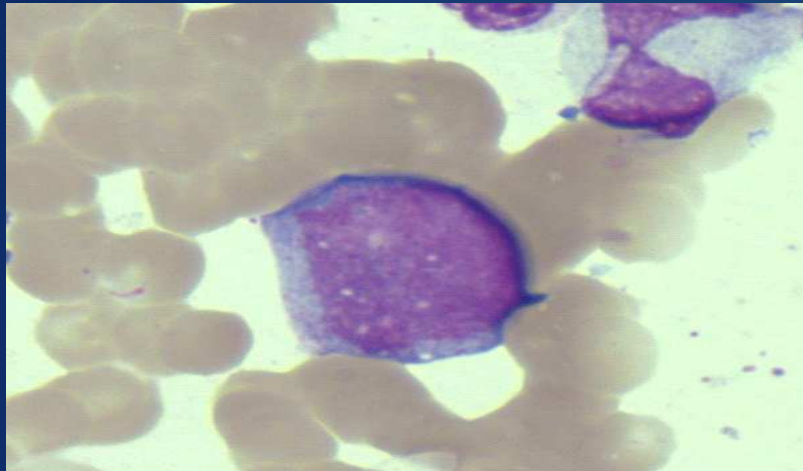
➡ AML (M1)

# 症例 2



ペルオキシダーゼ染色  
×1000

# 症例 2



FCM  
CD13,33,34,  
HLA-DR : 陽性

骨髓像

Blast:41.2%  
MONOCYTO:2.6%

染色体

46,xx,inv(16)(p13,1q22)



メイ・ギムザ染色  
×1000

➡ AML (M4)

# まとめ

- ペルオキシダーゼ染色は顆粒球系細胞とリンパ球系細胞の鑑別に有用である。
- 不明細胞を鑑別するとき、簡単に行うことのできる特殊染色のひとつである。