

『特殊染色を見直そう!』

エステラーゼ染色について

血液研究班研修会 2014.4.19

亀田総合病院 臨床検査部

本井 貴子



Kameda Medical Center

特殊染色

細胞内に含まれる酵素・
多糖類・脂質・金属イオン
などを化学反応にて発色
する方法



特殊染色の種類

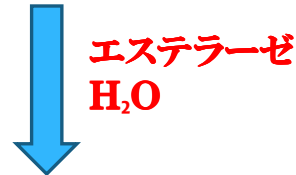
酵素	Peroxidase		P O
	Esterase	spciefic Esterase	
		Nonspciefic Esterase	
	Alkaline phoshatase		A L P N A P
	Acid phoshatase		A C P
非酵素	Periodic Acid-Schiff		P A S
	Iron		Fe
	Sudan black B Sudan III		脂肪



エステラーゼ染色

原理:アゾ色素法

ナフトールの酢酸エステル



ナフトール + ジアゾニウム塩

↓
アゾ色素(不溶性)沈着



エステラーゼとは？

カルボン酸エステルの加水分解を触媒する酵素

特異的エステラーゼ

比較的長鎖の炭素結合の
高級脂肪酸エステルを分解する

例)リパーゼ、コリンエステラーゼ、
アセチルコリンエステラーゼ

非特異的エステラーゼ


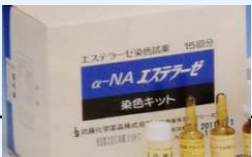
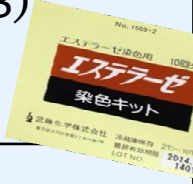
比較的短鎖の低級脂肪酸
エステルを分解する



反応基質とジアゾニ

	反応基質	
特異的 エステラーゼ	Naphthol AS-D Chloroacetate	Fast blue RR
	Naphthol AS-D Chloroacetate	Fast garnet GBC
非特異的 エステラーゼ	α -Naphthyl butyrate (α -NB)	Fast garnet GBC
	α -Naphthyl acetate (α -NA)	
	α -Naphthyl acetate (α -NA)	
	α -Naphthyl acetate (α -NA)	



<p>特異的エステラーゼ</p>		<p>非特異的エステラーゼ</p>	
<p>長鎖のエステルを分解</p>		<p>短鎖のエステルを分解</p>	
<p> Naphthol AS-D Chloroacetate</p>	<p>基質</p>	<p>α-Naphthyl acetate (α-NA)</p> <p></p>	<p>α-Naphthyl butyrate (α-NB)</p> <p></p>
<p>青色の顆粒状</p>	<p>染色結果</p>	<p>赤褐色の顆粒状</p>	
<p>前骨髓球から分葉核好中球までの各成熟段階の好中球系細胞</p>	<p>陽性細胞</p>	<p>巨核球系、単球系、 形質細胞、 一部のリンパ球</p>	<p>単球系細胞</p>

No. 1570-2

エステラーゼ染色用 10回分
エステラーゼ AS-D
染色キット

武藤化学株式会社 冷蔵庫保存 2℃~10℃
東京都文京区本郷2丁目10番7号 最終有効期限 2014.9.10
LOT NO. 140102



エステラーゼ染色法

固定

固定液

4℃

30秒

水洗

30秒



No. 1569-2

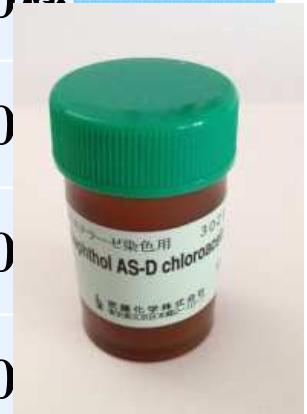
エステラーゼ染色用 10回分
エステラーゼ
染色キット

武藤化学株式会社 冷蔵庫保存 2℃~10℃
東京都文京区本郷2丁目10番7号 最終有効期限 2014.5.10
LOT NO. 140102



Kameda Medical Center

エステラーゼ二重染色法



固定	固定液	4°C	30秒
水洗	流水水洗		30秒
染色	反応液	37°C	30~40
水洗	流水水洗		30
染色	反応液	37°C	30~40
水洗	流水水洗		10~30
核染	カラッチ・ヘマトキシリン		10~15
水洗・色だし	流水水洗		5
乾燥	冷風乾燥		



染色結果①

	特異的エステラーゼ	非特異的エステラーゼ	
	Naphthol AS-D Chloroacetate	α -N B	N a F
骨髓芽球	(-) ~ (+)	(-) ~ (±)	(-) ~ (+)
前骨髓球	(+) ~ (3+)	(-) ~ (±)	(-) ~ (+)
骨髓球	(+) ~ (3+)	(-) ~ (±)	(-) ~ (+)
後骨髓球	(+) ~ (3+)	(-) ~ (±)	(-) ~ (+)
好中球	(+) ~ (3+)	(-) ~ (±)	(-) ~ (+)
好酸球	(-) ~ (±)	(-) ~ (±)	(-) ~ (+)
好塩基球	(-)	(-) ~ (±)	(-) ~ (+)
単球	(-) ~ (±)	(-) ~ (3+)	(-) 阻害される
リンパ球	(-)	(-) ~ (+)	(+) 阻害されない
形質細胞	(-)	(-) ~ (2+)	(+)
細網細胞	(-)	(2+) ~ (3+)	(+)
赤芽球	(-)	(-)	
巨核球	(-)	(+) ~ (3+)	(+)
血小板	(-)	(±)	

染色結果②

No. 1570-2

エステラーゼ染色用 10回分

エステラーゼ AS-D 染色キット

武藤化学株式会社 冷蔵庫保存 2℃~10℃
東京都文京区本郷2丁目10番7号 最終有効期限 2014.9.10
LOT NO. 140102

No. 1569-2

エステラーゼ染色用 10回分

エステラーゼ 染色キット

武藤化学株式会社 冷蔵庫保存 2℃~10℃
東京都文京区本郷2丁目10番7号 最終有効期限 2014.5.10
LOT NO. 140102

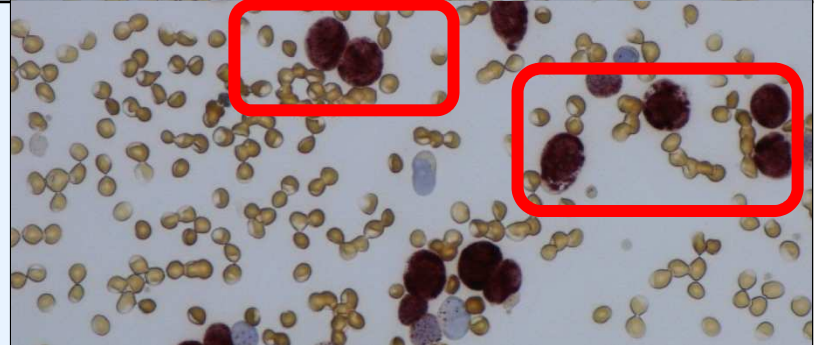
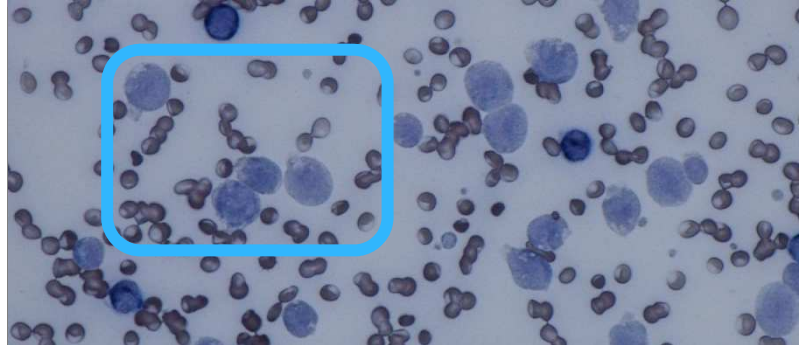
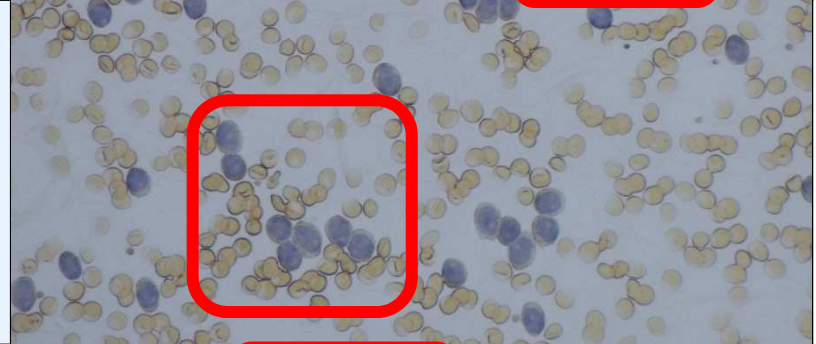
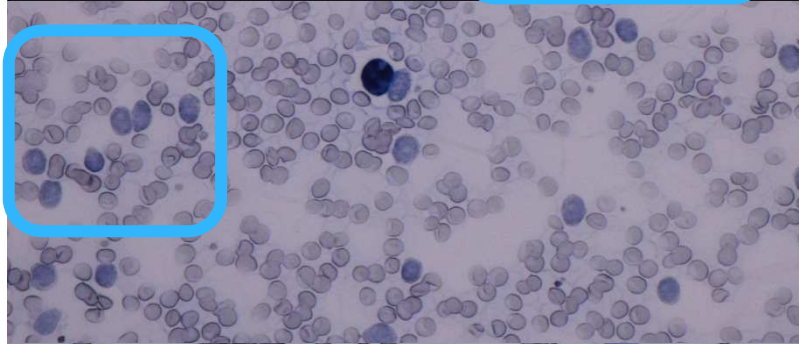
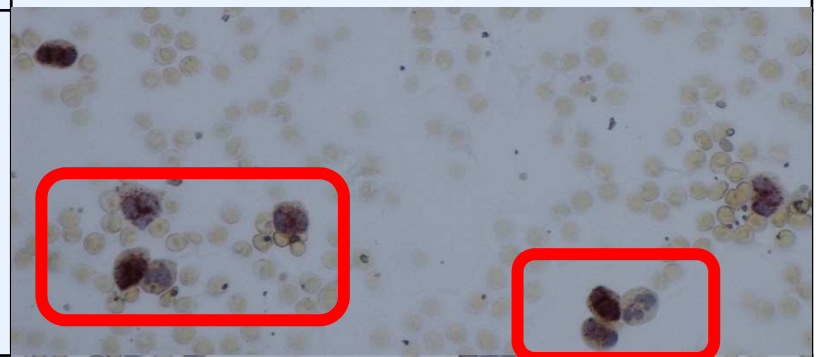
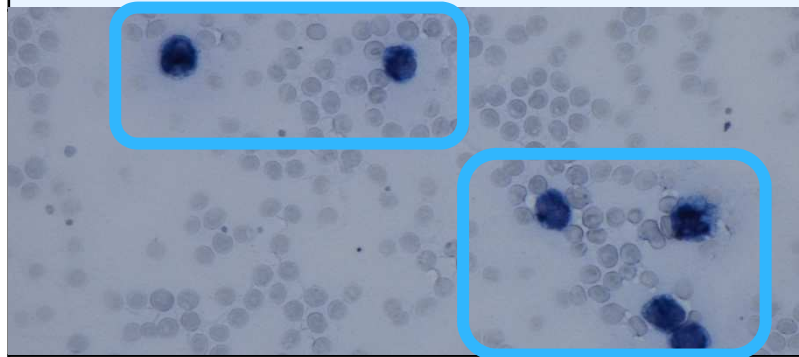
特異的
エステラーゼ

非特異的
エステラーゼ

好中球

リンパ球

単球



染色結果③

No. 1569-2

エステラーゼ染色用 10回分

エステラーゼ

染色キット

武藤化学株式会社 冷蔵庫保存 2℃~10℃
東京都文京区本郷2丁目10番7号 最終有効期限 2014.5.10
LOT NO. 140102

非特異的
エステラーゼ

NaF

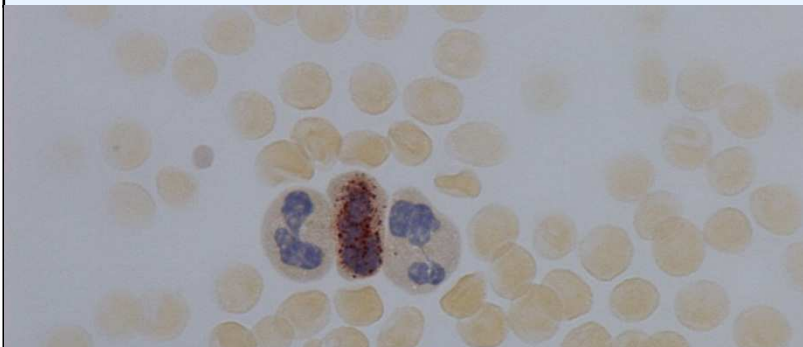
No. 1569-2

エステラーゼ染色用 10回分

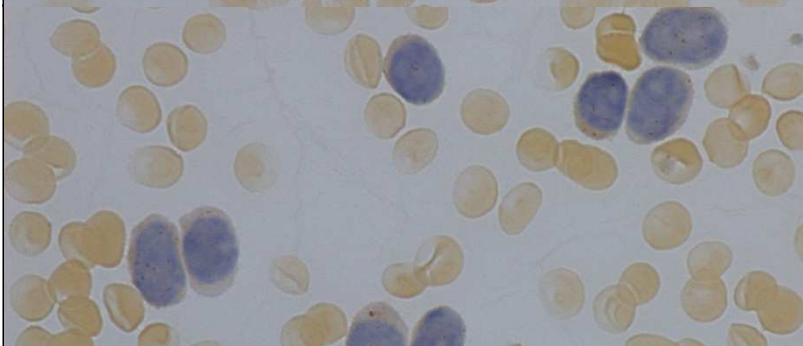
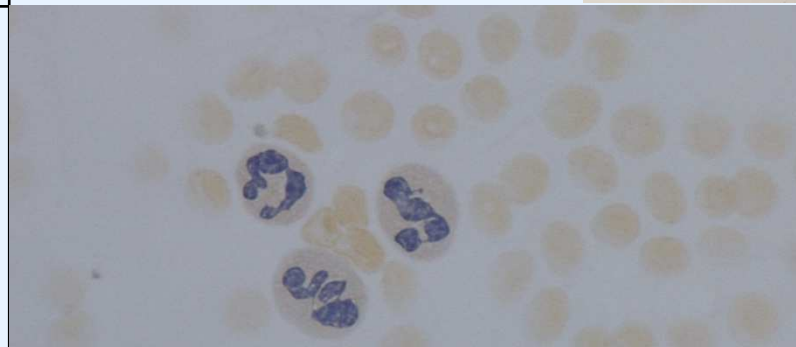
エステラーゼ

染色キット

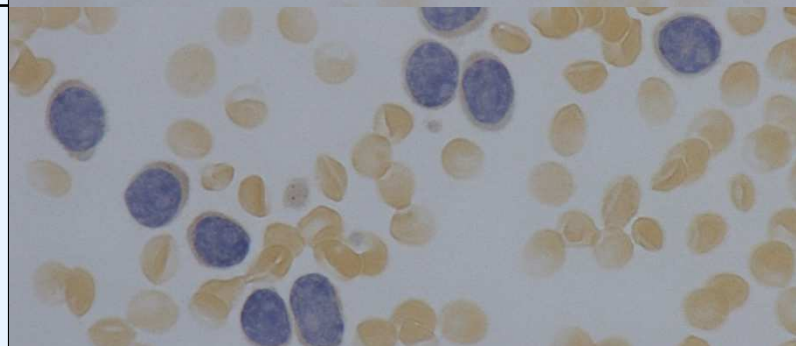
武藤化学株式会社 冷蔵庫保存 2℃~10℃
東京都文京区本郷2丁目10番7号 最終有効期限 2014.5.10
LOT NO. 140102



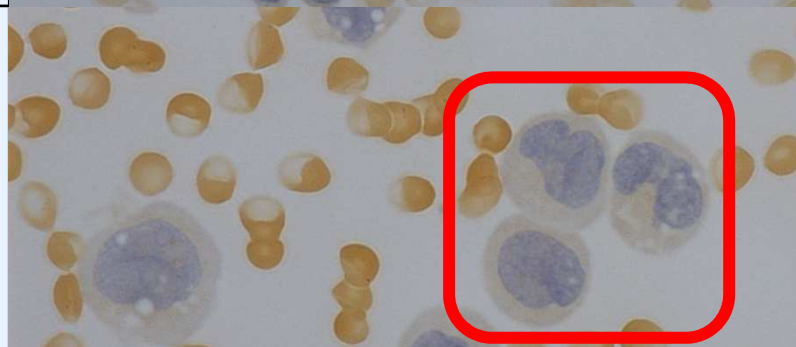
好中球



リンパ球

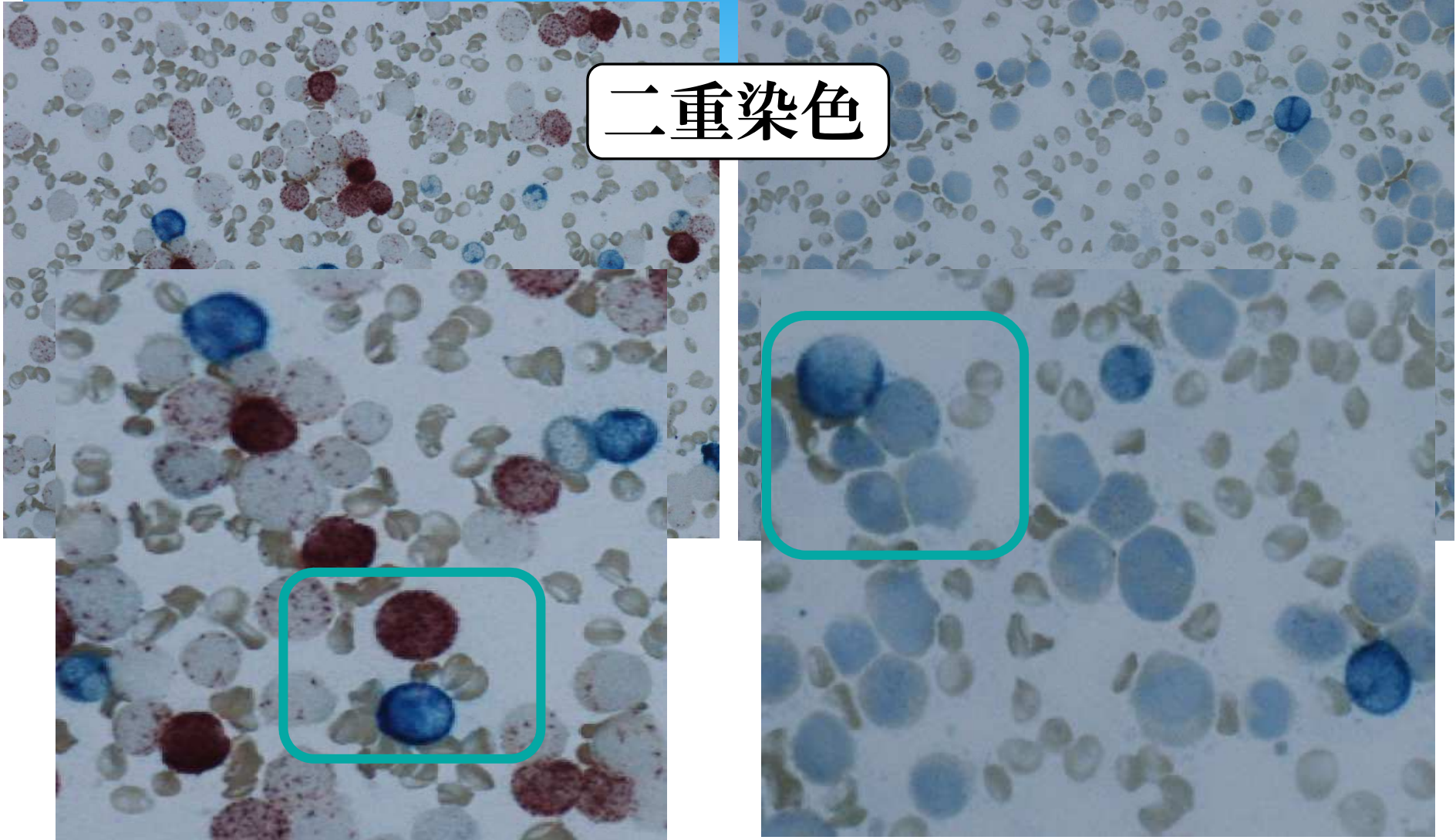


単球



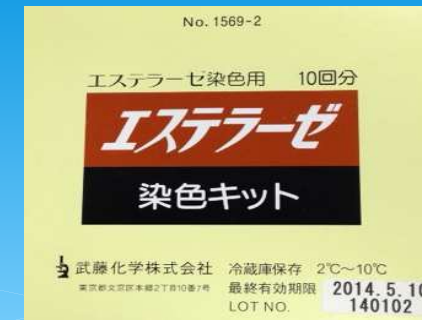
染色結果④

二重染色



染色結果⑤

非特異的エステラーゼ染色 α -NB



MUTO TOTAL PRODUCTS P.26より引用

基質特異性がなく種々の細胞が陽性を示すため、細胞により陽性度合いが異なることを利用し、陽性率と陽性度で報告するが多い

◆陽性率 = %

◆陽性度(SCORE) = アルカリホスファターゼ染色(朝長法)に準ずる



Kameda Medical Center

染色法の注意点とコツ

MUTO TOTAL PRODUCTS より引用

1、固定は**4°C 30秒**を守ること！

↳固定時間が短いと溶血をおこし、長すぎると反応が低下することがある

2、水洗は**流水**で！

↳標本上に固定液や反応液が残らないようにする

3、反応液は**使用直前**に調整する！

4、反応液や核染色は、**細胞数に応じて**調整してもよい！

5、色だしは流水のみでもよいが、温水につけてもよい！

↳軽く流水水洗し、**約60°Cの温水**につけ色だしすると核染色が鮮明になり、より陽性顆粒が見やすくなる

ただし、水洗せずに温水につけると色調のコントラストが不十分になるので注意

6、有機溶媒で**陽性顆粒が消失**する！

↳標本直接の油浸鏡検は厳禁

封入後カバーガラスの上から油浸にするか、ノーカバーレンズを使用する

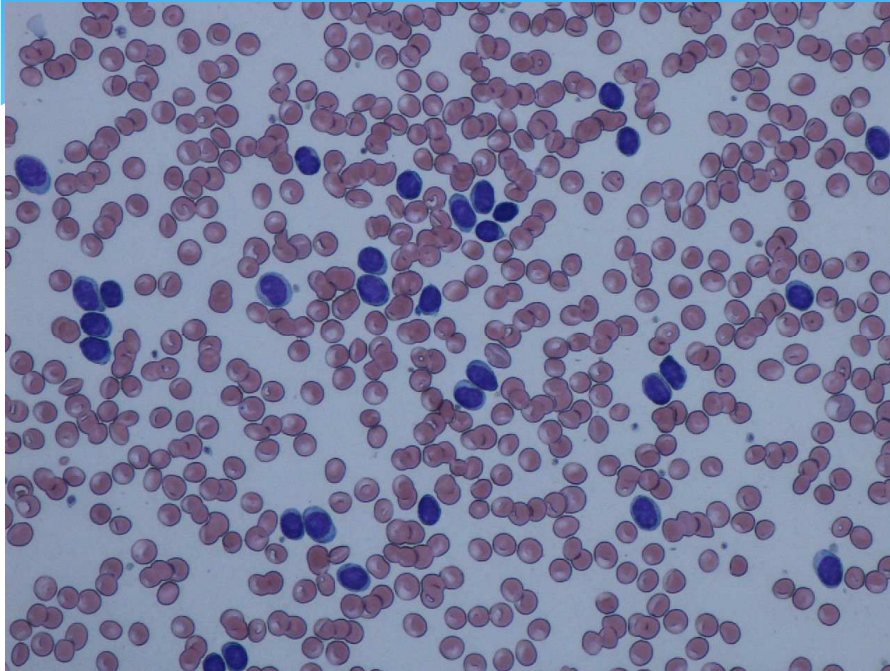
まとめ

- ★特殊染色は、目的とする物質を確実に染色し、形態観察が可能になるように、固定・反応・後染色などの方法を行うもの
- ★目的物質の選択を間違えることは診断に大きく左右するので、染色の特性や、臨床的意義を十分に理解しておきましょう

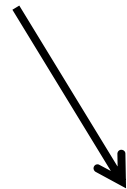
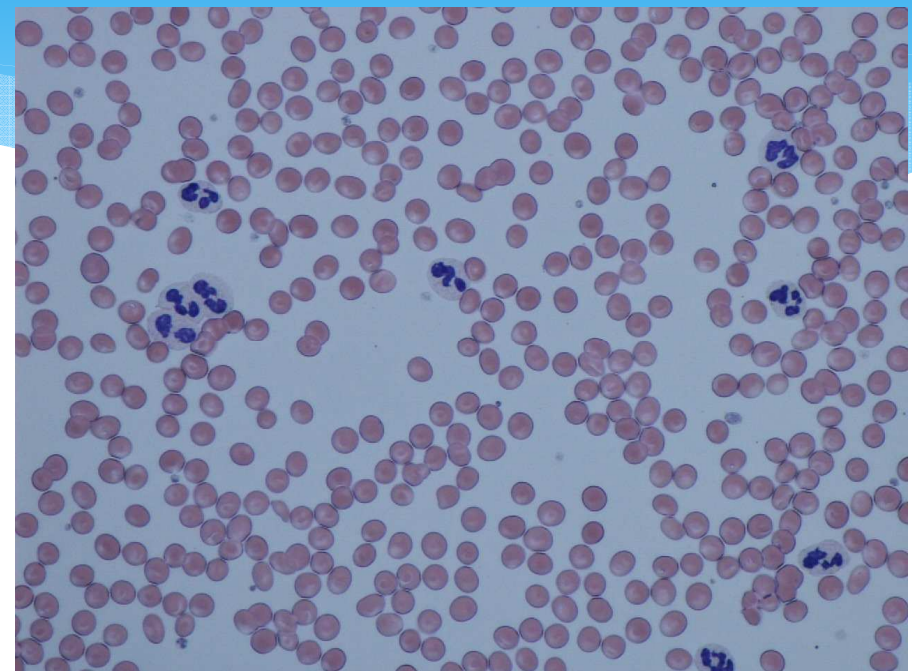


~ちょっと実験してみました~

WBC 165,600/ μ ℓ ⇒ リンパ球 96%



WBC 15,000/ μ ℓ ⇒ 好中球 93%



赤血球を溶血させ、生理食塩水にて WBC 7,000/ μ ℓ に調整



Kameda Medical Center

~ちょっと実験してみました~

WBC 7,000/ μL
に調整した各検体



ウロペーパー“栄研”



US-2200 (sysmex)

- ①US-2200で試験紙白血球を測定
- ②目視で試験紙白血球を判定

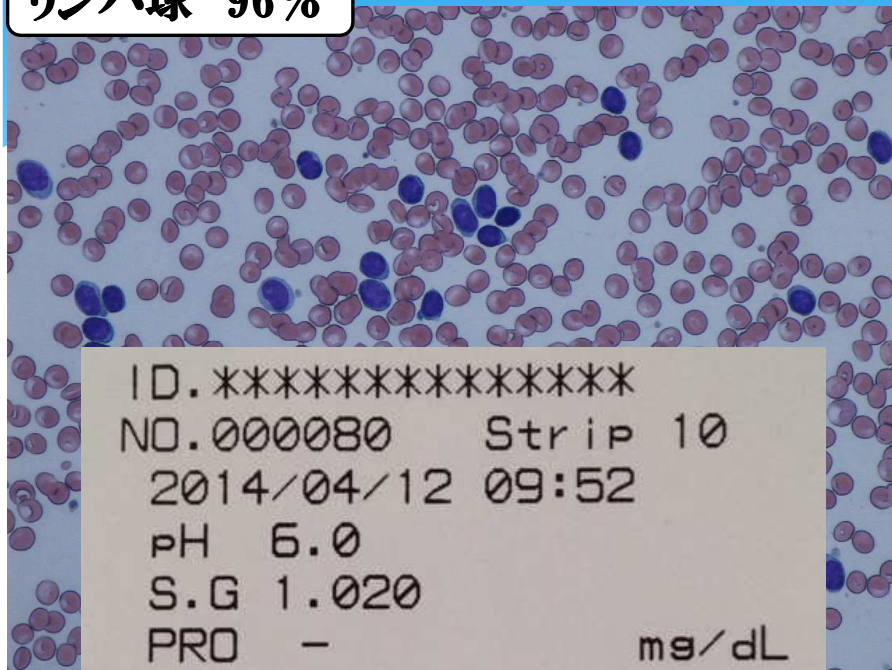


~ちょっと実験してみました~

結果

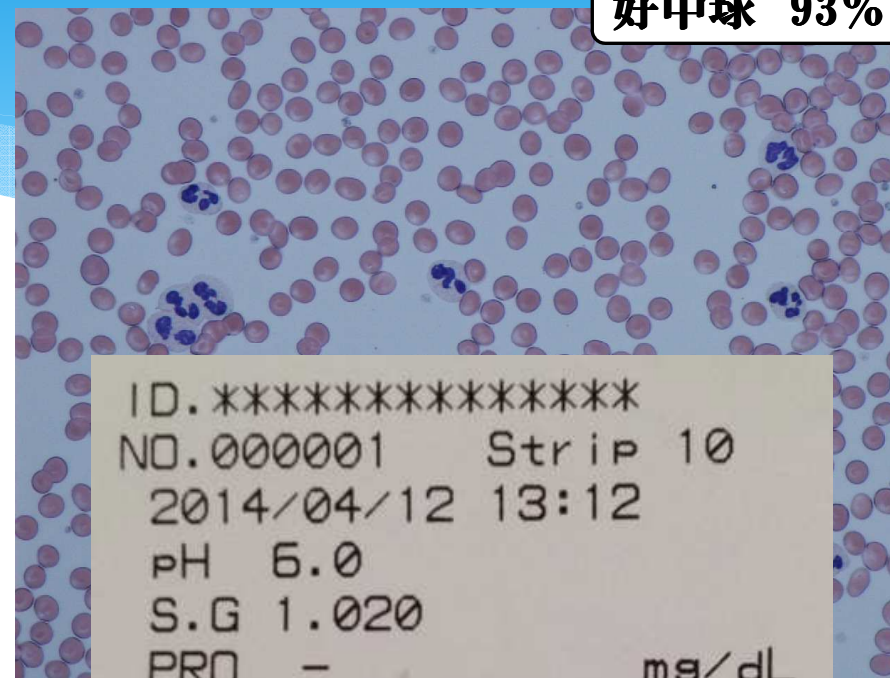
WBC 7,000/ μ ℓ

リンパ球 96%



ID.*****
NO.000080 Strip 10
2014/04/12 09:52
pH 6.0
S.G 1.020
PRO - mg/dL
GLU - mg/dL
URO normal mg/dL
BIL - mg/dL
BLD - mg/dL
KET -
***LEU 1+ 25 c/uL**
NIT -

好中球 93%



ID.*****
NO.000001 Strip 10
2014/04/12 13:12
pH 6.0
S.G 1.020
PRO - mg/dL
GLU - mg/dL
URO normal mg/dL
*BIL 1+ 0.5 mg/dL
BLD - mg/dL
KET -
***LEU 3+ 500 c/uL**
NIT -



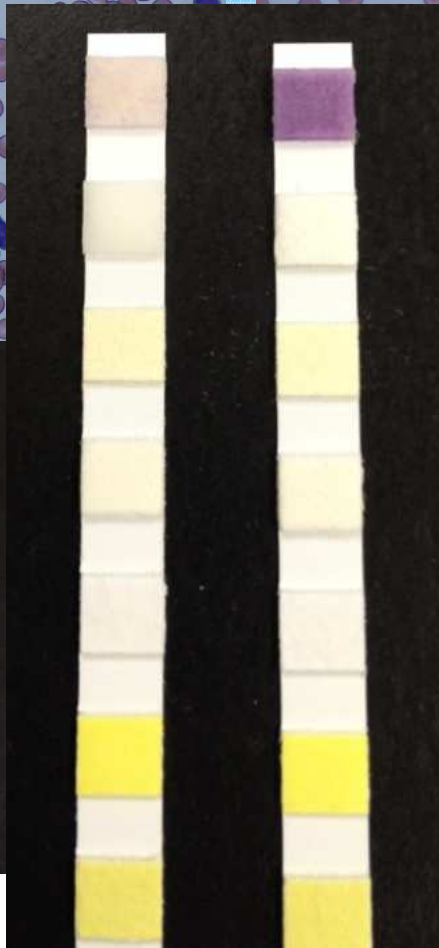
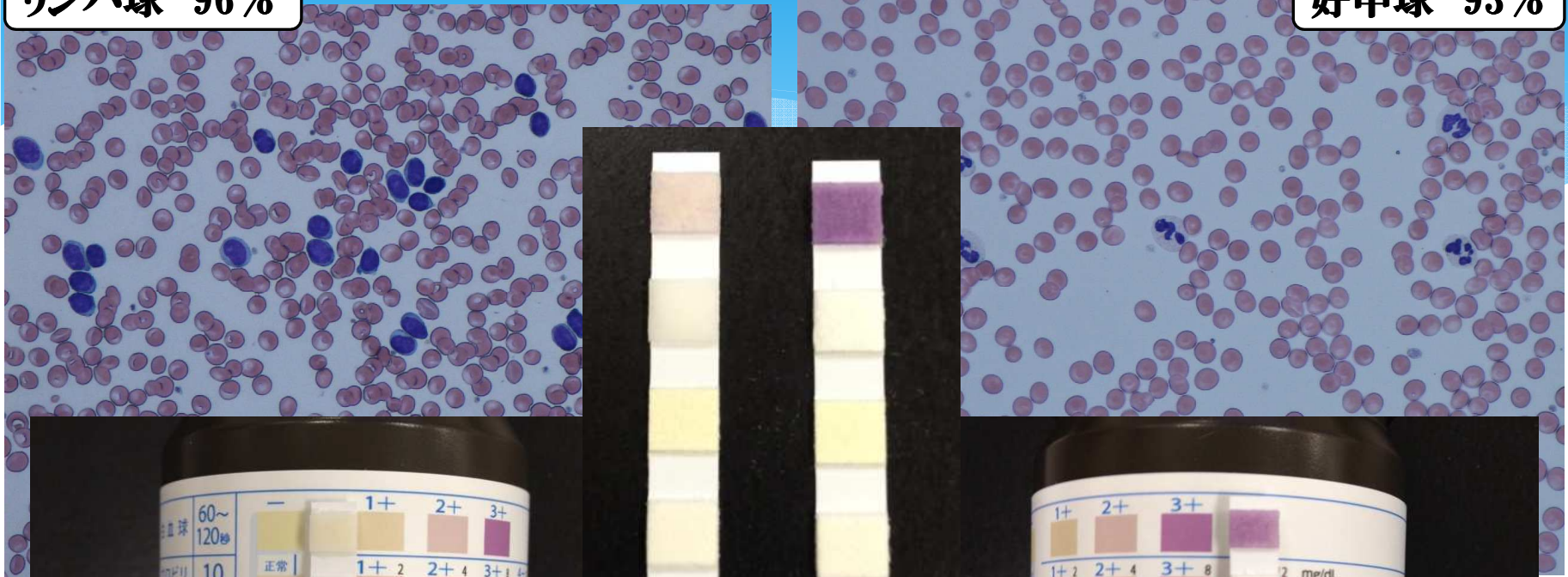
~ちょっと実験してみました~

WBC 7,000/ μ ℓ

結果

リンパ球 96%

好中球 93%



Kameda Medical Center

尿試験紙と沈渣の不一致(白血球)

		試験紙白血球	
		(-)	(+)
尿沈渣 白血球	(-)	異常なし	崩壊した白血球が存在
	(+)		古い尿
低張尿			
見落とし			
ホルムアルデヒドの混入(尿保存剤)			
ビリルビンなどによる着色			
など			
		白血球尿	
		試験紙の劣化	
		高張尿	
		高濃度の蛋白、ブドウ糖、シュウ酸	
		リンパ球	
		好酸球	
		など	