

# ストマトライザ-FB(II)による 白血球形態変化とその特徴

近藤 民章, 高木 由里, 河内 佐和子,  
河野 麻理, 和田 淳, 船越 國宏

シスメックス株式会社 学術本部 セルアナリシスセンター：神戸市西区高塚台 4-4-4 (〒 651-2271)

## 要 旨

多項目自動血球分析装置 X シリーズにおける好塩基球測定は、専用チャンネル (WBC/BASO チャンネル) で行われている。このチャンネルの専用試薬であるストマトライザ-FB(II) が各白血球に及ぼす影響を電子顕微鏡により解析した。

比重遠心法および磁気細胞分離法により得た各白血球 (好中球, 好酸球, Tリンパ球および単球) をストマトライザ-FB(II) で処理し、透過型電子顕微鏡で形態解析した結果、これらは 3 つのグループに分類された。すなわち、①核/細胞質の断面積比 (N/C 比) が比較的低く細胞外形や細胞質基質を保持したグループ (細胞質基質保持グループ)、②分葉核が裸核化したグループ (好中球・好酸球グループ)、③単核を持ち細胞質が縮小したグループ (Tリンパ球・単球グループ) である。

②および③のグループは健康者白血球の大部分を占めることから、これらは 2 種類の散乱光 (前方散乱光, 側方散乱光) の情報を用いた WBC/BASO スキャッタグラム上の 2 つのクラスターのうち、細胞数が非常に多い下部位置に存在するものと考えられた。

**キーワード** X シリーズ, 好塩基球, ストマトライザ-FB(II), WBC/BASO チャンネル, 電子顕微鏡

## はじめに

末梢循環血の白血球に含まれる好塩基球の割合は 1～2% 以下である<sup>1)</sup>。好塩基球の量的異常においては増加症に意義があり、また慢性骨髄性白血病での急性転化を予測する場合は好酸球と同様の臨床的所見となる<sup>2)</sup>。好塩基球の役割は、即時型アレルギー反応の引き金<sup>3)</sup>、慢性アレルギー炎症の誘導、Th1/Th2 バランスの制御、寄生虫感染防御などが報告されている<sup>4, 5)</sup>。

末梢血中に含まれる好塩基球比率の算出は、血液塗抹標本を用いた顕微鏡検査が標準法として用いられている<sup>6)</sup>。しかし日常検査では、迅速性や再現性の優れた多項目自動血球分析装置が用いられ、高いスクリーニング性能が確認されている<sup>7, 8)</sup>。

多項目自動血球分析装置 X シリーズでの好塩基球計

数は、WBC/BASO チャンネル (BASOch) で測定されている<sup>8)</sup>。BASOch では酸性溶血剤が用いられており、この専用試薬であるストマトライザ-FB(II) (以下、FB(II)) 反応後において裸核化・縮小化しない白血球を好塩基球としてとらえ、その他の白血球と区別して計測している<sup>7, 9-11)</sup> (図 1)。

X シリーズでの細胞計数システムにおいて、これまで網赤血球測定 (RET チャンネル)<sup>12)</sup> や、白血球 4 分類 (DIFF チャンネル)<sup>13)</sup> で実験的な検証がなされてきた。今回は X シリーズの BASOch の検証を進めるため、その第一段階として FB(II) が各白血球に及ぼす影響を、電子顕微鏡を用いて確認したので報告する。

## 材料および方法

### 1. 材料

7名の健常者ボランティア（インフォームドコンセント実施済み）から静脈採血（EDTA2K）により得た末梢血を試料として用いた。

### 2. 方法

#### 1) 末梢血からの各白血球の分離

ダルベッコ PBS (-)（以下、PBS）を用い血球成分を希釈した後、2種類の比重液（ $d=1.119$  および  $1.077$ ）を用い単核球層と多核球層を分取した。

比重遠心法にて得られた単核球層と多核球層を用い、磁気細胞分離法（Stem Cell TECHNOLOGIES社）にて、好中球、好酸球、Tリンパ球および単球を分離した。分離した細胞は、 $37^{\circ}\text{C}$ に加温した1.0%（w/v）ウシ血清アルブミン含有PBSの中で1時間静置した。

#### 2) FB (II) による細胞処置と電子顕微鏡観察

比重遠心法や磁気細胞分離法により得た各白血球を、XシリーズのBASOchの試薬反応手順と同様に処理した。すなわち、各白血球サンプル  $18\mu\text{L}$  にFB (II)  $882\mu\text{L}$  を加え、14秒間放置したものを電子顕微鏡の試料とした。

透過型電子顕微鏡（TEM）試料作製においては、各白血球サンプルをグルタルアルデヒド（GA）と四酸化オスミウムの二重固定後、エタノールを用いた上方系列で脱水し、樹脂へ包埋した<sup>14)</sup>。その後、超薄切片（80nm）を作製し、切片は酢酸ウラ

ニル水溶液と鉛染色液<sup>15)</sup>の二重染色を行った。細胞形態の解析は透過型電子顕微鏡（日立ハイテクノロジーズ社）にて行った。

走査型電子顕微鏡（SEM）試料作製においては、GA固定した各白血球サンプルを、ポリLリジンでコーティング処理したガラス小片に付着させ、四酸化オスミウムで後固定した。細胞の脱水はエタノールを用いた上方系列で行い、 $t$ -ブチルアルコールで置換および浸漬させた試料を凍結乾燥した。オスミウムコーターで細胞表面を処理した後、電界放出形走査電子顕微鏡（日本電子社）にて白血球表面構造を観察した。

## 結果

比重遠心法で得たFB (II) 未処理の白血球層をTEM観察したところ、典型的な血球像を認めた（**図2-a, b**）<sup>16-18)</sup>。すなわち、ヘモグロビンが均一に広がった赤血球、顆粒が多く見られる好中球、核/細胞質の断面積比（N/C比）が高く細胞小器官が乏しいリンパ球、細胞小器官が豊富な単球（**図2-a**）および特徴的な顆粒構造をもつ好塩基球（**図2-b**）を認めた。一方、FB (II) 反応後のTEM像では各白血球は激しく損傷していた。その形態的特徴は、細胞質がほとんど認められず核のみになったもの（裸核化）、膜構造や細胞骨格の断片と思われる構造が核の周囲にまばらに存在しているもの（縮小化）である（**図2-c**）。このように裸核化、縮小化した白血球が大部分を占めていたが、ごくまれに細胞外形と細胞質基質を保つ白血球を認めた（**図2-c** 矢印、**図2-d**）。この細胞の特徴は、

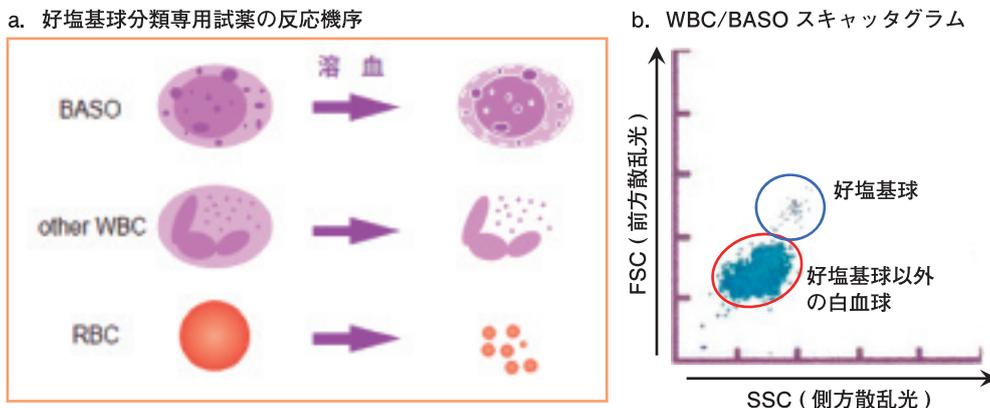


図1. WBC/BASOチャンネルでの好塩基球計数システム

核は分葉し、細胞質には直径約  $1.0\mu\text{m}$  かそれ以上の空胞を認め、判別可能な細胞小器官は見られず、細胞基質部分は均一な電子密度であった。N/C 比は比較的低く、細胞の内と外との境界は明瞭であり、細胞膜付近には細かな構造物を認めた。

磁気細胞分離法で得た好中球、好酸球、Tリンパ球および単球を試料とし、FB (II) 処理前後の TEM 像観

察を行った。まず FB (II) 未処理の各白血球について述べる。好中球では、細胞質に空洞 (図3-a 矢印) を認めるものや細胞外形が歪なものなど、やや変形した細胞が確認された。好酸球 (図3-b) と Tリンパ球 (図3-c) では、典型的な細胞像が得られた。単球では、細胞質が瘤状にふくらむものや (図3-d 矢印)、貪食像がみられるなど、形態変化を起こした像を確認した。

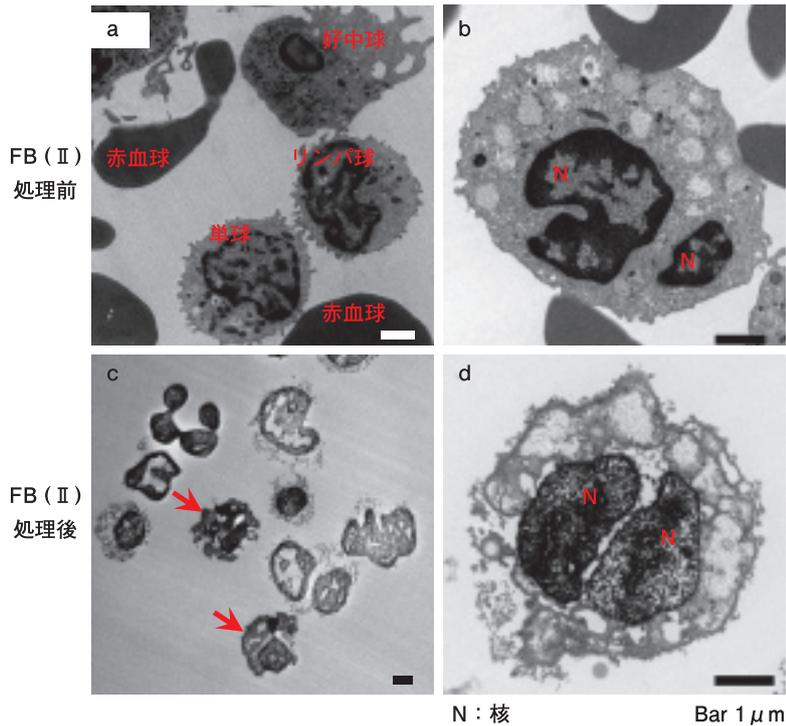


図2. ストマトライザ-FB (II) 反応後の白血球の形態変化

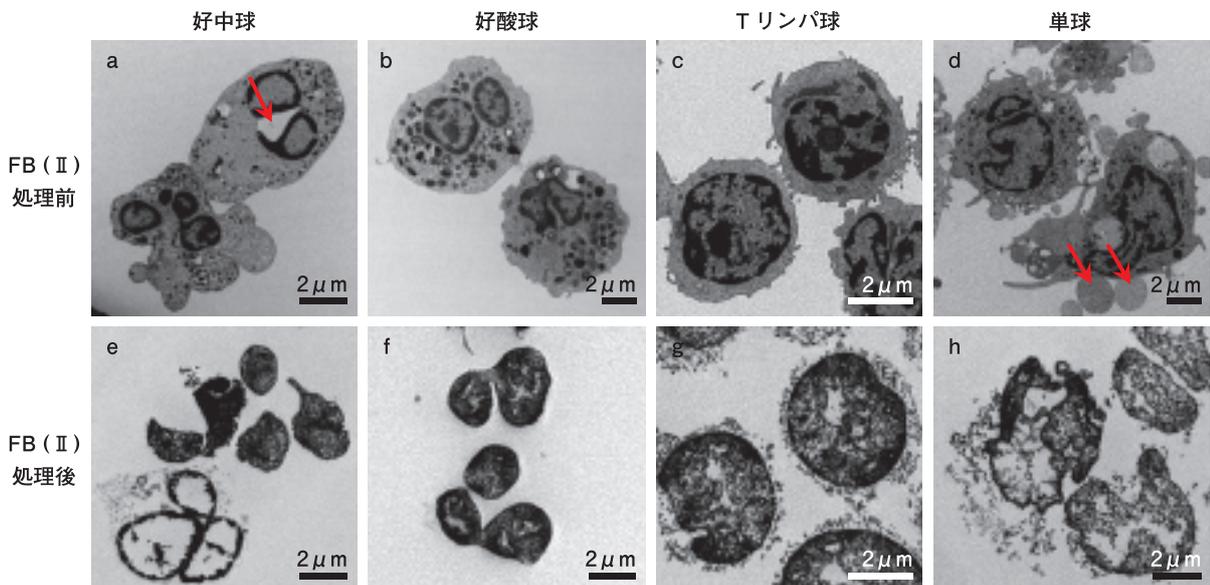


図3. 磁気細胞分離法で得た各白血球のストマトライザ-FB (II) 反応後の形態変化

次にFB (II) を反応させた各白血球のTEM 像について述べる。好中球および好酸球は、ほとんどの細胞で細胞質は認められず裸核化していた(図3-e, f)。Tリンパ球(図3-g)と単球(図3-h)は、膜成分や細胞骨格の痕跡を思われる構造物が核周辺を取り囲み、細胞全体が縮小していた(縮小化)。各白血球の核クロマチン構造は変化し、核の中央部が空洞化しているものが認められた。なお好塩基球は分離回収した細胞数が少ないため電顕観察を行うことができなかった。

比重遠心法で調整した白血球層にFB (II) を反応させ、それら細胞の形態をTEM およびSEM で比較した(図4)。TEM 像では裸核化した多核球(図4-a †)と縮小化した単核球(図4-a ‡)の像を認め、SEM 像では、長径が約1.0~2.0 $\mu\text{m}$ の粒子3~4個が集塊した核構造(図4-b †)と粒子径が約4 $\mu\text{m}$ の円形度の高い白血球(図4-b ‡)を認めた。

## 考 察

XシリーズのWBC/BASOチャンネル(図1-b)には、2種類の散乱光、すなわち前方散乱光(FSC)と側方散乱光(SSC)が用いられている。散乱光は細胞表面構造、粒子形状、核形態、屈折率および反射率などの影響を受けており、一般的にはFSCは細胞が大きくなるほど信号が大きくなり、SSCは細胞内部構造が複雑になるほど信号が大きくなる<sup>19~22)</sup>。その

ため電子顕微鏡観察で示された細胞形態の違いがWBC/BASO スキャッタグラム上の2つのクラスターに反映していると考えられる。つまり血液の前処理により標的とする細胞(好塩基球)と、その他の白血球に形態的な差異が生じており、それがフローサイトメータで検出されている。BASOchの専用試薬であるFB (II) はノニオン系界面活性剤を含んでおり、好塩基球が酸性条件下の溶血処理において裸核化抵抗性を示すことを利用した試薬である<sup>10)</sup>。Gilbertらは酸性条件とランタンイオンの存在下で、好塩基球内部のヘパリンを染色するアルシアンブルー染料を用い、目視とフローサイトメータにより、好塩基球の算定と比較を行い良好な成績を得た<sup>23)</sup>。この方法では血液細胞の前処理液にノニオン系界面活性剤であるTween 20が含まれ、酸性条件のもと白血球の細胞質を溶解することで、好塩基球が検出しやすくなることが確認されている。

このような酸性条件下の溶血における好塩基球の裸核化抵抗性を直接観察するために、FB (II) を反応させた各白血球のTEM 像を観察したところ、それらは形態的特長から3つのグループに分類された。すなわち①N/C比が比較的低く細胞外形や細胞質基質を保持したグループ(細胞質基質保持グループ、図2-d)、②分葉核が裸核化したグループ(好中球・好酸球グループ、図3-e, f)、③単核を持ち細胞質が縮小化したグループ(Tリンパ球・単球グループ、

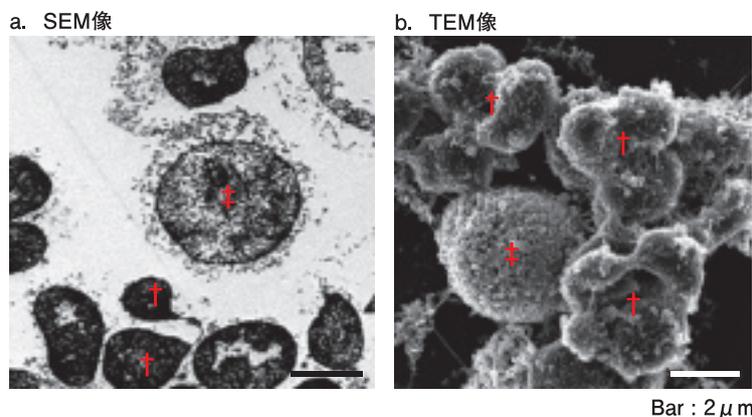


図4. ストマトライザ-FB (II) 反応後の単核球と多核球のTEM 像とSEM 像の比較

図3-g, h), である。これら3つのグループにおいて, ①は, ②および③と比較して細胞の外形は大きく, 内部構造は複雑である。また②および③の細胞は健常者の白血球の大部分を占めることから, これらはWBC/BASO スキャッタグラム (図1-b) の2つのクラスターのうち, 細胞数が非常に多い下部位置に存在するクラスターであると考えられる。一方, 上部位置に存在するクラスターに含まれる細胞は散乱光の特徴から, 他の細胞に比べて外形が大きく内部構造が複雑であることが読み取れ, それを反映しているものは, 上記①の細胞質基質保持グループ (図2-d) であると推察される。

今回の電子顕微鏡を用いた形態解析から, FB (II) の作用により好塩基球以外の各白血球が裸核化や縮小化するといった現象を確認したが, なぜそのようなことが起こるのかについては十分にわかっていない。Gilbert ら<sup>23)</sup> や, Cooper と Cruickshank<sup>24)</sup> は好塩基球に含まれるヘパリンやムコ多糖類を, 塩化セチルピリジウムにより不溶化させていることを述べているが, 界面活性剤やpH条件による好塩基球の裸核化抵抗性には言及していない。しかしXシリーズのWBC/BASO スキャッタグラムでは細胞の散乱光に差異が生じていることから, 好塩基球の細胞質の不溶化はFB (II) の成分やpHによるものと考えられる。FB (II) の影響について好塩基球以外の白血球の形態変化を考察する。FB (II) により裸核化される好中球と好酸球の細胞小器官の大部分は顆粒である<sup>16)</sup>。一方, FB (II) で縮小化されるリンパ球や単球にはミトコンドリアや小胞体が多く含まれる<sup>16)</sup>。したがって, FB (II) 処理後に認められた, 好塩基球以外の白血球の裸核化 (②グループ), 縮小化 (③グループ) の形態的差異には, 細胞質基質の性質や細胞小器官の種類と多寡による可能性が考えられる。また今回の実験では磁気細胞分離により各白血球を得たが, 好塩基球は電子顕微鏡で確認できる分量を分離することができなかった。今後は, 分離法を改善して十分な好塩基球の量を確保し, 試薬反応による形態変化やWBC/BASO スキャッタグラムの2つのクラスターのどの位置に好塩基球が属するかについての直接証明を実施したい。

## 参考文献

- 1) SM Lewis, BJ Bain, I Bates. Dacie and Lewis PRACTICAL HAEMATOLOGY. Tenth Edition. Philadelphia, PA : CHURCHILL LIVINGSTONE ELSEVIER ; 2006. 11-24
- 2) 浅野茂隆, 池田康夫, 内山卓. 三輪血液病学. 東京 : 文光堂 ; 2006. 262-276
- 3) 藤田尚男, 藤田恒夫. 標準組織学総論. 第4版. 東京 : 医学書院 ; 2002. 210-234
- 4) 瀧仲介. 好塩基球による免疫応答の制御機構. 炎症と免疫. 2006 ; 14 ( 1 ) : 88-89
- 5) 日本検査血液学会. スタンダード検査血液学. 第2版. 東京 : 医歯薬出版 ; 2008. 38-91
- 6) CLSI. Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods ; Approved Standard - Second Edition. CSLI document H20-A2. Wayne, PA : 2007. 63p.
- 7) 浅野茂隆, 池田康夫, 内山卓. 三輪血液病学. 東京 : 文光堂 ; 2006. 532-543
- 8) Inoue H. Overview of Automated Hematology Analyzer XE-2100. Sysmex J Int. 1999 ; 9 ( 1 ) : 58-64
- 9) 藤本敬二. 当社の血球計数装置の測定原理の概要. Sysmex J. 2007 ; 22 ( 1 ) : 43-59
- 10) 巽典之. 白血球計数学-3. 神戸 ; シスメックス株式会社. 2009. 71p.
- 11) 巽典之, 血液検査学研究会 編. 計測技術のテイーチング-自動血球分析装置の基本原理-. 東京 ; 宇宙堂八木書店. 2006. 210p.
- 12) Kono M et al. Morphological definition of CD71 positive reticulocytes by various staining techniques and electron microscopy compared to reticulocytes detected by an automated hematology analyzer. Clin Chim Acta. 2009 ; 404 ( 2 ) : 105-110
- 13) 河野麻理 他. CD抗体を用いたシスメックス自動血液分析装置の白血球分類スキャッタグラムにおける各白血球出現エリアの検証. Sysmex J. 2010 ; 33 : 35-42
- 14) Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. J Biophys Biochem Cytol. 1961 ; 9 : 409-414
- 15) 佐藤泰山. 超薄切片用鉛染色法の一改良法. J Electron Microsc. 1968 ; 17 ( 2 ) : 158-159
- 16) 三輪史朗, 渡辺陽之輔. 血液細胞アトラス. 第5版.

- 東京 ; 文光堂 : 2004. 466p.
- 17) Tanaka Y, Goodman JR. Electron microscopy of Human blood cells. New York ; Medical Department HAROER & ROW, PUBLISHERS : 1972. 432p.
- 18) Zucker-Frankin D. Electron Microscopic Study of Human Basophils. Blood. 1967 ; 29 ( 6 ) : 878-890
- 19) 粉体工学会 編 . 粒子計測技術 . 東京 ; 日刊工業新聞社 : 1994. 313p.
- 20) Howard MS. Practical Flow Cytometry. Fourth Edition. Hoboken, New Jersey ; Wiley-Liss. 2003. 273-410
- 21) Schafer IA et al. Multiangle Light Scattering Flow Photometry of Cultured Human Fibroblasts : Comparison of Normal Cells with a Mutant Line Containing Cytoplasmic Inclusions. J Histochem Cytochem. 1979 ; 27 ( 1 ) : 359-365
- 22) Benson MC, McDougal DC, Coffey DS. The Application of Perpendicular and Forward Light Scatter to Assess Nuclear and Cellular Morphology. Cytometry. 1984 ; 5 ( 5 ) : 515-522
- 23) Gilbert HS, Ornstein L. Basophil Counting With a New Staining Method Using Alcian Blue. Blood. 1975 ; 46 ( 2 ) : 279-286
- 24) Cooper J R, Cruickshank CN. Improved Method for Direct Counting of Basophil Leucocytes. J Clin Pathol. 1966 ; 19 ( 4 ) : 402

## Morphological Changes in Leukocytes due to STROMATOLYSER-FB (II) and Their Characteristics

Tamiaki KONDO, Yuri TAKAGI, Mari KONO, Atsushi WADA and Kunihiro FUNAKOSHI

Cell Analysis Center, Scientific Affairs, Sysmex Corporation, 4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe 651-2271

### SUMMARY

Sorting of basophiles with fully automated Hematology analyzers of the X series employs a special channel (WBC/BASO channel) . The present study was undertaken to analyze the influence of STROMATOLYSER-FB (II) (a reagent specific to this channel) on each kind of leukocyte under an electron microscope.

Each kind of the leukocyte (neutrophil, eosinophil, T lymphocyte and monocyte) obtained by specific gravity centrifugation and magnetic cell separation was treated with STROMATOLYSER-FB (II), followed by morphological observation under a transmission electron microscope (TEM) . The cells were thus divided into three groups: (1) a group with low nucleus/cytoplasm cross-section ratio (N/C ratio) with outer form and cytoplasm matrix of cells preserved (the cytoplasm preserved group), (2) a group characterized by segmented cells with stripped nucleus (the neutrophil/eosinophil group) and (3) a group characterized by mononuclear and diminished cytoplasm (the lymphocyte/monocyte group) .

Group (2) and (3) cells, which account for an overwhelming majority of all leukocytes in healthy individuals, are considered to belong to the lower one of the two clusters (i.e., the cluster composed of a very large number of cells) obtained in the WBC/BASO scattergram with two kinds of scatter ray (forward scatter (FSC) and side scatter (SSC)).

#### Key Words

X series, Basophil, STROMATOLYSER-FB (II), WBC/BASO channel, Electron Microscope