

好中性顆粒の“好中性”に関する文献上の考察: “好中性”とは何か?

近藤昌和[†], 安本信哉, 木村美智代

Literature review on the “neutrophilic” of neutrophilic granules: What is “neutrophilic”?

Masakazu Kondo^{1,†}, Shinya Yasumoto¹ and Michiyo Kimura²

Abstract: The term “neutrophilic” and “neutrophilic granule” was first introduced by Paul Ehrlich to identify specific granules of major polymorphonuclear leukocytes (neutrophils). He used an original staining method, triacid stain, for this purpose. The staining solution, called “neutral mixture”, which was mixture of acidic dye solution and basic dye solution, with soluble form in water (not neutral dye). In this paper, we speculate the structure and characteristics of the dye complex in the neutral mixture. The dye complex has free acidic groups and is expected to behave as an acidic dye. The dye complex bound to the neutrophilic granules stains the granules with the color tone of the dye complex (purple) because the acid and basic dyes do not dissociate. On the other hand, in the vicinity of the eosinophilic granules and nucleus, the dye complex dissociates into acid and basic dyes, and the former bind to the acid dye and the latter to the basic dye. It was inferred that this dye complex is not formed during staining with stains containing neutral dyes, such as May-Grünwald (methylene blue eosinate), Wright (polychromtic methylene blue eosinate), and Giemsa (containing azure II eosinate).

Key words: neutrophilic, neutrophilic granule, triacid stain, Romanowsky stain

緒言

顆粒を有する血球は、一般に顆粒球と呼ばれ、顆粒の染色性に基づいた名称が付けられている。例えば、脊椎動物の好酸球は、顆粒がエオジン eosin や酸性フクシン acid fuchsin などの酸性色素に染まること (好酸性)、好塩基球は顆粒がメチレンブルー methylen blue やメチレンアズール methylen azur などの塩基性色素に染まること (好塩基性) に由来する。一方、顆粒球の中には、“好中球”と呼ばれる白血球が存在し、その顆粒の染色性は“好中性”とされている。しかし、染色されたヒト好中球の好中性顆粒の色調については研究者の間で様々に表現され、混乱が認められる。このことは魚類においても同様である。多数の著作を解析したところ、混乱の原因が①“好中性 (中性好性)”や

“好中性顆粒”の用語を最初に使用した Ehrlich が自身の染色の原理を十分に考察・提案しなかったこと、②血液学において、Ehrlich の染色法 (triacid 染色) が廃れ、メチレンアズールを含む Romanowsky 型染色 [Wright 染色, Giemsa 染色, May-Grünwald・Giemsa 染色 (Pappenheim 染色) など] が主流になる時に、triacid 染色との比較が不十分であったことの2点に大別されると考えられた。

本稿では Ehrlich の triacid 染色液 (中性混合液) 中に形成される色素体の構造ならびにその特性について考察するとともに、現在血液学で常用されている Romanowsky 型染色においても中性混合液中の色素体が形成されるのか否かを文献に基づいて推察した。なお、本稿では動物名が明記されていない場合、ヒトの血球や顆粒を指す。

2023年11月29日受付, 2024年1月29日受理

¹水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

²新渡戸文化短期大学臨床検査学科 (Faculty of Clinical Laboratory Sciences, Nitobe Bunka College)

[†]責任著者 (corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

結果および考察

Ehrlichのtriacid染色

Ehrlichは多種類の酸性色素と塩基性色素をそれぞれ単独で、または組み合わせて、両生類のカエルとイモリやヒトを含む様々な脊椎動物¹⁾の血液や骨髄あるいは種々の組織を染色し、細胞内の顆粒が5種類に分類できることに気づいた¹⁻⁴⁾。これらの顆粒は当初は便宜上、 α 、 β 、 γ 、 δ および ε 顆粒と呼ばれ²⁻⁴⁾、それを有する細胞に特異的であるとして、特異顆粒 [ドイツ語でspecifische Granulationenやspecifische Körnungen (Granulationen)] と命名された^{3,4)}。これらのうち、 ε 顆粒が好中性顆粒である。ヒトの場合、 ε 顆粒の大部分は、現代における好中球の特殊顆粒 (specific granule; 特異顆粒や二次顆粒とも呼ばれる) に相当すると考えられる²⁾。なお、Ehrlichの α 顆粒は好酸球顆粒であるが [Kanthack & Hardy (1894)⁵⁾は α 顆粒をウサギの好中球顆粒としているがこれは明らかな誤認である]、 β 、 γ および δ 顆粒については、後の研究者によって対応する顆粒に関する記述が異なっている。 γ 顆粒についてのEhrlich自身の著作はなく、本顆粒についてはEhrlichが指導したWestphalの論文⁶⁾を参照するようにとしか記述していない⁴⁾。また、 δ 顆粒については、Ehrlichは何も記していない。

Ehrlichの著作のうち、“ ε 顆粒”の用語はEhrlich (1879b)³⁾とEhrlich (1880)⁴⁾にのみあり、Ehrlich (1880)⁴⁾には“好中性neutrophile”との用語も見られる。また、Ehrlich (1880)⁴⁾には“好中性顆粒neutrophiler Körnung”との用語が認められる。Ehrlichの好中性顆粒に関するまとまった記述はEhrlich (1880)⁴⁾にあるが、ここで彼はヒトの好中性顆粒を記述しており、他の動物との異同には触れていない。しかし、Ehrlich (1879b)³⁾において様々な脊椎動物¹⁾の血液と造血器官を調べて全部で5種類の特異的顆粒を発見していることから、ヒト以外の脊椎動物にも好中性の ε 顆粒が認められたことは明らかである。

Ehrlichが ε 顆粒の同定のために開発したtriacid染色とは、酸性色素の水溶液と塩基性色素の水溶液を混合して作製し、沈殿が生じない状態の染色液である (沈殿が生じた場合には濾過して濾液を使用している)。彼はこのような混合液を“neutral mixture (中性混合液)”と呼んだ。また、彼は使用した塩基性色素が三価酸triacidであると考え、“triacid染色 (三価酸染色)”と命名した。中性混合液は中性色素neutral dyeの溶液とは異なり、このことはEhrlichも

認識していた^{4,8,9)}。中性色素とは酸性色素の水溶液と塩基性色素の水溶液を混合して生じる沈殿を指し、アルコール溶性であるが、水に不溶性である。中性色素の例として、Jenner (1899)¹⁰⁾およびMay-Grünwald (1902)¹¹⁾のエオジン酸メチレンブルー、Leishman (1901)¹²⁾やWright (1902)¹³⁾のエオジン酸多染性メチレンブルー、Giemsa液中のエオジン酸アズールIIがあげられる^{14),*3)}。

Ehrlichは様々な酸性色素と塩基性色素を使用してtriacid染色を検討したと推察されるが、その内容については6編の著作に断片的にしか残さなかった [Ehrlich (1980, 1983, 1884, 1892)^{4),15-17)}, Ehrlich & Lazarus (1898)^{8),*4)}, Ehrlich et al. (1909)^{9),*5)}]。

Ehrlichはメチレンブルーやメチルグリーンmethyl greenを三価酸と考えた。三価酸とは酸性基と結合する部位が3つあることを意味する。換言すれば、酸性基と結合する塩基性基を3つ持つこととなる。しかし、現代の知見ではメチレンブルーやメチルグリーンmethylene greenには塩基性基が1つ^{18,19)}、メチルグリーンには塩基性基が2つしか存在しない²⁰⁾。したがって、これらの塩基性色素を用いた中性混合液からなる染色をtriacid染色と呼ぶのは正しくない (メチレンブルーとメチルグリーンはmonoacid, メチルグリーンはdiacidである)。しかし、本稿では慣例にしたがって以降もtriacid染色と呼ぶこととする。

Triacid染色の種類と染色性

Ehrlichは中性混合液を作製するための酸性色素として酸性フクシンを使用 (愛用) しているが、その理由は不明である (のちに酸性色素としてオレンジG orange Gを追加した処方やエオジンをういた処方も報告している^{8,9, 15-17)})。酸性フクシンは3つの酸性基のほかに塩基性基を1つ有する²¹⁾。したがって、酸性フクシンは両性amphotericの色素である²²⁾。しかし、総体としては酸性色素に属する。一方、オレンジGやエオジンは酸性基のみを2つ有する^{23,24)}。酸性色素水溶液と塩基性色素水溶液を混合して生じた沈殿は、さらにどちらかの色素液を追加することで溶解し、特に酸性色素液の添加において顕著である²²⁾。この現象はEhrlichも承知しており^{4,8,9)}、Ehrlich (1880)⁴⁾では酸性フクシン水溶液にメチレンブルー水溶液を徐々に加え、さらに蒸留水を加えて数日間放置し、濾過したのち使用している。この間に生じた変化についての考察がp557の脚注に以下の様に記されている: この過程でわずかに可溶性のメチレンブ

ルー二価酸物または三価酸物が生じ、過剰な水を加えることで可溶性のメチレンブルー一価酸物になる。最初の「可溶性」とは、ほとんど不溶性の意味であろう。また、「メチレンブルー二価酸物または三価酸物」とはそれぞれメチレンブルーに酸性フクシンが2つまたは3つ結合したものを意味すると考えられる。Ehrlich (1880)⁴⁾の考察ではメチレンブルーを三価酸と考えているが、本稿ですでに指摘したように、実際にはメチレンブルーは一価酸なので、誤った考察である。正しくは、酸性フクシンの3つの酸性基それぞれに、塩基性基を1つ有するメチレンブルーが結合することで沈殿が生じたと考えられる。蒸留水を過剰に加えることで可溶性のメチレンブルー一価酸物になるとの記述はおそらく誤りであり、蒸留水を加えなくてもEhrlich (1880)⁴⁾の処方では濾液中にメチレンブルー一価酸物(メチレンブルー1分子と酸性フクシン1分子が結合し、結合体全体としては未結合状態の酸性基を2つ有する)が形成されたと考えられる。しかし、酸性フクシン1分子にメチレンブルー2分子が結合した場合(酸性フクシンの酸性基のうち、1つにはメチレンブルーが結合していない状態)、沈殿となるのかは明らかではない。Ehrlich (1880)⁴⁾の処方のtriacid染色によって、赤血球は赤色に、白血球の大部分(好中球を指すと思われる)では顆粒が紫色に染色されるとされている。しかし、好酸球や好塩基球などの顆粒や細胞核の色調については言及していない。

Ehrlich はその後、4回処方を変えたtriacid染色を発表しており、Ehrlich (1883)¹⁵⁾以降は酸性色素として酸性フクシンとオレンジGを混合して使用している。

塩基性色素としてメチルグリーンを使用したEhrlich (1883)¹⁵⁾の処方では赤血球がオレンジ色を、核は緑がかった色を、好中性顆粒は紫色を呈するとしているが、好酸性顆粒については深く濃い(deep dark)としか述べておらず、色については言及していない。

Ehrlich (1884)¹⁶⁾でもEhrlich (1883)¹⁵⁾と同じ3種類の色素を用いているが、作製法が異なる。ここではヘモグロビンを含むものは全て“オレンジ黄色”に、核は緑色に、好中性顆粒は濃い紫色になるとしているが、好酸性顆粒はEhrlich (1883)¹⁵⁾と同様に深く濃くなるとしか述べていない。

Ehrlich (1892)¹⁷⁾では塩基性色素としてメチルグリーンを使用したtriacid染色液の作製法が示されている。ここではヘモグロビン(赤血球を指すと言え)はオレンジ色の、核は様々な強さの緑がかった色の、好中性顆粒は紫色の、好酸性顆粒は銅色を示すと述べており初めて好酸性顆粒の

色について記述されている。

Ehrlich & Lazarus (1898)⁸⁾には一見、triacid染色の原理とも思える記述があるが、不明瞭な点が多く、Ehrlich (1880)⁴⁾とは矛盾した記述もある(後述)。なお、Ehrlich & Lazarus (1898)⁸⁾にはtriacid染色の最終版ともいえる組成・製法が書かれているが(色素としてはオレンジG、酸性フクシンおよびメチルグリーンを使用)、この組成はすでに広く知れ渡っていたようであり、Jordan (1897)²⁵⁾にも同じ記述が見られる。これはGrübler社から市販されていたtriacid染色の組成であると考えられる。Ehrlich & Lazarus (1898)⁸⁾では核は緑がかり、赤血球はオレンジ色を、好酸性顆粒は銅赤色を、好中性顆粒は紫色を呈するとし、さらに好塩基球は染まらないとしている⁴⁶⁾。以上の変遷はより多くの対象を染め分けられるようにするための試行錯誤であると考えられる。また、中性混合液の作製過程で濾過の工程を省略する意味もあると考えられる。事実、Ehrlich (1883)以降では濾過が行われていない。一方、酸性色素を2種類使用していることから、中性混合液中の色素体の種類は複雑になっていると推察される。Jay (2001)²⁶⁾はEhrlichが当初、酸性フクシンとメチレンブルーからなるtriacid染色を考案し、のちにメチレンブルーをメチルグリーンに変えて、さらにオレンジGを加えたとしているが、Ehrlich (1880)⁴⁾ではすでに酸性フクシンとメチルグリーンからなるtriacid染色も検討したと述べている。

Ehrlich & Lazarus (1898)⁸⁾は塩基性色素にメチルグリーンを、酸性色素にオレンジGを使用した中性混合液では、メチルグリーンの3つの塩基性基全てがオレンジGと結合しており、メチルグリーンの三価酸化合物が生成されると記述している。この記述はEhrlich (1880)⁴⁾とは異なるが、上述したようにEhrlich (1880)⁴⁾の考察は誤っている。また、メチルグリーンは三価酸ではなく、二価酸であることは上述した。この構造を基に、中性混合液中の色素体の構造を推測する。なお、以下では水溶液中でイオン化した場合の色素にも特にイオンとは記さないこととする。

Triacid染色液(中性混合液)中の色素体の構造

Ehrlich (1880)⁴⁾における中性混合液中の色素体についてはすでに考察した。すなわち、酸性フクシンとメチレンブルーによって生じた沈殿では、酸性フクシンの酸性基3つ全てがメチレンブルーと結合したものと考えられ(酸性フクシン:メチレンブルー = 1:3)、これには酸性フクシン由来の未結合の酸性基が存在しない。また、メチレンブルー

の塩基性基は1分子につき1つなので、酸性フクシンとの結合によりメチレンブルーに未結合の塩基性基はなくなる。したがって、この沈殿は未結合の酸性基または塩基性基が存在しないこととなる。実際にはメチレンブルーと結合する前の酸性フクシンには、酸性基3つと塩基性基が1つ存在する。そのため、沈殿には酸性フクシン由来の塩基性基が1つ未結合のまま残っている。しかし、沈殿が生じることは事実であることから、酸性フクシン由来の塩基性基は、酸性フクシン1分子とメチレンブルー3分子からなる色素体を溶解させないと言え、実質この色素体は総体としてイオン化していないと見なせる。以後、酸性フクシンの塩基性基については触れないこととする。一方、酸性フクシンの酸性基1つにメチレンブルーが結合した場合には(酸性フクシン:メチレンブルー=1:1)、酸性フクシンの残りの塩基性基2つがメチレンブルーと結合していないこととなり、総体としてはイオン化している。この構造が酸性フクシンとメチレンブルーの組み合わせによる中性混合液中の可溶化した色素体と考えられる(Fig. 1)。なお、以後の議論では結合してない酸性基と塩基性基を、それぞれ自由酸性基および自由塩基性基と呼ぶこととする。

Ehrlich (1892)¹⁷⁾は酸性色素として酸性フクシンとオレンジGを、塩基性色素としてメチレングリーンを使用して中性混合液を作製している。メチレングリーンはメチレンブルーと同様に塩基性基を1つしか持たないため、形成され

る可溶性の色素体は酸性フクシン1分子とメチレングリーン1分子からなる色素体と、オレンジG 1分子とメチレングリーン1分子からなる色素体の2種類であると考えられる(Fig. 2)。前者には酸性フクシン由来の未結合状態の自由酸性基が2つあり、後者ではオレンジG由来の自由酸性基が1つ存在することとなる。

Ehrlich (1883)¹⁵⁾, Ehrlich (1884)¹⁶⁾およびEhrlich & Lazarus

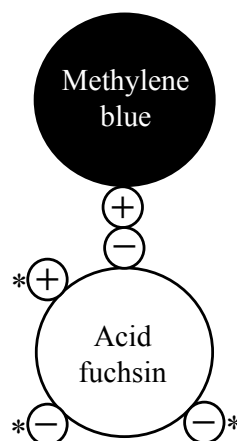


Fig. 1. Schematic illustration of the expected dye complex in Ehrlich's neutral mixture (triacid stain). Combination of tribasic acid dye (acid fuchsin) and monoacidic basic dye (methylene blue)⁴⁾. ⊕, acid group; ⊖, basic group. Astarisk indicates free group.

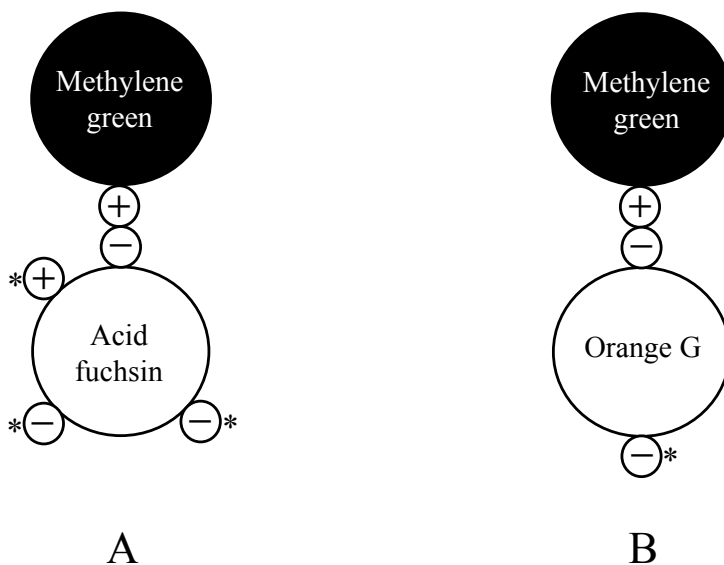


Fig. 2. Schematic illustration of the expected dye complex in Ehrlich's neutral mixture (triacid stain). Combination of two acid dyes (tribasic, acid fuchsin; dibasic orange G) and monoacidic basic dye (methylene green)¹⁷⁾. A, acid fuchsin + methylene green; B, orange G + methylene green. ⊕, acid group; ⊖, basic group. Astarisk indicates free group.

(1898)⁸⁾では酸性色素としては酸性フクシンとオレンジGを、塩基性色素としてメチルグリーンを使用している。メチルグリーンには塩基性基が2つ存在する。オレンジGとメチルグリーンの混合によっても沈殿が生ずることが Ehrlich & Lazarus (1898)⁸⁾に以下のように記述されている (p26): メチルグリーンの溶液を酸性色素, 例えばオレンジGの溶液に一滴ずつ滴下させると, まず粗い沈殿が生じ, オレンジGをさらに加えると完全に溶解する。この時に生じる沈殿の構造を推察する。“粗い沈殿”が生ずることから, 沈殿はオレンジGの酸性基1つとメチルグリーンの塩基性基1つが結合し, これを最小単位として連なっていると推察した。この連なりの両端にあるオレンジG由来の自由酸性基とメチルグリーン由来の自由塩基性基は可溶性には関与しないと考えられる。あるいは両端が結合するかもしれない。このような状態の沈殿物が, さらにオレンジGの追加によって可溶性となる場合, その構造は前述の最小単位とは異なるものであり, 最小単位よりもメチルグリーンへのオレンジGの結合が多くなると考えられる。これらを満たす構造として, メチルグリーンの2つの塩基性基それぞれにオレンジGが結合したものが考えられる。この結合物にはオレンジG由来の自由酸性基が2つ残存することとなる (オレンジG 1分子から1つ)。酸性フクシンとメチルグリーンからなる可溶性の色素体も同様の構造をとると推察される (メチルグリーン1分子に酸性フクシン2分子が結合し, 酸性フクシン由来の自由酸性基が計4つ存在する; Fig. 3)。酸性色素2種類と塩基性色素1種類からなる中性混合液には, 上述の2種類以外に可溶性の色素体がもう1つ形成さ

れると思われる。すなわち, メチルグリーン1分子にオレンジGと酸性フクシンがそれぞれ1分子結合した構造体である。これには酸性フクシン由来の自由酸性基2つとオレンジG由来のそれが1つ存在することとなる (Fig. 3)。以上の推察から導出した中性混合液中の可溶性の色素体は, 総体としてはいずれも酸性色素と見なし得る。

好中性顆粒が酸性フクシンやエオジンといった酸性色素に染色されることが知られている^{5,11)}。この事実は Ehrlich が中性混合液を開発するにいたった理由と矛盾する。Ehrlich (1880)⁴⁾は“正常なヒトの血液を調べ始めると, 好酸球の数はごくわずかで, 肥満細胞は病的なケース (白血病) でしか検出されず, それもごくわずかであることが分かった。白血球の大部分が酸性色素または塩基性色素で可視化できる顆粒を含んでいないとしても, 別の色素で可視化できる顆粒を持っている可能性はある。しかし, この場合, 新しい種類の色素を使用しなくてはならず, 酸性色素や塩基性色素は適さないで, 中性色素しか使用できなかった”と記した (p557)。Ehrlich (1880)⁴⁾が観察した染色標本では本当に好中球の顆粒が酸性色素や塩基性色素で染まっていなかったのかは不明であるが, 好中球の顆粒が微細であり, 高倍率で観察しないと認識できないとしていることから⁴⁾, Ehrlichが目指した染色は低倍率でも好中球を同定できる方法であったと考えられる。

Ehrlich & Lazarus (1898)⁸⁾はp26で, “オレンジ (オレンジGのこと) は (沈殿の) 完全溶解に必要な量以上加えてはならない”と記しているが, その理由については述べていない。これは, 市販の triacid 染色では時に好中性顆粒が酸

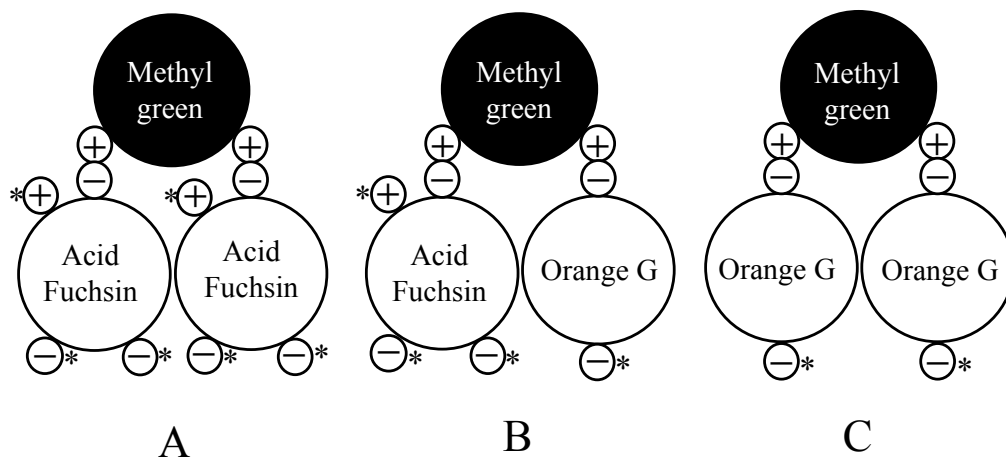


Fig. 3. Schematic illustration of the expected dye complex in Ehrlich's neutral mixture (triacid stain). Combination of two acid dyes (tribasic, acid fuchsin; dibasic orange G) and diacidic basic dye (methyl green)^{8,15,16)}. A, two acid fuchsin + methyl green; B, acid fuchsin & orange G + methyl green; C, two orange G + methyl green ⊕, acid group; ⊖, basic group. Astarisk indicates free group.

性色素に染まることがあり⁵¹⁾, それが過剰に添加された酸性色素に起因することに対する注意かもしれない。

中性混合液中の色素体の特徴

中性混合液中の色素体による染色機序について考察する。ここでは、最も複雑な構成となっていると考えられる酸性フクシン、オレンジGおよびメチルグリーンからなる中性混合液を取り上げる。Ehrlich & Lazarus (1898)⁸⁾は“核は緑がかり、赤血球はオレンジ色を、好酸性顆粒は銅赤色を、好中性顆粒は紫色を呈し、好塩基球は染まらない”としている。好塩基球の顆粒内容物は水溶性であることが一般に知られているので、triacid染色では染まらなかったと思われる。この中性混合液中には上述したように、3種類の色素体が形成されていると考えられる。すなわち、①オレンジG 2分子とメチルグリーン1分子からなる色素体、②酸性フクシン1分子とオレンジG 1分子がメチルグリーン1分子に結合した色素体および③酸性フクシン2分子とメチルグリーン1分子からなる色素体の3種類である。これらの色素体はいずれも自由酸性基を有する酸性色素として振る舞うと考えられ、種類によって紫色の程度(赤紫～青紫)は異なるかもしれないが、いずれも紫色を呈すると推察される。好中性顆粒には、これらの色素体が酸性色素と塩基性色素に解離せず、そのまま結合する(好中性顆粒は酸性色素によって染色されることはすでに述べた)。換言すれば、好中性顆粒の「好酸性度」は色素体を解離させない程度である(低い)。ここでは、色素体を構成する塩基性色素(メチルグリーン)を「好酸性物質」と考え、塩基性色素と好中性顆粒の好酸性成分(=好酸性物質)の間における好酸性度の高低を考慮している。好中性顆粒の好酸性度は、塩基性色素の好酸性度よりも低いため、色素体の酸性色素と塩基性色素は解離しないが、色素体は総体として酸性色素として振る舞うので、好中性顆粒に結合して顆粒を色素体の色である紫色に染めると言える。核が緑色に染色されるのは、核の好塩基性度が色素体の酸性色素(好塩基性物質)の好塩基性度よりも高いため、核の近傍で色素体が解離し、メチルグリーンが核を染色すると解釈される。赤血球はオレンジ色を、好酸球の好酸性顆粒は銅赤色を呈するが、これらはともに好酸性度が高く色素体を解離して酸性色素が結合したと考えられる。また、赤血球のオレンジ色はオレンジGの色調であり、好酸性顆粒の銅赤色はオレンジGと酸性フクシンの混色によると思われる。このことから、好酸性物質に対する色素体の解離の程度は色素体の種類に

よって異なると推察される。すなわち、前述の①<②<③の順に解離に要する好酸性度は高くなり、赤血球の好酸性度は好酸性顆粒のそれよりも低く、①の色素体のみが赤血球の近傍で解離するために、赤血球がオレンジ色に染まると思われる。また、好酸性顆粒の好酸性度は高く、①、②および③のいずれも解離するために、オレンジGと酸性フクシンの両方が好酸性顆粒に結合して銅赤色になると考えられる。

以上のような中性混合液における染色機序はこれまで報告されていない。Ehrlich & Lazarus (1898)⁸⁾は中性混合液による染色について、“核物質のように塩基性色素に親和性のある成分は、中性混合液では塩基性色素の色に染まり、好酸性成分は2つの酸性染料のうちの一つの色で染まる。一方、組織の構成上、酸性色素と塩基性色素に等しい親和性を持つ部分は、中性化合物を引き寄せるので、混合した色に染まる。”と述べているだけである(p27)。

中性混合液で染色された好中球の顆粒の色調はいずれの報告においても紫色とされている。この“紫色”が青紫色なのか赤紫色なのかはEhrlichの著作からは読み取れない。また、Ehrlichはtriacid染色像を残していない。しかし、Ehrlich et al. (1909)⁹⁾にはtriacid染色像がある。この図(Tafel V)は本著の執筆者であるNaegeliが指導して画家に描かせた着色されたスケッチであるが、図の説明は本文中にない。その図から少なくともオレンジG、酸性フクシンおよびメチルグリーンからなるtriacid染色における好中性顆粒の色調は赤紫色と判断される。しかし、他の色素の組み合わせによるtriacid染色の場合は不明である。

Romanowsky型染色における好中性顆粒の染色性

現在、一般に血液学で使用されている染色液はアズールBを主成分とするメチレンアズールを含むものであり、メチレンアズールのほかにエオジンやメチレンブルーが含まれている。このような染色液による染色はRomanowsky型染色と称されているが、いずれの染色液においてもエオジンは塩基性色素と中性色素を形成しており、Ehrlichのtriacid染色における中性混合液とは異なる。Romanowsky型染色の実施時に中性混合液中の色素体と同じ構造が形成されるのか否かについてはこれまで考察されていない。

Romanowsky (1890, 1891)^{27,28)}はエオジンとメチレンブルー(使用したメチレンブルー水溶液には、意図せずにメチレンアズールが生成・混入していた)からなる中性混合

液を作製して血液を染色している (Romanowskyは中性色素を作製・使用したわけではない)。Romanowskyによる最初の報告は1890年に予報として発表され²⁷⁾、翌年、St. Petersburg Medicinische Wochenschriftに詳細な内容が掲載された²⁸⁾。Romanowsky が中性混合液を作製したことはRomanowsky (1891)²⁸⁾ に記されているが、Romanowsky (1890)²⁸⁾では明記されていない。Romanowskyの中性混合液によって全ての種類の白血球の核が紫色になり、好中球には濃紫色の顆粒が観察されている²⁸⁾。この好中性顆粒の色調は中性混合液によるものと言える。Romanowskyの発表以降、核が紫色 (赤紫色) に染色されることをRomanowsky効果と呼ぶが、効果の発揮にはメチレンブルーの酸化物であるメチレンアズールが必要であることがのちに判明する²⁹⁻³²⁾。また、Romanowsky効果にはエオジンも必要であり²⁹⁻³²⁾、メチレンアズールとエオジンが複合体を形成することで紫色を呈すると考えられている³³⁾。メチレンアズールによって様々な血球の顆粒が紫色 (赤紫色) に染色されることも知られている。好中球では好中性顆粒よりも早期に産生されるアズール顆粒がこれに該当する。メチレンアズールによるアズール顆粒の紫色の色調は、一般にメチレンアズールが異調染色性を示すことによるものとされており、核における紫色の色調発現とは異なる*⁷⁾。Romanowsky型染色液にはメチレンアズールが含まれていることから、好中球に紫色の顆粒が観察された場合、Romanowsky型染色で好中性顆粒が紫色になると仮定すると (この仮定は以後の議論で棄却される)、好中性顆粒とアズール顆粒の区別ができないこととなる。また、紫色のアズール顆粒をその染色性から好中性顆粒に誤同定することも考えられる。好中球のアズール顆粒は顆粒の成熟によってアズール好性が消失することが知られており³⁴⁾、通常、血液中出现した好中球 (成熟した好中球) のアズール顆粒はRomanowsky型染色によって染色されない。しかし、感染症時にはアズール顆粒を起源とする中毒顆粒を有する好中球が血液中に現れ、本顆粒はアズール好性で紫色を呈する³⁵⁻³⁸⁾。中毒顆粒を有する好中球では好中性顆粒の発達が悪いことも知られている³⁹⁾。このことから、中毒顆粒を好中性顆粒と誤認する可能性もある。さらに、健常者の血液中の好中球に、好中性顆粒の色調が反映していると思われる淡いピンク色の細胞質とともに、時に粗大なアズール顆粒が少数認められることがある³⁶⁾。このことから、アズール顆粒を紫色に染まった好中性顆粒に誤同定することが考えられる。

Jenner (1899)¹⁰⁾とMay & Grünwald (1902)¹¹⁾はエオジンとメチレンブルーからなる中性色素 (エオジン酸メチレンブルー) を作製し、これをメタノールに溶解して染色に用いている。エオジン酸メチレンブルーはメチレンアズールが含まれないので、単独で使用する場合にはRomanowsky型染色ではない。しかし、エオジン酸メチレンブルーのメタノール溶液 (May-Grünwald液と称されることが多い) は、May-Grünwald・Giemsa (MGG) 染色に使用されており、またGiemsa液中にもエオジン酸メチレンブルーが含まれている [Giemsa液の成分であるエオジン酸アズールIIはエオジン酸メチレンブルーとエオジン酸メチレンアズールの等 (重) 量混合物である]。さらに、エオジン酸メチレンアズールやWright液およびLeishman液中のエオジン酸多染色性メチレンブルーもエオジン酸メチレンブルーと同様に中性色素である。これら中性色素の構造はエオジン1分子の酸性基2つそれぞれに塩基性色素が結合したものと考えられる。したがって、Jenner (1899)¹⁰⁾とMay & Grünwald (1902)¹¹⁾の結果の解析は、中性色素によってEhrlichのtriacid染色における中性混合液中の色素体が形成され得るのかの判断に有用である。また、中性混合液中の色素体形成とは異なる染色機序が存在するのかも推察できる。

Jenner (1899)¹⁰⁾とMay & Grünwald (1902)¹¹⁾はともに、好中性顆粒は赤色であるとしている。彼らの染色法は現代のMGG染色時のMay-Grünwald染色とは異なっており、Jenner (1899)¹⁰⁾はエオジン酸メチレンブルーのメタノール溶液に標本を浸漬したのち、蒸留水で水洗するだけである。May & Grünwald (1902)¹¹⁾も同様にメタノール溶液に浸漬したのち、数滴のメタノール溶液を加えた蒸留水で洗浄している。これらの方法と結果がEhrlich et al. (1909)⁹⁾で紹介されている [p37; ただし、メタノール溶液への浸漬時間はJenner (1899)¹⁰⁾が1-3分間、May & Grünwald (1902)¹¹⁾が2分間としているのに対して、Ehrlich et al. (1909)⁹⁾では5分間となっている。また、洗浄には蒸留水が使われたことになっている⁹⁾]。May & Grünwald (1902)¹¹⁾ではエオジン酸メチレンブルーのメタノール溶液による染色以外の染色についても記されており、①好中性顆粒はメチレンブルー単染色で青く染まる。②エオジン染色後にメチレンブルー染色を施しても好中性顆粒は両色素を混合した色調にはならない (エオジンの色調を示すと思われる)。③1%のエオジン水溶液と1%のメチレンブルー水溶液を等量混合直後に染色に用いると、好中性顆粒は赤く染まる (この混合液中に形成された沈殿がエオジン酸メチレンブルーである)。May &

Grünwaldによるこれらの観察結果から、好中性顆粒には好酸性成分だけでなく、好塩基性(メチレンブルー好性)成分も存在するが、後者はメチレンブルーを単独で使用した時にしか染色されないと考えられる。すなわち、エオジンとメチレンブルーが共存する場合には、エオジンが優先的に好中性顆粒に結合し、その後のメチレンブルーの結合は起こらないと言える(エオジンとメチレンブルーによる二重染色においても、先に好中性顆粒をエオジンで染めるために、後染色に用いたメチレンブルーは好中性顆粒に結合しなかったと思われる)。また、エオジン酸メチレンブルーは染色能力を有する状態(=水溶液中でイオン化した場合)では、中性混合液中の色素体を形成せず、イオン化したエオジンが優先的に好中性顆粒に結合するので、好中性顆粒をエオジンとメチレンブルーの混色、すなわち紫色に染色することはないと推察される。なぜ、エオジンとメチレンブルーが共存した状態では、好中性顆粒にメチレンブルーが結合しないのかを考察する。ここでは、好中性顆粒内のメチレンブルー陽性成分と、水溶液中のエオジンの両方を好メチレンブルー成分と考え、両者の好メチレンブルー度を比較した場合、エオジンの方が高いため、メチレンブルーは好中性顆粒内の好メチレンブルー成分に結合せず、水溶液中のエオジンと結合したと解釈した。

エオジン酸メチレンブルーが好中性顆粒を紫色に染色できないことが、他の中性色素にも適応可能なかを、中性色素のみからなるLeishman染色とWright染色について解析した。Leishman (1901)¹²⁾とWright (1902)¹²⁾はメチレンブルーをアルカリと熱で処理してメチレンアズールを含む様々な酸化物からなる多染性メチレンブルーを作製し(使用したアルカリと加熱条件は両者で異なる)、これとエオジンによる中性色素を作製した。両者とも中性色素のメタノール溶液を標本上に載せて固定したのち、蒸留水を注いで染色を行っている。Leishman (1901)¹²⁾では、好中球の核は濃いルビー赤(ruby-red)色となり、その顆粒は赤色と記した。なお、Leishmanは好中球の顆粒を好中性顆粒と呼ばず、好酸性顆粒としている。核のルビー赤色は赤紫色を指し、Romanowsky効果による色調と考えられる。この記述から、多染性メチレンブルーとエオジンで形成される中性色素も、エオジン酸メチレンブルーと同様に好中性顆粒を紫色に染色しないと見える。一方、Wright (1902)では好中球の核はdark lilac colorとされ、顆粒はreddish lilac colorと表記されている。lilac colorは赤紫色を指すことから、核は濃い赤紫色を、顆粒は赤味が強い赤紫色とい

うことになる。この顆粒の色調が、本当に紫色であれば、好中性顆粒はWright染色で紫色を呈することになる。しかし、Wright染色を施した他の研究者の著作では、好中性顆粒は淡いピンク色(淡橙色)³⁷⁾と記述しているものもある。また、Wright染色像からは淡赤色(カラー写真)^{37,40)}や淡橙色(着色されたスケッチ)^{40,41)}の顆粒として認められる。したがって、Wright染色による好中性顆粒の色調はエオジンによると判断された。Wright (1902)が観察したreddish lilac colorの顆粒は好中性顆粒ではなく、アズール顆粒に関連した構造、例えば中毒顆粒であった可能性もあり、後述するViereck (1906)⁴²⁾の観察結果と同じであると思われる。以上のように、中性色素のみからなる染色液では、好中性顆粒は紫色を示さないと考えられる。

May (1906)⁴³⁾はMay-Grünwald染色を施した標本をメチレンアズール水溶液で処理することで、Romanowsky効果が得られると報告したが、好中性顆粒の色調には変化を認めていない。Viereck (1906)⁴²⁾はMay (1906)⁴³⁾の方法を追試し、メチレンアズールによる後処理で、Romanowsky効果が得られるとのMayの主張を否定している。しかし、Viereck (1906)⁴²⁾は好中球に好酸性顆粒(好酸球の顆粒)よりも小さく赤紫色の顆粒が不均一に分布していたと記述している。この顆粒はメチレンアズールによる後処理で染色されたものであることから中毒性顆粒であると推察される。すなわち、Viereck (1906)⁴²⁾が観察した標本の好中球は中毒性顆粒を有していたこととなる。

Giemsa液には中性色素のほかに、塩基性色素であるメチレンブルーとメチレンアズールがそれぞれ単独で含まれている。Giemsaは1904年に、現代でも使用されているGiemsa液について報告したが¹⁴⁾、これには血球の染色性に関する記述はない。Giemsaは1902年にGiemsa (1904)¹⁴⁾に繋がる2編の報告を行った。Giemsa (1902a)³²⁾は予報として発表され、その詳細はGiemsa (1902b)⁴⁴⁾にある。血球の染色性に関する記述はGiemsa (1902a)³²⁾にあるが、この染色は、Giemsa (1904)¹⁴⁾で報告された現代のGiemsa染色ではない。Giemsa (1902a, 1902b)^{32,44)}はアズールII [メチレンブルーとメチレンアズールの等(重)量混合物; Giemsa (1902b)⁴⁴⁾では混合率が示されていないが、Giemsa (1904)¹⁴⁾で等(重)量であることが記述されている]の水溶液とエオジン水溶液を混合して染色に用いている。染色中に沈殿が生じたと記されていることから、混合直後に染色を開始したと思われる。また、中性混合液を作製したとの記述もない。染色前に標本をアルコール [おそらくエタノール] で

固定しているが、固定時間は記述されていない。Giemsa (1902a)³²⁾は、“赤血球は淡赤色、単核および多核白血球の核は鮮やかな赤色または紫色、寄生虫(マラリア原虫を指すと思われる)およびリンパ球の細胞質は青色、好中性顆粒はルビー赤色、好酸性顆粒は淡赤色または淡青色”と記した。この知見はEhrlich et al. (1909)⁹⁾で紹介されている(p37)。ただし、ここの染色方法は詳細は異なるが、Giemsa (1904)¹⁴⁾に準じた記述であり、Giemsa (1902a)³²⁾が実際に行った方法とは異なる。Ehrlich et al. (1909)⁹⁾ではGiemsa (1902a)³²⁾の記述を、“赤血球は淡赤色、単核および多核白血球の核は鮮やかな赤色または紫色、寄生虫およびリンパ球の細胞質は青色、”としており、ここまでは、Giemsa (1902a)³²⁾と同じであるが、以後の記述を、“好中性顆粒は紫赤色、好酸性顆粒は赤茶色、肥満細胞の顆粒は藤色mauve、”と記しており、Giemsa (1902a)³²⁾の記述と異なる。なお、引用文献にはGiemsa (1902a)³²⁾のみがある。また、肥満細胞とは好塩基球のことであり⁴⁷⁾、藤色とは赤紫色を指すと思われる。Giemsa (1902a)³²⁾が“好酸性顆粒は淡赤色または淡青色”と記したのはおそらく誤りであり、淡赤色を示すのが好酸性顆粒(好酸球の顆粒)であり、淡青色の顆粒は好塩基球の顆粒と考えられるが、Ehrlich et al. (1909)⁹⁾ではこれらの顆粒を赤茶色および藤色としている。また、好中性顆粒をGiemsa (1902a)³²⁾がルビー赤としているのに対して、Ehrlich et al. (1909)⁹⁾では紫赤色となっている。Ehrlich et al. (1909)⁹⁾には自身でGiemsa染色を行ったとの記述が一切なく、Giemsa (1902a)³²⁾の記述との比較もないことから、Ehrlich et al. (1909)⁹⁾によるGiemsa (1902a)³²⁾の記述は根拠のない大幅な改変であると考えられ、本稿における考察には使用できない。Giemsa (1902a)³²⁾における好中性顆粒のルビー赤は赤紫色なのか、赤色なのかを考察する。Giemsa (1902a)³²⁾では単核および多核白血球の核は鮮やかな赤色または紫色とされており“紫色”の単語が使われている。もしも好中性顆粒が赤紫色であるのならば“ルビー赤”ではなく“赤紫色”または“紫色”と記述するはずである。また、triacid染色によって好中性顆粒は“紫色”に染色されることは当時知られていたことなので、同じ色調であるならば“ルビー赤”ではなく“赤紫色”とするはずである。Giemsa (1902a)³²⁾は染色液中に生じた沈殿(中性色素のエオジン酸アズールIIと言え、その組成はエオジン 1分子に、①メチレンブルー2分子が結合、②メチレンブルー1分子とメチレンアズール1分子が結合、③メチレンアズール2分子が結合した3種類が考えられる)を使用した染色も行って

いるが[方法の詳細はGiemsa (1902a)³²⁾にも、Giemsa (1902b)⁴⁴⁾にもない]、その沈殿による染色との間に違いはなかったとしている。上述したように中性色素を用いた染色では好中性顆粒は中性色素の解離によって生じたエオジンによって優先的に染色されると推察される。このことから、Giemsa (1902a)³²⁾のルビー赤は赤紫色ではなく赤色、おそらく透明感のある赤色であったと考えられる。

PappenheimはMay-Grünwald染色とGiemsa染色[現代でも使用されているGiemsa (1904)¹⁴⁾の処方]を組み合わせたMGG染色(Pappenheim染色)を考案したが、それに先立つ1901年に、エオジンとメチレンアズールからなる中性混合液について報告しており⁴⁵⁾、好中性顆粒は紫色を示すとしている。作製した染色液は中性混合液なので当然の結果である。PappenheimによるMGG染色法は最初、May (1906)⁴³⁾の論文紹介の記事中に付録として示された⁴⁶⁾。しかし、MGG染色による血球の染色性については言及されていない。MGG染色法はPappenheim & Hirschfeld (1908)⁴⁷⁾にも記述されており(p348)、好中性前骨髄球(neutrophilic Promyelozyten)に好中性顆粒とともに明らかなアズール顆粒が認められるとしているが(p361)、顆粒の色調については書かれていない。なお、ここの好中性前骨髄球は、現在の分類では好中性骨髄球に相当すると考えられる。Pappenheim (1908)⁴⁸⁾には染色方法とともに、染色標本は“May染色の繊細な構造および色調と、Giemsa染色の利点(アズールの赤と核構造)を組み合わせている”と記されている。ここのMay染色とは、文脈からMay (1906)⁴³⁾ではなく、May & Grünwald (1902)¹¹⁾であると考えられ、アズールの赤とは赤紫色のことと思われる。したがって、MGG染色された好中球の好中性顆粒はMay-Grünwald染色時の赤であると言える。Pappenheim (1908)⁴⁸⁾にはGiemsa染色¹⁴⁾では好中性顆粒は通常、あまり染色されないとされている。なお、Pappenheimが行ったMGG染色では、標本をMay-Grünwald液で固定後、標本上に蒸留水を追加してMay-Grünwald染色を実施している。この方法は現在のMGG染色と同様である。Pappenheimはメチレンアズールとエオジンからなる中性混合液では好中性顆粒が紫色を呈することを報告しているが⁴⁵⁾、MGG染色時の好中性顆粒の色調との異同については言及していない。おそらくPappenheimにとって好中性顆粒が染色法の違いによって異なる色調となることは当然であり、むしろMGG染色においてアズール顆粒と好中性顆粒が染め分けできることは好都合であったと考えられる。

現代における好中性顆粒の染色性の記述

以上の様に, エオジン酸メチレンブルーによる染色や中性色素を含むRomanowsky型染色では好中性顆粒はtriacid染色時のような紫色を示すことはないと考えられた。しかし, 現実にはRomanowsky型染色による好中性顆粒の染色性について様々に表現されており, 淡橙色⁴⁹⁾, ピンク色ないし紫色⁵¹⁾, 桃色または薄紫色³⁵⁾, 茶かっ色⁵⁴⁾, 淡褐色³⁸⁾ (以上は染色法不明), 淡桃色から淡紫紅色⁵³⁾, 淡いピンク色 (淡橙色)³⁷⁾ (以上はWright染色), ピンク色ないし淡青色 (Giemsa染色)^{55,56)}, 淡赤紫色⁵⁷⁾, 淡橙色⁵⁰⁾, 橙褐色⁵²⁾ (以上はMGG染色) などがある。もしも本当に好中球に紫色の顆粒が観察されたのであれば, それはメチレンアズール好性で紫色を呈する状態のアズール顆粒に関連した構造と推察される。

Giemsa染色によって好中性顆粒がピンク色ないし淡青色を呈するとの報告がある^{55,56)}。真骨魚類 (硬骨魚類) のコイ *Cyprinus carpio* では, 好中球に3種類の顆粒 (好エオジン性顆粒, 好塩基性顆粒, 難染色性顆粒) が認められているが, 好エオジン性顆粒はMGG染色のMay-Grünwald染色時に染まり, その後のGiemsa染色時に褪色することが報告されている⁵⁸⁾。一方, 好塩基性顆粒はMay-Grünwald染色では染まらず, Giemsa染色によって淡青色を呈する。なお, 難染色性顆粒はいずれの色素にも染まらない。ヒト好中球のGiemsa染色標本に認められる淡青色の顆粒は, 本来の好中性顆粒ではなく, 好中球に含まれる他の種類の顆粒⁴²⁾が染色されたのかもしれない。

ヒト好中球の好中性顆粒の色調については, “塩基性および酸性色素の双方をすこしずつとる⁵³⁾”, “塩基性色素と酸性色素がそれぞれ結合する⁵⁹⁾”などと記述されている。また, “中性色素のエオジン酸メチレンブルーは好中性顆粒を赤褐色³⁶⁾や赤褐色~紫紅色⁶⁰⁾に染色する”とするという記述も認められる。さらに, “中性色素が顆粒中の脂質に溶け込む”との考えもある⁵⁹⁾。しかし, 上述したように, 中性色素 (エオジン酸メチレンブルー) による染色を行った Jenner (1899)¹⁰⁾ および May & Grünwald (1902)¹¹⁾ の記述では好中性顆粒は赤色であり, 酸性色素と塩基性色素の混色による色調や, 中性色素自体の色調とは異なる。

現代では Ehrlich の triacid 染色が血液学研究に使用されることはほとんどなく, ヒト以外の脊椎動物, 例えば魚類の好中球に triacid 染色で紫色に染色される顆粒が存在するか否かは明らかではない。すなわち, 厳密な意味の好中性顆粒が魚類にあるのかは不明である。しかし, ヒトの好中

球と相同な顆粒球は魚類にも存在すると考えられており, 一般に好中球と称されている。本稿において, 現在血液学で使用されている Romanowsky 型染色では好中性顆粒は, triacid 染色時の紫色を示さないと考えられた。したがって, 魚類だけでなく, ヒトを含む他の脊椎動物においても, 好中球の好中性顆粒 (特殊顆粒, 二次顆粒) の Romanowsky 型染色における染色性を “好中性” と呼ぶのは不適當であると思われる。

後 注

⁴¹⁾ カエルとイモリの種名は不明である。また, Ehrlich はヒト以外の哺乳類としてウサギ, モルモット, イヌ, ウシ (子牛) を使用している。

⁴²⁾ 現在では, ヒトの好中球には5種類の顆粒 [①アズール顆粒 (azurophilic granule = 一次顆粒 primary granule), ②特殊顆粒 (specific granule = 二次顆粒 secondary granule), ③ゼラチナーゼ顆粒 (gelatinase granule = 三次顆粒 tertiary granule), ④フィコリン-1-リッチ顆粒 (ficolin-1-rich granule) および ⑤分泌小胞 secretory vesicle が存在することが知られているが⁷⁾, アズール顆粒と特殊顆粒以外の顆粒の染色性については不明である。

⁴³⁾ エオジンとメチレンブルーからなる中性色素がエオジン酸メチレンブルーであり, これをメタノールに溶解したものが, May-Grünwald 液 (= Jenner 液) である。エオジンと多染性メチレンブルーからなる中性色素 (エオジン酸多染性メチレンブルー) をメタノールに溶解したものが, Leishman 液や Wright 液である (メチレンブルーをアルカリ中で酸化させたものが多染性メチレンブルーであり, これには種々のメチレンアズール等が含まれる)。Giemsa 液にはエオジン酸アズールIIとアズールIIがグリセリンとメタノールの等量液中に溶解されている [アズールIIとはメチレンブルーとメチレンアズール (主成分としてアズールBが含まれる; メチレンアズールはアズールIとも呼ばれる) の等 (重) 量混合物であるが, 現在ではメチレンブルーと精製されたアズールBからなる。また, エオジン酸アズールIIとはエオジン酸メチレンブルーとエオジン酸メチレンアズール (エオジンとメチレンアズールからなる中性色素) の等 (重) 量混合物である。我が国の成書ではしばしば, エオジン酸アズールIIをエオジン酸メチレンブルーとメチレンアズール (= アズールI) の混合物と記されているがこれは誤りである。

- *⁴ Ehrlich & Lazarus (1898)⁸では両者の執筆範囲が明記されていないので、共著とした。
- *⁵ Ehrlich et al. (1909)⁹はEhrlich & Lazarus (1898)⁸の第2版に相当するが、Ehrlichは序文しか記していない。しかし、本稿ではEhrlichの著作として扱う。
- *⁶ Ehrlichは好塩基球を血液中に遊離した肥満細胞であると考えていたので(Westphal⁶参照)、Ehrlichの著作では“好塩基球”は“肥満細胞”と表記されている。
- *⁷ アズール顆粒においても核と同様にメチレンアズールとエオジンの複合体が形成されて赤紫色になるとの意見もある³³。

文 献

- 1) Ehrlich P: Beiträger zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, **13**, 263-278 (1877)
- 2) Ehrlich P: Beiträger zur Kenntniss der granulirten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. *Archiv für Anatomie und Physiologie, Physiologische Abtheilung (Verhandlungen der physiologischen Gesellschaft zu Berlin 1878-1879)*, 166-169 (1879a)
- 3) Ehrlich P: Ueber die specifischen Granulationen des Blutes. *Archiv für Anatomie und Physiologie, Physiologische Abtheilung (Verhandlungen der physiologischen Gesellschaft zu Berlin 1878-1879)*, 571-579 (1879b)
- 4) Ehrlich P: Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Zeitschrift für Klinische Medizin*, **1**, 553-560 (1880)
- 5) Kanthack AA & Hardy WB (1894): The morphology and distribution of the wandering cells of mammalia. *The Journal of Physiology*, **17**, 81-119 + 1 plate (II) (1894)
- 6) Westphal E: Ueber Mastzellen (Inaugural-Dissertation, 1880). *In: Ehrlich P (herausgegeben) Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes (Gesammelte Mittheilungen)*, August Hirschwald, Berlin, 17-41 (1891)
- 7) Schuettpelz LG, Link DC: Neutrophilic Leukocytes. *In: Means RT etc. (ed) Wintrobe's Clinical Hematology (15th edition)*, Wolters Kluwer, Philadelphia etc., 136-167 (2024)
- 8) Ehrlich P, Lazarus A (Mitverfasser): Die Anaemie: Normale und Pathologische Histologie des Blutes, Alfred Hölder, Wien, 201pp + 2 Tafeln (I & II) (1898)
- 9) Ehrlich P (Vorwort), Lazarus A, Naegeli O (mitwirkender Author): Die Anaemie: Normale und Pathologische Histologie des Blutes (zweite Auflage), Alfred Hölder, Wien & Leipzig, 161pp + 5 Tafeln (I-V) (1909)
- 10) Jenner L: A new preparation for rapidly fixing and staining blood. *The Lancet*, **153**, 370-371 (1899)
- 11) May R, Grünwald L: Über Blutfärbungen. *Centralblatt für Innere Medicin*, **23**, 265-270 (1902)
- 12) Leishman WB: Note on a simple and rapid method of producing Romanowsky staining in malarial and other blood films. *The British Medical Journal*, **2**, 757-758 (1901)
- 13) Wright JH: A rapid method for the differential staining of blood films and malarial parasites. *The Journal of Medical Research*, **7**, 138-144 (1902)
- 14) Giemsa G: Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, **37**, 308-311 (1904)
- 15) Ehrlich P: Demonstration eines leukämischen Blutpräparates. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, **9**, 670-671 (1883)
- 16) Ehrlich P: Zur Kenntniss des acuten Milztumors. *Charit-Annalen*, **9**, 107-114 (1884)
- 17) Ehrlich P: Ueber schwere anämische Zustände. *Verhandlungen des Kongresses für Innere Medizin*, **11**, 33-52 (1892)
- 18) Anonym: 6137. Methylene Blue. *In: Budavari S etc. (ed) The Merck Index (12th edition)*, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station (NJ), 6142 (1996)
- 19) PubChem Compound Database: Methylene green. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/75889> (Viewed on November 20, 2023)
- 20) Anonym: 6157. Methyl Green. *In: Budavari S etc. (ed) The Merck Index (12th edition)*, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station (NJ), 6154 (1996)

- 21) Anonym: 109. Acid Fuchsin. *In*: Budavari S etc. (ed) The Merck Index (12th edition), Merck Research Laboratories, Whitehouse Station (NJ), 101 (1996)
- 22) 関 正次: 組織検査法 (組織構造と局所化学) (改題第3版), 杏林書院, 434pp (1961) [Seki M: No title in a foreign language (Histological Examination Method (Organizational Structure and Local Chemistry) (retitled 3rd edition)), Kyorin-Shoin, Tokyo, 434pp (1961) (in Japanese)]
- 23) PubChem Compound Database: Orange G. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Orange-G> (Viewed on November 20, 2023)
- 24) Anonym: 3639. Eosine Yellowish – (YS). *In*: Budavari S etc. (ed) The Merck Index (12th edition), Merck Research Laboratories, Whitehouse Station (NJ), 3638 (1996)
- 25) Jordan A: The technique of staining blood for microscopical examination with Ehrlich's tri-acid solution. *Medical Record*, **51**, 802-804 (1897)
- 26) Jay V: Paul Ehrlich. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **125**, 724-725 (2001)
- 27) Романовскаго ДЛ: Къ вопросу о строении чужеродныхъ малярии. *Врачъ*, **11**, 1171-1173 (1890) [Romanowsky DL: To a question of a structure of malaria parasites. *Vrach*, **11**, 1171-1173 (1890) (in Russian)]
- 28) Romanowsky D: Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. *St. Petersburger Medicinische Wochenschrift*, **16**, 297-302 + 307-315 (1891)
- 29) Nocht B: Zur Färbung der Malariaparasiten. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, **24**, 839-844 (1898)
- 30) Nocht B: Nachtrag zu dem Aufsätze in No. 22: "Zur Färbung der Malariaparasiten.". *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*. 1. Abteilung, **25**, 17 (1899a)
- 31) Nocht B: Zur Färbung der Malariaparasiten. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*. 1. Abteilung, **25**, 764-769 (1899b)
- 32) Giemsa G: Färbemethoden für Malariaparasiten. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, **31**, 429-430 (1902a)
- 33) Horobin RW: How Romanowsky stains work and why they remain valuable – including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotechnic & Histochemistry*, **86**, 36-51 (2011)
- 34) Parmley RT: Mammals. *In*: Rowley AF, Ratcliffe NA (ed) Vertebrate Blood Cells, Cambridge University Press, Cambridge etc., 337-424 (1988)
- 35) 近藤 弘, 竹田知広: 末梢血白血球の異常. *In*: 通山 薫, 張替秀郎 (編) 血液細胞アトラス (第6版), 文光堂, 東京, 135-142 (2018) [Kondo H, Takeda T: No title in a foreign language (Peripheral Blood Leukocyte Abnormalities). *In*: Tohyama K, Harigae H (ed) Atlas of Blood Cells (6th edition), Bunkodo, Tokyo, 135-142 (2018) (in Japanese)]
- 36) 勝田逸郎, 井野晶夫, 岡本昌隆, 池本敏行 (共著), 平野正美 (監): ビジュアル臨床血液形態学, 南江堂, 東京, 323pp (1999) [Katsuda I, Ino T, Okamoto M, Ikemoto T (co-author), Hirano M (supervisor): Visual Textbook of Blood Cells Hematology, Nankodo, Tokyo, 323pp (1999) (in Japanese)]
- 37) 小郷正則: 実践人体血液検査, 西日本法規出版, 岡山, 351pp (1995) [Ogou M: Human Practical Hematology, Nishinihonhoukishuppan, Okayama, 351pp (1995) (in Japanese)]
- 38) 常名政弘: 血球形態検査. *In*: 奥村伸生, 戸塚 実, 本田孝行, 矢富 裕 (編), 金井正光 (監): 臨床検査法提要 改訂第35版, 金原出版, 東京, 251-297 (2020) [Jona M: No title in a foreign language (Blood Cell Morphometry). *In*: Okumura N, Tozuka M, Honda T, Yatomi Y (ed), Kanai M (supervisor): Kanai's Manual of Clinical Laboratory Medicine (revised 35th edition), Kanehara, Tokyo, 251-297 (2020) (in Japanese)]
- 39) 三輪史朗, 渡辺陽之輔 (共著): 血液細胞アトラス (第5版), 文光堂, 東京, 466pp (2004) [Miwa S, Watanabe Y (co-author): Atlas of Blood Cells (5th edition), Bunkodo, Tokyo, 466pp (2004) (in Japanese)]
- 40) Bloom W, Fawcett DW: A Textbook of Histology (10th edition, Asian edition), W. B. Saunders, Philadelphia etc., and Igaku Shoin, Tokyo, 1033pp (1975)
- 41) Jordan HE: A Textbook of Histology (8th edition), D. Appleton-Century, New York & London, 690pp (1940)
- 42) Viereck H: Die Romanowskyfärbung nach May.

- Münchener Medizinische Wochenschrift*, **53**, 1414-1415 (1906)
- 43) May R: Eine neue Methode der Romanowsky-Färbung. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, **53**, 358-359 (1906)
- 44) Giemsa G: Färbemethoden für Malariaparasiten. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, **32**, 307-313 (1902b)
- 45) Pappenheim A: Eine panaptische Triazidfärbung. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **27**, 798-799 (1901)
- 46) Pappenheim A: Richard May, Eine neue Methode der Romanowsky-Färbung. *Münchener Medizinische Wochenschrift. Folia haematologica*, **3**, 344 (1906)
- 47) Pappenheim A, Hirschfeld H (mitwirkender Author): Über akute myeloide und lymphadenoide makrolymphozytäre Leukämie an der Hand von zwei verschiedenen Fällen. *Folia haematologica*, **5**, 347-425 + 2 Tafeln (III & IV) (1908)
- 48) Pappenheim A: Panaptische Universalanfärbung für Blutpräparate. *Medizinische Klinik. Beihelt*, **4**, 1244 (1908)
- 49) 張替秀郎: 血液細胞の基本構造. *In: 通山 薫, 張替秀郎 (編) 血液細胞アトラス (第6版)*, 文光堂, 東京, 2-6 (2018) [Harigae H: No title in a foreign language (Basic Structure of Blood Cells). *In: Tohyama K, Harigae H (ed) Atlas of Blood Cells (6th edition)*, Bunkodo, Tokyo, 2-6 (2018) (in Japanese)]
- 50) 坂東史郎: 正常末梢血にみられる細胞. *In: 通山 薫, 張替秀郎 (編) 血液細胞アトラス (第6版)*, 文光堂, 東京, 84-95 (2018) [Bando S: No title in a foreign language (Cells Found in Normal Peripheral Blood). *In: Tohyama K, Harigae H (ed) Atlas of Blood Cells (6th edition)*, Bunkodo, Tokyo, 84-95 (2018) (in Japanese)]
- 51) 奈良信雄: 白血球 (white blood cell, leukocyte). *In: 奈良信雄, 小山高敏, 東 克巳, 近藤 弘, 三村邦裕, 小河原はつ江, 西岡淳二 (共著): 最新臨床検査学講座. 血液検査学 (第2版)*, 医歯薬出版, 東京, 17-48 (2021) [Nara N: Leukocyte. *In: Nara N, Koyama T, Higashi K, Kondo H, Mimura K, Ogawara H, Nishioka J (co-author): No title in a foreign language (Current Clinical Laboratory Science Course. Clinical Laboratory Hematology (2nd edition))*, Ishiyaku Publishers, Tokyo, 17-48 (2021) (in Japanese)]
- 52) 通山 薫: 血球の動態と機能. *In: 矢富 裕, 通山 薫 (編): 標準臨床検査学. 血液検査学*, 医学書院, 東京, 5-26 (2012) [Tohyama K: No title in a foreign language (Blood Cell Dynamics and Function). *In: Yatomi Y, Tohyama K (ed): No title in a foreign language (Standard Clinical Laboratory Science. Clinical Laboratory Hematology)*, Igaku-Shoin Publishers, Tokyo, 5-26 (2012) (in Japanese)]
- 53) 柴田 進, 武元良整, 杉原 尚, 長谷川泰子 (共著): 血液標本の見方 (第5版). 金芳堂, 京都, 252pp (1997) [Shibata S, Takemoto Y, Sugihara T, Hasegawa Y: Interpretation of the Hematological Slide (5th edition), Kinpodo, Kyoto, 252pp (1997) (in Japanese)]
- 54) 新谷和夫, 菅沼 清: 白血球系. *In: 寺田秀夫, 鈴木弘文, 新谷和夫, 只野寿太郎, 菅沼 清, 相賀静子 (共著): 検査室血液学*, 講談社サイエンティフィック, 東京, 41-56 (1977) [Niitani K, Suganuma K: No title in a foreign language (Leukocyte Series). *In: Terada H, Suzuki H, Niitani K, Tadano J, Suganuma K, Aiga S (co-author): No title in a foreign language (Laboratory Hematology)*, Kodansha Scientific, Tokyo, 41-56 (1977) (in Japanese)]
- 55) 渡辺陽之輔, 榎本康弘: 顆粒球の形態. *In: 三輪史朗 (編): 血液病学 1*, 文光堂, 東京, 178-200 (1981) [Watanabe Y, Enomoto Y: No title in a foreign language (Morphology of Granulocytes). *In: Miwa S (ed): No title in a foreign language (Hematology 1)*, Bunkodo, Tokyo, (1981) (in Japanese)]
- 56) 榎本康弘, 渡辺陽之輔: 顆粒球 (好中球, 好酸球, 好塩基球). *In: 三輪史朗, 青木延雄, 柴田 昭 (編): 血液病学 (第2版)*, 文光堂, 東京, 178-198 (1995) [Enomoto Y, Watanabe Y: No title in a foreign language (Granulocytes (Neutrophils, Eosinophils, Basophils)). *In: Miwa S, Aoki N, Shibata A (ed): Hematology (2nd edition)*, Bunkodo, Tokyo, 178-198 (1995) (in Japanese)]
- 57) 吉田弥太郎, 内野治人: 5-白血球. 総論. *In: 三輪史朗, 山口 潜 (編): 図説臨床内科講座第21巻 血液 (1)*, メジカルビュー社, 東京, 228-231 (1982) [Yoshida Y, Uchino H: No title in a foreign language (5-Leukocytes. General Exposition). *In: Miwa S, Yamaguchi H (ed) Illustrated Handbook of Internal Medicine, volume 21. Hematology (1)*, Medical View, Tokyo, 228-231 (1982)

- (in Japanese)]
- 58) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球のアズール顆粒. 水産大学校研究報告, **51**, 17-29 (2002) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y: Azurophilic granule of carp neutrophil. Journal of National Fisheries University, **51**, 17-29 (2002) (in Japanese with English abstract)]
- 59) 東 克巳: 塗抹標本作製および血液の普通染色法. *In*: 通山 薫, 張替秀郎 (編) 血液細胞アトラス (第6版), 文光堂, 東京, 7-12 (2018) [Higashi K: No title in a foreign language (Smear Preparation and Normal Staining of Blood). *In*: Tohyama K, Harigae H (ed) Atlas of Blood Cells (6th edition), Bunkodo, Tokyo, 7-12 (2018) (in Japanese)]
- 60) 安藤秀実: 血球染色 (普通染色). *In*: 水口國雄 (編) 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 288-294 (2021) [Ando H: No title in a foreign language (Blood Cell Staining (Normal Staining)). *In*: Mizuguchi K (ed) No title in a foreign language (All about Staining Methods), Ishiyaku Publishers, Tokyo, 288-294 (2021) (in Japanese)]