

Triacid染色液中の色素複合体の特徴

近藤昌和^{1†}, 安本信哉¹, 木村美智代²

Characterization of the dye complexes in triacid staining solutions

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

Abstract: Triacid staining solution (neutral mixture) contains dye complex. Here, we speculate on the structure and characteristics of the dye complex in various triacid staining solutions. It was inferred that the dye complexes in the Ehrlich (methyl green + 2 acid fuchsin, methyl green + 2 orange G, methyl green + acid fuchsin + orange G), Romanowsky (eosin + methylene blue), and Pappenheim (eosin + methylene azure) triacid stains behave as acidic dyes, and that the dye complexes do not dissociate against weakly acidophilic objects, resulting in staining with a complex color (purple). Therefore, it can be said that the objects to which the dye complexes bind without dissociation do not need to be basophilic. When the stained material is highly acidophilic or basic, the dye complex dissociates, and the acidophilic object is stained by the acidic dye and the basophilic object by the basic dye. The dissociation of dye complexes depends on the degree of acidophilicity and basophilicity of the stained material, and the dissociation depends on the types of dye composing the dye complexes. The dye complex in a triacid stain can be defined as a purple acidic dye in which the bonds between the acidic and basic dyes in the complex can be broken, depending on the acidophilic and basophilic strength of the object.

Key words: triacid stain, dye complex, Ehrlich, Romanowsky, Pappenheim

緒言

著者らは前報¹⁾において、脊椎動物の顆粒性白血球の一種である好中球の好中性とはtriacid染色によって紫色を呈することを意味することを指摘するとともに、酸性色素と塩基性色素の混合によって生ずるtriacid染色液(中性混合液)のうち、Ehrlichが報告した染色液中の色素複合体の構造と特徴について考察した。この色素複合体は、現在血液染色に常用されているWright染色やGiemsa染色およびMay-Grünwald・Giemsa染色では生じず、これらの染色による紫色の色調は好中性を意味せず、その多くはアズール色素による異調染色性を示すと推察した。

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。Triacid染色はEhrlichが考案したが、その染色原理に

ついて十分考察せず、“核成分のように塩基性色素に親和性のある物質は、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 [Ehrlich & Lazarus (1898)²⁾, p27; Ehrlich et al. (1909)³⁾, p32]。

魚類を含む各種生物の好中球様の細胞を、厳密な意味で好中性の顆粒を有する白血球であるとするためには、現在では廃れてしまったtriacid染色を実施しなくてはならないが、その際に、triacid染色の特徴をあらかじめ理解しておく必要がある。

Triacid染色はEhrlich以外に、Romanowsky⁴⁾やPappenheim⁵⁾も報告しており、その処方Ehrlichとは異なる。本稿では、各種triacid染色液中の色素複合体の構造

2024年11月6日受付; 2025年1月6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

や特徴について考察した。その結果, triacid染色では弱い好酸性の被染色物に対しては, 色素複合体が解離せずに結合し, 色素複合体そのものの色調 (紫色) を呈すること, 強い好酸性や強い好塩基性の被染色物に対しては色素複合体が解離し, 生じた酸性色素や塩基性色素によって被染色物が染まること, 解離条件は色素複合体の構成色素によっても異なることが明らかになったのでここに報告する。

結果および考察

Ehrlichのtriacid染色液

Ehrlichは5回処方を変えたtriacid染色を報告している^{12,6,9}。最初の報告⁹では酸性色素に酸性フクシンacid fuchsinを, 塩基性色素にメチレンブルー methylene blueを使用している。このtriacid染色液中の色素複合体はおそらく酸性フクシン1分子とメチレンブルー1分子が結合した構造と考えられている¹⁾。Ehrlichはこのtriacid染色によってヒトでは, “赤血球は赤色 (rot) に, 白血球の大部分では顆粒が紫色 (violett) を示す” と報告した^{1,6)}。大部分の白血球とは好中球であろう。この報告では好酸球や好塩基球の顆粒の色調が述べられていない。

2回目以降の処方では酸性色素として酸性フクシンとオレンジG orange Gが使用されており^{2,7,9)}, 2, 3および5回目では塩基性色素としてメチルグリーンmethyl greenが^{1,2,7,8)}, 4回目ではメチレングリーンmethylene greenが塩基性色素に使用されている^{1,9)}。これらの処方のいずれにおいても好中球顆粒は紫色 (violett) を呈するとされているが, 好酸球顆粒については2回目と3回目の処方では“深く濃い”としか記されておらず^{1,7,8)}, 色に関する記述がない。しかし, 4回目と5回目の処方では好酸球顆粒は銅色 (kupferfarben) とされている^{1,2,9)}。一方, 好塩基球顆粒に関する記載は5回目にしかなく, そこでは“好塩基球顆粒は染まらない”とされている^{1,2)}。本研究では, 好塩基球の染色性も記述されている5回目の処方を他の研究者のtriacid染色と比較した。なお, 5回目の処方は, 広く一般に知られているEhrlichのtriacid染色であるので, 今後, 5回目の処方を単にEhrlichのtriacid染色とする。

Romanowskyのtriacid染色液

Romanowsky (1891)⁴⁾はエオジンeosinとメチレンブルーからなるtriacid染色液を作製し, ヒトの血液塗抹標本を染色することで, 好中球顆粒は濃紫色 (dunkel-violett), 好塩

基球の細胞質 (顆粒を意味すると思われる) は濃青色 (dunkleren Blau), 好酸球顆粒は強いピンク色 (intensiv rosa) に染まると述べている。Romanowskyのtriacid染色液中の色素複合体は, 2つの酸性基を有するエオジン1分子に, 塩基性基を1つ有するメチレンブルー1分子が結合した構造と推察される (Fig. 1)。この複合体ではエオジンの酸性基の1つが自由酸性基¹⁾となることで総体としては酸性色素であると考えられる。

Pappenheimのtriacid染色

Pappenheim (1901)⁵⁾はエオジンとメチレンアズール methylene azureからなるtriacid染色液を開発し, この染色によって, ヒトの好中球顆粒は紫色 (violett), 好塩基球顆粒は深い洋紅色 (gesättigt larminroth; 濃い紫味の赤色), 好酸球顆粒は鮮やかな緋色 (leuchtend scharlachroth) に染まると述べている。好塩基球顆粒の色調はメチレンアズールが異調染色性を示したものと考えられる。Pappenheimのtriacid染色液中の色素複合体は, Romanowskyのそれと類似しており, Romanowskyにおけるメチレンブルーが,

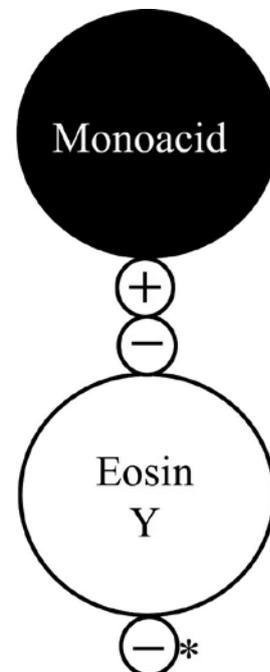


Fig. 1. Schematic illustration of the expected dye complex in Romanowsky's⁴⁾ and Pappenheim's⁵⁾ neutral mixture (triacid stain). Combination of dibasic acid dye (eosin) and monoacidic basic dye (methylene blue⁴⁾ or methylene azure⁵⁾). ⊕, acid group; ⊖, basic group. Asterisk indicates free group.

塩基性基を1つ有するメチレンアズールに代わっただけであり、総体としては酸性色素であると考えられる (Fig. 1)。

Pappenheimのtriacid染色はRosin (1903, p1032; 1910, p315)に引用されているが^{10,11)}、その記述は不正確である。RosinはPappenheimがEhrlichのtriacid染色液中のメチルグリーンを別のものに置き換えて改良した2つの方法を推奨しているとしている。すなわち、一つ目はメチルグリーンの代わりにメチレンブルーが使用され、Grübler社から“panoptic triacid dry residue”の名で販売されている粉末染料とし、二つ目はメチルグリーンの代わりにメチレンアズールが使用され、同社から販売されている“panoptic triacid solution”を記述している。また、後者の場合、濃厚なトルイジンブルー水溶液で核をあらかじめ染色しておくとう利なことがあるとしている (何に対して有利なのかは明記されていない)。しかしながら、これらのRosinによる記述は完全な誤りである。Pappenheim (1901)⁵⁾はエオジンとメチレンアズールからなるtriacid染色を開発したのであり、その染色液と乾燥物がGrübler社から販売されている⁹⁾。

Ehrlichのエオジン・メチレンブルー混合液

Ehrlich & Lazarus (1898)²⁾とEhrlich et al. (1909)³⁾にはエオジン水溶液とメチレンブルー水溶液の混合液にジメトキシメタンdimethoxymethane (Methylalと表記)を加えた染色液が記されており、この染色液でヒトの好中球顆粒は混色 (エオジンの色調とメチレンブルーの色調が混ざったことを示す)、好酸球顆粒は赤色 (rot)、好塩基球顆粒は青色 (blau)を示すとされている。エオジンの色調とメチレンブルーの色調の混色とは紫色を指すと考えられるが、好中球顆粒の色を紫色とせずに混色とした理由は不明である。ジメトキシメタンを加える理由は書かれていない。この染色液はRosin^{10,11)}に引用されており、そこではジメトキシメタンを溶媒としている。この染色液をEhrlich & Lazarus (1898)²⁾とEhrlich et al. (1909)³⁾ではtriacid染色液とはしていないが、おそらくRomanowskyのtriacid染色液と同様の色素複合体が形成されていたと推察される。前報¹⁾においてEhrlichがエオジンを使用した中性混合液 (triacid染色液)を報告していたが (p90)、それはこのエオジン・メチレンブルー混合液を指す。

Ehrlich et al. (1909)³⁾にはPappenheim (1901)⁵⁾のtriacid染色に関する記述はない。また、Ehrlich et al. (1909)³⁾にはRomanowskyのtriacid染色を想起させる記述があるが (p32)、Romanowskyの染色液をtriacid染色液であるとは述

べておらず、単に“エオジンとメチレンブルーを一定の比率で混合すると新しい化学物質が形成される”としか記していない。Ehrlichはエオジンとメチレンブルーからなる中性混合液はtriacid染色液とは異なると考えていたと思われるが、その理由については不明である。

ヒトの好塩基球顆粒に対する染色性の違い

前報¹⁾において、Ehrlichのtriacid染色液の色素複合体が紫色であるのに、なぜ好酸球顆粒が酸性色素に、核が塩基性色素に染色されるのかを考察した。各種triacid染色における好塩基球顆粒の染色性の違いを前報と同様に色素複合体の解離の有無で説明する。

Romanowskyのtriacid染色やPappenheimのtriacid染色ではヒトの好塩基球の顆粒が塩基性色素で染色される。一方、Ehrlichのtriacid染色では好塩基球顆粒は染まらない。この違いは色素複合体が解離する条件が異なることを示している。すなわち、RomanowskyやPappenheimのtriacid染色では好塩基球顆粒の好塩基性の程度 (強さ)によって、色素複合体を構成する酸性色素と塩基性色素に解離し、塩基性色素が好塩基球顆粒に結合すると考えられる。しかし、Ehrlichのtriacid染色では、色素複合体が解離せず、構成成分の塩基性色素であるメチルグリーンが遊離しないので好塩基球顆粒に結合できないと推察される。我々は前報¹⁾でEhrlichのtriacid染色で好塩基球顆粒が染色されない理由について、顆粒が水溶性であることを考察したが (p94)、それは誤りであり、前述の理由が正しいと思われる。

コイの好中球顆粒に対する染色性の違い

Pappenheim (1909a)¹²⁾は複数種の両生類、ハ虫類および魚類の血液を調べるとともに、他の研究者の報告を引用して、哺乳類を含む脊椎動物の比較血液学的論文を発表している。この総説的な論文には材料と方法の項目が無い。そのため、実験生物種は本文中から読み取らなくてはならない。また、染色方法も本文の内容から推察する必要がある。さらに、Pappenheim自身の観察結果は本文中に散在しているが、各項目において全ての実験生物の結果を明記していない。

Pappenheim (1909a)¹²⁾は自身が用いた魚類のうち¹⁾、コイ *Cyprinus carpio*では好中球に相当する細胞の顆粒は好酸性だが、*Carassius*と*Cobitis*および*Petromyzon planeri*とその幼生ならびに*Myxine*には好中性顆粒が存在すると報告した²⁾。

Pappenheimにとって、好中性顆粒とは、酸性色素や塩

基性色素では染まらず, triacid染色のみに染まり紫色を呈する顆粒を指す^{12,13}。したがって, triacid染色で紫色を呈する顆粒であっても, 酸性色素や塩基性色素でも染まる場合, その顆粒は好中性顆粒ではない。この定義はEhrlich (1880)⁶の簡単な記述に基づくが (p557), 好中性顆粒をPappenheimの様に厳密に定義する場合と, 単にtriacid染色で紫色を示せば, その顆粒が酸性色素や塩基性色素に染まっても好中性顆粒と呼ぶ場合がある。前者としてはHirschfeld (1897)¹⁴, Pappenheim (1909a, 1909b)^{12,13}, Furno (1911)¹⁵が, 後者としてはvon Niegolewski (1894)¹⁶, Ilberg (1895)¹⁷, Tamassia (1895)¹⁸, Mezincescu (1902)¹⁹が挙げられる。von Niegolewski (1894)¹⁶はEhrlichのtriacid染色やその改変法を使用し, マウス, モルモット, ウサギ, イヌ, ネコといった哺乳類に好中性顆粒を観察した [Furno (1911)¹⁵から引用; p33]。また, 両生類, ハ虫類および魚類においても好中性顆粒を観察している [Werzberg (1911)²⁰より引用; p42, p55, p69, p90, p133, p153]³。Ilberg (1895)¹⁷はEhrlichのtriacid染色によってウシ, ウシ, イヌ, ヒツジ, ウサギで好中性顆粒を確認した (Hirschfeld (1897)¹⁴, p25より引用)。Tamassia (1895)¹⁸はEhrlichが発表した2種類のtriacid染色液 (メチレンブルーと酸性フクシンからなるtriacid染色液と⁶, メチルグリーン, 酸性フクシンおよびオレンジGからなるtriacid染色液²) でウシ, ブタ, ヒツジ, ノウサギ, ネコ, サルに好中性顆粒を確認した。Mezincescu (1902)¹⁹はRomanowskyのtriacid染色によってモルモット, ウサギ, イヌ, マウスに好中性顆粒を観察した。

Pappenheim (1909a)¹²がいかなる染色法を使用して好中性を判断したのかは不明であるが, p541 L16における両性類に関する自身の観察結果の項で, May-Giemsa染色, triacid染色, メチルグリーン-ピロニン染色を行ったことが記述されている。メチルグリーン-ピロニン染色は2種類の塩基性色素の混合液であるので, 好塩基性の判定に使用したと考えられる。May-Giemsa染色はPappenheim自身が考案したMay-Grünwald染色とGiemsa染色からなる二重染色であるが^{21,23}, 好中性の判定には関係ない。事実, ヒトの好中球の好中性顆粒は, May-Giemsa染色で赤色を示すが^{21,23}, その色調はPappenheimにとっては好中性を否定するものではない⁴。Pappenheim (1901)⁵は自身のtriacid染色は, Ehrlichのtriacid染色よりも有効であると報告していることから, Pappenheim (1909a)¹²で使用したtriacid染色はエオジンとメチレンアズールからなるtriacid染色と

推察した。顆粒の好酸性の判定には, 単独の酸性色素を使用する場合と, 複数種の酸性色素の混合液を使用する場合がある。後者の代表としてEhrlichのトリグリセリン混合物が挙げられる^{23,24}。トリグリセリン混合物はアウランシアaurantia, エオジンおよびインズリンindulin (またはニグロシンnigrosin) それぞれのグリセリン溶液を混合したものであり, 本混合液で染色されれば色調を問わず好酸性と判断される⁴⁵。Pappenheim (1909a)¹²が単独の酸性色素による染色を行ったのか, トリグリセリン混合物を使用したのかは不明であるが, Furno (1911)¹⁵の記述内容からPappenheim (1909a)¹²はトリグリセリン混合物による染色から好酸性か否かを判断したと推察される。Furno (1911)¹⁵は好酸性をトリグリセリン混合物による染色のみで判断している。また, p251において, Pappenheimから論文執筆に関する様々な助言を受けたことを記している。このことから, Pappenheimは好酸性の判定にはトリグリセリン混合物による染色で十分であると判断したと思われる。以上の考察から, Pappenheimは顆粒の好中性を判断するために, triacid染色として, 自身が開発したtriacid染色を, 酸性色素染色としてトリグリセリン混合物を, 塩基性色素染色としてメチルグリーン-ピロニン染色を採用したと考えられる。

コイの好中球に相当する細胞の顆粒が好酸性であるとのPappenheim (1909a)¹²の記述は, Pappenheimのtriacid染色では顆粒が紫色を示さずに赤色となること, トリグリセリン混合物によって染色されること, メチルグリーン-ピロニン染色では染まらないことを意味している。一方, *Carassius*, *Cobitis*, *Petromyzon planeri*とその幼生ならびに*Myxine*では顆粒はtriacid染色で紫色を呈すが, トリグリセリン混合物やメチルグリーン-ピロニン染色では染まらないこととなる。

Meinertz (1902)²⁵はコイの血液中に, Ehrlichのtriacid染色で好中性を示す顆粒を有する血球を観察し, ヒトのそれに類似していると報告した。また, Werzberg (1911)²⁰もコイにEhrlichのtriacid染色で好中性を示す顆粒を有する血球を認めている。Pappenheim (1909a)¹²ではMeinertz (1902)²⁵を引用文献として挙げているが, コイの好中球様細胞のtriacid染色性の違いについては触れていない。これらのことは, Ehrlichのtriacid染色とPappenheimのtriacid染色は, 色素複合体の解離条件が, 好酸性側でも異なることを示唆している。

Triacid染色液中の色素複合体の種類

Ehrlich, RomanowskyおよびPappenheimのtriacid染色液中の色素複合体はいずれも総体として酸性色素と見なすことができる。総体が塩基性色素として振る舞う色素複合体は存在しないのか?この疑問はPappenheimの著作を精査していた時に浮上してきた。

Pappenheim (1909b)¹³⁾は他の研究者の報告を基に、染色性に基づく好中球様細胞の顆粒の分類を示している(p235)。すなわち、1. 中性の混合液 (triacid染色液を指す)でのみ (好中性に) 染色可能であり、非好塩基性かつ非好酸性の絶対好中性顆粒。2. 塩基性色素と酸性色素の混合液で好中性を示し、単独の酸性色素や塩基性色素でも染色される両性好中性顆粒。両性好中性は3種類に分類されている: a) 酸性色素でも染まり、塩基性色素では染色されない好酸性好中性顆粒; b) 塩基性色素でも染まり、酸性色素では染色されない好塩基性好中性顆粒; c) 酸性色素でも塩基性色素でも染まる顆粒。3. 好酸性かつ好塩基性である両性顆粒。両性顆粒は中性色素 (triacid染色を指す) による染色性から2種類に分類される: a) 中性色素染色で好塩基性を示す両性好塩基性の顆粒; b) 中性色素染色で好酸性を示す両性好酸性顆粒。絶対好中性顆粒はヒトの好中球に、両性好酸性顆粒はウサギとモルモットのそれに相当すると記されているが、他の種類の顆粒がどの生物種の好中球に存在するのことは明記されていない。Pappenheimの分類のうち、2の両性好中性、特に2-aの好塩基性好中性について考察する。

両性好中性に相当する記述はPappenheim (1909a)¹²⁾にもあり (p524)、そこで、von Niegolewski (1894)¹⁶⁾が哺乳類以外にも両生類、ハ虫類および魚類において好中性顆粒が観察されたことから、好中性顆粒は広く一般に見られると主張したことに対する反論として、Hirschfeld (1897)¹⁴⁾を引用して、“ある種の動物では顆粒に酸性と中性、または塩基性と中性、あるいは塩基性と酸性と中性が取り込まれる”ことを挙げている。ここの酸性とは酸性色素を、塩基性とは塩基性色素を指し、中性とは、Pappenheim (1909b) の分類の2における塩基性色素と酸性色素の混合液で好中性を示すことに相当する。ではこの混合液とは何か? Hirschfeld (1897)¹⁴⁾はp25でTamassia (1895)¹⁸⁾が酸性フクシンとメチレンブルーの混合液を用いて哺乳類数種に好中性顆粒を観察したと述べている。Tamassia (1895)¹⁸⁾の混合液はEhrlichの好中性顆粒に関する最初の報告⁹⁾で記述したtriacid染色液そのものであり、Tamassia (1895)¹⁸⁾もそのこ

とに触れている。また、Tamassia (1895)¹⁸⁾は酸性フクシン、オレンジGおよびメチルグリーンからなるEhrlichのtriacid染色²³⁾も実施し、本染色でも好中性の色調を得たと述べている。なお、Furno (1911)¹⁵⁾はEhrlichが最初に報告したtriacid染色を酸性フクシン、オレンジGおよびメチルグリーンからなるとしているが (p221)、これは完全に誤りである。Hirschfeld (1897)¹⁴⁾にはTamassia (1895)¹⁸⁾の混合液が、Ehrlichが最初に報告したtriacid染色液であることが書かれていない。Pappenheim (1909a, 1909b)^{12,13)}はTamassia (1895)¹⁸⁾の混合液がtriacid染色液であるとは知らずに、単に酸性色素と塩基性色素の混合液であると解釈したと思われる。Furno (1911)¹⁵⁾にもTamassia (1895)¹⁸⁾が引用されているが (p221)、ここでもTamassia (1895)¹⁸⁾の混合液がtriacid染色液であるとは記述されていない [おそらくHirschfeld (1897)¹⁴⁾から引用したのでであろう]。Tamassia (1895)¹⁸⁾はウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ネコ、サルに好中性顆粒を確認した。これらのうち、Hirschfeld (1897)¹⁴⁾が調べた哺乳類はウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ネコである。Hirschfeld (1897)¹⁴⁾はEhrlichのtriacid染色も行っているが、全体に赤味が強かったことを指摘している。このことは使用したtriacid染色液中に色素複合体の他に酸性色素が過剰に含まれていたことを意味する。Pappenheimはこのことに気づき、Hirschfeld (1897)¹⁴⁾のtriacid染色結果を採用せず、代わりにTamassia (1895)¹⁸⁾の結果を使用したと考えられる。したがって、PappenheimはHirschfeld (1897)¹⁴⁾の観察結果からは酸性色素および塩基性色素に対する染色性の有無のみを利用したと推察される。Tamassia (1895)¹⁸⁾とHirschfeld (1897)¹⁴⁾の観察結果を総合すると、Pappenheimの分類の2-aにはヒツジが相当すると考えられた。すなわち、Hirschfeld (1897)¹⁴⁾ではヒツジの好中球に相当する血球の顆粒は、トリグリセリン混合物では染まらず、塩基性色素 (メチレンブルー、メチルグリーン) による染色では“互いに離れた多数の細かい顆粒が観察される”となっている。これらの記述から、Pappenheim (1909a, 1909b)^{12,13)}は2-aを設定したのでであろう。しかし、この分類基準はHirschfeld (1897)¹⁴⁾の結論とは異なる。Hirschfeld (1897)¹⁴⁾自身はヒツジの好中球に相当する血球の顆粒は酸性にも塩基性にも着色しないとしている。また、Hirschfeld (1897)¹⁴⁾はトリグリセリン混合物以外に、単独の酸性色素による染色も行っており (エオジン、オレンジG、インズリンを使用⁵⁾)、いずれの色素にも“細胞質は均一で非常に弱く染まる”とした。おそらく、ヒツジの好中

球顆粒は、エオジンやオレンジGに弱陽性であり、Tamassia (1895)¹⁸⁾の混合液 (= triacid染色液) によって紫色を呈すると推察される。また、インズリンは酸性色素ではなく、塩基性色素である可能性があることから⁴⁵⁾、インズリン陽性の顆粒は好塩基性の顆粒と考えられる。トリグリセリン混合物でヒツジの好中球顆粒が酸性色素 (アウランチア, エオジン) にもインズリンにも染色されなかったのは、被染色物 (顆粒) と混合物中の色素の相互作用によるものと考えられる⁴⁶⁾。

Pppenheimが分類した2-aは、その根拠論文の解析から存在しないと推察したが、Ehrlich, Romanowsky, Pappenheimが作成したtriacid染色液で顆粒が好中性を示しかつ、酸性色素には染まらずに塩基性色素に染まることはあるのか？これらの triacid染色液はいずれも総体として酸性色素と見なすことができることから好塩基性の顆粒がこれらの triacid染色によって好中性を示すことはないと考えられる。では、総体が塩基性の色素複合体は作成できないのか？著者らは2つ以上の酸性基を有する酸性色素と2つ以上の塩基性基を有する塩基性色素を使用すれば、総体として塩基性の色素複合体ができると推察した。オレンジGとメチルグリーンからなる色素複合体を考察する。両色素を用いた triacid染色液に関する記述がEhrlich & Lazarus (1898)²⁾にある (p26)。両色素の混合によって生じた沈殿をオレンジGの追加によって溶解させていることから、前報¹⁾では形成される色素複合体が、メチルグリーン1分子とオレンジG 2分子からなり、メチルグリーンの塩基性基2つそれぞれと、オレンジGの酸性基1つが結合することで、総体として自由酸性基を2つ有する複合体であると推察した (p93)。生じた沈殿をメチルグリーンの追加で可溶化させれば、オレンジG 1分子とメチルグリーン 2分子からなる色素複合体が生じ、総体として塩基性となると思われる (Fig. 2)。また、メチルグリーンとエオジンの組み合わせでも同様であると考えられるが (Fig. 2)、酸性色素に3つの酸性基を有する酸性フクシンを使用した場合、酸性フクシン1分子にメチルグリーン3分子が結合した複合体となると推察される (Fig. 3)。

ヒトの好中性顆粒は酸性色素や塩基性色素に染まらないのか？

上述したようにPappenheimは好中性という用語を、好酸性でも好塩基性でもなく、triacid染色のみで染まる性質と考えた。ここではその根拠となるEhrlichの報告につい

て考察する。

Ehrlich (1880)⁶⁾はp557で、“(ヒトの) 白血球の大部分が酸性または塩基性色素で可視化できる顆粒を含んでいなかったとしても、色素で可視化できる別の顆粒を持っている可能性がある”とし (L8)、続いて“しかしこの場合、新しい種類の色素を使用しなければならず、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 (L11)。白血球の大部分とは好中球を指す。また、次の段落では“私の最初の研究は、中性色素がほとんど水に溶けないという事実のために失敗に終わったが、私はすぐにこれら化合物のいくつかは過剰な酸性色素に溶けること、そしてそのような溶液が組織学的に有利に使用できることに気づいた”としている (L23)。Ehrlichの著作の中で、好中性顆粒が酸性色素にも塩基性色素にも染まらないとする根拠はわずかこれだけの文章である。実際にヒトの好中性顆粒は酸性色素や塩基性色素には染まらないのか？

Kanthack & Hardy (1894)^{26),46)}とMay & Grünwald (1902)²⁷⁾はヒトの好中球顆粒がエオジンによって染色されることを報告している。また、May & Grünwald (1902)²⁷⁾は同顆粒がメチレンブルーにも染色されるとしている。これらの報告から、Ehrlich (1880)⁶⁾の記述は正しくないと考えられる。また、本稿の緒言でも記したEhrlich & Lazarus (1898)²⁾とEhrlich et al. (1909)³⁾にある、“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”との記述は、好中性顆粒が酸性色素にも塩基性色素にも染まることを意味しているのかもしれない。おそらくEhrlichは好中球の顆粒が酸性色素にも塩基性色素にも染まることを認識しており、この顆粒を好酸球顆粒と好塩基球顆粒とは異なる色調で染め分けるためには、酸性色素と塩基性色素の混合液を用いれば混色 (紫色) となると予想したのであろう。そこで、酸性色素液と塩基性色素液の混合に特段の注意をせず、すなわちtriacid染色液となるような混合をせずに染色に用いたが、その結果は予想に反して好中性顆粒が混色にならず、酸性色素にも塩基性色素にも染まらなかったため、残された選択肢として酸性色素と塩基性色素が結合した中性色素の使用を思い立ったと考えられる。

Triacid染色の再定義

Ehrlichは好中性の部分は酸性色素と塩基性色素に等しい親和性を持つので、中性化合物 (triacid染色液中の色素複合体) を引き寄せ混合した色に染まると考えたが^{2,3)}、前

報¹⁾と本研究から、Ehrlich, RomanowskyおよびPappenheimのtriacid染色液中の色素複合体は総体として酸性色素として振る舞い、弱い好酸性物質に対しては、色素複合体が解離しないので、複合体の色調(紫色)に染色されると推察された。このことから、色素複合体が解離せずに結合する部位は好塩基性を示す必要はないと言える。また、被染色物の好酸性度または好塩基性度が強い場合、色素複合体の酸性色素と塩基性色素が解離し、好酸性物質は酸性色素により、好塩基性物質は塩基性色素に染まると考えられた。また、各種triacid染色による染色性の違いから、色素複合体を構成する色素の解離条件は、色素複合体を構成する色素の種類によっても異なることが明らかとなった。triacid染色液中の色素複合体は、被染色物の好酸性度および好塩基性度の強さによっては複合体を構成する酸性色素と塩基

性色素の間の結合が切れることがある紫色の酸性色素と定義できる。

後 注

*Pappenheim (1909a)¹²⁾は以下の魚類を実験に用いた:
Petromyzon planeri (*Lampetra planeri*のシノニム)とその幼生 (*Ammocoetes planeri*と表記), *Myxine* (種名不明), *Scyllium catulus* (*Scyliorhinus stellaris*のシノニム), *Perca fluviatilis*, *Leuciscus rutilus* (*Rutilus rutilus*のシノニム), *Cobitis fossilis* (*Misgurnus fossilis*のシノニム), *Cobitis viridis* (不明種), *Gadus lota* (*Lota lota*のシノニム), *Esox lucius*, *Anguilla fluviatilis* (*Anguilla anguilla*のシノニム), *Rhodesus amarus* (*Rodues amarus*と表記), *Cyprinus carpio*, *Tinca* (種名

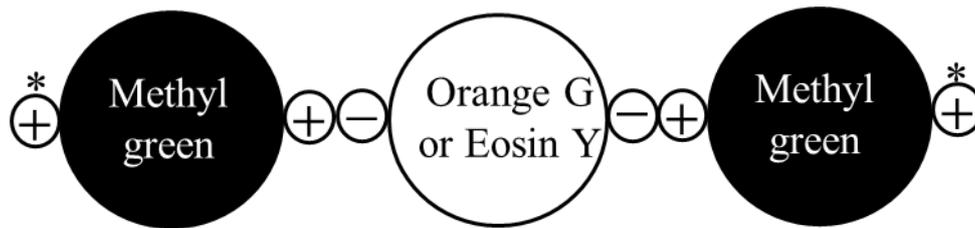


Fig. 2. Schematic illustration of the expected dye complex in basic neutral mixture (basic triacid stain). Combination of dibasic acid dye (orange G or eosin) and diacidic basic dye (methyl green). ⊕, acid group; ⊖, basic group. Astarisk indicates free group.

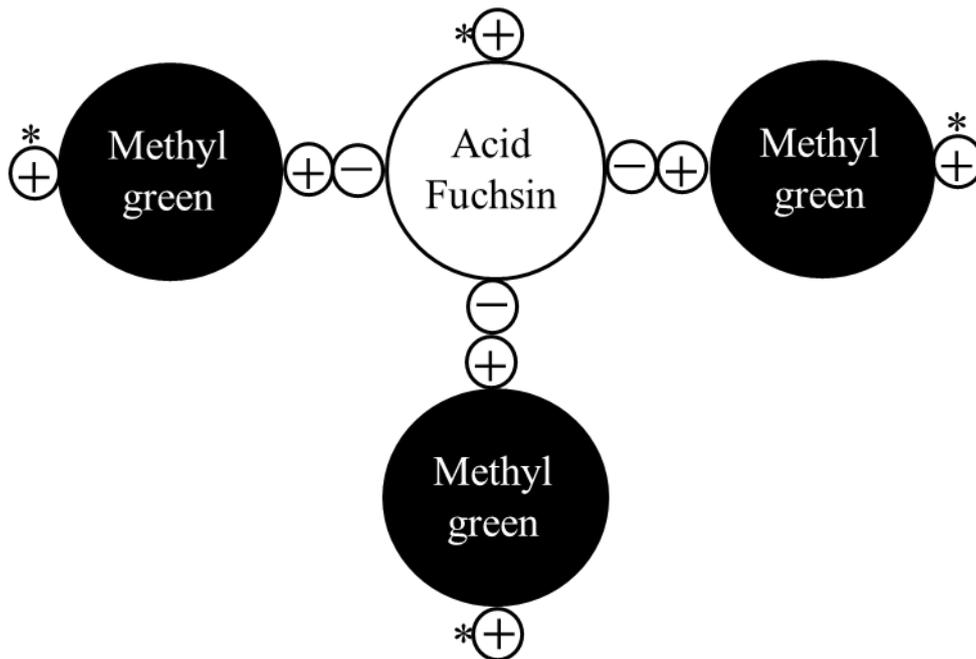


Fig. 3. Schematic illustration of the expected dye complex in basic neutral mixture (basic triacid stain). Combination of tribasic acid dye (acid fuchsin) and diacidic basic dye (methyl green). ⊕, acid group; ⊖, basic group. Astarisk indicates free group.

不明), *Ameiurus*属ナマズ (種名不明; *Amiurus*と表記), *Carassius* (種名不明), キンギョ [Schleirschwanz (独); 種名不明]。

*2コイに関する記述はp524脚注1にあり, *Carassius*, *Cobitis* および*Petromyzon*についてはp524脚注3, p525脚注6およびp527脚注1にある。p527脚注1では*Cyprinus*も含まれているがこれは誤記であり削除されるべきである。なお, p532L32-35では*Carassius*, *Cyprinus*および*Petromyzon*に好中性顆粒が存在することになっているが, この*Cyprinus*は*Cobitis*の誤りであろう。Pappenheimはp550L18で*Petromyzon*とその幼生*Ammocoetes planari*を実験に用いたことを記していることから, 本文中の自身の観察結果における*Petromyzon*とは*Petromyzon planari*を指す。*Petromyzon planari*の幼生に好中性顆粒が観察されることは, p525脚注6とp533L22に, スタウナギ類の*Myxine*についてはp533L22に記述されている。

*3Werzberg (1911)²⁰によれば, von Niegolewski (1894)¹⁶は少なくとも両生類2種, ハ虫類2種および魚類2種を使用した: 両生類, fire salamander *Salamandra maculosa* (*Salamandra salamandra*のシノニム) とヨーロッパトノサマガエル*Rana esculenta*; ハ虫類, *Emys lutaria* (ヨーロッパヌマガメ*Emys orbicularis*のシノニム) と*Tropidonotus natrix* (ヨーロッパヤマカガシ*Natrix natrix*のシノニム); 魚類, *Carassius auratus*とstone loach *Cobitis barbatula* (*Barbatula barbatula*のシノニム)。

*4このPappenheimの態度は奇妙である。おそらく, 彼にとってEhrlichの記述は絶対であったのであろう。

*5Ehrlichはこれらの色素をいずれも酸性色素と考えており^{23,24}, 他の研究者もそのことに疑問を呈していない。著者らは, Ehrlichや他の研究者が使用したインズリン (またはニグロシン) は塩基性色素であると考えており, これについては別稿で考察する。

*6前報¹⁾においてKanthack & Hardy (1894)²⁶がEhrlichの α 顆粒をウサギの好中球顆粒としていると記述したが (p90), これは正確ではなかったのでここで削除・訂正する。

引用文献

1) 近藤昌和, 安本信哉, 木村美智代: 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? 水産大学校研究報告, 72, 89-102 (2024) [Kondo M, Yasumoto S, Kimura M: Literature review on the “neutrophilic” of

neutrophilic granules: What is “neutrophilic”? *Journal of National Fisheries University*, 72, 89-102 (2024) (in Japanese with English abstract)]

2) Ehrlich P, Lazarus A (Mitverfasser): Die Anaemie: Normale und Pathologische Histologie des Blutes. Alfred Hölder, Wien, 201pp + 2 Tafeln (I & II) (1898)

3) 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)

4) Romanowsky D: Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. *St. Petersburger Medicinische Wochenschrift*, 16, 297-302 + 307-315 (1891)

5) Pappenheim A: Eine panaptische Triazidfärbung. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 27, 798-799 (1901)

6) Ehrlich P: Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Zeitschrift für Klinische Medizin*, 1, 553-560 (1880)

7) Ehrlich P: Demonstration eines leukämischen Blutpräparates. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 9, 670-671 (1883)

8) Ehrlich P: Zur Kenntniss des acuten Milztumors. *Charit-Annalen*, 9, 107-114 (1884)

9) Ehrlich P: Ueber schwere anämische Zustände. *Verhandlungen des Kongresses für Innere Medizin*, 11, 33-52 (1892)

10) Rosin H: Neutrale Farbstoffe und Farbgemische. In: Ehrlich P, Krause R, Mosse M, Rosin H, Weigert C (herausgegeben) *Encyklopädie der Mikroskopischen Technik mit besonderer Berücksichtigung der Färbelehre*. Urban & Schwarzenberg, Berlin & Wien, 1028-1033 (1903)

11) Rosin H: Neutrale Farbstoffe und Farbgemische. In: Ehrlich P, Krause R, Mosse M, Rosin H, Weigert C (herausgegeben) *Encyklopädie der Mikroskopischen Technik (Zweite, vermehrte und verbesserte Auflage; II. Band)*. Urban & Schwarzenberg, Berlin & Wien, 311-316 (1910)

12) Pappenheim A: Einige interessante Tatsachen und theoretische Ergebnisse der vergleichenden

- Leukozytenmorphologie. *Folia Haematologica: Internationales Zentralorgan für Blut- und Serumforschung*, **8**, 504-563 (1909a)
- 13) Pappenheim A: Atlas der Menschlichen Blutzellen, Zweite (Schluß-) Lieferung (II. Teil), 84-571 + 13 Tafel (XIII-XXV). Gustav Fischer, Jene (1909b)
- 14) Hirschfeld H: Beiträge zur vergleichenden Morphologie der Leukocyten. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*, **149**, 22-51 + 1 Tafel (I) (1897)
- 15) Furno A: Beiträge zur Kenntnis der vergleichenden Hämatologie der Spezialleukozyten-Granulationen einiger Laboratoriums-Säugetiere. *Folia Haematologica: Internationales Magazin für Klinische und Morphologische Haematologie, I. Teil, Archiv*, **11**, 219-252 (1911)
- 16) von Niegolewski F: Die Ehrlich'sche Granulation der weissen Blutkörperchen bei einigen Tierspecies. Inaugural-Dissertation, München (1894) [Title: cited from Jahres-Verzeichniss der an den Deutschen Universitäten erschienenen Schriften X²⁸⁾ (p206)]
- 17) Ilberg F: Das Blut des Menschen und der Tiere in forensischer Beziehung, m. bes. Berücks. d. neutrophilen Granulationen. Inaugural-Dissertation, Berlin (1895) [Title: cited from Jahres-Verzeichniss der an den Deutschen Universitäten erschienenen Schriften X²⁸⁾ (p9)]
- 18) Tamassia A: Valore delle granulazioni neutrofile dei globuli bianchi nella determinazione specifica del sangue. *Gazzetta Medica Lombarda*, **54**, 12-13 (1895)
- 19) Mezincescu D: Contributions a la morphologie comparée des leucocytes. *Archives de Médecine Expérimentale et d'Anatomie Pathologique*, **14**, 562-575 + 1 planche (XII) (1902)
- 20) Werzberg A: Studien zur vergleichenden Hämocytophologie einiger poikilothermer Vertebraten. *Folia Haematologica: Internationales Magazin für Klinische und Morphologische Haematologie, I. Teil, Archiv*, **11**, 17-193 + 4 Tafeln (I-IV) (1911)
- 21) Pappenheim A: Richard May, Eine neue Methode der Romanowsky-Färbung. Münchener Medizinische Wochenschrift. 1906. No. 8. *Folia haematologica: Internationales Zentralorgan für Blut- und Serumforschung*, **3**, 344 (1906)
- 22) Pappenheim A, Hirschfeld H (mitwirkender Author): Über akute myeloide und lymphadenoide makrolymphozytäre Leukämie an der Hand von zwei verschiedenen Fällen. *Folia haematologica: Internationales Zentralorgan für Blut- und Serumforschung*, **5**, 347-425 + 2 Tafeln (III & IV) (1908)
- 23) Pappenheim A: Panaptische Universalanfärbung für Blutpräparate. *Medizinische Klinik. Beiheft*, **4**, 1244 (1908)
- 24) Ehrlich P: Ueber die spezifischen Granulationen des Blutes. *Archiv für Anatomie und Physiologie, Physiologische Abtheilung (Verhandlungen der physiologischen Gesellschaft zu Berlin 1878-1879)*, 571-579 (1879)
- 25) Meinertz J: Beiträge zur vergleichenden Morphologie der farblosen Blutzellen. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medicin*, **168**, 353-398 + 1 Tafel (XI) (1902)
- 26) Kanthack AA, Hardy WB: The morphology and distribution of the wandering cells of mammalia. *The Journal of Physiology*, **17**, 81-119 + 1 plate (III) (1894)
- 27) May R, Grünwald L: Über Blutfärbungen. *Centralblatt für Innere Medicin*, **23**, 265-270 (1902)
- 28) Anonym: Jahres-Verzeichniss der an den Deutschen Universitäten erschienenen Schriften X (15. August 1894 bis 14. August 1895). A. Asher, Berlin, 310pp (1895)