

酸性色素と塩基性色素の混合液における染色原理

近藤昌和^{1†}, 安本信哉¹, 木村美智代²

Staining principle in the mixtures of acidic and basic dyes

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

Abstract : Previously, we speculated on the staining principle of triacid staining solution (neutral mixture) containing a dye complex. The principle could be explained solely by the relationship between the stained object and the dye complex. We propose here to extend the staining principles of triacid stain to explain the staining principles of other dye mixtures such as May-Grünwald (MG), Giemsa and MG-Giemsa. In a mixture of acidic and basic dyes, the staining characteristics of the object were presumably determined by the degree of stainability (degree of acidophilicity or basophilicity) of the object, the degree of stainability of both dyes (degree of basophilicity of the acidic dye and degree of acidophilicity of the basic dye), and the ratio and concentration of each dye.

Key words : acidic dye, basic dye, mixture of dyes, staining principle

緒言

著者らはこれまでにtriacid染色の特徴について考察してきた^{1,2)}。Triacid染色液は酸性色素液と塩基性色素液の混合によって生ずる水溶性の色素複合体を含む中性混合液である。この色素複合体は酸性色素と塩基性色素が結合したものであるが、中性色素 (酸性色素と塩基性色素が結合した水不溶性の沈殿) とは異なり、総体としては酸性色素と見なすことができる^{1,2)}。Triacid染色液中の色素複合体 (以後、単に色素複合体と称す) は弱い好酸性を示す被染色物に結合し、色素複合体の色調 (紫色) に被染色物を染色する (例: ヒト好中球の特異顆粒)。しかし、ヒト好酸球の特異顆粒のような強好酸性の被染色物や、強好塩基性の被染色物 (例: 細胞核やヒト好塩基球の特異顆粒) に対しては、色素複合体の酸性色素と塩基性色素が解離し、被染色物を酸性色素または塩基性色素で染色する。色素複合体を形成する酸性色素は塩基性色素と結合しているので、好塩基性と言える。同様に、色素複合体中の塩基性色素は好酸性で

あると解釈できる。これらのことから著者らは色素複合体を構成する色素と被染色物の間の関係を考察した^{1,2)}。すなわち、好酸性の被染色物 (以後、好酸性物質と称す) と色素複合体を構成する塩基性色素は、色素複合体の酸性色素に対して同じ立場にあり [同様に好塩基性の被染色物 (好塩基性物質) と色素複合体を構成する酸性色素は、色素複合体の塩基性色素に対して同じ関係にある]、色素複合体が解離するのは、好酸性物質の好酸性度が色素複合体を形成する塩基性色素の好酸性度よりも高い場合であると推察した (好塩基性物質の好塩基性度が複合体の酸性色素のそれよりも高い場合にも色素複合体は解離する)。以上の記述は、triacid染色の染色原理と言え、被染色物と色素複合体の間の関係のみで説明できた。

現在血液学で常用されている一般染色はWright染色やMay-Grünwald・Giemsa染色などである。これらの染色液ではtriacid染色液中の色素複合体は形成されず¹⁾、染色時には酸性色素と塩基性色素の混合液 (以後、色素混合液と略す) とみなすことができるが、その染色原理について

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

の明確な記述が文献上認められない。著者らはtriacid染色の染色原理を拡張することで他の色素混合液の染色原理を説明できると考え、ここに提案する。

結果および考察

色素混合液中の基本的な染色原理

色素混合液中では混合直後には、多数の酸性色素分子と塩基性色素分子が互いに非結合状態で存在すると考えられる。しかし、時間の経過とともに酸性色素と塩基性色素が結合した中性色素が沈殿する。沈殿した中性色素は被染色物の染色には関与しない。

混合直後の色素混合液には遊離した酸性色素と塩基性色素がある比率で存在する。被染色物の被染色部位 (色素が結合する部位) 一つに注目する。この被染色部位が仮に好酸性部位であり、酸性色素1分子と結合できる場合、酸性色素のみが染色液中に存在すれば当然、酸性色素1分子が被染色部位に結合する。しかし、染色液中に酸性色素と塩基性色素が共存する時には、被染色部位に酸性色素が結合する場合と結合しない場合が想定される。前者では酸性色素が周囲の塩基性色素と結合せずに、被染色物に結合することとなる。これは被染色物の好酸性度が、染色液中の塩基性色素のそれよりも強いことを意味する。一方、後者では被染色物の好酸性度は染色液中の塩基性色素よりも弱いと言える。以上の議論は文章中の酸性色素と塩基性色素を入れ替えれば好塩基性部位についても当てはまる。被染色物に対する色素混合液中の酸性色素と塩基性色素の関係は、その存在比によって変わると予想される。ここで、一つの被染色部位の周囲の空間を微小空間 (microspace) と定義する。色素混合液中の酸性色素と塩基性色素の比率は染色液中のいかなる場所でも同じはずなので、微小空間における両色素の比率も同じになる。また、各色素濃度も染色液中と微小空間中で同じになる。色素混合液中の酸性色素と塩基性色素の比率が1 : aの時には酸性色素が好酸性部位に結合するが、別の比率、例えば塩基性色素の割合が前者よりも高い時 [1 : b ($b > a$)] には酸性色素が好酸性部位に結合しない場合を考える (aおよびbは正数)。前者において酸性色素が好酸性部位に結合できるということは、好酸性部位1つの好酸性度が酸性色素1分子の周囲に存在する塩基性色素b分子分の好酸性度よりも強いと言える。一方、後者では好酸性部位の好酸性度が塩基性色素b分子分の好酸性度よりも弱いと解釈できる。この場合、各色素の濃度は

無視できる (ただし、すでに被染色部位に結合している色素の被染色部位からの解離には微小空間中の各色素の濃度が関係する)。これが本稿で提案する色素混合液の基本的な染色原理である。この原理をもとに、以下に我々が以前^{3,5)}、コイ *Cyprinus carpio* の好中球にMay-Grünwald (MG) 染色、Giemsa染色およびMay-Grünwald-Giemsa (MGG) 染色を施して観察した時に認めた現象の解釈を述べる。また、前報²⁾で予告したEhrlichのトリグリセリン混合物による染色についても考察する。

MG染色液

MG染色液 (原液) 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) をメタノールに溶解したものである⁶⁾。エオジンは酸性基を2つ有し、メチレンブルーは塩基性基を1つ有する。したがって、エオジン酸メチレンブルーはエオジン1分子にメチレンブルー2分子が結合した構造を有することとなる。MG染色時には標本上に原液を載せることで、溶媒のメタノールによる固定をし、次いで蒸留水や緩衝液を標本上の原液に追加・混合することで染色を行う。染色時にはエオジン酸メチレンブルーが解離し、エオジンとメチレンブルーの混合液になる。この時のエオジンとメチレンブルーの比率は1:2である。この混合液中では時間の経過とともに、エオジンとメチレンブルーが結合して中性色素の沈殿が生じるが、遊離のエオジンとメチレンブルーの比率は全ての色素が中性色素になるまで一定と考えられる。

Giemsa染色液

Giemsa原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⁷⁾。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の等 (重) 量混合物であり、アズールIIとはメチレンブルーとメチレンアズールの等 (重) 量混合物である。現在ではメチレンアズールの代わりにその主成分であるアズールBが使用されている。したがって、アズールIIとはメチレンブルーとアズールBの等 (重) 量混合物であり、エオジン酸メチレンアズールはエオジンとアズールBからなる。Giemsa原液中のエオジン酸アズールIIとアズールIIの比率は重量比で3 : 0.8である⁷⁾。メチレンブルーとアズールBの分子量はほぼ同じであり、エオジンの分子量はこれら塩基性色素の約2倍であることから、原液中のエオジンと塩基性色素の分子比はおおよそ1.3となり、

MG染色液に比べて塩基性色素が多く含まれていることになる。染色前に標本をメタノールで固定し、原液を蒸留水や緩衝液で希釈して染色に供する。Giemsa原液を蒸留水や緩衝液で希釈することで、エオジン酸メチレンブルーとエオジン酸アズールBは酸性色素(エオジン)と塩基性色素(メチレンブルー、アズールB)に解離する。また、希釈後、時間の経過とともに中性色素が形成・沈殿し、中性色素形成の進行にともない、染色液中の塩基性色素の比率が高くなる。この特徴は重要であるので、例を挙げて詳説する。上述の通り、Giemsa染色液中の酸性色素(エオジン)と塩基性色素(メチレンブルー、アズールB)の分子比は約1:3である。エオジンには酸性基が2つ、メチレンブルーとアズールBには塩基性基がそれぞれ1つあるので、形成される中性色素はエオジン1分子と塩基性色素2分子からなる。今、微小空間にエオジン10分子と塩基性色素30分子が存在すると仮定する(比率は1:3)。時間の経過とともに中性色素が形成され、エオジンが5分子になったとき、塩基性色素は20分子になる(減少した塩基性色素10分子はエオジンと中性色素を形成する)。この時のエオジンと塩基性色素の比率は1:4となる。エオジンが全て中性色素形成に使用されても塩基性色素が10分子残ることとなり、この状態の染色液は塩基性色素液である。

MGG染色

MGG染色はPappenheimによって考案された二重染色であり⁸⁻¹⁰⁾、標本をMG染色したのち、Giemsa染色を施す。

コイの好中球顆粒

コイの好中球には3種類の顆粒が認められている^{3,5)}。すなわち、エオジンの色調を呈する好酸性顆粒、青色に染色される好塩基性顆粒およびMG染色、Giemsa染色ならびにMGG染色のいずれにも明瞭な色調を示さない難染性顆粒が観察される。我々はこれら3種類の顆粒をこれまでそれぞれ α 、 γ および β 顆粒と呼んでいたが^{3,5)}、Ehrlichの $\alpha \sim \gamma$ 顆粒とは全く関係ないので、以後、コイの3種類の好中球顆粒は単に好酸性顆粒、好塩基性顆粒、難染性顆粒と称することとする。以前の研究では、蒸留水の他に、種々のpHや濃度のリン酸緩衝液を希釈液として用い、MG染色、Giemsa染色およびMGG染色を施して観察した^{3,5)}。しかし、Giemsa原液の希釈には、慣例にしたがって緩衝液を蒸留水で10倍希釈して用いていたので、同じ濃度・pHの緩衝液を用意しても実際の染色液中では緩衝液の濃度は異なる。

本項ではまず蒸留水を希釈液に用いた場合の好酸性顆粒と好塩基性顆粒のMG染色性、Giemsa染色性およびMGG染色性を考察する。考察の過程でこれまで異なる顆粒としていた好酸性顆粒と好塩基性顆粒が、同一顆粒である可能性が考えられたのでそのことについても言及する。

蒸留水を希釈液に用いた場合における好酸性顆粒の染色性の解釈

コイ好中球の好酸性顆粒はMG染色によって橙色を呈するが、Giemsa染色では、Giemsa原液の希釈率を変えても[原液:蒸留水=1:20(低希釈)または1:100(高希釈)]60分間の染色において全く観察されない。MG染色後にGiemsa染色を施した場合(MGG染色)、高希釈のGiemsa染色液では多数の好酸性顆粒が観察されるが、低希釈のGiemsa染色液では少数の好酸性顆粒しか染まらない(Table 1)。

MG染色では、酸性色素(エオジン)1分子に対する好酸性顆粒(厳密には好酸性成分中の一つの好酸性部位)の好酸性度は、塩基性色素(メチレンブルー)2分子分の好酸性度よりも高いので、エオジンが好酸性部位に結合すると言える。一方、Giemsa染色では、エオジン1分子に対する好酸性顆粒の好酸性度は、塩基性色素3分子分の好酸性度よりも低いので(メチレンブルーとアズールBはともに塩基性基を1つ有するので、本稿は両者の好酸性度は等しいと仮定する)、エオジンが好酸性部位に結合しないと考えられる。

MGG染色では、Giemsa染色を行う前にすでにMG染色によって好酸性部位にエオジンが結合している。今、微小空間内にエオジン1分子が結合した好酸性部位1つが存在すると仮定する。Giemsa染色液中のエオジンと塩基性色素の比率は、Giemsa原液を希釈した直後には1:3なので、まず、この微小空間にさらにエオジン1分子と塩基性色素3分子が存在する場合を想定する。MG染色の場合(エオジン:塩基性色素=1:2)にはエオジンが好酸性部位に結合でき、Giemsa染色(エオジン:塩基性色素=1:3)ではこの結合が起こらないことから、おそらく好酸性部位1つとエオジン1分子の結合を解離させるのに必要な塩基性色素は3分子あれば可能と推察される。前述の微小空間には、エオジン1分子と結合した好酸性部位1つ、遊離のエオジン1分子および塩基性色素3分子があるので、塩基性色素3分子分の好酸性度は、遊離エオジンとの結合と、結合状態のエオジンの解離の両方に関与できる。遊離エオジンとの結

合に使われる塩基性色素の好酸性度は、中性色素形成が起こる2分子分と予想される。したがって、この微小空間の塩基性色素3分子分の好酸性度のうち、2分子分が遊離エオジンとの結合に使われるため、好酸性部位とエオジンの解離には残りの1分子分しか使用できない。前述のようにこの解離には塩基性色素3分子分の好酸性度が必要と考えられるので、好酸性部位からのエオジンの解離は起こらないと推察される。次にエオジン1分子が結合した好酸性部位1つ、遊離エオジン5分子、塩基性色素15分子が存在する微小空間を想定する。この空間においても先の微小空間と同様に遊離エオジンと塩基性色素の比率は1:3である。塩基性色素15分子分の好酸性度のうち、遊離状態のエオジン5分子との結合には塩基性色素10分子分の好酸性度が利用され、残りの塩基性色素の好酸性度は5分子分となる。この好酸性度は、結合状態のエオジンの解離に必要と考えられる3分子分より多くなるため、好酸性部位とエオジンの解離が起こると推察される。

蒸留水を希釈液に用いた場合における好塩基性顆粒の染色性の解釈

好塩基性顆粒はMG染色標本には観察されず、Giemsa染

色では、Giemsa原液の希釈率を変えても60分間の染色において多数認められる。しかし、MGG染色では、低希釈のGiemsa染色液では多数の好塩基性顆粒が観察されるが、高希釈のGiemsa染色液では本顆粒は染色されない (Table 1)。

「コイの好中球顆粒」の項で指摘した通り、この好塩基性顆粒は先の好酸性顆粒と同一あるいは一つの好酸性顆粒の一部分である可能性が考えられた。すなわち、好塩基性顆粒を好酸性顆粒とは異なる顆粒とした場合、下記のようにMG染色性とGiemsa染色性の説明はできるが、MGG染色性の説明では矛盾が生じた。本項では好塩基性顆粒を顆粒として説明するが、これは顆粒の好塩基性層と読み替えても議論は成立する。

好塩基性顆粒の好塩基性部位1つが存在する微小空間を考える。この部位には塩基性色素が1つ結合できるとする。MG染色では、この微小空間に塩基性色素2分子とエオジン1分子が存在することになる。エオジンの好塩基性度が好塩基性部位の塩基性度よりも高いと塩基性色素はエオジンと結合することになる。コイの好塩基性顆粒はMG染色では塩基性色素に染色されないことから、エオジン1分子の好塩基性度は塩基性色素2分子と結合する強さと言える。

Table 1. Staining conditions and staining characteristics of eosinophilic granules (EG) and basophilic granules (BG; or basophilic layer in the EG) in the neutrophils of common carp (modified from Kondo et al.⁹⁾)

Stain	Diluent	Condition of G stain		EG	BG
		Ratio	Time		
MG	DW	—	—	+++	—
	5 mM PB, pH 5.0	—	—	+++	—
	5 mM PB, pH 6.0	—	—	+++	—
	5 mM PB, pH 7.0	—	—	+++	—
	5 mM PB, pH 8.0	—	—	—	—
	1/15 M PB, pH 5.0	—	—	+++	—
	1/15 M PB, pH 6.0	—	—	+++	—
	1/15 M PB, pH 7.0	—	—	+	—
	1/15 M PB, pH 8.0	—	—	—	—
G	DW	1:100	15 min	—	+
	DW	1:100	60 min	—	+++
	DW	1:20	15 min	—	+++
	DW	1:20	60 min	—	+++
MGG	DW	1:100	15 min	+++	—
	DW	1:100	60 min	+++	—
	DW	1:20	15 min	+++	—
	DW	1:20	60 min	+	+++

MG, May-Grünwald stain (after fixation for 5 min with MG solution, the smear was stained for 10 min in MG diluted (1:1) with various diluent); G, Giemsa stain (after fixation with absolute methanol for 5 min, the smear was air-dried and then stained with Giemsa diluted with DW); MGG, May-Grünwald + Giemsa stain (after staining with MG stain, the smear was stained with diluted Giemsa solution); DW, distilled water; PB, phosphate buffer; Ratio, Giemsa : DW; +++, many; +, some; —, not observed.

Giemsa染色では、微小空間に好塩基性部位1つ、エオジン1分子および塩基性色素3分子が存在することになる。塩基性色素2分子はエオジンと結合するので、塩基性色素1分子が余り、これが好塩基性部位に結合する。

MGG染色標本の解釈には、好塩基性顆粒だけではなく、好酸性顆粒の関与を考慮する必要がある。MGG染色では、Giemsa染色を行う前にすでにMG染色によって好酸性顆粒の好酸性部位にエオジンが結合している。この結合したエオジンは、上述の好酸性顆粒のMGG染色性の解釈で記したように、Giemsa染色時に、条件によって解離する。すなわち、高希釈したGiemsa染色をMGG染色に用いても好酸性顆粒は多数観察されるが（エオジンは解離しない）、低希釈Giemsa染色液を使用した場合、観察される好酸性顆粒の数は減少する（エオジンが解離する）。後者の場合、好塩基性部位1分子を含む微小空間内には、Giemsa染色液からのエオジンと塩基性色素が1：3の割合で存在する。さらに、エオジンが結合した好酸性部位からの遊離したエオジンが加わることで、微小空間中のエオジンと塩基性色素の比率が変化する。この比率が1：2の場合、それはMG染色液と同じなので好塩基性顆粒は染色されない。また、1：2 ($1/2=0.5$) よりも大きい場合（例えば、1：1 = 1）にも好塩基性顆粒は認められないと言える。事実、低希釈Giemsa染色液によるGiemsa染色標本には染色時間15分間でも60分間染色した標本と同様に多数の好塩基性顆粒が認められるが、同じGiemsa染色液を用いたMGG染色標本では15分間のGiemsa染色の場合には本顆粒は観察されない。しかし、低希釈Giemsa染色液を使用してGiemsa染色を60分間施したMGG染色標本には多数の好塩基性顆粒が観察される。このことは、エオジンの解離が起こることで、短時間では微小空間内のエオジンの比率が高くなるが、時間の経過とともに遊離したエオジンは染色液中に拡散するので微小空間中のエオジンと塩基性色素の比率は標本上の低希釈Giemsa染色液中のそれとほぼ同じになり、好塩基性顆粒が染色されると説明できる。高希釈したGiemsa染色液を使用したMGG染色では、好酸性部位からのエオジンの解離が起こらないので、Giemsa染色に全く影響しないはずである。しかし、高希釈した染色液によるGiemsa染色で観察される多数の好塩基性顆粒は、同染色液を使用したMGG染色では全く認められない。好酸性顆粒と好塩基性顆粒が異なる種類の顆粒であれば、高希釈したGiemsa染色液を使用したMGG染色上で、両顆粒が好中球中に同時に多数観察されるはずである。しかし、このような染色

像は認められない。このことは、両顆粒が同一顆粒であり、エオジンで先に染色された場合には、そのエオジンが解離しないと塩基性色素が結合できないことを示している。同一顆粒が好酸性と好塩基性を示す場合、それらの染色性を示す成分には2種類が考えられる。1つ目は好酸性成分と好塩基性成分が異なる分子であり、2つ目は一つの分子中に好酸性部位と好塩基性部位が存在する分子（好両性分子）である。前者においては、両分子それぞれの好染色性部位の近傍に微小空間を、後者では一分子中の両好染色性部位それぞれの近傍に微小空間を設定すればこれまでの議論が適用できるので、エオジンが解離しないと塩基性色素が結合できない現象を説明できない。好塩基性顆粒は好酸性顆粒よりも僅かに小さいので⁴⁾、染色性の異なる2層性の顆粒があり、外層は好酸性で、内層が好塩基性なのかもしれない。しかし、好酸性顆粒に層構造は認められていないことから^{3,4)}、両層とも好酸性であるが、内層には好塩基性分子が好酸性分子と混在するか、または好両性分子があると推察される。この顆粒が、MG染色によってエオジンに染色されると、その後のGiemsa染色では、高希釈Giemsa染色液の場合、エオジンに染まった外層を塩基性色素が物理的に通過できないため、好塩基性の内層に到達できず内層が塩基性色素で染色されない。一方、低希釈Giemsa染色液では、エオジンが顆粒から解離するので、塩基性色素が内層に入りことができ、塩基性色素で染色されると推察される。

希釈液の異なるMG染色性

コイ好中球の好酸性顆粒は蒸留水の他に、pH5～pH7の低濃度（5 mM）リン酸緩衝液や、pH5およびpH6の高濃度（1/15M）リン酸緩衝液を希釈液に用いても染色され、多数の好酸性顆粒が好中球中に観察される（Table 1）。しかし、pH8の低濃度緩衝液やpH7およびpH8の高濃度緩衝液の場合、好酸性顆粒はほとんど認められない（Table 1）。すなわち、好酸性顆粒がエオジンに染色されなくなる。この現象の説明には少なくとも3つの可能性が挙げられる。すなわち、好酸性顆粒が染色されない条件では、①塩基性色素の好酸性度よりも好酸性部位の好酸性度が低くなり、エオジンが好酸性部位ではなく塩基性色素に結合する。②好酸性部位と塩基性色素の好酸性度が等しくなり、拮抗することでエオジンが好酸性部位にも塩基性色素にも結合しなくなる。③エオジンの酸性度がゼロになり、酸性色素として機能しなくなる。

MG染色液は染色時には酸性色素と塩基性色素の混合液とみなせるが、好酸性顆粒だけでなく、好塩基性顆粒（または好酸性顆粒の好塩基性層）もpH8の低濃度緩衝液やpH7およびpH8の高濃度緩衝液を希釈液に使用した場合には観察されない。換言すれば、酸性色素と塩基性色素の混合液では条件によっては好酸性部位や好塩基部位が本来存在していても、染色できないことがあることとなる。次項では、酸性色素の混合液と考えられて使用されていた染色液が、おそらく酸性色素と塩基性色素の混合液であった事例について考察する。

Ehrlichのトリグリセリン混合物

Ehrlich (1879)¹¹⁾ はヒト、ウサギ、モルモット、イヌ、子ウシ、カエルおよびイモリを実験動物として用い、好酸球の好酸性顆粒 (α 顆粒) の染色性を述べている。ウサギに関する記述がしばしば出てくるが、これはウサギを代表としたにすぎず、いずれの説明も全ての実験生物に当てはまると考えられる。Ehrlichは酸性色素を単独あるいは混合して使用した。Ehrlichは多くの種類の酸性色素を用いたが、それらのうち、 α 顆粒を確実に検出するには、①グリセリンに溶解したエオジン、②グリセリンに飽和させたインズリン (indulin) および③オレンジ (orange G) の濃水溶液を併用すれば十分であるとし、続けて α 顆粒とこれ関連する β 顆粒との議論に用いる第4の溶液、エオジンとインズリンをグリセリンに飽和させた溶液 (エオジン-インズリン-グリセリン; 以後、EIGと称す) の使用が必要であると記述した。また、赤血球と α 顆粒および β 顆粒を染め分ける染色としてアウランシア (aurantia), エオジンおよびインズリンを含むグリセリン溶液を開発・紹介している。これが一般にEhrlichのトリグリセリン混合物と称される染色液であるが、Ehrlich自身はこの混合液をトリグリセリン混合物とは呼んでいない^{11,12)}。

Ehrlichの β 顆粒は一般には酸性色素にも塩基性色素にも染色される顆粒とされ、両染色性 (amphophilic) 顆粒とも呼ばれる。Ehrlich自身の著作のうち、 β 顆粒に関する記述はEhrlich¹¹⁾にしかないが (α 顆粒に関する著作もこれしかない)、これには β 顆粒が好塩基性でもあるとの記述は全くない (両染色性であるとの記述もない)。Ehrlichの β 顆粒に関する詳細な考察は後日発表する予定である。

Ehrlich¹¹⁾ではp573でアウランシアをヘキサニトリジフェニルアミンとしているが、p574とp575ではナフチルアミンイエローと記している。また、インズリンの代わり

にこれに類似した色素であるニグロシン (nigrosin) も使用しているが、本文中ではEIGとエオジン-ニグロシン-グリセリンの結果が混同されている (以下ではニグロシンを使用した場合でもインズリンとする)。本項では、Ehrlichが酸性色素であると考えて使用したインズリンとニグロシンが塩基性色素であった可能性について考察する。

インズリンはアニリンとアニリン塩酸塩をアミノアゾベンゼンに作用させた生成物であり、フェナジン染料の混合物からなる¹³⁾。また、ニグロシンは塩化鉄 (II) と塩酸の存在下でアニリンにニトロベンゼンを作用させた生成物であり、インズリンと同様にフェナジン染料の混合物である¹³⁾。インズリンとニグロシンは本来塩基性色素であり、両色素に共通する成分もある¹³⁾。また、一般にアルコール溶性 (水不溶性) であるが、塩基性で水溶性の種類もある^{13,14)}。さらに、両色素ともにスルホン化することで水溶性の酸性色素となる¹³⁾。Ehrlich¹¹⁾はインズリンやニグロシンをスルホン酸類に属す水溶性の黒色酸性色素と記した (p573)。この記述から、Ehrlichが水溶性のインズリンやニグロシンであれば全てスルホ基を有する酸性色素であると誤解していたと推察される。

Ehrlich¹¹⁾はトリグリセリン混合物や、EIGによって、 α 顆粒はエオジンに、 β 顆粒はインズリンに染色されたとした。また、同溶液によって α 顆粒が赤紫色になることがあると記した。この色調はエオジンとインズリンの混色を意味すると考えられるが、Ehrlichはこのような α 顆粒の色調の変化を血液中の好酸球には認めておらず、造血組織である骨髓の細胞に観察している。EhrlichはEIGで赤紫色を呈する α 顆粒は β 顆粒ではなく、 β 顆粒から α 顆粒への発達途中と考えた。この結論を導き出すために、Ehrlichは血液塗抹標本を低温で加熱固定した場合と、高温で固定した場合のEIGに対する α 顆粒の染色性が異なることを挙げ、前者では α 顆粒がインズリンに、後者ではエオジンに染まるとした (熱固定の条件は記されていない)。この染色性の違いを、加熱による顆粒の成分密度、換言すれば成分間の広さの違いによるものと考えた。すなわち、低温加熱では多くの水分が α 顆粒中にあるため、顆粒の成分間が広いので高分子量のインズリンが入りやすいが、高温加熱では水分量が少なくなるので成分間も狭く、低分子量のエオジンが入ると推察した。この考察は正しいのだろうか? 成分間が狭ければ高分子量のインズリンが入れなくなるかもしれないが、成分間が広ければ高分子量のインズリンだけでなく、低分子量のエオジンも容易には入ると考えられ、その

顆粒の色調は赤紫色になると思われる。しかし、Ehrlichは低温加熱標本では α 顆粒はインズリンで染まるとしている。Ehrlichは加熱の違いによる血液中の α 顆粒の染色性の違いを顆粒の成分間の広さの違いと考え、これを α 顆粒と β 顆粒の両方が観察される骨髓細胞に適用し、 β 顆粒は未熟なので顆粒内の成分が少なく、成分間が広いのでインズリンに染まり、 α 顆粒は成熟した顆粒なので成分間が狭く、エオジンに染まるとした。本文中では明言されていないが、 β 顆粒から α 顆粒への成熟途中では両色素で染色されるので赤紫色になると考えたと思われる。なお、Ehrlichは骨髓標本の熱固定条件について記していないが、エオジン好性の α 顆粒が観察されることから、高温で加熱固定したと考えられる。

現代の知見に照らし合わせると、Ehrlichの β 顆粒は好塩基性顆粒であるアズール顆粒に相当すると言える。好酸球ではアズール顆粒のアズール好性は顆粒の成熟とともに低下するが、アズール顆粒に好酸球顆粒の成分が付加されることで、アズール顆粒は好酸性を示して好酸性の特異顆粒となる^{15,16)}。Ehrlichの α 顆粒は特異顆粒に、 β 顆粒はアズール顆粒に相当すると考えられ、両顆粒の関係に関するEhrlichの考察は現代の知見からもみて正確である。このことから、 β 顆粒のインズリン好性は、インズリンが塩基性色素であるために生じたと解釈できる。Furno (1911)¹⁷⁾はモルモットの骨髓中の未熟な α 顆粒(β 顆粒のこと)はトリグリセリン混合物による染色ではインズリン好性であるが、May-Grünwald染色には好塩基性であると記している(p235脚注1)。また、Pappenheim¹⁸⁾もモルモットの未熟な α 骨髄球(未熟な好酸球のこと)の β 顆粒に相当する顆粒について記述しており、単独の塩基性色素(色素名は明記されていない)に染まり、May-Grünwald染色では塩基性色素(メチレンブルーのこと)の色を呈し、トリグリセロール混合物ではインズリン好性としている(p522)。また、Pappenheim¹⁸⁾はGiemsa染色ではこの顆粒が酸性成分(酸性色素)で染まるとしているが、正しくはGiemsa染色液中のメチレンアズールによる異調染色性のことであろう。したがって、 β 顆粒はメチレンブルーに正調染色性(青色)を示し、メチレンアズールには異調染色性を呈すると言える。Ehrlich¹¹⁾が β 顆粒で観察したインズリン好性の青色は、塩基性色素のインズリンが正調染色性を示したと推察される。Ehrlich¹¹⁾は低温の熱固定では血液中の(成熟した) α 顆粒がEIGでインズリン好性を、高温固定ではエオジン好性を示すとした。インズリンが塩基性色素であるならば、 α 顆

粒は酸性色素(エオジン)と塩基性色素(インズリン)のどちらにも染色される特徴を有するが、高温では好塩基性部位が不活化されるのでインズリンに染まらなくなると解釈できる。しかし、高温固定したと考えられる骨髓細胞では β 顆粒と成熟途中の α 顆粒がインズリン好性となる。これらのことから、成熟した α 顆粒のインズリン好性と β 顆粒のそれは異なる因子によるものと推察される。また、低温固定した血液中の α 顆粒がEIGでエオジンに染まらなかったのは、 α 顆粒中の好酸性部位と染色液中の酸性色素および塩基性色素の好染色度の関係によるものと思われる。

Furno¹⁷⁾はトリグリセリン混合物中にエオジンの沈殿が生じることに気づいた。トリグリセリン混合物に関する最初の記載論文であるEhrlich¹¹⁾には本混合物の処方記されていない。Ehrlichの研究室で学位論文研究を行ったSchwarze¹⁹⁾はトリグリセリン混合物の処方について、アウランシアで飽和させたグリセリンとグリセリンを1:1~2の割合で混合し、これにエオジンとアニリンブラック(ニグロシンのこと)を過剰量加えて長時間の振盪で飽和させたと記述している(p86)。Ehrlichの元で研究したKurloff^{20,21)}はアウランシア、エオジンおよびニグロシからなる混合物を使用した。Kurloffの記載はない。Hirschfeld²²⁾にはEhrlichの方法を厳守したとしか書かれておらず、処方は不明である。Furno¹⁷⁾はアウランシア、エオジンおよびインズリンを同量使用したとし、使用前に生じた沈殿を可溶化させるために60℃で加温したとしている。このことからFurno¹⁷⁾は各色素の飽和溶液の上清を同量混合したが、使用前に沈殿が生じていることに気づき、加温してから染色に供したと考えられる。一方、Schwarze¹⁹⁾は飽和溶液を作製したので、混合物が入った容器の底には最初から過剰の色素が沈殿しており、新たな沈殿の形成に気が付かず、この飽和溶液の上清を染色に使用したと思われる。Ehrlich¹¹⁾、Kurloff^{20,21)}およびHirschfeld²²⁾もSchwarze¹⁹⁾と同様なトリグリセリン混合物を用いたと推察される。Furno¹⁷⁾は沈殿をエオジンであるとした。これはトリグリセリン染色における彼の結果(ウサギやモルモットの好中球顆粒はエオジン好性)とHirschfeld²²⁾の結果(好中球顆粒はインズリン好性)の違いを説明するための推測であると思われる。すなわち、Furno¹⁷⁾はHirschfeld²²⁾がエオジンの沈殿が生じた混合液の上清を使用したために好中球顆粒がインズリン陽性になったと考えた。実際にはFurno¹⁷⁾が観察した沈殿は酸性色素(アウランシア、エオジン)と塩基性のインズリンが結合し

て生じた中性色素と考えられる。中性色素は加熱によって溶解することが知られており^{23,24)}, Furno¹⁷⁾も加温によって沈殿を溶解している。

調整直後のトリグリセリン混合物中の色素の比率や、実際に染色に使用した時の比率は研究者間や同じ研究者でも調整後の経過時間によって異なると考えられ、同じ被染色物に対する染色性も異なると容易に推察される。トリグリセリン混合物は顆粒の好酸性を調べる染色法として魚類を含む様々な生物の血球に使用されてきた^{17,22,25,26)}。ここではウサギの好中球顆粒について考察する。前述のように、Furno¹⁷⁾はウサギの好中球顆粒をエオジン好性とし、Hirschfeld²²⁾はインズリン好性としている。また、Kurloff^{20,21)}もエオジン好性としている。Schwarze¹⁹⁾はヒトや多くの動物で、酸性色素で染色できる顆粒は(好酸球の) α 顆粒だけであるとした。この記述はウサギの好中球顆粒は酸性色素に染まらないことを意味する。この酸性色素にはエオジンとインズリンが含まれることから、Schwarze¹⁹⁾のトリグリセリン混合物ではウサギの好中球顆粒は染まらなかったと言える。Ehrlich¹¹⁾にはウサギ好中球のトリグリセリン混合物による染色性の記述がない。Ehrlich¹¹⁾はこの発表の時点ですでに5種類の特異顆粒 ($\alpha \sim \epsilon$ 顆粒) を識別しており (p572), ここでは好酸球に焦点をあてて記述しているためである。しかし奇妙なことに、Ehrlichの他の著作においてもトリグリセリン混合物による好酸球以外の白血球の染色性に関する明確な記述がない。ただし、Ehrlich & Lazarus¹²⁾におけるKurloffの研究内容を紹介した箇所 (p56) において、“ウサギの好中球にエオジン好性顆粒が存在することはすでにEhrlichが観察しているが、ウサギの好中球顆粒のトリグリセリン混合液による染色性は好酸球のそれと全く異なる”と記している。これはウサギの好中球顆粒はトリグリセリン混合液でエオジンに染まらないことを意味し、Kurloffの観察結果と全く異なる。また、ウサギの好中球にエオジン好性顆粒をEhrlichがすでに観察しているのであれば、それはいかなる染色であったのであろう? 多分、Ehrlichはエオジンを単独で使用した血液標本上で、ウサギの好中球顆粒がエオジンに染まることを観察したが、トリグリセリン混合物による染色標本上ではSchwarze¹⁹⁾の記述のように好中球顆粒がエオジンにもインズリンにも染色されなかったのであろう。この観察結果は、好酸球と好中球を識別できることを意味し、Ehrlichにとってトリグリセリン混合物による染色標本、特に骨髓のその観察時に好都合であったと思

われる。なお、Ehrlichはトリグリセリン混合物で好中球顆粒が染色されなかった理由について何も記述していない。上述のように、同じ被染色物 (ウサギの好中球顆粒) に対してもトリグリセリン混合物による染色性は報告ごとに大きく異なる。このことは各報告間においてトリグリセリン混合液中の色素の比率や濃度が異なることに起因すると考えられる。Ehrlich¹¹⁾は水溶性のインズリンとニグロシンは全てスルホ基を有する酸性色素と考えていたが、実際使用した色素は水溶性の塩基性色素であったと思われる。また、他の研究者たちもEhrlichにならって水溶性のインズリンをスルホン化されているかを確認せずに使用していたと推察される。

酸性色素と塩基性色素の混合液では、被染色物の染色性は、被染色物の好染色度 (好酸性度, 好塩基性度) と、両色素それぞれの好染色度 (酸性色素の好塩基性度と塩基性色素の好酸性度) と比率および濃度によって決まると推察された。

謝 辞

Kurloffの原著論文^{20,21)}の入手に尽力いただいた水産大学校名誉教授 酒井治己博士に厚く感謝いたします。

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) 近藤昌和, 安本信哉, 木村美智代: Triacid染色液中の色素複合体の特徴. 水産大学校研究報告, **73**, 35-43 (2025) [Kondo M, Yasumoto S, Kimura M: Characterization of the dye complexes in triacid staining solutions. *Journal of National Fisheries University*, **73**, 35-43 (2025) (in Japanese with English abstract)]
- 3) 近藤昌和, 安本信哉, 高橋幸則: コイ好中球顆粒のメイ-グリュンワルド・ギムザ染色性. 水産大学校研究報告, **50**, 109-117 (2002) [Kondo M, Yasumoto S, Takahashi Y:

- May-Grünwald-Giemsa staining properties of granules in carp *Cyprinus carpio* neutrophil. *Journal of National Fisheries University*, **50**, 109-117 (2002) (in Japanese with English abstract)]
- 4) 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)]
 - 5) 近藤昌和, 安本信哉, 大野美和, 高橋幸則: コイ, ナイルティラピアおよびイサキの好中球顆粒. 水産大学校研究報告, **61**, 51-64 (2012) [Kondo M, Yasumoto S, Oono M, Takahashi Y: Granules of neutrophils from common carp (*Cyprinus carpio*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and striped grunt (*Parapristipoma trilineatum*). *Journal of National Fisheries University*, **61**, 51-64 (2012) (in Japanese with English abstract)]
 - 6) May R, Grünwald L: Über Blutfärbungen. *Centralblatt für Innere Medizin*, **23**, 265-270 (1902)
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) Pappenheim A: Panaptische Universalfärbung für Blutpräparate. *Medizinische Klinik. Beiheft*, **4**, 1244 (1908)
 - 11) 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)
 - 12) Ehrlich P, Lazarus A (Mitverfasser): Die Anaemie: Normale und Pathologische Histologie des Blutes. Alfred Hölder, Wien, 201pp + 2 Tafeln (I & II) (1898)
 - 13) Raue R: Azine dyes. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, volume 4 (Antiulcer Drugs to Benzene) (6th edition). Wiley-VCH, Weinheim, 293-322 (2003)
 - 14) Pappenheim A: Grundriss der Farbchemie: zum Gebrauch bei mikroskopischen Arbeiten. August Hirschwald, Berlin, 476pp (1901)
 - 15) 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)]
 - 16) Parmley RT: Mammals. In: Rowley AF, Ratcliffe NA (ed) Vertebrate blood cells. Cambridge University Press, Cambridge etc., 337-424 (1988)
 - 17) 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)
 - 18) Pappenheim A: Einige interessante Tatsachen und theoretische Ergebnisse der vergleichenden Leukozytenmorphologie. *Folia Haematologica: Internationales Zentralorgan für Blut- und Serumforschung*, **8**, 504-563 (1909)
 - 19) Schwarze G: Ueber Eosinophile Zellen (Inaugural-Dissertation, 1880). In: Ehrlich P (herausgegeben) Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes (Gesammelte Mittheilungen). August Hirschwald, Berlin, 72-95 (1891)
 - 20) Курлова МГ: Объ измѣненіяхъ крови у безселезеночныхъ животныхъ въ теченіи перваго года по удаленіи селезенки. *Врачъ*, **10**, 515-518 & 538-543 (1889) [Kurloff MG: About blood changes in spleenless animals during the first year after spleen removal. *Vrach*, **10**, 515-518 & 538-543 (1889) (in Russian)]
 - 21) Курлова МГ: Объ измѣненіяхъ крови у безселезеночныхъ морскихъ свинокъ въ теченіи втораго года послѣ операціи.

- Врачъ*, **13**, 469-474 (1892) [Kurloff MG: About blood changes in spleenless guinea pigs during the second year after surgery. *Vrach*, **13**, 469-474 (1892) (in Russian)]
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 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) Werzberg A: Studien zur vergleichenden Hämozytologie einiger poikilothermer Vertebraten. *Folia Haematologica: Internationales Magazin für Klinische und Morphologische Haematologie, I. Teil, Archiv*, **11**, 17-193 + 4 Tafeln (I-IV) (1911)