

超生体染色色素の固定に関する研究

第 1 編

沃度カリ水銀溶液と各種ア＝リン及びアゾ色素 (特に超生体染色色素)との反応に就て

岡山大学医学部病理学教室 (指導・妹尾左知丸教授)

真 木 照 雄

〔昭和 33 年 9 月 22 日受稿〕

緒 言

電子顕微鏡の発達、或は位相差顕微鏡の発達以前に於ては生体染色乃至超生体染色法は細胞の小器官を観察するためのすぐれた方法として細胞学者の間に広く一般に用いられて来た(1-27)。即ちヤーヌス緑 B によるミトコンドリアの染色(2)(21)(22)(24)(25)、中性赤によるゴルジ体の検出(19)(35)、プリリアントクレシル青及びニール青による細胞内好塩基性物質の観察(26)等はその主なるものであり、之等は 1930 年代に詳しく追及され Sabin(4)、清野(13)(35)(18)、杉山(18)(23)等の莫大な業績によりその方法と観察は完成の域に達した。之等の方法と結果は細胞学の分野のみならず臨床医学の面に於ても、特に血液学の分野に於て広範囲に種々なる方面に応用されて来た事は周知の事実である。電子顕微鏡並に位相差顕微鏡の発達により細胞内小器官が直接観察されるようになってからは細胞の超生染による観察はその形態学的意義を殆んど失つて来たが、特殊な色素が特別の小器官を染色するという事は之等小器官の化学的構成要素、酵素活性と密接に関連し新しい細胞化学的意味に於ての染色機構解明の必要性を痛感せしめる。しかしながら超生体染色色素はその固定が不可能で一般に生のままで観察されている。この事は細胞の小器官の染色状態を観察するために屢々障礙となり、間違つた結論が引出されたり、又何が染色されているのか判定に苦しむ事が多い。著者はこれらの障礙を除いて各種の超生体染色色素の染色顆粒と小器官との関係をより明瞭に観察し、組織化学的研究の一助とするために各種超生体染色色素の固定方法について研究した。超生体染色色素或いは生体染色色素顆粒を固定し永久標本として観察しようとする試みは超生体観察の盛ん

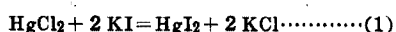
に行われた時代に可成り試みられたようである。特に生体染色法の研究に於て毒性が少い事と美麗な染色像を与える事から中性赤顆粒の固定法は下等動物、高等動物組織或いは血液細胞に於て(4)(21)(28)-(42)試みられ更にこれらの研究中トルイジン青(29)(30)、プリリアントクレシル青(33)、メチレン青(29)、塩酸ニール青(32)等の固定法が報告されている。一方超生体染色色素の固定法は 1923 年 Sabin(4)が試み血液細胞超生体染色塗抹標本を空中にて乾燥固定し 1928 年 Scott(38)も同様な方法を用いている。然しながら超生体染色色素一般についての固定法の試みは殆んど行われていない。私は超生体染色色素一般の固定法について研究し、先人の固定法を追試し、更に新しい非常に簡単な固定術式を考案しほぼ満足すべき成績を得たので次にその理論と方法並に成績について報告する。

昇汞はある超生体染色色素と結合して水に不溶の錯塩を作り、殊に中性赤顆粒の固定については Golovine(28)、Gurwitsch(29)は昇汞溶液を用いて良好な成績を得たといひ、Skraup(32)は塩基性超生体染色色素は原理的に昇汞溶液にて固定されるといつている。然し佐口(42)は生体染色臓器塊での固定の研究に於て昇汞は錯塩結晶の形成を来し中性赤液胞の形態を著しく変化させる事を指摘し、又昇汞による細胞構造破壊を強張り昇汞固定は細胞構造の研究には無価値であるといっている。

一方沃度の色素固定効果についてはルゴール或いは沃度蒸気を用いて Parat(35)が之を試み固定迅速にしてその結果が良好であつたといっている。

かかる事実から私はこの両者を同時に作用させた場合の色素固定効果を検討した。手段として昇汞と沃度カリを反応させてここに生ずる沃度カリ水銀の

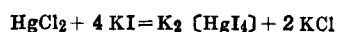
錯塩を利用する事によつては満足すべき効果が得られた。この時に起る反応は先づ



として HgI_2 の赤色沈澱を生ずるが更に多量の沃度カリを加えると



の状態に反応が進行する。 $\text{K}_2 [\text{HgI}_4]$ は無色の錯塩で (1) (2) より最終反応は



この $\text{K}_2 [\text{HgI}_4]$ なる錯塩のアルカリ溶液が Nessler 氏試薬としてアンモニアの定量反応に用いられる事は周知の事実である⁴³⁾。

一方超生体染色色素は一般にアニリン色素であり表 1 に見る如くその構造中にアミノ基、モノメチルアミノ基、ジメチルアミノ基を有している。これらの事実より私は超生体染色色素が $\text{K}_2 [\text{HgI}_4]$ にて

表 1 種々なる超生体染色色素の化学構造式

色 素 名	化 学 構 造 式
ア ニ リ ン	
中 性 赤	
ヤ ー ヌ ス 緑 B	
ア ニ ー ル 青	
ブリリアントクレシル青	
メ チ レ ン 青	
トルイジン 青	
メ チ ル オ レ ン ジ	
メ チ ル グ リ ー ン	

ア ゾ 色 素	O. A. T.	
	D. A. B.	
	M. A. B.	
	A. B.	

水に不溶の沈澱を生じ固定されるのではないかと考
え各種色素について沈澱の形成とその溶解性を観察
した。

実験方法

$K_2[HgI_4]$ 液 5%昇汞溶液(加熱溶解する)
100 cc と15%沃度カリ溶液 60 cc を徐々に加え振盪
して放置する。この際赤色の HgI_2 の沈澱が残れば
濾過してその濾液を使用する。時間の経過と共に
 I_2 の遊離のために無色→淡黄色に変化するが使用可
能である。

アニリン及びアゾ色素: 水溶性色素(主として
アニリン色素)として0.1%中性赤, 0.1%ヤーマス

緑B, 0.1%ニール青, 0.1%ブリリアントクレシ
ル青, 0.1%メチレン青, 0.1%トルイジン青, 0.1%
メチルオレンジ水溶液, 油溶性色素(主としてアゾ
色素)として10%オルトアミノアゾトルオール, 3
%ジメチルアミノアゾベンゾール, 3%モノアミノ
アゾベンゾール, 3%アゾベンゾールオリブ油溶
液及び3%ジメチルアミノアゾベンゾール Tween
80溶液を用いた。なお油溶性溶液の場合発色を鮮明
にするため $K_2[HgI_4]$ 液 100 cc につき濃塩酸 1 cc
を加えた。

操作: i) 試験管に $K_2[HgI_4]$ 溶液 (5%
 $HgCl_2$ 100 cc と15% KI 60 cc を加えて沈澱を濾過
した上清) 5 cc を取り之に各種色素溶液を1滴滴下

表 2 $K_2[HgI_4]$ と各種アニリン及びアゾ色素との反応

色 素 液				$K_2[HgI_4]$ 添加 後 沈 澱 生 成			上 清	沈 澱 物		沈澱物溶解度試験		
色 素	濃度	溶媒	色	直後	1時 間後	3時 間後	着色度	色	性状	水	有機 溶媒	カーボワッ クス1500
中 性 赤	0.1	水	鮮紅	卅	卅	卅	—	深紅	微 細	不溶	易溶	可溶
ヤーマス	0.1	水	黒青 藍	卅	卅	卅	—	藍青	微細多量	〃	〃	〃
ニール青	〃	〃	青藍	+	卅	卅	⊥	深青	極く微細	〃	〃	〃
ブリリアントク レシル青	〃	〃	青	卅	卅	卅	—	青	極 微 細	〃	〃	〃
メチレン青	〃	〃	青	卅	卅	卅	—	青	微 細	〃	〃	〃
トルイジン青	〃	〃	青	卅	卅	卅	—	青	微 細	〃	〃	〃
メチルオレンジ	〃	〃	黄橙	卅	卅	卅	⊥	黄橙	微 細	〃	〃	〃
O. A. T.	10 ブ油 (+HCl)	オリ ブ油 (黒赤)	橙	卅	卅	卅	⊥	黒赤	稍粗大 小不同	〃	〃	〃
D. A. B.	3 〃	〃 (黄 鮮紅)	黄	卅	卅	卅	—	深紅	〃	〃	〃	〃
M. A. B.	〃 〃	〃 (〃)	〃	卅	卅	卅	⊥	〃	〃	〃	〃	〃
A. B.	〃 〃	〃 (〃)	〃	卅	卅	卅	⊥	〃	〃	〃	〃	〃
D. A. B.	〃 Tween 80	〃 (〃)	〃	卅	卅	卅	—	〃	〃	〃	〃	〃

する。直後、1時間後及び3時間後に沈澱の形成を観察した。ii) 試験管に各種色素液 5 cc を取り之に $K_2[HgI_4]$ 溶液を等量加え数時間室温に放置後遠心沈澱して沈澱物を濾過し濾液は $K_2[HgI_4]$ 溶液と比較する。沈澱物は水、アルコール、キシロール、アセトン、クロロフォルム、カーボワックス 1,500 に対する溶解度試験に用いた。

実験結果並びに考按

アミノ基、モノメチルアミノ基、ジメチルアミノ基を有するアニリン及びアゾ色素は $K_2[HgI_4]$ にて水に不溶の微細な沈澱を形成しその沈澱物は色素の元の色を保有しており色の変化は如何なる場合にも起らない(表2)。しかしながらここに生じた沈澱物はアルコール等の有機溶媒、カーボワックス等の或る種の包埋剤に可成り容易に溶解する。これらの事実は中性赤に於て試みられた生体染色の顆粒固定が困難であり⁴¹⁾(脱水包埋過程に脱色する)、 $K_2[HgI_4]$ もその例外でない事を示している。

一方又0.1%ヤーマス緑B水溶液を少量のチオ硫酸ソーダ粉末にて還元し pH を変化させ色素の元の色を変化させたものについて同様の反応を行わせて見たがこの場合にも $K_2[HgI_4]$ は無色のままの色素と結合して水に不溶の沈澱物を生ずる。この事実は色素と $K_2[HgI_4]$ との反応はアミノ基、モノ

メチルアミノ基、ジメチルアミノ基との間におこる反応で、色素の酸化還元反応²⁴⁾とは無関係である事を示している。

結 論

著者は超生染色素固定の目的を以て種々の色素と沃度カリ水銀との試験管内反応を試み次の如き結論を得た。

1. 沃度カリ水銀はアミノ基、モノメチルアミノ基又はジメチルアミノ基を有する色素と反応し水に不溶の沈澱物を形成する。

2. 反応は色素の酸化還元反応とは無関係で沈澱物は元の色素と全く同一の色を保有する。

3. 反応生成物は水に不溶であるがアルコール、アセトンその他の有機溶媒に可溶である。

以上の事実から固定後の操作を充分考慮すれば本反応は超生染色素の固定に応用し得る可能性を有する。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師妹尾教授に深謝する。

(本研究の要旨は第67回岡山医学会総会に於て報告した)

文 献

- 1) Kiyono, K. Die Vitale Karminspeicherung, Jena, Gustav Fischer, 1914.
- 2) Cowdry, E. V. : Internat. Monatschr. Anat. Physiol., 31, 267, 1914.
- 3) 清野謙次 生体染色研究の現況及び其の検査術式, 南江堂, 東京, 大10.
- 4) Sabin, F.R. Bull. Johns Hopk. Hosp., 34, 277, 1923.
- 5) 清野謙次: 生体染色の研究, 2, 南江堂, 東京, 昭3.
- 6) 森喜久男: 十全会雑誌, 33, 8, 昭3.
- 7) 森喜久男 同上, 34, 8, 昭4.
- 8) 森喜久男: 同上, 34, 11, 昭4.
- 9) 野手雅信: 同上, 33, 7, 昭3.
- 10) 野手雅信: 同上, 33, 8, 昭3.
- 11) 野手雅信: 同上, 33, 11, 昭3.
- 12) 野手雅信: 同上, 34, 6, 昭4.
- 13) 野手雅信: 同上, 35, 11, 昭5.
- 14) 野手雅信: 同上, 35, 12, 昭5.
- 15) 八木義一: 同上, 37, 522, 昭7.
- 16) 藤田秀一: 同上, 38, 3250, 昭8.
- 17) 藤田秀一: 同上, 38, 3629, 昭8.
- 18) Kiyono, K., Sugiyama, S. & Amano, S. Die Lehre von der Vitalfärbung, Kyoto, 1938.
- 19) Baker, J.R. : Quart J. Micr. Sc. 85, 1, 1944.
- 20) 天野重安 血液学の基礎, 上巻, 丸善, 昭24.
- 21) 加藤勝治: 血液学研究法, 南山堂, 東京, 昭25.
- 22) 関 正次: 組織検査法と物化学, 杏林書院, 東京, 1951.
- 23) 杉山繁輝 血液及び組織の新研究と其方法, 南江堂, 東京, 昭27.
- 24) Lazarow, A. & Copperstein, S.J. : J. Histochem. Cytochem., 1, 4, 234, 1953.
- 25) De Robertis, E.D.P. et al. : General Cyto-

- logy, Saunders, London, 1955.
- 26) 神田三郎 : 岡山医学会雑誌, 68, 11, 昭31.
- 27) Brachet, J. : Biochemical Cytology, Academic Press Inc., New York, 1957.
- 28) Golovine, E. : Zeitschr. f. wiss. Mikr., 19, 176, 1902.
- 29) Gurwitsch, A. : Pflügers Archiv, 91, 71, 1902.
- 30) Gross, W. : Zieglers Beitr. f. Path. Anat., 51, 528, 1911.
- 31) Arnold, J. : Über Plasmastrukturen, Jena, S. 6, 1914.
- 32) Skraup, S. : Ber. d. Dentsch. chem. Ges., Jg. 59, 1916.
- 33) Vonwiller, P. : Archiv. f. Protistenk., 38, 279, 1918.
- 34) Kordes, P. J. : Anat. Record, Vol. 27, 1924.
- 35) Parat, M. et Painlevé : Comptes Rendus de la Société de Biologie, II, P. 315, 1925.
- 36) Chlopin, N.G. : Archiv f. exp. Zellforsch., Bd 4, H. 4, 1927.
- 37) Gardner L. U. and Smith, D. T. : Amer. J. Path., 3, 5, 1927.
- 38) Scott, G. H. : Anat. Record, 38, 2, 233, 1928.
- 39) Adams, A. E. : Science N. S., 68, 1761, 303, 1928.
- 40) Cappel, D. F. : J. Path. Bac., 32, 3, 611, 1929.
- 41) 塚本 茂 : 十全会雑誌, 37, 5, 昭7.
- 42) 佐口 栄 : 医学と生物学, 4, 12, 551, 昭18.
- 43) Treadwell, F. P. : Analytical Chemistry, Vol. 1. Qualitative Analysis, 1937.

Studies on the Fixation of the Dyes used in Supravital Staining of Cells

Part 1. Chemical Reaction Between Anilin- and Azo-dyes and Nessler's Reagent

By

Teruo MAKI

Department of Pathology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan
(Director : Prof. Satimaru SENO)

For the purpose of establishing a method of fixing the dyes used in supravital staining of cells, the author observed the precipitation reactions of several dyes, neutral red, Janus green B, Nile blue, etc. with the Nessler's reagent, by which those dyes having amino-, monomethylamino or dimethylaminogroups can be precipitated forming the water insoluble complexes. The reaction proved to have no relation with the oxidation or reduction of dyes, which often causes the change in the color of dyes, showing that the insoluble precipitates have the original color of dyes, and the colored dye forms the same colored precipitate, the reduced noncolored dye a white precipitate.

The organic solvents such as alcohol, acetone etc. dissolve this complexes, and therefore, it is suggested that their reaction can be applicable for the fixation of the supravital stained dyes with exception of the organic solvents in the course of the following dehydrating processes for the observation.