

## 遊離した酸性色素を含むtriacid染色液の特徴

近藤昌和<sup>†</sup>, 安本信哉

### Characterization of triacid staining solution containing free acidic dyes

Masakazu Kondo<sup>†</sup> and Shinya Yasumoto

**Abstract:** Triacid staining is a technique used to confirm the neutrophilic properties of constituents, resulting in a purple color in neutrophilic substances such as neutrophilic granules. However, it is known that neutrophilic substances that are normally purple in triacid staining may occasionally exhibit the color of the acidic dye, which is one of the dyes included in the triacid staining solution. This study reports that the cause is the presence of excessive free acidic dye in the triacid staining solution and examines this staining model. The dye complex formed in a triacid staining solution consisting of orange G, acid fuchsin, and methyl green has two binding sites for neutrophilic substances, and free acidic dyes may be mixed with this complex. In such cases, it was inferred that the preferential binding of the acidic dye to the neutrophilic substance was due to the number of acidic groups corresponding to the free acidic groups of the acidic dye being higher than the number of free acidic groups at the binding sites of the dye complex.

**Key words:** triacid stain, dye complex, acidic dye, acid fuchsin, orange G

### 緒 言

著者らはこれまで、脊椎動物の顆粒性白血球の一種である好中球の好中性を証明するtriacid染色液について、その含有色素の構造と特徴を考察してきた<sup>1,2)</sup>。好中性とはtriacid染色によって紫色を呈することを意味し、triacid染色液の含有色素は酸性色素と塩基性色素が結合したものであると考えられた<sup>1,2)</sup>。また色素複合体は水溶液中では沈殿が生じない形態、すなわち、イオン化していると推察した<sup>1,2)</sup>。この色素複合体は現代において血液染色に用いられるWright染色やGiemsa染色およびMay-Grünwald・Giemsa染色では生じないと思われる<sup>1)</sup>。Triacid染色はEhrlichによってカエル、ヤモリ、ウサギ、モルモット、イヌ、ウシ(子牛)およびヒトを対象として開発され<sup>3)</sup>、使用された色素は酸性フクシン(酸性色素)とメチレンブルー(塩基性色

素)であった。Ehrlichはその後、色素種の変更や、作製法の改変を行っており(文献1参照)、現在では酸性色素として酸性フクシンとオレンジGを、塩基性色素にはメチルグリーンを使用し、Ehrlichの著書<sup>4)</sup>に記載された作製法によるtriacid染色液が、一般にEhrlichのtriacid染色液と呼ばれている。Ehrlich以外にも、Romanowsky<sup>5)</sup>やPappenheim<sup>6)</sup>がtriacid染色液を報告しているが、その色素種はEhrlich<sup>3,4)</sup>とは異なる(文献2参照)。

Triacid染色液中の色素複合体は、総体としては酸性色素であり、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するため、被染色物は色素複合体そのものの色調(紫色)を呈すると考えられる<sup>1,2)</sup>。一方、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被染色物が染まると推察された<sup>1,2)</sup>。また、色素複合体が解離する条件は構成色

2025年12月16日受付; 2026年1月20日受理; 2026年2月27日発行 (Received 16 December 2025; Accepted 20 January 2026; Published 27 February 2026)

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

<sup>†</sup>責任著者 (corresponding author): kondom@fish-u.ac.jp

©水産大学校研究成果委員会 〒759-6595 下関市永田本町2-7-1 (Research Results Committee, National Fisheries University, 2-7-1 Nagatamachi, Shimonoseki 759-6595, Japan)

素の種類によっても異なると考えられる<sup>2)</sup>。

Ehrlichは1887年に、それまでに自身が提唱した白血球系細胞の特異顆粒の分類体系 ( $\alpha - \epsilon$  顆粒)<sup>3,7)</sup>を破棄するような記述を論文<sup>8)</sup>に記した (p292)。すなわち、「これまでに血液および造血管の検査において、このような顆粒 (特異顆粒のこと) が7つ発見されている。このうち、好酸性顆粒 (好酸球の顆粒のこと) と肥満細胞性顆粒 (肥満細胞と好塩基球の顆粒のこと) の2つは検査した全ての動物に存在していたが、その他の顆粒は狭い範囲に分布している。好中性顆粒はヒトのみ、他の2つはウサギとモルモットのみ、最後の2つは鳥類のみに認められた。」と記した。この記述はその後の顆粒性白血球の分類に大きな影響を与え、Ehrlichが記述中に暗示した顆粒について多くの研究者が様々な解釈をし、また、種々の動物を使用した研究を進めるきっかけになった。しかし、Ehrlichはウサギ、モルモットおよび鳥類にあるとした特異顆粒についての詳細な記述を残さなかった。Ehrlichは好中性顆粒はヒトのみにあるとしているが、これはEhrlich<sup>9)</sup>以降にヒトに対して開発された新たなtriacid染色液 (酸性フクシン、オレンジおよびメチルグリーンを含む) をヒト以外の動物では試していないことを示していると考えられる。また、好中性顆粒はヒトのみにあるとしていることから、7つあるとした特異顆粒のうち、ウサギとモルモットのみにあるとした2種類の特異顆粒と、鳥類のみにあるとする2種類の特異顆粒の中に、これら動物の好中球に相当する顆粒性白血球の顆粒が含まれると推察される。

上述のEhrlichの暗示がCorin (1893)<sup>9)</sup>による各種哺乳類の好中球のtriacid染色性を調べるきっかけになり、Corin<sup>9)</sup>への反証をTamassia (1894, 1895)<sup>10,11)</sup>が示し、さらにIlberg (1895)<sup>12)</sup>によるTamassia<sup>10,11)</sup>の追認につながった。Corin<sup>9)</sup>は各種哺乳類の好中球が、ヒトの好中球のようにtriacid染色に染まらないとしたが、これを否定したTamassia<sup>10,11)</sup>やIlberg<sup>12)</sup>にはCorin<sup>9)</sup>の観察結果に対する考察、すなわち、Corin<sup>9)</sup>が観察した標本では好中性顆粒が認められなかった理由が明記されていない。

Corin<sup>9)</sup>、Tamassia<sup>10,11)</sup>およびIlberg<sup>12)</sup>の原著論文を精査した結果、Tamassia<sup>10,11)</sup>の記述からCorin<sup>9)</sup>が使用したtriacid染色液には遊離の酸性色素が含まれていたと推察された。ヒトにおいてもtriacid染色で好中球の顆粒が紫色ではなく、酸性色素の色調を示すことがある<sup>13,14)</sup>。著者らは既報<sup>1)</sup>でその原因はtriacid染色液作製時に過剰に添加された酸性色素であると推測した (p93-94)。しかし、triacid染色液中において酸性色素と見なせる色素複合体と、その構成色素

でもある酸性色素が混在した場合、好中性顆粒が紫色ではなく、酸性色素の色調となる理由は不明であった。本研究では、Corin<sup>9)</sup>、Tamassia<sup>10,11)</sup>およびIlberg<sup>12)</sup>の原著論文に対する考察とTamassia<sup>10,11)</sup>の記述を基に、遊離の酸性色素を含むtriacid染色液において好中性顆粒が酸性色素に染まる理由を報告する。

## 結果および考察

### Corin<sup>9)</sup>の記述に対する考察

Corinは法医学上の問題、すなわちヒトの血液と他の動物の血液を区別する方法を検討する中で、Ehrlichのtriacid染色によってヒトの好中球と他の動物のそれが区別できるのではないかと考えた。これは緒言にも記したEhrlichの論文<sup>8)</sup>における記述からのCorinの洞察である (p286)。Corinは各種哺乳類 (イヌ、ウサギ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマおよびヒツジ) の血液標本にtriacid染色を施して観察した。その結果、これらの哺乳類では好中性顆粒が検出されなかったことから、好中性顆粒はヒトに特有と考えた。ただし、これら哺乳類において好中球に相当する顆粒性白血球の顆粒の色調についての記述はない。その後、Corinは様々な状態のヒト血液 (凝血塊やガーゼに付着した血液など) から標本を作成してtriacid染色を行い、いくつかの条件では好中性顆粒の検出に成功したと報告している。しかし、Corinが各種哺乳類の血液を調べた時に、対照としてヒトの血液標本を染色したとの記述はない。Corinはtriacid染色液の作製法および使用法 (染色法) を示している。また、ドイツの試薬会社であるGrübler社製のtriacid染色液を使用したと記している。Ehrlichは酸性フクシン、オレンジおよびメチルグリーンからなるtriacid染色液の作製法を2回変更している<sup>1)</sup>。最初の記述はEhrlich (1883)<sup>15)</sup>にあり、翌年1回目の修正法を発表している<sup>16)</sup>。また、2回目の変更による作製法はEhrlich and Lazarus (1898)<sup>4)</sup>にある。Corinが記したtriacid染色液の作製法は、“オレンジの飽和水溶液125 cc, 20%アルコールに飽和させた酸性フクシン125 cc, これに徐々に以下のものを加える: メチルグリーンの飽和水溶液125 cc, 無水アルコール75 cc。”となっている。これに類似した記述はEhrlich<sup>16)</sup>にあり、“オレンジの飽和水溶液125 ccに、20%アルコールに飽和させた酸性フクシン125 ccおよび75 ccの無水アルコールを加え、振盪しながらメチルグリーンの飽和水溶液125 ccを徐々に加える。”とある。オレンジとはオレンジGのことである。CorinはEhrlichの著作物とし

で、Ehrlichが編集した論文集<sup>17)</sup>とEhrlich<sup>8)</sup>しか引用しておらず、論文集には酸性フクシン、オレンジGおよびメチルグリーンからなるtriacid染色液の作製法が記された論文はない。また、Ehrlich<sup>8)</sup>にもtriacid染色液の作製法は記されていない。したがって、Corinが記したtriacid染色液の作製法は、Ehrlichの著作物から引用したものではなく、Corinが使用した市販のtriacid染色液に添付されていた説明書に書かれていたものと推察される。Grübler社製のtriacid染色液が、Corinが記した作製法と同様に調製されたのかは不明であるが、Corinの記述にしたがってtriacid染色液を調製する場合、オレンジGの飽和水溶液と20%アルコールに飽和させた酸性フクシンを混合したあとに、メチルグリーンの飽和水溶液を徐々に加え、次いで無水アルコールを徐々に加えるのが一般的と思われる。しかし、Ehrlich<sup>10)</sup>ではオレンジと酸性フキシンの混合液にまず無水アルコールを加えるとある。無水アルコールを加えたのちにメチルグリーンを徐々に加える理由は、Ehrlich<sup>10)</sup>には書かれていない。Corinが記した作製法はGrübler社が対外向けに記したものであり、実際の作製法とは異なると推察される。Corinが記した染色法には、染色前の標本を125℃で2時間加熱固定するとある。Ehrlichの著作物<sup>4,15,16)</sup>では標本の加熱条件について何も書かれていない。この加熱温度と時間も添付されていた説明書からの引用と思われる。

Corin<sup>9)</sup>はTamassia<sup>10,11)</sup>とIlberg<sup>12)</sup>に引用されているが、TamassiaはCorinが調べた哺乳類をイヌ、ウサギ、ネコ、ブタ、ウマおよびヒツジとしており、ウシが欠けている。一方、IlbergはCorinが使用した実験動物を正確に記している。

### Tamassia<sup>10,11)</sup>の記述に対する考察

Tamassiaはヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ネコおよびサルに好中性顆粒を確認しているが、Corin<sup>9)</sup>よりも緻密な実験を行っている。Tamassiaはまず、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triacid染色液でヒトの血液標本を染色したが、Ehrlichが報告したような色は得られなかったと記している。この時の好中球顆粒の色調についての記述はないが、好中性を意味する紫色ではないことは明らかである。この結果を得たTamassiaは、ヒトの好中球はtriacid染色では紫色を示さないと結論付けなかった。Tamassiaはtriacid染色液を繰り返し使用することで、好中性顆粒が検出されるようになったと記述している。繰り返し使用すると、染色液を一回切りではなく何度も使うとの意味であろう。この何度も使用してヒト

の好中性顆粒が紫色に染色されるようになったtriacid染色液によって、保存していた標本にも好中性顆粒が検出されたとしている。保存していた標本とはヒトの標本であろう。TamassiaにもCorin<sup>9)</sup>と同様にtriacid染色液の作製法が記されているが、その記述はCorin<sup>9)</sup>と全く同じである。また、染色前の標本を125℃で2時間加熱すると記述もCorin<sup>9)</sup>と同じである。Tamassiaには市販のtriacid染色液を使ったとの記述はないが(自身で調製したとも書かれていない)、Corinの再試を行っていることを考慮すると、Corinと同様にGrübler社製のtriacid染色液を使用したと推察される。Tamassiaはヒト血液を用いた実験中に、標本を125℃で長時間加熱すると白血球の細胞質が変化し、好中性顆粒の検出に支障をきたすが、標本を火炎中に数回通すだけで加熱固定は十分であることに気付いた<sup>10,11)</sup>。この加熱方法で処理したヒト血液標本を、Ehrlichが推奨する別の染色液で染色すると、好中性顆粒は酸性フクシン、オレンジGおよびメチルグリーンからなるtriacid染色よりも明瞭に観察されるとしている<sup>10,11)</sup>。Ehrlichが推奨する別の染色液の組成が記されているが、この染色液はEhrlichが1880年に報告した酸性フクシンとメチレンブルーからなるtriacid染色液<sup>3)</sup>である。Tamassia<sup>10,11)</sup>は「Ehrlichが推奨する別の染色液」と記したが、これがtriacid染色液であるとは記述していない。Tamassiaは標本を火炎中に数回通して加熱固定し、これに酸性フクシンとメチレンブルーからなるtriacid染色液を施すことで、4-5日経過したヒト血液や8-10日経過したヒト血痕からも好中性顆粒が検出されたとしている。Tamassiaはこれら「2つの方法」に習熟したのちにヒト以外の哺乳類(ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、ネコおよびサル)の血液標本に「2つの方法」を施して好中性顆粒が検出されたと報告している。また、特に「2つ目の方法」が有効であったと記した。「2つの方法」とは、火炎中に数回通す加熱固定をした標本に対して、①繰り返し使用することでヒトの好中球顆粒が好中性を示すようになったtriacid染色液を用いて染色する方法と、②酸性フクシンとメチレンブルーからなるtriacid染色液で染色する方法を指す。「2つ目の方法」とは前述の②に相当する。

Tamassiaが最初にヒトの血液を用いて実験していることから、TamassiaはCorinが各種動物の血液にtriacid染色を行う時に、対照としてヒトを調べなかったと予想したと考えられる。Tamassiaはtriacid染色液を繰り返し使用することで、ヒトにおいて好中性顆粒が検出されるようになったと記述しているが、Tamassiaはtriacid染色液がロットによって好中性を示さないことがあることを事前に知っ

しており, その原因がtriacid染色液に過剰に添加された酸性色素であると考えて, triacid染色液を繰り返し使用する実験を設定したのではないかと推察される。

Tamassia (1895)<sup>11)</sup>はTamassia (1894)<sup>10)</sup>の再録であり, 本文中に変更はない。しかし, 脚注にある引用文献の発行年が異なっている。すなわち, Tamassia (1894) のp272の脚注1では発行年が1891年であるのに対し, Tamassia (1895) では1881年になっている (p12左段脚注1)。また, Tamassia (1894) のp272の脚注2における発行年 (1893年) が, Tamassia (1895) では1883年になっている (p12左段脚注2)。Tamassia (1894) に記載された発行年が正しいのでTamassia (1895) の発行年は誤植と考えられる。

IlbergはTamassiaを引用しているが, Tamassiaはウシ, ブタ, ウサギ, ネコおよびサルで好中性顆粒を観察したとしており, ヒツジが挙げられていない。また, ヒトについても触れていない。

### Ilberg<sup>12)</sup>の記述に対する考察

Ilbergは子牛, ウシ, ヒツジ, イヌおよびウサギに, 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triacid染色を施して好中性顆粒を確認している (p25-26)。IlbergにもCorin<sup>9)</sup>やTamassia<sup>10,11)</sup>と同じ記述 (triacid染色液の作製法, 加熱条件) があることから (p23-24), 明記されてはいないが市販のtriacid染色液を使用したと思われる。Ilbergはヒト血液についてはtriacid染色を行っていない。

### Triacid染色液のロットによる染色性の違い

以上のCorin, TamassiaおよびIlbergの記述に対する考察から, 彼らはいずれも市販のtriacid染色液を使用したと考えられる。しかし, Corinがヒトを除く各種哺乳類を調べた時にはtriacid染色液で好中球に相当する顆粒性白血球の顆粒が好中性 (紫色) を示さず, その後に行ったヒト血液に対する実験時にはtriacid染色液でヒトの好中球が好中性を示した。しかし, Tamassiaが使用したtriacid染色液では, ヒトの好中球顆粒が最初は好中性を示さなかった。一方, Ilberg が使用したtriacid染色では各種哺乳類の好中球顆粒が好中性を示した (ヒトには実施していない)。Corin, TamassiaおよびIlbergはいずれも同じ加熱条件を採用しているので違いはtriacid染色液のロットだけである。

Corinにはヒトを除く各種哺乳類をtriacid染色液で調べた時の好中球に相当する顆粒性白血球の顆粒の色調の記述がない。また, Tamassiaが使用したtriacid染色によってヒトの好中球顆粒が好中性を示さなかった時の顆粒の色調

は不明である。Kanthack and Hardy (1894)<sup>13)</sup>はヒト, ウサギ, モルモット, マウスおよびラットの好中球顆粒がGrübler社製のtriacid染色液では酸性フクシンとオレンジGで染まったことから (実際の色調については書かれていない), 「好中性顆粒」と「好中球」という用語を廃止し, 「微細好酸性顆粒」と「微細顆粒性好酸性細胞」という名称を提唱している。また, May and Grünwald (1902)<sup>14)</sup>にはヒトの好中球顆粒がtriacid染色液で赤く染まると記述がある。おそらく, Corinがヒトを除く各種哺乳類のtriacid染色標本で観察した好中球に相当する顆粒性白血球の顆粒と, Tamassiaがtriacid染色によって最初にヒトの好中球顆粒に観察した顆粒の色調は酸性色素による色調であると推察される。May and Grünwald<sup>14)</sup>には使用したtriacid染色液の詳細は書かれていないが, 自作したとの記述がないので市販品を使用したと推察される。ただし, 発表年 (1902年) からMay and Grünwald<sup>14)</sup>が使用したtriacid染色液はEhrlich<sup>16)</sup>に書かれた作製法によるものではなくEhrlich and Lazarus (1898)<sup>4)</sup>にある処方にしたがって作製されたtriacid染色液かもしれない。

### 遊離した酸性色素を含むtriacid染色液の特徴

前項までに, 市販のtriacid染色液ではロットによっては本来好中性を示すはずの被染色物, 例えばヒトの好中球顆粒が, 好中性を意味する紫色には染まらずに, 酸性色素の色調を呈することを示した。本項ではこの現象が生じた理由について考察する。

Triacid染色液中の色素複合体は, イオン化した酸性色素と見なせる<sup>1)</sup>。したがって, triacid染色液中にイオン化した遊離の酸性色素が存在しても, 色素複合体と酸性色素は結合せずに共存できると推察される。ここで, 最も重要な現象を示す。それはTamassia<sup>10,11)</sup>がtriacid染色液を繰り返し使用することで, 好中性顆粒が検出されるようになったことである。もしも色素複合体と酸性色素が毎回の染色で顆粒に同等に結合するのであれば, 染色液を繰り返し使用した場合, 色素の消費によって顆粒の色の濃淡が変化すること, すなわち色が薄くなることはあっても, 色そのものに変化はないはずである。Triacid染色液を繰り返し使用することで, 好中性顆粒が検出されるようになったということは, triacid染色液中に遊離した酸性色素が過剰に混在し, 色素複合体よりも遊離の酸性色素の方が優先的に顆粒に結合することを意味すると考えられる。

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色素複合体は3種類あると考えられる<sup>1)</sup>。すなわち, メチ

ルグリーン1分子に対して、①酸性フクシン2分子が結合した複合体、②オレンジG 2分子が結合した複合体および③酸性フクシン1分子とオレンジG 1分子が結合した複合体が形成されると推察される。

まず、酸性フクシンとメチルグリーンからなる色素複合体と、この複合体の構成色素である酸性フクシンとの関係を考察する。なお、酸性フクシンには3つの酸性基と1つの塩基性基が存在するが<sup>1)</sup>、色素複合体の形成にこの塩基性基は関与しないと考えられている<sup>1)</sup>。色素複合体中の酸性フクシンにも塩基性基が1つ存在することから、以下の考察ではこの塩基性基を無視できると考えられる。色素複合体では、メチルグリーン1分子に存在する2つの塩基性基それぞれに、酸性フクシンの酸性基1つが結合していると推察される<sup>1)</sup>。酸性フクシンは酸性基を3つ有しているので<sup>1)</sup>、色素複合体では2つの酸性フクシンはそれぞれ2つの酸性基には何も結合していないことになる。このような酸性基を自由酸性基と呼ぶ<sup>1)</sup>。メチルグリーンと酸性フクシンからなる色素複合体には総体として自由酸性基が4つ存在する。一方、遊離の酸性フクシンの酸性基は自由酸性基と見なすことができ、酸性フクシン1分子に自由酸性基が3つあることになる。両者が被染色物に接近し、色素複合体よりも遊離の酸性フクシンが優先的に被染色物に結合する現象を説明するために、メチルグリーンと酸性フクシンからなる色素複合体には被染色物への結合部位が2つであると仮定する。すなわち、メチルグリーン1分子に結合した2分子の酸性フクシンのそれぞれが結合部位に相当すると考える。この場合、色素複合体の結合部位1つには自由酸性基が2つしかないこととなり、遊離の酸性フクシンの酸性基の数(3つ)よりも少ない。被染色物への結合の優先度の差は、色素複合体の総体としての自由酸性基の数ではなく、色素複合体が有する結合部位における自由酸性基の数と遊離した酸性色素のその違いによると考えられる。

オレンジGとメチルグリーンからなる色素複合体と、この複合体の構成色素であるオレンジGの関係を考察する。色素複合体はメチルグリーン1分子に対して2分子のオレンジGが結合していると考えられている<sup>1)</sup>。両色素は、メチルグリーン1分子に存在する2つの塩基性基それぞれに、オレンジGの酸性基1つが結合していると推察される<sup>1)</sup>。オレンジGは酸性基を2つ有しているので<sup>1)</sup>、色素複合体では2つのオレンジGはそれぞれ1つの酸性基には何も結合していないことになる。つまり、オレンジGとメチルグリーンからなる色素複合体には総体として自由酸性基が2つ存在

する。一方、遊離のオレンジGの酸性基は自由酸性基と見なすことができ、自由酸性基が2つあることになる。両者が被染色物に接近し、色素複合体よりも遊離のオレンジGが優先的に被染色物に結合する現象の説明のために、色素複合体には被染色物への結合部位が2つであると仮定する。すなわち、メチルグリーン1分子に結合した2分子のオレンジGのそれぞれが結合部位に相当すると考える。この場合、色素複合体の結合部位1つには自由酸性基が1つしかないこととなり、遊離のオレンジGの酸性基の数(2つ)よりも少ない。被染色物への結合の優先度の差は、色素複合体の総体としての自由酸性基の数ではなく、色素複合体が有する結合部位における自由酸性基の数と遊離した酸性色素のその違いによると考えられる。

次にメチルグリーンとオレンジGからなる色素複合体について考察する。この色素複合体では、メチルグリーン1分子とオレンジG 2分子がそれぞれの塩基性基と酸性基で結合し、2つの結合部位が形成されると思われる。遊離のオレンジGの酸性基(自由酸性基に相当)は2つであり、そのうち1つはメチルグリーンとの結合に使われるので、色素複合体における結合部位1つの自由酸性基は1つである(色素複合体の自由酸性基は総体として2つ)。遊離のオレンジGには2つの自由酸性基があるので、その数は色素複合体の結合部位1つの自由酸性基よりも多い。したがって、被染色物にメチルグリーンとオレンジGからなる色素複合体と遊離のオレンジGが接近した場合、上述のメチルグリーンと酸性フクシンからなる色素複合体と遊離の酸性フクシンとの関係と同様に、自由酸性基が多い遊離のオレンジGが優先的に結合すると考えられる。

被染色物への結合の優先度、すなわち優劣は自由酸性基の数の違いで説明できると考えられる。おそらく、メチルグリーンとオレンジGからなる色素複合体と遊離の酸性フクシンが混在した場合、この色素複合体の被染色物への結合部位1つの自由酸性基は1つであるのに対し、遊離の酸性フクシンの自由酸性基は3つあるので、被染色物は酸性フクシンと結合すると推察される。May and Grünwaldはヒトの好中球顆粒がtriacid染色液で赤く染まると報告している<sup>14)</sup>。赤色は酸性フクシンの色調であるので、May and Grünwald<sup>14)</sup>が使用したtriacid染色液には遊離の酸性フクシンが過剰に含まれていたと考えられる。一方、Kanthack and Hardyはヒト、ウサギ、モルモット、マウス、およびラットの好中球顆粒がtriacid染色液では酸性フクシンとオレンジGに染まったとしている<sup>13)</sup>。Kanthack and Hardy<sup>13)</sup>が使用したtriacid染色液には遊離の酸性フクシン

とオレンジGが含まれていたと推察される。

以上のことから, 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染色液の色素複合体は, 被染色物 (好中性物質) への結合部位を2つ有し, この色素複合体の構成要素である酸性色素が遊離状態で色素複合体と混在する場合, 遊離の酸性色素が優先的に被染色物に結合すると考えられた。また, 酸性色素の被染色物への優先的な結合は, 遊離した酸性色素の自由酸性基に相当する酸性基の数が色素複合体の結合部位における自由酸性基の数よりも多いことによると推察された。

## 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) Ehrlich P: Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Zeitschrift für Klinische Medizin*, **1**, 553-560 (1880) (in German)
- 4) Ehrlich P, Lazarus A (Mitverfasser): Die Anaemie: Normale und Pathologische Histologie des Blutes. Alfred Hölder, Wien (1898) (in German)
- 5) Romanowsky D: Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria. *St. Petersburger Medicinische Wochenschrift*, **16**, 297-302 + 307-315 (1891) (in German)
- 6) Pappenheim A: Eine panaptische Triazidfärbung. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, **27**, 798-799 (1901) (in German)
- 7) 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 (1879) (in German)
- 8) Ehrlich P: Ueber die Bedeutung der neutrophilen Körnung. *Charité-Annalen*, **12**, 288-295 (1887) (in German)
- 9) Corin G: Recherches sur le diagnostic du sang en médecine légale. *Annales de la Société Médico-Chirurgicale de Liège*, **32**, 282-289 (1893) (in French)
- 10) Tamassia A: Valore delle granulazioni neutrofile dei Globuli bianchi nella determinazione specifica del sangue. *Giornale di Medicina Legale*, **1**, 272-275 (1894) (in Italian)
- 11) Tamassia A: Valore delle granulazioni neutrofile dei Globuli bianchi nella determinazione specifica del sangue. *Gazzetta Medica Lombarda*, **54**, 12-13 (1895) (in Italian)
- 12) Ilberg F: Das Blut des Menschen und der Tiere in forensischer Beziehung, mit besonderer Berücksichtigung der neutrophilen Granulationen. Inaugural-Dissertation welche zur Erlangung der Doctorwürde in der Medicin und Chirurgir mit Zustimmung der medicinischen Facultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin (1895) (in German)
- 13) Kanthack AA, Hardy WB: The morphology and distribution of the wandering cells of mammalia. *The Journal of Physiology*, **17**, 81-119 + 1 plate (II) (1894)
- 14) May R, Grünwald L: Über Blutfärbungen. *Centralblatt für Innere Medizin*, **23**, 265-270 (1902) (in German)
- 15) Ehrlich P: Demonstration eines leukämischen Blutpräparates. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, **9**, 670-671 (1883) (in German)
- 16) Ehrlich P: Zur Kenntniss des acuten Milztumors. *Charité-Annalen*, **9**, 107-114 (1884) (in German)
- 17) Ehrlich P (Herausgeber): Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes (Gesammelte Mittheilungen). August Hirschwald, Berlin (1891) (in German)

## 遊離した酸性色素を含む triacid 染色液の特徴

近藤昌和, 安本信哉

**要旨:** Triacid染色は被染色物の好中性を証明する染色法であり, 好中性物質 (例えば好中性顆粒) を紫色に染める。しかし, triacid染色によって本来紫色を呈する好中性物質が, 時に triacid染色液の構成色素である酸性色素の色調を呈することが知られている。本研究ではその原因が triacid染色液中に存在する過剰な遊離の酸性色素であることを報告し, その染色モデルを考察した。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染色液中に形成される色素複合体は, 好中性物質への結合部位を2つ有し, 遊離の酸性色素が色素複合体と混在する場合, 酸性色素の好中性物質への優先的な結合は, 酸性色素の自由酸性基に相当する酸性基の数が色素複合体の結合部位における自由酸性基の数よりも多いことによると推察された。