Aus dem Anat. Inst. d. Mediz. Fakultät, Univ. Okayama
(Vorstand: Prof. M. SEKI).

Elektronenmikroskopie des Hämatoxylin während der Oxydation und der durch Heparinzusatz metachroma- tisch veränderten basischen Farbstoffe.

酸化中のヘマトキシリンとヘパリンにてメタクロマジーを
起した塩基性染料の電子鏡検.

Takuji ŌKURA 大倉卓治.

(Eingegangen am 27. März 1955.)

Vor kurzem haben ŌKURA und KŌYAMA (1950) mit Hilfe des Elektronenmikroskops die Größe der Moleküle und Teilchen von 7 verschiedenen Säurefarbstoffen bestimmt und berichtet, daß je geringer die Atomzahl der Farbstoffmoleküle, um so kleiner ihre Molekular- und Teilchengröße ist. Weiterhin hat ŌKURA (1952) 13 verschiedene basische Farbstoffe und den Lack des Hämatoxylin und des Carmins elektronenmikroskopisch untersucht und gefunden, daß ein ähnliches Verhältnis zwischen der Atomzahl und der Teilchengröße des Farbstoffmoleküls wie bei den Säurefarbstoffen bei gelben und roten basischen Farbstoffen zwar angenommen, bei violetten, blauen, grünen und braunen basischen Farbstoffen aber nicht angenommen werden kann, und daß die Teilchen des Hämatoxylin und Carmins bei der Lackbildung sich vergrößern. In vorliegender Arbeit hat derselbe Autor bisher noch nicht angestellte elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Veränderung des Hämatoxylin-
teilchens während der Oxydation und über 12 verschiedene basische Farbstoffe, welche durch Heparinzusatz metachromatisch verändert worden waren, durchgeführt.

I. Methode des Experimentes.

Eine in 10%igem Alkohol gelöste 1%ige Hämatoxylinlösung wurde 1 Tag, 1-, 3-, 5-, 9-, 12-, 16-, und 20 Monate nach ihrer Herstellung auf den Trägerfilm der Objektblende dünn aufgespritzt. Außerdem leitete man Bomben-Sauerstoff (500 cc pro Minute) 5-, 30-, und 90 Minuten lang zu 5 cc 1%iger Hämatoxylinlösung. Ein Tröpfchen der so behandelten Hämatoxylinlösungen wurde auf den anderen Trägerfilm ausgestrichen. Diese wurden unter völlig gleichen Bedingungen gleichzeitig ausgetrocknet und im Elektronenmikroskop bei 5.000facher Vergrößerung aufgenommen. Man vergrößerte die Bilder auf das 6fache und bestimmte die Größe der Hämatoxylinteilchen unter einem Mikroskop schwacher Vergrößerung.

Andererseits bereitete man eine 0.5%ige wässrige Lösung von Trypaflavin, Neutralrot, Pyronin, Safranin, Fuchsin, Dahlia, Thionin, Methylviolett, Toluidinblau, Methylenblau, Methylgrün und Victoriablau 4R gleichzeitig. Beim Victoriablau 4R verdünnte man eine 1%ige alkoholische Farblösung mit 10fachem destilliertem Wasser. Nach 48 Stunden wurde ein kleines Tröpfchen der Farblösung auf den Trägerfilm aufgespritzt. Daneben setzte man ein Tröpfchen (etwa 1/20 cc) von 0.01%igem Heparin zu 0.5 cc der einzelnen Farblösung zu und strich dann ein kleines Tröpfchen diesen Gemisches auf den anderen Trägerfilm aus. Die Teilchengröße wurde wie oben an den Elektronenbildern gemessen.

Es wurde ferner zu 0.5 cc dieser 0.1%igen wässrigen Farbstofflösungen ein kleines Tröpfchen (etwa 1/20 cc) von 0.01%iger Heparin-, 0.1%iger arabischer Gummi-, 0.1%iger gelber Blutlaugensalzlösung bzw. von Emulsion der Nabelstrangsubstanz eines 5 Monate alten menschlichen Embryos hinzugesetzt. Die letzt genannte Emulsion wurde so hergestellt, daß man zu 0.2 g der von der Amnionscheide und den Blutgefäßen befreiten Nabelstrangsubstanz 4 cc Wasser fügte. Man beobachtete die Farbenveränderung der Farbstofflösungen.

Ferner wurde die Diffusion der Hämatoxylinlösung in 0.5%iger Agar-gallerte und die der basischen Farbstofflösung in 10%iger Gelatinegallerte untersucht. Nach vollständiger Erstarrung der Agar- bzw. Gelatinelösung wurden nämlich die Farblösungen, die miteinander verglichen werden sollten, gleichzeitig auf die Gallerte übergeschichtet, 6 Stunden lang bei 20°C gehalten, um den Diffusionsweg zu messen. Zur Vermeidung jeweiligen Einflusses von Seiten der Ionen gebrauchte man keine Pufferlösung, sondern ließ das pH der Agar- und Gelatinegallerte mit Natronlauge auf 7.0 einstellen. Die Herstellungsfirma des Trypaflavins war SANKYO, die des Methylenblaus und Hämatoxylins MERCK und die aller übrigen GRÜBLER.

II. Ergebnisse und ihre Auswertung.

Sicherheitshalber wiederholte man die Beobachtung 4—5 mal. Die Resultate der Untersuchung sind in den Tabellen zusammengestellt, in welchen die Verteilung der Teilchengröße der Farbstoffe durch die Prozentzahl gezeigt ist. Tabelle 1 zeigt die Verteilung der Größe der Hämatoxylinteilchen in 1 Tag bis 20 Monate alter Lösung (vgl. Abb. 1), und Tabelle 2 die der Hämatoxylinlösung, zu welcher der Bomben-Sauerstoff 5—90 Minuten lang zugeleitet worden war (vgl. Abb. 2). Tabelle 3 stellt die Teilchengröße der wässrigen basischen Farbstofflösungen und derjenigen, zu welcher Heparin zugesetzt wurde, dar (vgl. Abb. 3—6), und Tabelle 4 gibt den durch den Zusatz von verschiedenen chromotropen Substanzen hervorgerufenen Farbenveränderung der basischen Farbstoff-

lösungen. Die Atomzahl und das Molekulargewicht der Farbstoffe, die zu der Tabelle 3 hinzugefügt sind, gehen auf ROWE (1924), SCHULTZ (1932) und MERCKs Index (1952) zurück. Da die molekulare Formel von Victoriablau 4R unbekannt ist, hat man dort die des Victoriablau R benutzt.

Tabelle 1. Größe und Zahl der Hämatoxylinteilchen in 1 Tag bis 20 Monate alten Farblösungen und ihr Diffusionsweg in der Agargallerte.

Zeit nach d. Herstellung	Farbe d. Lös.	Diffusion (mm)	Größe ($m\mu$) u. Zahl (%) d. Teilchen				
			10—15	16—20	21—25	26—30	31—35
1 Tag	gelb	12	63	21	5	1	10
1 Mon.	orange	11	48	28	16	4	4
3 Mon.	orange	10	53	32	10	5	—
5 Mon.	orangerot	9	62	14	17	7	—
7 Mon.	orangerot	9	60	29	11	—	—
9 Mon.	rötlichbraun	8	45	48	7	—	—
12 Mon.	rötlichbraun	8	21	43	18	18	—
16 Mon.	rötlichbraun	8	20	47	13	20	—
20 Mon.	rötlichbraun	6	9	42	32	12	5

Tabelle 2. Größe und Zahl der Hämatoxylinteilchen in der frisch bereiteten Farblösung, zu welcher der Bomben-Sauerstoff 5—90 Minuten lang zugeleitet wurde, und ihr Diffusionsweg in der Agargallerte.

Oxydierung	Farbe d. Lös.	Diffusion (mm)	Größe ($m\mu$) u. Zahl (%) d. Teilchen				
			10—15	16—20	21—25	26—30	31—35
0 Min.	gelb	13	32	29	16	9	14
5 Min.	orange	13	45	41	8	3	3
30 Min.	orangerot	13	15	38	12	19	16
90 Min.	rötlichbraun	13	25	33	16	19	7

Bei genauerem Studium der Tabellen 1 und 2 erregen folgende wichtige Tatsachen unsere Aufmerksamkeit. Je länger die Hämatoxylinlösung nach der Herstellung aufgehalten wird, umso mehr finden sich größere Moleküle und Teilchen von Hämatoxysin in der Lösung und umso kleiner wird ihre diffundierende Geschwindigkeit in der Agargallerte. Aus den Zahlen der Farbstoffteilchen speziell von 10—20 $m\mu$ Größe ergibt sich, daß in der Periode von 1 Tag bis 7 Monaten die Teilchen von 10—15 $m\mu$ Größe überwiegend sind und die von 16—20 $m\mu$ Größe spärlich. Dagegen

nehmen die Teilchen von 10—15 $m\mu$ Größe nach 9 bis 20 Monaten an Zahl ab, die von 16—20 $m\mu$ zu und ferner treten die noch größeren Teilchen von 21—30 $m\mu$ reichlich auf. Früher haben MÖLLENDORFF und TOMITA (1926), MIKAMI (1929) und SEKI (1933) berichtet, daß die Hämatoxylinlösung umso langsamer in der Agar- oder Gelatinegallerte diffundiert, je länger sie gehalten wird. Dabei hat SEKI noch bemerkt, daß das Hämatoxilin bei der Überführung in seine Oxydationsprodukte Hämatein und Oxyhämatein seine Löslichkeit vermindert. Die Resultate meines Diffusionsversuches decken sich mit denjenigen, die früher berichtet wurden, und die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt tatsächlich, daß die Dispersität der Hämatoxylinteilchen während des Oxydationsprozesses abnimmt. Wie man aus Tabelle 2 sieht, läßt sich die Oxydation der frisch hergestellten Hämatoxylinlösung durch die Zuleitung des Bomben-Sauerstoffes schnell beschleunigen, wobei die Farbe

Tabelle 3. Größe und Zahl der Farbstoffteilchen in den mit reinem Wasser bereiteten und in den durch Heparinzusatz metachromatisch veränderten basischen Farbstofflösungen und ihr Diffusionsweg in der Gelatinegallerte.

Farbstoffe	Farbe d. Lös.	Atom-zahl	Molekl. gewicht.	Diff. (mm)	Größe ($m\mu$) u. Zahl (%) d. Teilch.				
					10—20	21—30	31—40	41—50	51—60
Trypaflavin	gelb	34	256	3.0	95	5	—	—	—
Trypaflavin + Hep.	gelb	—	—	2.5	56	44	—	—	—
Neutralrot	rot	37	288	2.5	93	7	—	—	—
Neutralrot + Hep.	rotorange	—	—	2.0	76	24	—	—	—
Pyronin	saflorrot	40	302	2.5	92	7	1	—	—
Pyronin + Hep.	rot	—	—	2.5	90	9	1	—	—
Safranin	rot	44	350	2.5	75	25	—	—	—
Safranin + Hep.	orange	—	—	2.0	79	17	4	—	—
Fuchsin	saflorrot	50	361	2.0	87	13	—	—	—
Fuchsin + Hep.	rot	—	—	2.0	79	21	—	—	—
Dahlia	rotviolett	62	421	3.0	98	2	—	—	—
Dahlia + Hep.	violettrot	—	—	2.5	27	14	41	9	9
Thionin	blauviolett	27	263	2.5	64	27	9	—	—
Thionin + Hep.	rotviolett	—	—	2.0	33	58	9	—	—
Methylviolett	violett	56	393	3.0	37	50	13	—	—
Methylviolett + Hep.	rotviolett	—	—	2.5	39	48	9	4	—
Toluidinblau	blau	36	305	3.0	56	37	7	—	—
Toluidinblau + Hep.	rotviolett	—	—	1.5	27	46	25	2	—
Methylenblau	blau	39	373	3.0	17	50	33	—	—
Methylenblau + Hep.	dunkelblau	—	—	3.0	9	27	41	16	7
Victoriablau	blau	65?	457?	0.5	94	3	3	—	—
Victoriablau + Hep.	blauviolett	—	—	0.5	64	36	—	—	—
Methylgrün	grünlichblau	64	457	1.0	12	72	12	4	—
Methylgrün + Hep.	grünlichblau	—	—	1.0	22	57	14	7	—

Tabelle 4. Farbe der wässrigen Lösung der basischen Farbstoffe beim Zusatz von verschiedenen chromotropen Substanzen.

Farbstoffe	Wäss. Lös.	Zusatz von				
		Heparin	Agarlösung	Arab. Gummi	Nabelstrang-substanz	Gelbes Blutlaugesalz
Trypaflavin	gelb (+)	gelb (—)	gelb (±)	gelb (±)	gelb (+)	gelb (±)
Neutralrot	saflorrot	rotorange	rotorange	rotorange	orange	rotorange
Pyronin	saflorrot(+)	rot (+)	saflorrot(+)	saflorrot(+)	saflorrot(+)	saflorrot(+)
Safranin	rot	orange	orangerot	rot	rot	rot
Fuchsin	saflorrot	rot	saflorrot	saflorrot	saflorrot	saflorrot
Dahlia	rotviolett	violettrot	rotviolett	rotviolett	rotviolett	rotviolett
Thionin	blauviolett	rotviolett	rotviolett	violett	blauviolett	violett
Methylviolett	violett	rotviolett	rotviolett	violett	violett	violett
Toluidinblau	violettblau	rotviolett	dunkelblau	dunkelblau	dunkelblau	dunkeblau
Methylenblau	grünl. blau	dunkelblau	grünl. blau	dunkelblau	grünl. blau	grünl. blau
Victoriablau	blau	blauviolett	violett	violett	dunkelblau	violett
Methylgrün	grünl. blau	grünl. blau	grünl. blau	grünl. blau	grünl. blau	grünl. blau

Bemerkung: (+), (±) u. (—) zeigt die Intensität der Fluoreszenz.

der Lösung sich von gelb bis orange, orangerot, rötlich braun verschiebt. Trotzdem gibt es zwischen der frisch hergestellten und der so behandelten Hämatoxylinlösung keinen merkbareren Unterschied bezüglich der Teilchengröße und der diffundierenden Geschwindigkeit.

Aus der Tabelle 3 kann man die folgenden Tatsachen entnehmen. Abgesehen von Methylgrün, Fuchsin und Pyronin, deren Farbe sich kaum verändern, nehmen die von mir untersuchten basischen Farbstoffe, wenn man in ihre wässrige Lösung das Heparin zusetzt, an ihrer Molekular- oder Teilchengröße zu, die Reihenfolge steht aber in keiner Zusammenhang mit der ursprünglichen Teilchengröße, der Atomzahl und dem Molekulargewicht der Farbstoffe. Diese Reihenfolge ist: Dahlia > Methylenblau, Toluidinblau > Trypaflavin > Victoriablau, Thionin > Neutralrot > Methylviolett, Safranin. Dabei ist die Größe der Methylgrün-, Fuchsin- und Pyroninteilchen beinahe beständig geblieben. Die diffundierende Geschwindigkeit des Toluidinblaus in der Gelatinegallerte setzt sich durch den Heparinzusatz beträchtlich herab. Es folgen Trypaflavin, Safranin, Neutralrot, Methylviolett, Thionin, und Dahlia. Methylenblau, Victoriablau, Fuchsin, Methylgrün und Pyronin haben ihre Diffusibilität kaum verändert. Früher hat LISON (1935) berichtet, daß die Farbe der wässrigen Lösung von Safranin, Dahlia und Toluidinblau sich durch den Zusatz der chromotropen Substanz Galactan verändert und dabei das Absorptionsspektrum des Lichtes sich nach der geringen Wellenlänge verschiebt. MICHAELIS und GRANICK (1945) setzten ein Tröpfchen der Agarlösung,

LEVINE und SCHUBERT (1952) Kaliumsalz der Chondroitinschwefelsäure aus dem Nasenknorpel des Rindes zur wässrigen Lösung von Methylenblau und Toluidinblau und WEISSMAN u. a. (1952) Nukleinsäure zur wässrigen Lösung von Toluidinblau zu und nahmen eine ähnliche Verschiebung des Absorptionsspektrums des Lichtes wahr. Sie kamen zu der Ansicht, daß die dabei hervorgerufene Farbenveränderung der Lösung wahrscheinlich auf der Aggregation der Farbstoffmoleküle oder -teilchen beruht. Diese Folgerung wird aus den Ergebnisse meiner elektronenmikroskopischen und Diffusionsuntersuchung tatsächlich bewiesen. Wie man aus Tabelle 2 ersieht, ist die Stärke der Farbenveränderung durch den Zusatz der chromotropen Substanzen: Neutralrot > Toluidinblau, Victoriablau > Thionin > Methylenblau, Methylviolett > Trypaflavin, Safranin > Pyronin, Dahlia > Fuchsin > Methylgrün, wobei die Farbe der Lösung von Methylgrün sich kaum verändert. Vergleicht man schließlich Tabelle 3 mit Tabelle 4, so ergibt sich, daß die Farbe der wässrigen Lösung der basischen Farbstoffe, deren Molekular- und Teilchengröße beim Heparinzusatz beträchtlich zunimmt, durch die verschiedenen chromotropen Substanzen ziemlich leicht verändert wird.

III. Zusammenfassung.

Es wurden eine Hämatoxylinlösung, die nach der Herstellung 1 Tag bis 20 Monate lang aufgehalten wurde bzw. zu der 5 bis 90 Minuten lang der Bomben-Sauerstoff zugeleitet wurde, und 12 verschiedene basische Farbstofflösungen, welche durch Heparinzusatz metachromatisch verändert worden waren, auf Trägerfolien angetrocknet und im Elektronenmikroskop untersucht. Es wurde aber auch ihre Diffusionsgeschwindigkeit in der Agar- oder Gelatinegallerte bestimmt. Weiterhin wurden verschiedene chromotrope Substanzen zur wässrigen Lösung der basischen Farbstoffe zugesetzt, und die Veränderung der Farbe beobachtet.

1. Je länger die Hämatoxylinlösung nach der Herstellung aufgehalten wird, umso mehr finden sich größere Moleküle und Teilchen in ihr und umso kleiner wird ihre Diffusionsgeschwindigkeit in der Agargallerte, insbesondere gilt dies vom 9 Monate nach ihrer Herstellung.

2. Wenn man den Oxydationsprozess der Hämatoxylinlösung durch den Bomben-Sauerstoff beschleunigt, wird die Farbe von gelb bis orange, orangerot und rötlichbraun. Es gibt keinen merkbareren Unterschied an der Größe der Farbstoffteilchen und der Diffusionsgeschwindigkeit zwischen der frisch hergestellten und den so behandelten Lösungen.

3. Mit Ausnahme von Methylgrün, Fuchsin und Pyronin nehmen die Teilchen der hier untersuchten basischen Farbstoffe durch den Heparinzusatz an ihrer Größe zu. Die Reihenfolge der Vergrößerung ist: Dahlia > Methylenblau, Toluidinblau > Trypaflavin > Victoriablau, Thionin >

Neutralrot > Methylviolett, Safranin. Dabei bleibt die Größe der Methylgrün-, Fuchsin- und Pyroninteilchen beinahe unverändert.

4. Die Diffusionsgeschwindigkeit des Toluidinblaus in der Gelatine-gallerte setzte sich durch den Heparinzusatz beträchtlich herab. Es folgen Trypaflavin, Safranin, Neutralrot, Methylviolett, Thionin und Dahlia. Man sieht aber keine merkbare Verzögerung bei Methylenblau, Victoria-blau, Fuchsin, Methylgrün und Pyronin.

5. Die Reihenfolge des Farbenveränderung, die durch den Zusatz von Heparin, arabischem Gummi, Agarlösung, gelbem Blutlaugensalz und Emulsion der Nabelstrangsubstanz leichter hervorgerufen wird, stimmt beinahe mit derjenigen, nach welcher die Farbstoffteilchen sich beim Heparinzusatz vergrößern, überein: Neutralrot > Toluidinblau, Victoria-blau > Thionin > Methylenblau, Methylviolett > Trypaflavin, Safranin > Pyronin, Dahlia > Fuchsin > Methylgrün.

内 容 自 抄

ヘマトキシリン溶液内の分子と微粒子は調製後長く経過したものほど大径であり、寒天ゲル内の拡散が遅い。調製直後のヘマトキシリン溶液に酸素を5—90分通じて酸化を促進すれば、溶液の色調が黄より橙、橙赤、赤褐に変ずるが、ヘマトキシリン分子と微粒子の径と寒天ゲル内の拡散速度は調製直後のものと殆んど違わない。12種の塩基性染料溶液にヘパリンを加えると、メチール緑、フクシン、ピロニンを除き、ダーリヤ>メチレン青、トルイジン青>トリパフラビン>ビクトリヤ青、チオニン>中性赤>メチール紫、サフラニンの順に易く大径の染料分子または微粒子を生ずる。メチレン青、ビクトリヤ青、メチール緑、フクシン、ピロニンのほかはヘパリンの添加によりゲラチンゲル内の拡散速度を減ずる。種々のクロモトローブ物質にて易く変色する順は、中性赤>トルイジン青、ビクトリヤ青>チオニン>メチレン青、メチール紫>トリパフラビン、サフラニン>ピロニン、ダーリヤ>フクシンであり、そのうちメチール緑は殆んど変色しない。

Literatur.

Levine, A. a. M. Schubert: Metachromasy of thiazine dyes produced by chondroitin sulfate. *J. Amer. chem. Soc.* 74 (1952). — **Lison, L.**: Études sur la métachromasie; colorants métachromatiques et substance chromotropes. *Arch. biol.* 46 (1935). — **Mercks Index**. Rahway 1952. — **Michaelis, L. a. S. Granick**: Metachromasy of basic dyestuffs. *J. Amer. chem. Soc.* 67 (1945). — **Mikami, N.**: Physiko-chemische Bedeutung der Hämatoxylinreifung. (Jap.) Kaibo. Z. 4

(1929). — **Möllendorff, W. v. u. T. Tomita**: Durchtränkungs- und Niederschlagsfärbung bei der Beizenfarbstoffe. Z. Zellforsch. 3 (1926). — **Okura, T. u. Y. Kōyama**: Elektronenmikroskopie von Farbstoffen, die zur Messung der Strukturdichte der Gewebsteile verwandt werden. (Jap.) Arch. hist. jap. 1 (1950). — **Okura, T.**: Elektronenmikroskopie der verschiedenen basischen Farbstoffe. (Jap.) Arch. hist. jap. 4 (1952). — **Rowe, F. M.**: Colour Index. Bradford 1924. — **Schultz, G.**: Farbstofftabellen. Leipzig 1931. — **Seki, M.**: Zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung. IV. Okajimas Fol. 11 (1933). — **Weissman, N., Wm. H. Carnes, P. S. Bubin, a. J. Fischer**: Metachromasy of toluidin blue induced by nucleic acid. J. Amer. chem. Soc. 74 (1952).

Erklärung der Tafelabbildungen.

Tafel. 1. Elektronenbilder von getrockneten, 1 Tag bis 20 Monate alten Hämatoxylinlösungen. 30,000×.

Tafel. 2. Elektronenbilder der getrockneten, frisch hergestellten Hämatoxylinlösung und der kurz nach der Herstellung 5 bis 90 Minuten lang mit den Bomben-Sauerstoff geleiteten. 30,000×.

Tafel. 3—6. Elektronenbilder der getrockneten, wässrigen basischen Farbstofflösungen und der mit dem Heparin versetzten. 30,000×.

T. OKURA (1)

1. Tag

1. Mon.

3. Mon.

5. Mon.

7. Mon.

9. Mon.

12. Mon.

16. Mon.

20. Mon.

T. OKURA (2)

0. Min.

5. Min.

30. Min.

90. Min.

T. OKURA (3)

Trypaflavin

Trypaflavin +
Heparin

Neutralrot

Neutralrot +
Heparin

Pyronin

Pyronin +
Heparin

Safranin

Safranin +
Heparin

Fuchsin

Fuchsin +
Heparin

Dahlia

Dahlia +
Heparin

Thionin

Thionin +
Heparin

Methylviolett

Methylviolett +
Heparin

Toluidinblau

Toluidinblau +
Heparin

T. OKURA (6)

Methylenblau

Methylenblau +
Heparin

Victoriablau

Victoriablau +
Heparin

Methylgrün

Methylgrün +
Heparin