ヘマトキシリン代用色素としての合成塩基性色素 ガレイン (Gallein) およびピロカテコール・ヴァイ オレット (Pyrocatechol violet) について

獨協医科大学, 第一病理学教室, 病院病理部

山 田 喬 佐 藤 豊 彦

癌研究会附属病院, 細胞診断部

平 田 守 男

関東化学株式会社学術部

山 田 博

ヘマトキシリンは1865年 Böhmer により初めて一般に紹介され, 1880年代より細胞核染色に用いられている。この色素は中南米のみに産するカンペシア木 (*Hae-matoxylon campechianum*) から抽出される物質であり, 現在の所その合成は成功していないと聞く。従ってわが国では, 専ら輸入により入手している現状である。

しかるに最近その輸入が困難となり, 噂によれば, 原産地における気候の変化によりカンペシア木の大部分が枯れてしまったためであると云われる。もしそれが事実であるならば, このカンペシア木は豆科の木であるから, 再びヘマトキシリンを得るためには数年を経なければ入手不可能ということになる。たとえ今回の入手困難な理由が誤りであったとしても, 将来この種の事故は本当に起り得る可能性は否定できない。

そこで, このヘマトキシリンに代るべき色素で, しかもわが国において簡単に合成できる色素があれば, 上記のような事故に際して急場をしのげることができて便利である。

われわれはこのような理由に基づき, ヘマトキシリンと類似の染色機構を持つ物質を探してみた。その結果, 図1に示すような6種のキノイド環を有する物質中, ヘ

マトキシリンと類似の染色性を有する物質として, ガレイン (Gallein)⁵⁻⁷⁾ およびピロカテコール・ヴァイオレット (Pyrocatechol violet)⁸⁻¹¹⁾ が有用であることを発見したので報告したい。

図1 検索した物質

図2 ヘマトキシリンの製成過程

Two synthesized dyes, Gallein-aluminium and Pyrocatechol violet-aluminium, as substitutes for Hematoxylin.

Takashi YAMADA and Toyohiko SATO: Dept. of Path. and Lab. of Clin. Path., Dokkyo University School of Medicine.

Morio HIRATA: Dept. of Clin. Cytol., Cancer Institute Hospital.

Hiroshi YAMADA: Research Lab., Kanto Chemical Co. Inc.

図 3 Gallein-Papanicolaou 染色によるヒト子宮腺癌細胞 (×400)

図 4 図 3 と同一癌細胞の Papanicolaou (Hematoxylin 核染色) 細胞 (×400)

図 5 Gallein-Papanicolaou 染色によるヒト子宮腺癌細胞 (×1,000)

方法および結果

ヘマトキシリン色素は図 2 に示すように、ヘマトキシリンに過酸化水素を加えて酸化してヘマトインを作り、これに明礬を加えて、アルミニウムイオンとラックさせると発色して来る。従って分子構造のいずれかの位置にヘマトキシリンと類似のキノイド構造をもつ図 1 の各物質に明礬を加えた。いずれもすでに酸化された基を持っているからアルミニウムイオンと直ちにラックさせる意味で、これらの物質に 1:20* の割合にアンモニウム明礬を直接混合し、2~5% の水溶液を製作した。その結果、Gallein および Pyrocatechol violet は赤紫色および青紫色に発色したが、他の物質は発色しても赤ないし橙色に発色すると共に一部は沈澱物を形成し、ヘマトキシリンと類似の色を示さなかった。

そこで Gallein および Pyrocatechol violet についてのみ細胞染色性を検索したところ、両者は剥離細胞および組織切片的のいずれの細胞核および細胞膜を選択的に染色したが、特に前者は剥離細胞(パパニコラウ染色)

* Pyrocatechol のみは 1:25 に溶かした。

に、後者は組織切片によく染まり、いずれもヘマトキシリンの代用色素として充分に役に立つことを知った。現在までに得られた両染色色素の染色条件は次の通りである。

Gallein による染色法: この色素はライトグリーンによる細胞質染色と共に用いると核がよく染め出される。すなわちその染色色調はやや赤味をおびているために細胞質をエオジンで染めるとその対照が鮮やかでなく、ライトグリーンの色調とは対照的である。特に Walter-Reed 変法(OG-6, EA-50 の染色の間に 1% 酢酸アルコール、1% 隣タングステン、アルコールを使用)の Papanicolaou 染色のヘマトキシリンの代用として用いると良い。

Gallein は 10% 水溶液 (pH 3~4) を室温にて 5~6 分間染色 (40°C 位に加温すれば 2~3 分でよい)。Gallein 染色後は流水で少し長めに (10 分程度) 分別の方がよい。0.5% 塩酸による分別はその効果がはっきりする)。

組織切片を染める際は、通常のヘマトキシリン-エオジン染色に準じ、ヘマトキシリンの代りに 10% Gallein 水溶液を用い、少し染色時間を長くする。しかし組織片の細胞核は必ずしもきれいに染まらない。この Gallein の赤色調を改善する意味で、鉄およびアンチモン⁵⁾ をそれぞれ Gallein とラックさせて使用してみたが、その細胞染色は不良であった(図 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)。

Pyrocatechol violet による染色法: 青色調が強いので細胞質をエオジンで染めると対照的になる。2~5% 水溶液、5~15 分染色。若干濃いめに染めて分別の方がよい。染色直後は細胞核は茶褐色であるが流水中で分別するとやがて青紫色になる。(中性およびアルカリ性で発色)。この分別の程度が若干難かしいが慣れれば適当な条件を見出せる。初めは顕微鏡でみて分別発色をチェックしながら行なうと良い。多少細胞質に Pyrocatechol

図 6 Gallein-Papanicolaou 染色による腔塗抹細胞 (×200)

図 7 Gallein-Papanicolaou 染色によるマウス腹水癌細胞 (×400)

図 8 Gallein-Papanicolaou 染色によるマウス腹水癌細胞

図 9 Gallein-Eosin 染色によるヒト腎系球体 (組織片) (×200)

図 10 Pyrocatechol violet-Safranin 染色によるヒト未分化癌 (組織片) (×200)

図 11 Hematoxylin-Eosin 染色によるヒト未分化癌 (組織片) (×200) (図 6 と同一腫瘍)

violet が残る位 (すなわち多少共染する状態) の方が核が濃く染まる。

この色素を Papanicolaou 染色の核染色に用いると、必ずしも鮮明な核染色ができない。むしろ組織片染色に適しており細胞質をエオジンで赤く染めると対照的に核が染まる。しかし分別を長くすると多少共鮮明でなくなるが、核構造は良く見える (図 10, 11, 12)。

考 察

新しい代用色素を探す場合、そのもとの色素の染色機構と分子構造の類似物質を求めるのが、当然定道であろう。ここに報告した二つの色素も文字通り、この線に沿って見出されたものであり、従来のわれわれのヘマトキシリン染色機構についての一連の研究の成果の²⁻⁴⁾一部

図 12 Pyrocatechol-Eosin 染色によるヒト未分化癌（組織片）（×200）

として発見されたものである。

検索した物質は 6 種類であるが、ヘマトキシリンの染色機構と関係ある（すなわちアルミニウムイオンとラックを作る部分）キノイド環を有する物質を探し、金属イオンとラックさせた。検索物質 6 種のうち Pyrocatechol violet は最後にみつかった物質であり、Gallein の染色性を見出してから、これと類似の分子構造でキノイド環を有する物質として見出された。従って Gallein がもしみつからなければ Pyrocatechol もみつからなかったかもしれない。

Gallein も、Pyrocatechol violet もあらたに合成された物質でなく、市販の既成品である。しかし他の用途に用いられていたか、あるいは実用面では忘れ去られていた合成物質である。少なくとも生物試料の染色に用いられていたものではない。

Gallein は蕉性没食子酸と無水フタル酸から加熱下に合成されたもので、本邦において、その合成は可能であると云われる。Colour Index では Mordant violet 25 (bluish violet) と呼ばれるものである。かつては木綿等の線維染色に用いられていたようであるが、現在、その生産は工業化されていない。またアンチモンと定量的結合して発色するのでその定量の指示薬として用いられていたことがある⁵⁾。

Pyrocatechol violet はスルホフタレイン系の色素であり古くから微量の金属イオンや pH 測定のための指示薬として用いられている⁶⁾が、生物試料の染色剤として用いられたという報告はないと思われる。その合成は Gallein 程容易ではないが、本邦においても、その合成は可能であると云われる。いずれにしても両色素はあまり高価なものでないことは確かであり、その値段はこの物質合成の工業化の程度により多少左右される。

いずれもヘマトキシリンそのものよりも利点があるわ

けではない。しかし Gallein は細胞染色のための、Papanicolaou 染色過程中的ヘマトキシリンの代用に、Pyrocatechol violet は組織片染色のためのヘマトキシリン-エオジン染色過程中的ヘマトキシリンの代用に用いると良いと思われる。Gallein の細胞核細胞はかなりよく染りあまり欠点はないが、Pyrocatechol violet は細胞質を共染するので若干困った点である。従って染色後の分別にかなり工夫が必要であろう。濃く染めすぎると共染し、分別しすぎると核染色性が弱くなる。これを改良する意味で細胞質をサフラニンで染めるとより対照的に核が染め出されるが、全体としてはあまりきれいではない（図 7）。

結 論

ヘマトキシリンの代用染色色素としてガレイン (Gallein) およびピロカテコール・ヴァイオレット (Pyrocatechol violet) が役に立つことを見出した。ガレインの色調は赤紫色であるから、Papanicolaou 染色における剝離細胞の核染色に適している。ピロカテコール・ヴァイオレットは青紫色の色調を示すためにエオジンによる細胞質染色と併用すると良い。特に後者は組織切片の染色に適していると思われる。従って両者を上手に使いわけすれば、剝離細胞診のための細胞染色にも、また病組織診のための組織切片染色にこれらの色素が役に立ち、ヘマトキシリンのない急場をしるものと思われる。

Summary

To stain the nuclei in the cytologic specimen and the histologic section, two synthesized basic dyes, Gallein-aluminium and Pyrocatechol violet-aluminium, were found to be substituted for Hematoxylin. Since these dyes have also o-hydroxyquinoid ring in molecular structure and are lacked with aluminium, their staining mechanisms might presumably simulate the one of Hematoxylin.

文 献

- 1) Conn, H.J. : Biological Stains. Biotech. Pub. N.Y., 1953.
- 2) 山田 喬: 剝離細胞診断学—その臨床病理学的基础—文光堂, 東京, 1970.
- 3) 山田 喬, 天野 実: 細胞染色機構と細胞形態をめぐる諸問題—特にクロマチンの形態について—, 臨床検査, 15 : 1408~1418, 1971.

- 4) 山田 博, 丸山治子, 田村善蔵, 山田 喬: ヘマトキシリン染色液調製の改良と, その染色機構の解明, 日臨細会誌, 11: 281, 1972.
- 5) 内藤多喜夫: 有機アンチモン錯塩の研究 (第一報) Gallein とアンチモンとの錯塩並に Gallein によるアンチモンの検出, 日本薬学会誌, 58: 690~696, 1938.
- 6) Bucka: (内藤より引用) Ann. Chem. 209: 261~263, 1881.
- 7) Baeyer: (内藤より引用) Berichte. d. deutsch. Chem. Gesel. 4: 457, 1871.
- 8) 上野景平: キレート滴定法, 南江堂, 1961.
- 9) Ryba, O. et al.: (上野より引用) J. Chem. Listy 49: 1786, 1955. (チェコスロバキヤ)
- 10) Suk, V. & Malat, M.: (上野より引用), Chemist-Analyst. 45: 30, 1956. (チェコスロバキヤ)
- 11) Cifka, J. et al.: J. Chem. Lysty 50: 888, 1956.

追記: 本論文を投稿してから後に Lillie 等の報告を (Am. J. Clin. Path. 60, 817~819, 1973) 知った. 彼らもまた Gallein の核染色法を検索しているが, パパニコラウ染色の核染色に用いていないので, その利点を見出していない. 吾々もエオジンによる細胞質染色と共に用いると好ましくないことは本論でも指摘した所である.