

超生体染色所見から見た血球の細胞膜透過性に関する研究

第 1 編

各種色素の濾紙電気泳動と、それ等色素の正常家兎白血球、 網赤血球への超生体染色所見

岡山大学医学部病理学教室 (主任：妹尾左知丸教授)

大 口 基 光

〔昭和 31 年 9 月 13 日受稿〕

緒 言

Aschoff—清野¹⁾⁻⁴⁾の生体染色の研究以来生体染色⁵⁾⁻¹⁴⁾超生体染色の研究は日進月歩の進歩を見せ、その後 Sabin, 杉山その他¹⁵⁾⁻³⁴⁾によつて引きつがれ現在に至っている。一方色素を用いて細胞膜の透過性を分析しようとする試みは Jacobs³⁵⁾によつて数多の色素で検討されたのに始まり、幾多の業績が報告されている。Overton³⁶⁾は脂質親和性の色素がよく細胞に浸入する事実から、細胞膜はうすい脂肪層より成ると説き、一方 Ruhland³⁷⁾⁻⁴¹⁾は色素分子の直径と透過性の関係から細胞膜の透過性は蛋白の網目によつて規定されると説いた。以後 Höber⁴²⁾, Hertz⁴³⁾, Nirenstein⁴⁴⁾, Irwin⁴⁵⁾ 其の他⁴⁶⁾⁻⁶¹⁾によつて各種条件の分析、色素の検討、各種動植物に於ける観察がなされて来た。その他細胞膜透過性研究に対する色素の応用は極めて広く、酸やアルカリの透過性についての Indicator としても利用されている。例えば好適な色素を持つた動物⁶²⁾⁻⁶⁴⁾、植物⁶⁵⁾⁻⁷⁰⁾の細胞に就て、或は中性赤⁷¹⁾⁻⁷⁵⁾⁶²⁾等を利用してその変色度から細胞内 pH の変化が追及されている。これ等の実験から酸が原形質に侵入する時その溶液の pH が関係⁷⁰⁾⁷⁶⁾することも記載せられている。他方イオンの細胞膜透過性に関する研究は Gellhorn⁷⁷⁾⁷⁸⁾, Steinbach⁷⁹⁾, Danielli⁸⁰⁾ その他⁸¹⁾⁻⁸⁹⁾によつて行われており、これ等は全て細胞膜の性格の判定に役立つものである。

私は細胞膜の透過性を検する指標として各種色素を用い家兎血球の特殊超生体染色所見によつて媒液の pH と色素の透過性の関係を追及する一方佐竹⁹⁰⁾、佐野⁹¹⁾⁹²⁾、小林⁹³⁾等によつて紹介された濾紙電気泳動を利用して、pH の変化と色素の荷電状態の変化を合せ観察した。媒液の pH の変化と超生体染色との関係は杉山門下の橋⁹⁴⁾によつて手が付けられたが一定の結果が得られていない。この失敗は超生体染色に於ける時間的要素を無視した事に原因している。私は超生体染色によつて透過性の変化を追及するには時間と云う要素が結果を大きく左右する事を知り、之を一定に保つ工夫をこらして実験を進めた。この他超生体染色に当つては色素の濃度について Cameron⁹⁵⁾による色素濃度と毒性との研究、Michaelis⁹⁶⁾による色素濃度と重合との研究を参照した。

1) 溶液の pH の変化による色素の荷電状態の変化に就て

実験方法

色素の荷電状態の程度を観察するためには濾紙電気泳動法を利用した。定電圧装置は三重県立大学の河合和夫氏の製作せるもの及び小林式濾紙電気泳動装置(夏目製作所製)を用いた。濾紙は東洋濾紙50番(巾2cm, 長さ50cm)を用い、之等を予め測定される色素溶液と同じ pH をもつ McIlvaine⁹⁷⁾の緩衝液に浸して使用した。McIlvaine の緩衝液

は pH 2.2, 3.2, 4.0, 4.8, 5.6, 6.2, 7.0, 8.0 の 8 種を用い、尚酸性液として N/100 HCl, アルカリには N/40 NaOH を使用した。色素は之等の緩衝液に次に述べる様に一定の濃になるよう溶解し、これを濾紙の中心に置いて電気泳動を行つた。河合によつて作製せられた定電圧装置を用いた場合は 400 V, 1~3 mA, 1 時間泳動した。用いた色素は 0.5% ニール青, 0.5% 中性赤, 0.5% プリラントクレシール青 (但し以後 B. C. B. と略称する), 0.5% ヤーヌス緑, 1% メチール緑, 5% 酸性フクシン, 5% エリトロチン各緩衝溶液である。McIlvaine の緩衝液は pH の変化に応じてイオン量を調節する目的で次の如く稀釈して用いた (pH 2.2—原液, pH 4.0—4 倍稀釈液, pH 5.6—7 倍稀釈液, pH 6.2—8 倍稀釈液, pH 7.0—10 倍稀釈液, pH 8.0—16 倍稀釈液)。小林式濾紙電気泳動装置は 800 V, 4~8 mA で 2 時間電流を通じた。用いた色素は 0.5% メチレン青, 1/2 飽和ゲンチアナ紫, 0.5% ビスマルク褐, 1% アニリン青, 0.5% ホフマン紫, 1% メチール紫, 0.5% チオニン, 0.5% アズール I, 1% トリパン青, 2.5% エバンス青, 1% フロキシニン, 1% トルイチン青, 0.5% アズール II, 1% ポンソーフクシン, 0.1% ポンソーフクシン, 0.5% マラヒット緑, 1% ピロニン, 0.5% メチール赤, 0.5% インヂゴカルミン, 5% オランゲ G, 1% ヤーヌス緑+家兎血清, 1% 中性赤+家兎血清, 1% ニール青+家兎血清, 1% コンゴ赤, 0.5% クレシール紫, 0.5% クリスタル紫, 0.5% B. C. B., 2.5% エオジン, 1% ヤーヌス緑, 1% 中性赤, 1% ニール青各緩衝溶液である。この電気泳動装置を用いた時は McIlvaine 緩衝液は各 pH に於て次の如き稀釈液を用いた (pH 2.2—原液, pH 3.2—5 倍稀釈液, pH 4.0—7 倍稀釈液, pH 4.8—8 倍稀釈液, pH 5.6—9 倍稀釈液, pH 6.2—11 倍稀釈液, pH 7.0—12 倍稀釈液, pH 8.0—14 倍稀釈液)。

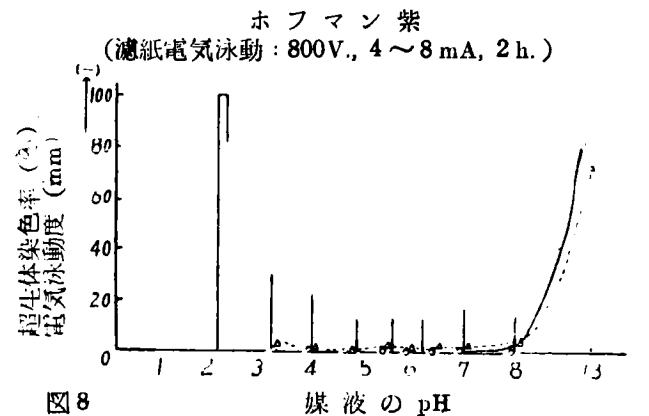
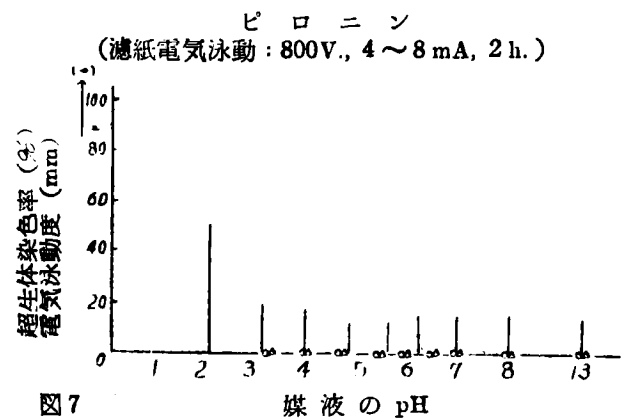
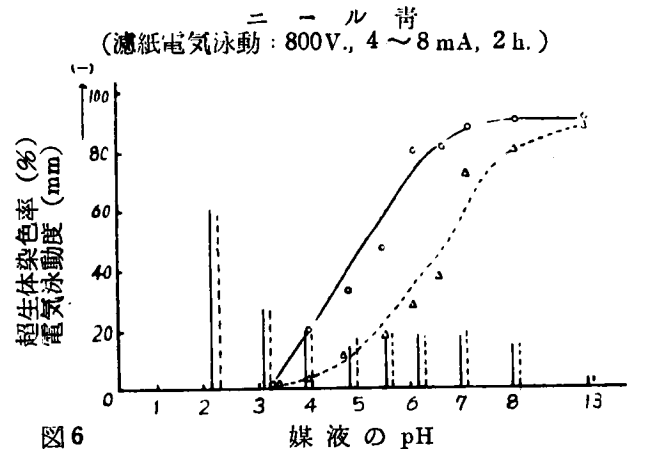
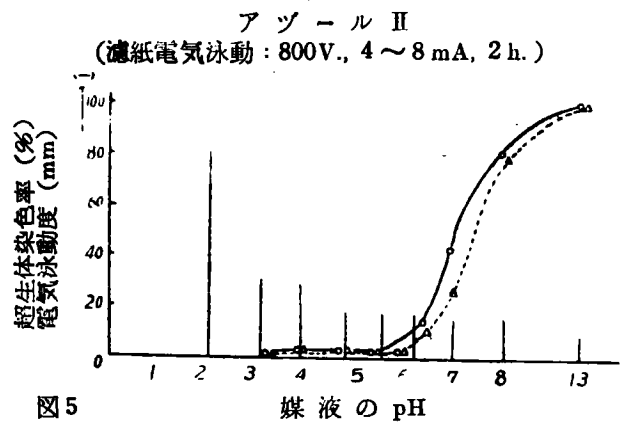
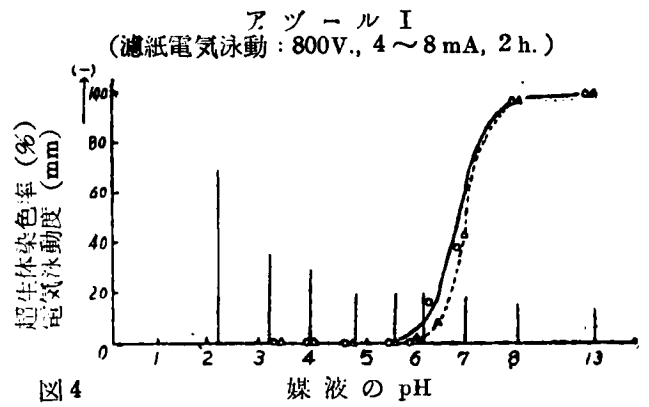
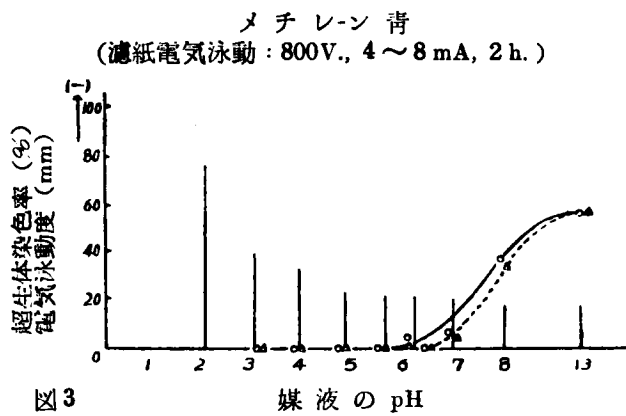
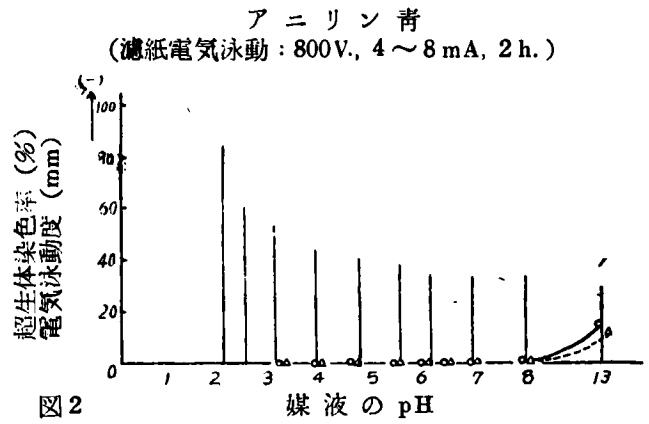
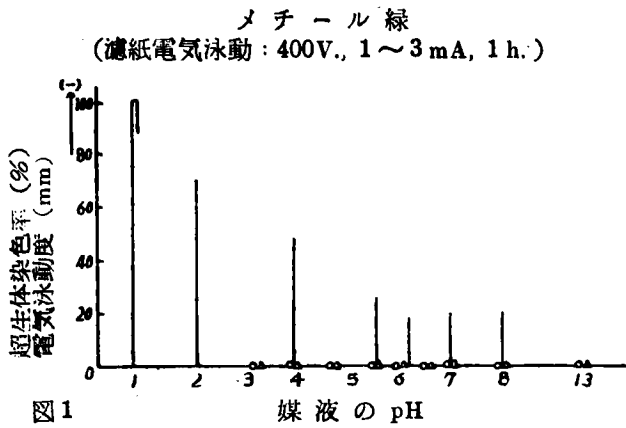
実 験 結 果

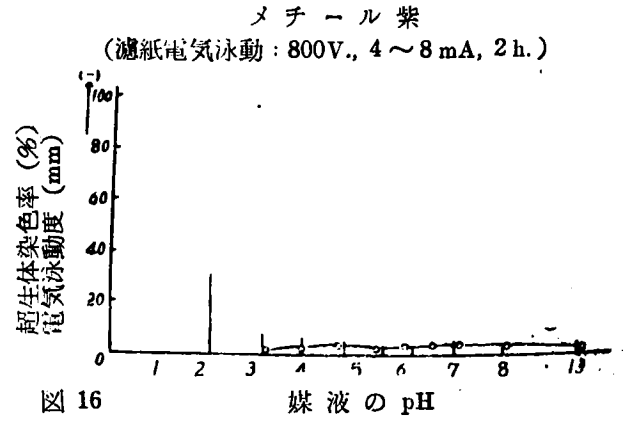
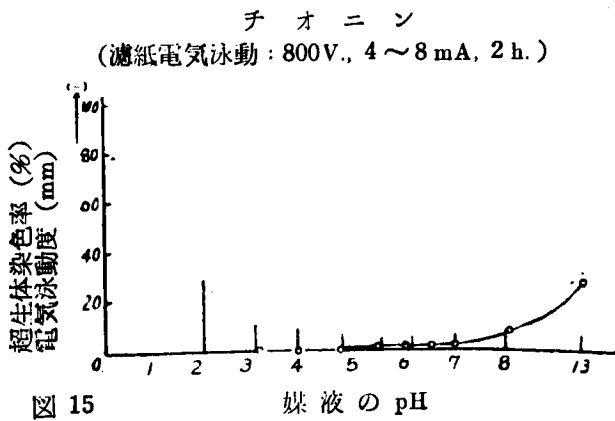
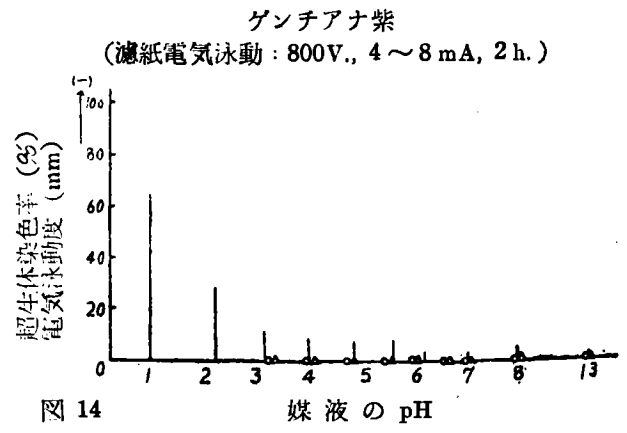
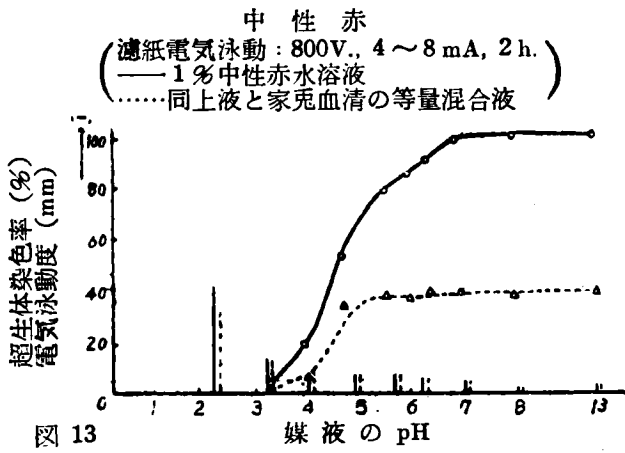
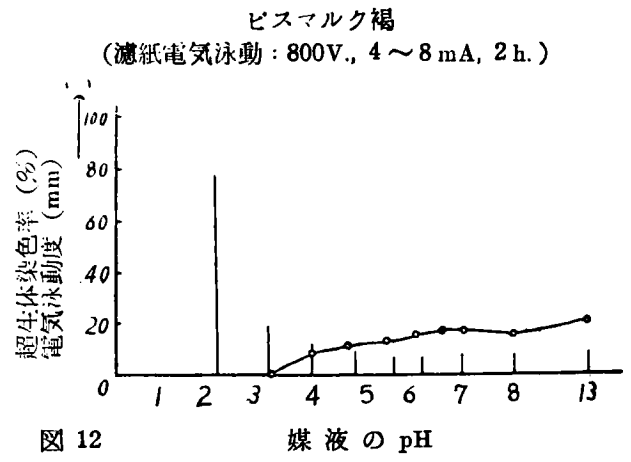
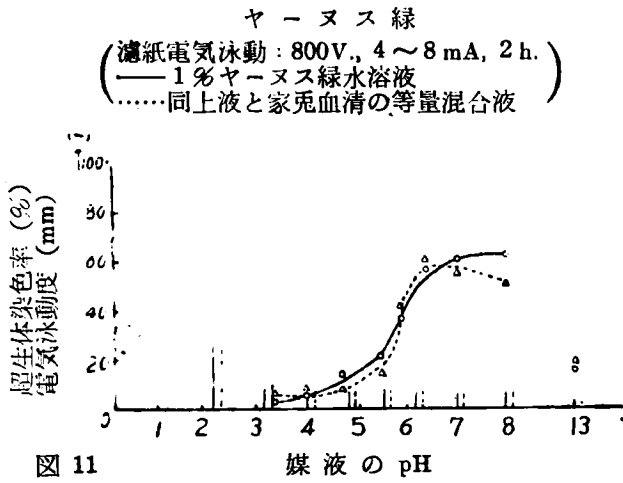
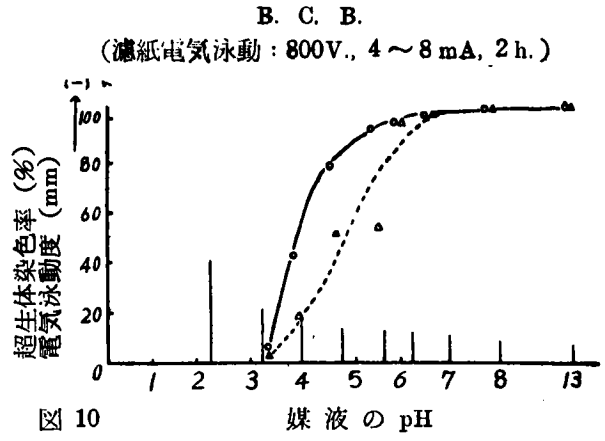
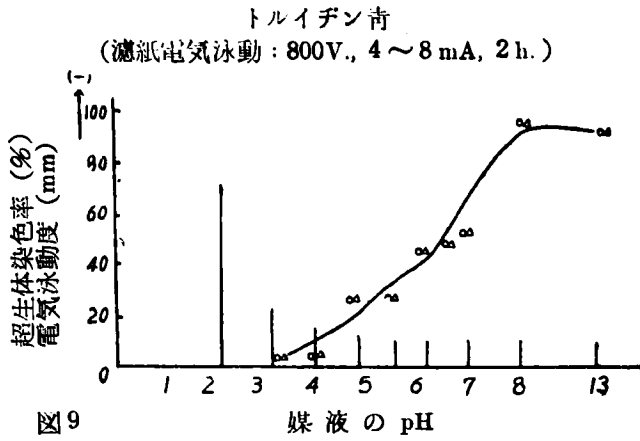
メチール緑, アニリン青, メチレン青, アズール I, アズール II, ニール青, ピロニン, ホフマン紫, トルイチン青, B. C. B., ヤーヌス緑, ビスマルク褐, 中性赤, ゲンチアナ紫, チオニン, メチール紫, クレシール紫, クリスタル紫等の塩基性色素はすべて (-) の電極に向つて泳動し, (+) の荷電を持つことを示すと共に酸性側に於て泳動度が著しく強く, 従つて荷電の強いことを示し, アルカリ側では殆んど泳動せず, その荷電が減少していることを示した。この関係は図 1~18 の棒グラフに示される。

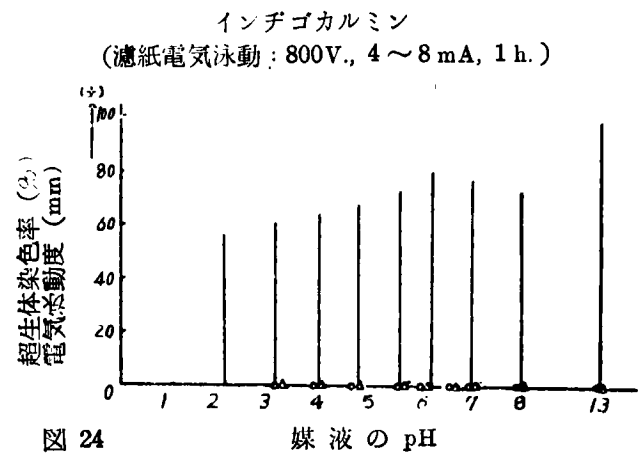
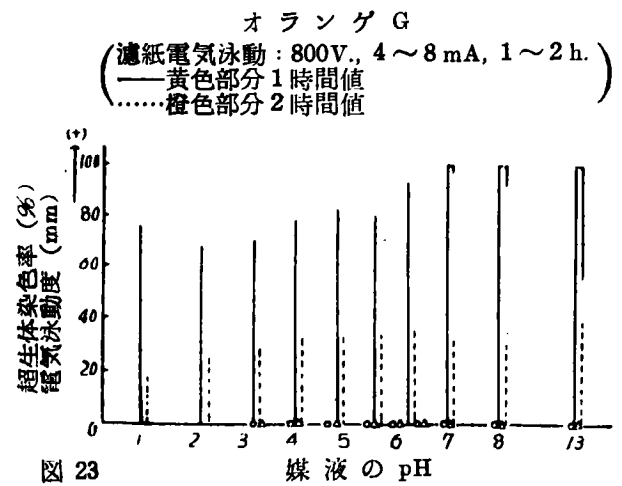
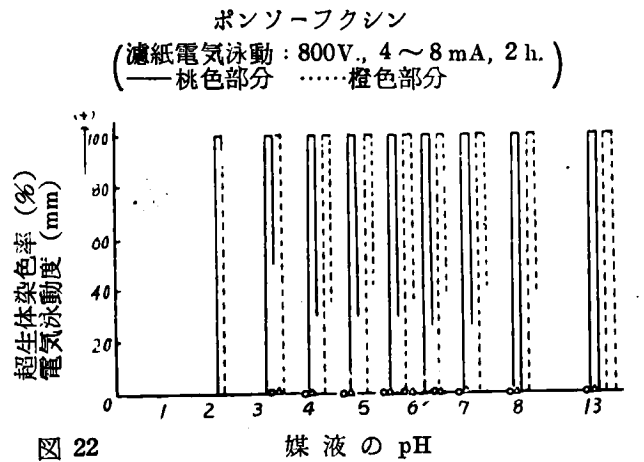
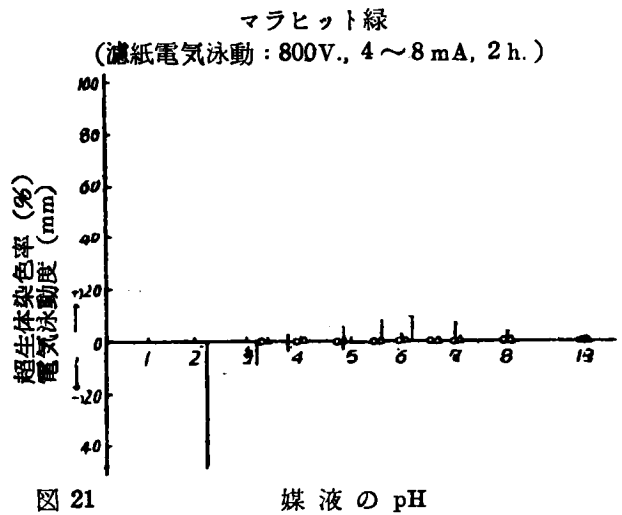
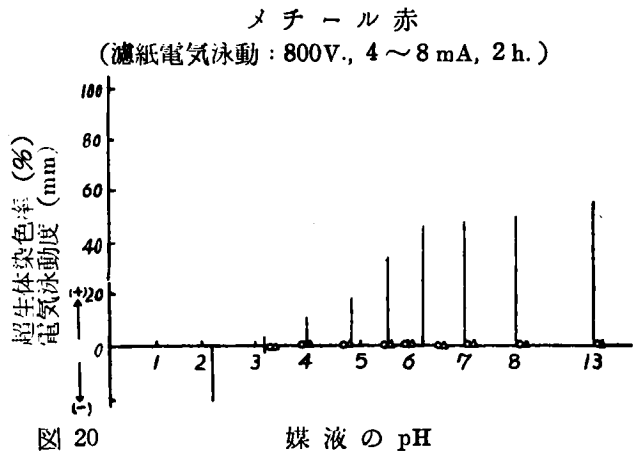
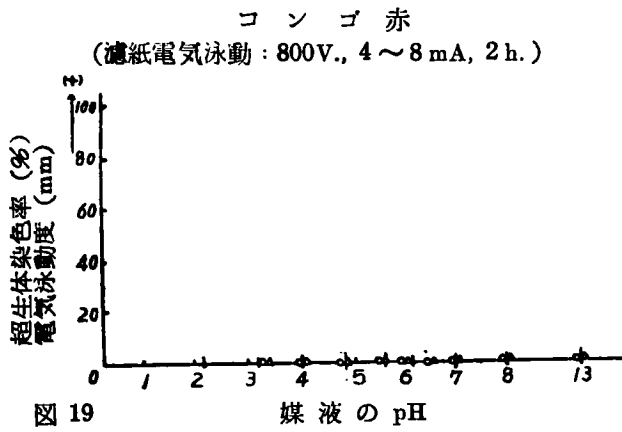
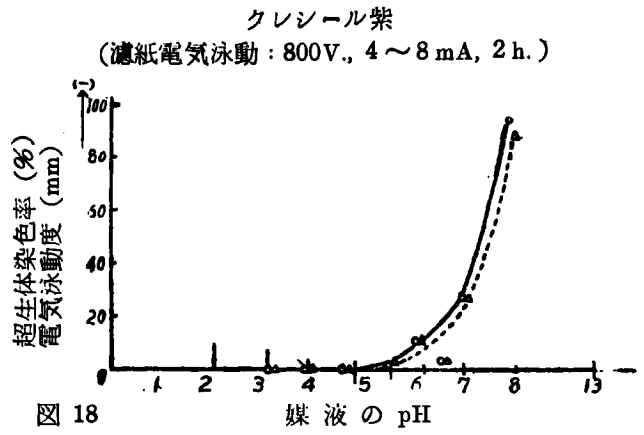
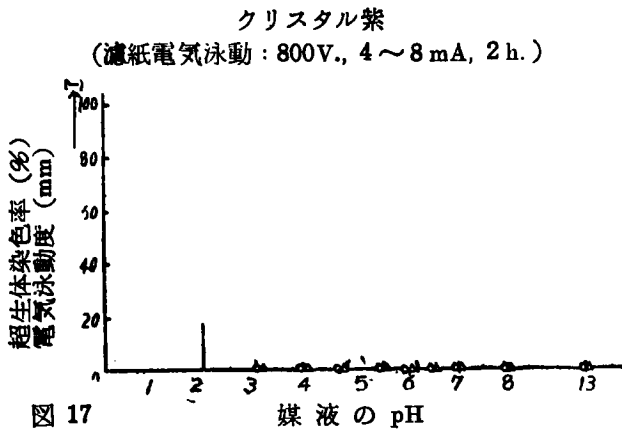
他方酸性色素ではその泳動像が数ケの群に分れる。即ち第 1 群は殆んど全 pH 域に於て全く泳動しない。コンゴ赤がそれである (図 19 の棒グラフ)。第 2 群はアルカリ側に於て (-) の荷電を持ち (+) の電極に向つて泳動し酸性側に於て (+) の荷電を持ち (-) の電極に向つて泳動するもの。マラヒット緑とメチール赤が之に属する (図 20, 21 の棒グラフ)。第 3 群はすべて (+) の電極に向つて色素が泳動し, その泳動度が pH の変化により著しい影響を受けないもの。これに属するものにはトリパン青, エバンス青, 酸性フクシン, オランゲ G, インヂゴカルミン及びポンソーフクシンがある (図 22~27 の棒グラフ)。之等の内最後の四つの色素は泳動度が著しく大きい。オランゲ G とポンソーフクシンは泳動時色調の異なる二つの色素に分れ, 各々その泳動度を異にするがその詳細は図 22, 23 に示される。第 4 群は酸性側に於て殆んど泳動せず, アルカリ側に於て極めて強い電気泳動を示す。これに属する色素はエリトロチン, エオジン及びフロキシニンである (図 28~30 の棒グラフ)。

以上の色素の電気泳動像を参照しつつ次の超生体染色実験に移つた。

図1~30 棒グラフは各種色素の濾紙上に於ける電気泳動度を示し、線グラフは同色素を以て超生染された白血球の百分率を示す。(○印：顆粒球、△印：リンパ球)







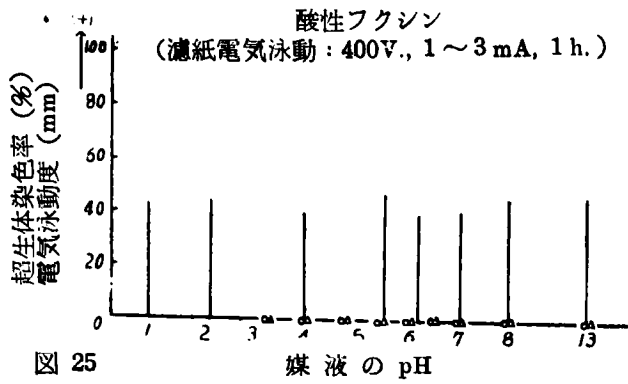


図 25

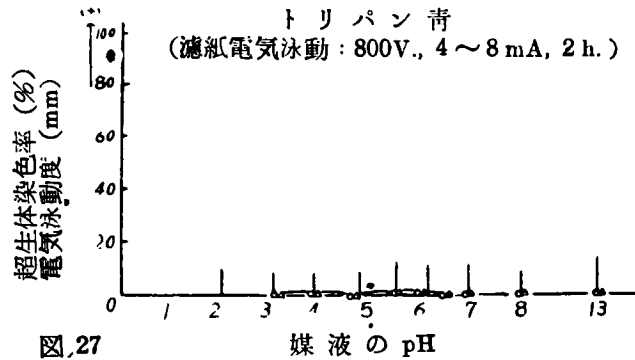


図 27

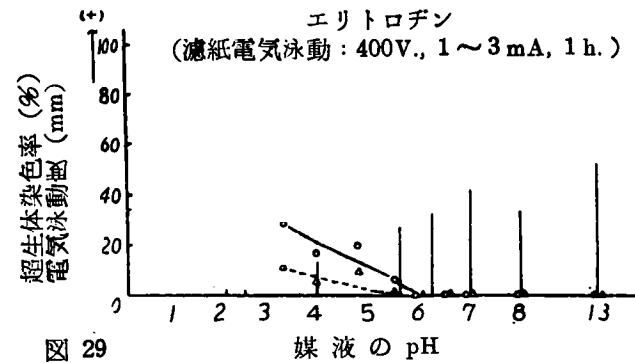


図 29

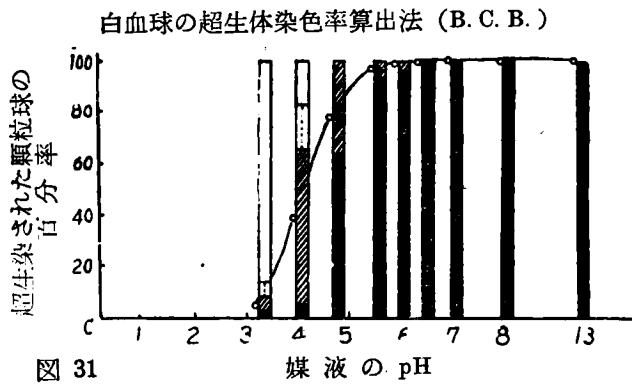


図 31

棒グラフの **■** は B. C. B. に依り強染の顆粒球の百分率を示し, **▨** は中等度染, **▤** は弱染, **□** は不染を夫々示す。
(○印 超生体染色率計算値)

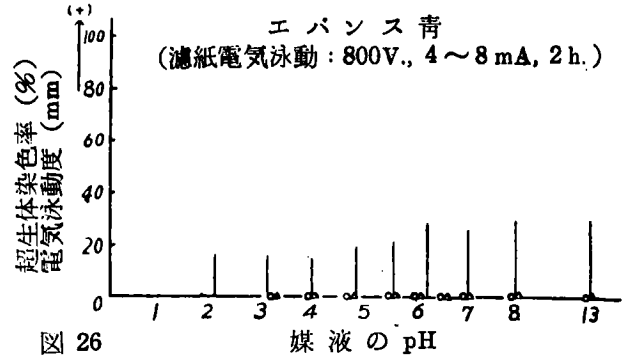


図 26

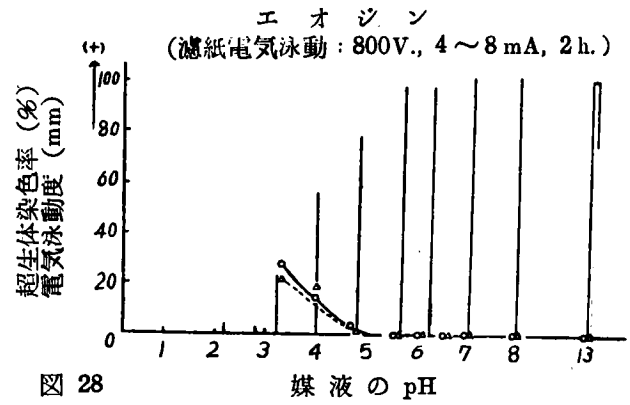


図 28

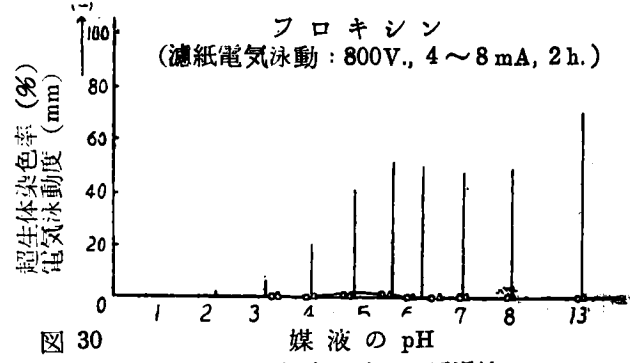


図 30

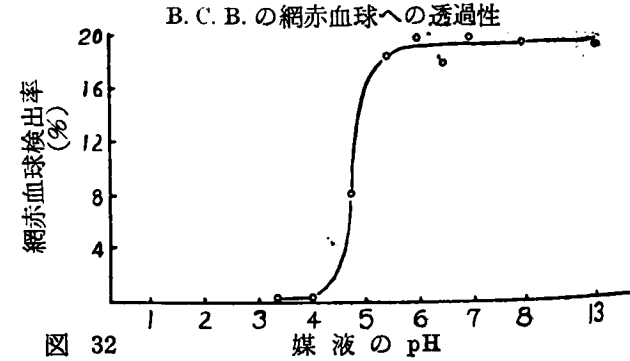


図 32

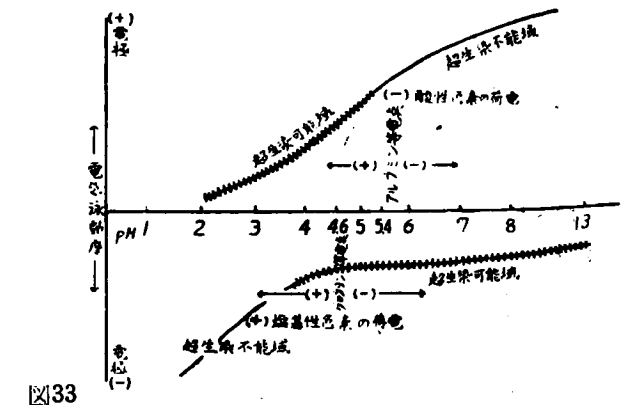


図 33

2) 各種色素による正常家兎顆粒球、 リンパ球の超生体染色所見

実験方法

色素：0.1% B. C. B., 0.1% エオジン, 0.1% 中性赤, 0.01% ニール青, 0.1% アズール II, 0.1% メチレン青, 0.1% アズール I, 0.1% チオニン, 0.1% ビスマルク褐, 0.1% ヤーヌス緑, 0.1% メチール紫, 0.1% マラヒット緑, 0.1% クレシール紫, 0.1% トリパン青, 0.1% フロキシシン, 0.1% ホフマン紫, 0.1% トルイヂン青, 0.5% エリトロチン, 0.01% アニリン青, 0.5% メチール赤, 1% ピロニン, 0.2% メチール緑, 0.1% ゲンチアナ紫, 0.1% インチゴカルミン, 0.1% 酸性フクシン, 0.1% コンゴ赤, 0.1% オランゲ G, 0.1% クリスタル紫, 0.1% エバンス青及び0.1% ポンソーフクシン各生理的食塩水溶液の30種を用いた。これ等の色素液10容に対して下記の如き各種 pH 値を示す McIlvaine の緩衝液或は N/10 NaOH 1容を加えて用いた。McIlvaine の緩衝液は pH 2.2, 3.2, 4.0, 4.8, 5.6, 6.2, 7.0, 8.0 の8種を用いた。

家兎血液：耳静脈より採取，即ち耳の毛を剃り70%アルコールにて消毒，アルコール乾燥後注射針を以て小静脈を突き溢す血液を0.1ccのメスピペットを用いて採取，別に緩衝された色素液を同容のメスピペットを以て採取血液の9倍量とり，両者を室温(20°C)で速に混和1分後，予め孵卵器中で50°Cに暖ためておいた載物ガラスに塗抹，風を送つて極めて迅速に乾燥させた。この塗抹標本は固定する事なく位相差顕微鏡油浸レンズDH. DMにて観察⁹⁸⁾，個々の細胞に就て夫々の血球種を見定めた後直ちに絞り零に廻して，その染色度を観察した。染色度の判定にはその程度に応じて4種を区別し，著しく強く染色せられるものを強染(++)，程度は強くないが明らかに染色されているものを中等度染(+)，辛うじて染色されていると識別出来るものを弱染(±)，全く染っていないもの

を不染(-)とし，強染細胞の百分率×1，中等度染の百分率×1/2，弱染の百分率×1/4，不染の百分率×0の総和を各pH値に於ける超生体染色率(%)とし，これに基づいて染色度曲線をつくつた。この関係はB. C. B.に例を取つて図31の線グラフと棒グラフに示される。因みにオリンパス製顕微分光測光装置により1360Åの線を用いて染色細胞全体の吸光率を測定すれば(++):(+):(±):(-)=(0.36~0.28, 平均0.304):(0.25~0.14, 平均0.188):(0.14~0.04, 平均0.087):(0)であつた。尚緩衝された色素液は血液と上記の割合で混合する場合に可成のpHの変動を来すので混合液のpHは別に色素液と血液とを同じ割合で混合したものに就て一々ガラス電極によりそのpHを測定した。

実験結果

1) 塩基性色素による正常家兎顆粒球及びリンパ球の超生染所見：a) メチレン青は pH 7.0 に於て僅かに，8.0, 13.0 に於て好染する。b) アズール I は pH 6.5 に於て僅かに，pH 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染する。c) アズール II は pH 4.0, 4.7, 5.5, 6.0 で極めて僅かに，pH 6.5 に於て僅かに，pH 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染する。d) ニール青は顆粒球を pH 4.0 に於て僅かに，pH 4.7, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染し，リンパ球を pH 4.0, 4.7, 5.5 で僅かに，pH 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染する。e) トルイヂン青は pH 4.7, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染する。f) B. C. B. は顆粒球を pH 4.0, 4.7, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染し，リンパ球を pH 4.0 に於て僅かに，pH 4.7, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染する。g) ヤーヌス緑は pH 4.7, 5.5 に於て僅かに，pH 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染する。h) 中性赤は pH 4.0 に於て僅かに，pH 4.7, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染する。i) クレシール紫は pH 6.0, 6.5 に於て僅かに，pH 7.0, 8.0, 13.0 に於て好染する。j) メチール緑は顆粒

球、淋巴球共に全 pH 域に於て不染である。
 k) アニン青は pH 3.3~8.0 で不染, pH 13.0 で僅かに染める。l) ピロニンは顆粒球及び淋巴球を全 pH 域に於て全く染めない。
 m) ホフマン紫は顆粒球を pH 13.0 に於てのみ好染し, 他の pH 域にて不染, 淋巴球は pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 に於て極めて僅かに染め pH 13.0 に於てのみ好染する。
 n) ビスマルク褐は顆粒球を pH 4.0, 4.7, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 13.0 に於て僅かに染める。o) ゲンチアナ紫は顆粒球及び淋巴球を全 pH 域に於て染めない。p) チオニンは顆粒球を pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 で極めて僅かに染め, 13.0 に於て僅かに染める。q) メチール紫は顆粒球を pH 4.0, 4.7, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 に於て極めて僅かに染める。r) クリスタル紫は顆粒球及び淋巴球を全 pH 域に於て染めない。

以上の様な方法で塩基性色素が顆粒球、淋巴球を超生染した場合の像を観察するに大部分の色素は原形質に入つて顆粒状の形態を取り、位相差顕微鏡による観察からすれば色素顆粒は原形質内顆粒に一致するがこの他に各色素が大きい顆粒として染められるもの、更に顆粒以外の部分を瀰漫性に染めているもの等を見る。

2) 酸性色素による超生体染色所見: a) コongo赤は 1.0~13.0 に至る全 pH 域に於て全く不染。b) メチール赤とマラヒット緑も全 pH 域に於て全く不染。c) ポンソーフクシン, インチゴカルミン, オランゲ G, 酸性フクシン, エバンス青及びトリパン青も又全 pH 域に於て全く不染。d) フロキシンは pH 4.7, 5.5 に於て極めて僅かに染まり, エオジンは pH 3.3, 4.0 で僅かに染まり, エリトロチンは pH 3.3, 4.0, 4.7 で僅かに染る。

以上の実験結果によれば前記術式により明瞭に生染可能な酸性色素はエオジンとエリトロチンのみである。これ等の酸性色素による超生体染色像は塩基性色素の場合と違つて常に瀰漫性に原形質を染色し、唯少数の色素顆粒がこの中に散見されるのみである。このよ

うな所見は古く Möllendorff⁹⁹⁾-¹⁰⁵⁾ や Schlemann¹⁰⁶⁾ の観察と類似している(細胞の種類と術式に於て著者の場合と異なるが)。この酸性色素顆粒はミトコンドリアその他の原形質内顆粒と多少の関係を持つている様である。例えば野手²⁹⁾³⁰⁾ がアヅール・エオジン液, 中性赤・メチール紫液, エリトロチン・トリパン青液, 中性赤・トリパン青液その他の塩基性-酸性色素混合液を用いて血液細胞(顆粒球, 単球)の超生染を行つた結果によれば, 混合液による染色の場合は先ず塩基性色素により顆粒状超生体染色が発現し一定時間後褪色若くは脱色し, 然る後酸性色素によつて再び同一顆粒が染色されると述べている。

本実験に用いた30種の色素の超生体染色率は線グラフとして図1乃至30の同色素濾紙電気泳動所見の棒グラフと対比して示される。即ち図により明かな様に酸性及び塩基性色素の何れに於ても色素の荷電の減少する pH 域に於て細胞の染色性は強くなり, 酸性色素は低い pH 域で, 塩基性色素はより高い pH 域で細胞内に侵入する。

3) 網赤血球に対する B. C. B. の超生体染色所見

実験方法

網赤血球(RC)の観察には体重2kgの瀉血家兎(1回20ccの瀉血を2日毎に6回, RCの数は20%に至る)の耳静脈より採血, 白血球の場合と同様にして緩衝された色素液と混じり RCの数を算定した。この場合色素は0.1% B. C. B. 生理的食塩水溶液である。

実験結果

pH 3.3 及び 4.0 で RC 不染, pH 4.7 で 8.5%, pH 5.5 で 18.5%, pH 6.0 で 19.5%, pH 6.5 で 17.5%, pH 7.0 で 19.5%, pH 8.0 で 19%, pH 13.0 で 18.5% の割合に RC が検出された。即ち pH 4.7 でその約半数を, 5.5 以上では全 RC が染色された(図32)。

4) 色素の各種溶媒への溶解度

実験方法

1系列を29本の試験管とし, 4系列作り,

第1系列の各試験管に蒸溜水 5cc を容れる。順次第2系列には無水アルコール、第3系列にはエーテルアルコール（エーテル5・アルコール1）、第4系列にはエーテル各々5ccを容れる。色素は上述の実験に用いた29種を1鋭匙（大約0.05g）投入する。投入後試験管を数回振盪し、室温に2時間放置後、溶液の

色調の濃淡を肉眼で判じ、その最も易溶なるものから易溶、難溶、不溶なるものへと卍、卍、+、±、-の記号で表わした。

実験結果

溶解度判定の結果は各溶媒別に表1に表示したから記述は省略する。

表 1

塩基性色素	溶媒	溶解度				荷電 (清野に依る)	分子 量	膜透過性				
		水	アルコール	アルコール 5:1	エーテル			色素液の % 水	セルローズ カツスイングス			
									水	生理的食塩水 pH8.0 pH2.2		
メチール緑 (グルーベル)	卍	卍	卍	一	+	458.462	2	卍				
アニリン青 (片山)	卍	卍	卍	一		737.718	1	卍	卍	卍	卍	
メチレン青 (島田幾)	卍 3.55	± 1.48	±	一	+	319.845						
アズールI (武田)	卍	+	+	一								
アズールII (陸軍衛生材料廠)	卍	+	+	一								
ニール青 (バイエル)	卍	卍	卍	+	+	443.	2	卍	卍	卍	卍	
ピロニン (メルク)	卍	+	+	一	+	302.795?	2	卍	卍	卍	卍	
ホフマン紫 (メルク)	卍	卍	卍	一		421.997						
トルイチン青 (グルーベル)	卍 3.82	卍 0.57	卍	±		305.819	2	卍	卍	卍	卍	
ブリラントクレシール青(メルク)	卍	卍	卍	±	+	317.811						
ヤースス緑 (グルーベル)	卍 5.18	卍 1.12	卍	±	+	511.053	2	+				
ビスマルク褐 (石津)	卍	+	+	±	+	419.318	1	+				
中性赤 (グルーベル)	卍 5.62	卍 2.45	卍	一	+	288.775	2	卍	卍	卍	卍	
ゲンチアナ紫 (ナカライ)	卍	卍	卍	一	+		2	+				
チオニン (メルク)	+	0.25	卍 0.25	卍	一	263.741	1	±				
メチール紫 (片山)	卍 2.93	卍15.21	卍	一		393.	1	+				
クリスタル紫 (片山)	± 2.93?	±15.21?	±	一	+	407.971						
クレシール紫 (グルーベル)	卍 0.38	+	+	一		339.815	1	卍				
酸性色素												
コンゴ赤 (メルク)	卍	卍 0.19	+	±	一	696.658	2	一	一	一	一	
メチール赤 (武田)	±	卍	+	+		269.294						
マラヒット緑 (片山)	± 50.9	卍 9.02	卍	一	+, -	364.903						
フロキシソ (石津)	卍	卍	+	±		760.804						
エオジン (武田)	卍 44.20	卍 2.18	卍	±	一	691.906						
エリトロチン (グルーベル)	卍 11.10	卍 1.87	卍	±	一	628.098	1	+				
インヂゴカルミン (石津)	卍	卍	±	一		466.354						
オレンジ G (グルーベル)	卍 10.86	卍 0.22	±	±	一	452.730						
酸性フクシン (片山)	卍	卍	一	一		585.534						
エバンス青(イーストマンコダック)	卍	+	一	一		960.808						
トリパン青 (メルク)	卍	卍	一	一	一	960.808	2	一				

5) 色素のセロファン膜及びセルローズカッシングス膜透過性実験

実験方法

セロファン膜は市販のものを、Cellulose Casings 膜は The Visking Corporation, Chicago, Illinois, U. S. A. のものを用いた。色素はメチール緑、アニリン青、ニール青、ピロニン、トルイチン青、ヤーヌス緑、ピスマルク褐、中性赤、ゲンチアナ紫、チオニン、メチール紫、クレシール紫、コンゴ赤、エリトロチン、トリパン青の15種を用いた。これ等の色素を1或いは2%の割合に蒸留水乃至生理的食塩水(但し後者は McIlvaine の緩衝液によつて pH 2.2 或いは pH 8.0 に調整されている)に溶解し、その5ccをセロファン膜或いはセルローズカッシングス膜に容れ、ベッヘル内に容れた夫々対応する溶媒の中に吊す。室温にて2時間放置後ベッヘル内溶媒への色素の移行の程度を、その色調の濃淡から判じ、最も濃いものから全く色素の移行せぬものへとⅡ, +, ±, -の記号で表わした。

実験結果

透過性判定の結果は各溶媒別に表1に表示し、該色素の分子量と対比してあるから記述は省略する。

考 按

色素の濾紙電気泳動像と顆粒球、淋巴球への超生体染色率曲線との関係について考察して見るに、塩基性色素に就ては媒質のpHが高くなるに従つて色素の電気泳動度が減じ、之と共に細胞内への透過性が充進し超生染率曲線が上昇する。即ち色素の荷電がある程度減少した場合に極めてよく超生染される様になる。逆にpHが低下して来ると色素の荷電が増して行くが之と共に色素の細胞内への浸入が阻止され超生染率曲線は急激なカーブを示して下降し、最後には殆んど超生染不能の像を呈して来る。この様な一般的な所見から明

らかな様に色素の荷電の低下はその細胞内浸入を助ける。今著者の使用した色素をその荷電の強いものから弱いものへ(pH 4~7)順序を追つてならべて見ると、メチール緑→アニリン青→メチレン青→アズールI→アズールII→ニール青→ピロニン→ホフマン紫→トルイチン青→B.C.B.→ヤーヌス緑→ピスマルク褐→中性赤→ゲンチアナ紫→チオニン→メチール紫→クリスタル紫→クレシール紫の順である。この様な順序を念頭において各色素の超生染所見を観察するに最も大きな電気泳動度を呈し、強い荷電を持つているメチール緑、アニリン青は超生染不能である。次に中等度の泳動を示すメチレン青、アズールI及びII、ニール青、ホフマン紫、トルイチン青、B.C.B.、ヤーヌス緑、ピスマルク褐、中性赤等は何れも可成な細胞膜透過性を示し、従来超生染に用いられて来た色素はこの中に属している。

次に泳動度が少い色素に就て見るにゲンチアナ紫、チオニン、メチール紫、クリスタル紫等がある。之等は上記中等度の荷電を有するものに比して著しく超生染性が落ちる。この現象は細胞膜の性格によるものか又色素の分子量その他に関係があるか俄に断じがたいが、荷電の減少により色素重合による粗大粒子の形成(Trim & Alexander)が関係しているのではないかと考えられる。例えばゲンチアナ紫、チオニン、メチール紫は分子量小なるに拘らず表1に示す如く、セロファン膜の透過性が悪い。然るにクレシール紫は上記3種の色素に比して尚その荷電は低い、超生染性は可成認められる。この色素は分子量小さく且セロファン膜を通過するもので、明かに重合は起つていない。この様な事実から考察すれば荷電の著しい減少によつて色素の細胞内浸入が阻止されるのは、色素そのものの粒子が或程度粗大化する事に原因があるらしい。之等の事実は色素の細胞膜透過性には荷電の弱い事而も、色素が荷電の消失によつて粗大粒子にまで発展しない状態と云うものが最も好都合であるものと考えられる。次に色

素の荷電と関係してエーテルアルコールへの溶解性を見るに、ニール青, B. C. B. が先ず第1で次にトルイデン青, ヤーヌス緑等があり, 之等は最もよく超生染する色素である。ゲンチアナ紫, メチール紫もアルコールエーテルによく溶けるが, 之は荷電が少なすぎて粒子が大ききよく染らない。又水, アルコール, エーテルに殆んど溶けないクリスタル紫も超生染は全く不能である。

次に只一つの例外としてピロニンあげねばならない。この色素は水, アルコール, エーテル, エーテルアルコールにある程度溶解し, 分子量小さく電気泳動度弱く, セロファン膜を通過するので(アズールI, IIと殆んど同じ性格), 之等の条件は著者のしらべた超生染可能の色素の特徴を全て備えるものであるが, pHの全領域に亘つて超生染不能である(野手²⁷⁾³⁰⁾の報告に一致する)。この色素が何故にこの様な性格をもつに拘らず細胞内に侵入しないかに就ては現在の所全く不明である。色素のpHを変えてCellulose Casings膜に対する透過性を検しても表1に示す如くすべて(+)であつた。

次に酸性色素について按ずるに之等も塩基性色素の場合と同様に濾紙電気泳動と超生染所見は極めて密接な関係を示し, 荷電が大きく電気泳動度の強い色素, 酸性フクシン, オランゲG, ポンソーフクシン, インチゴカルミン等は全く染色能なく, エオジン, エリトロチン及びフロキシンの色素に於ては酸性域で色素が電気泳動を殆んどなくなるpHで超生染可能であり, 色素が顕著な電気泳動を示すpH域では之等の色素も全く超生染不能となる。この関係は特にエオジン, エリトロチンで顕著に認められる。フロキシンのやや不明瞭な結果が得られたのは本色素が淡黄色で染色度の判別がやや困難である事に由来するものと思われる。之等の色素とは別にコンゴ赤は電気泳動を殆んど示さず而も水によく溶解するが, 之はセロファン膜を通過せず, エバンス青及びトリパン青等も泳動度は小さいが分子量著しく大きくセロファン

膜を通過せず, メチール赤, マラヒット緑は水に難溶であり, 之等の色素が細胞膜を通過しない事は荷電の関係とは別にその粒子の大きさ, 溶解度等によつて理解されるべき性質のものである。尚このメチール赤とマラヒット緑は図20, 21に示す如く, アルカリ側に於て(-)の荷電を持ち, 酸性側に於ては(+)の荷電をもつ。清野⁴⁾によればMalachite green krist (G)(+荷電)とMalachite green (G)(-荷電)との2種があるが何れも超生染不能であつて以上の所見を説明するに充分である。

以上専らpHの変化による荷電の変化を中心に色素の膜透過性を論議して来たが, 之等を要約すると塩基性色素も酸性色素も細胞膜を通過するためには或る程度の荷電の減少を必要とし, 而もこの状態に於て尚充分小さい粒子として存在しなければならないと云う事である。即ち色素は分子が小さくその極性の弱いものが細胞膜を通過し, その関係を模式的に示せば図33の様である。この事はOvertonその他による細胞膜のリポイド乃至リポ蛋白説を支持するものである。勿論この場合細胞膜の荷電が問題になるであろう。アルブミン, グロブリン等の一般的蛋白を標準にして観察すると, 酸性色素は略々蛋白の等電位点の左側(+価電)に於て, 塩基性色素はその右側(-価電)の域で超生染される。この様な事実は色素と細胞表面との電気的な部分が可成主要な役割を演じているのではないかとこの考えを抱かせるが, 荷電の強い色素が全く超生染不能である事実は, やはり透過性は主として細胞表面の不極性分子によつて大きく支配されている事を示すものである。色素以外の物質, 例えばイオンの透過性に就てこれまでに行われた多くの実験を見ても陰価電を有する酸根は酸性側で, 陽価電をもつアルカリ性イオンはアルカリ側でよく細胞膜を透過する事が知られており, 之等の事実は著者の色素の場合と同様に荷電の低下した状態で物質が細胞膜を通過する事を示すものである。例えば次に細胞膜の性質乃至構造に就ての先

人の業績を見るに Frey-Wyssling¹⁰⁷⁾, Osterhout¹⁰⁸⁾, Irwin¹⁰⁹⁾¹¹⁰⁾, Trim & Alexander¹¹¹⁾¹¹²⁾, Burger¹¹³⁾, Loeb¹¹⁴⁾によつて細胞膜の性質が種々追及せられて, Overton¹¹⁵⁾¹¹⁶⁾, Nirenstein⁴⁴⁾, Höber¹¹⁷⁾, Collander¹¹⁸⁾等の実験によれば浸入物の脂肪溶剤への溶解性が細胞膜透過について重要な因子をなすと云い, Cole & Curtisは原形質膜に大きなインピーダンスを証明し, Weatherby¹¹⁹⁾は人工の Phospholipidmembran について研究し, Chargaff¹²⁰⁾, Ponder¹²¹⁾, Booiij¹²²⁾, Ferguson¹²³⁾は細胞膜がリピドとリポ蛋白によつて構成されていると述べ, Monné¹²⁴⁾及び教室の神田¹²⁵⁾は偏光顕微鏡的研究から細胞質内細繊維は蛋白の糸とこれに直角にリピドの結合したものであるとしており, 之等が細胞表面で密に排列したものが細胞膜であるとの見解をとつている。この様な見解は Danielli & Harvey の提案するような「細胞膜はリピドと蛋白との結合による篩状構造より成る」とする説と略々同様であり, 著者の実験は又この様な説を色素の透過性の面から支持したものと云える。

結 論

1. 約30種の塩基性及び酸性色素に就てその濾紙電気泳動度を各種の段階の pH をもつ緩衝液中に於て検し, 同時に各種 pH 域に於ける家兎末梢血顆粒球, 淋巴球及び網赤血球

の超生体染色度を検した。

2. 塩基性色素の内メチレン青, アズール I, アズール II, ニール青, ホフマン紫, トルイヂン青, B. C. B., ヤーヌス緑, ビスマルク褐, 中性赤, クレシール紫は一般に超生染率よく, その荷電の減少する pH 域に於て超生染率がよくなり, 荷電の強くなる pH 域 (pH 3~5) では超生染性が落ちる。

3. 酸性色素に於てはフロキシソ, エオチン, エリトロチンが超生染可能であり, 之等は色素の荷電が減弱する酸性域に於て超生染性良好となる。

4. 網赤血球については B. C. B. を用い, pH を変えて超生染度を検した。その結果は同色素の白血球に於ける場合と略々一致している。

5. 之等の結果から著者は細胞膜の性格とその透過性に就て論じ, 細胞膜がリピド乃至リポ蛋白で出来ているとする Overton, Chargaff その他の説を支持した。

本研究要旨は昭和30年日本医学会総会病理学会で発表した。

稿を終えるに臨み終始御懇切なる御指導と御校閲を頂いた妹尾左知丸教授に深謝し御援助を頂いた小田助教授と三重県立大学の河合氏に感謝する。

尚本研究は文部省科学研究費の補助を受けた。謹んで謝意を表す。

文 献

- 1) 清野謙次・生体染色研究の現況及其検査術式, 南江堂, 東京, 大10.
- 2) Kiyono, K.: Die Vitale Karminspeicherung, Jena, Gustav Fischer, 1914.
- 3) 清野謙次・生体染色の研究, 2, 南江堂, 東京, 昭3.
- 4) Kiyono, K., Sugiyama, S. & Amano, S.: Die Lehre von der Vitalfärbung (Kyoto) 1938.
- 5) Höber, R.: Biochem. Z., 20, 56, 1909.
- 6) Garmus, A.: Z. Biol., 58, 185, 1912.
- 7) Asher, L. & Garmus, A.: Zentralbl. Physiol., 25, 844, 1911.
- 8) Henze, M.: Z. Physiol. Chem., 79, 215, 1912.
- 9) Winterstein, H.: Biochem. Z., 75, 71, 1916.
- 10) Wertheimer, E.: Pflügers Arch., 199, 383, 1923.
- 11) Wertheimer, E.: Ebenda, 200, 82, 1923.
- 12) Wertheimer, E.: Ebenda, 200, 354, 1923.
- 13) Wertheimer, E.: Ebenda, 201, 488, 1923.
- 14) Wertheimer, E.: Ebenda, 201, 591, 1923.
- 15) Sabin, F. R.: Bull. Johns Hopk. Hosp., 34, 277, 1923.
- 16) 天野重安: 血液学の基礎, 上巻, 丸善, 昭24.
- 17) Lazarow, A. & Cooperstein, S. J.: J. Histochem. Cytochem., 1, 4, 1953.
- 18) 杉山繁輝: 血液及組織の新研究と其方法, 南江

- 堂, 東京, 昭27.
- 19) 八木義一: 十全会雑誌, 37, 522, 昭7.
 - 20) 藤田秀一: 全上, 38, 3250, 昭8.
 - 21) 藤田秀一: 全上, 38, 3629, 昭8.
 - 22) 森喜久男: 全上, 33, 8, 昭3.
 - 23) 森喜久男: 全上, 34, 11, 昭4.
 - 24) 森喜久男: 全上, 34, 8, 昭4.
 - 25) 野手雅信: 全上, 33, 7, 昭3.
 - 26) 野手雅信: 全上, 33, 8, 昭3.
 - 27) 野手雅信: 全上, 33, 11, 昭3.
 - 28) 野手雅信: 全上, 34, 6, 昭4.
 - 29) 野手雅信: 全上, 35, 11, 昭5.
 - 30) 野手雅信: 全上, 35, 12, 昭5.
 - 31) Seki, M.: Z. Zellforsch., 19, 2, 238, 266, 274, 289, 1933., 21, 5, 757, 1934.
 - 32) Seki, M.: Z. Zellforsch., 22, 3, 445., 22, 5, 707, 720., 23, 2, 314, 1935.
 - 33) 長谷川定: 日血会誌, 12, 3, 136, 昭24.
 - 34) 横田政信, 長谷川定: 日血会誌, 13, 1, 16, 昭25.
 - 35) Jacobs, M. H.: Cowdray's General Cytology, 3, Chicago, 1924.
 - 36) Overton, E.: Jahrb. Wiss. Bot., 34, 669, 1900.
 - 37) Ruhland, W.: Ebenda, 46, 1, 1908.
 - 38) Ruhland, W.: Ebenda, 51, 376, 1912.
 - 39) Ruhland, W.: Ber. Deutsch. Bot. Ges., 30, 139, 1912.
 - 40) Ruhland, W.: Biochem. Z., 54, 59, 1913.
 - 41) Ruhland, W.: Jahrb. Wiss. Bot., 54, 391, 1914.
 - 42) Höber, R.: Physik. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe, Leipzig, 1922.
 - 43) Hertz, W.: Pflügers Arch., 196, 444, 1922.
 - 44) Nirenstein, E.: Ebenda, 179, 233, 1920.
 - 45) Irwin, M.: J. Gen. Physiol., 8, 147, 1925.
 - 46) Commoner, B.: J. Cell. Comp. Physiol., 12, 171, 1938.
 - 47) Scarth, G. W.: Plant. Physiol., 1, 215, 1926.
 - 48) Hall, B. E.: Folia haemat., 43, 206, 1930.
 - 49) Herwerden, M. A. v.: Protoplasma, 17, 359, 1932.
 - 50) Endler, J.: Biochem. Z., 42, 440, 1912.
 - 51) Petrie, A. K. H.: Austr. J. Exp. Biol. & Med. Sci., 4, 169, 1927.
 - 52) Brooks, M. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 24, 370, 1927.
 - 53) Commoner, B.: Biol. Bull., 73, 383, 1937.
 - 54) Gicklhorn, J. & Keller, R.: Biochem. Z., 153, 2, 1924.
 - 55) Krebs, H. A. & Nachmansohn, D.: Biochem. Z., 186, 478, 1927.
 - 56) Collander, R.: Jahrb. Wiss. Bot., 60, 354, 1921.
 - 57) Brooks, M. M.: Protoplasma, 7, 46, 1929.
 - 58) Scarth, G. W.: Protoplasma, 1, 204, 1927.
 - 59) Irwin, M.: J. Gen. Physiol., 10, 75, 425, 1926.
 - 60) Irwin, M.: Ibid., 10, 927, 1927.
 - 61) Irwin, M.: Ibid., 14, 1, 19, 1930.
 - 62) Harvey, E. N.: Am. J. Physiol., 31, 335, 1912~13.
 - 63) Crozier, W. J.: Science, 42, 735, 1915.
 - 64) Crozier, W. J.: J. Biol. Chem., 24, 255, 443, 1916.
 - 65) De Vries, H.: Arch. Neerland. sc. exact. et. nat., 6, 124, 1871.
 - 66) Pfeffer, W.: Osmotische Untersuchungen, Lipsic, 140, 1877.
 - 67) Ruhland, W.: Jahrb. Wiss. Bot., 48, 1, 1909.
 - 68) Pfeffer, W.: The Physiol. of Plants, Oxford, 2, 1, 92, 1903~06.
 - 69) Harvey, E. N.: Science, 39, 947, 1914.
 - 70) Haas, A. R.: J. Biol. Chem., 27, 225, 1916.
 - 71) Bethe, A.: Pflüg. Arch. Ges. Physiol., 127, 219, 1909.
 - 72) Warburg, O.: Z. Physiol. Chem., 66, 305, 1910.
 - 73) Harvey, E. N.: J. Exp. Zool., 10, 507, 1911.
 - 74) Mc Clendon, J. F. & Mitchell, P. H.: J. Biol. Chem., 10, 459, 1911~12.
 - 75) Harvey, E. N.: Intern. Zeit. Phys. Chem. Biol., 1, 463, 1914.
 - 76) Gompel, M.: Ann. Physiol., 1, 166, 1925.
 - 77) Gellhorn, E.: Das Permeabilitäts Problem, Berlin, 1929.
 - 78) Gellhorn, E.: Pflügers Arch., 219, 761, 1928.
 - 79) Steinbach, H. B.: Ann. Rev. Physiol., 13, 21, 1951.
 - 80) Davson, H. & Danielli, J. F.: The Permeability of Natural Membranes, 1952.

- 81) Rosenberg, T. & Wilbrandt, W. Intern. Rev. Cytol., **1**, 65, 1952.
- 82) Brown, R. : Intern. Rev. Cytol., **1**, 107, 1952.
- 83) Le Fevre, P. G. & Le Fevre, M. E. : J. Gen. Physiol., **35**, 6, 891, 1952.
- 84) Le Fevre, P. G. & Davies, R. I. : J. Gen. Physiol., **34**, 5, 1951.
- 85) Sheppard, C. W. & Beyl, G. E. : J. Gen. Physiol., **34**, 5, 1951.
- 86) Green, J. W. : J. Cell. Comp. Physiol., **33**, 247, 1949.
- 87) Wigglesworth, V. B. : F. Exp. Biol., **21**, 97, 1945.
- 88) Beament, J. W. L. : F. Exp. Biol., **21**, 115, 1945.
- 89) Danielli, J. F. Trans. Faraday Soc., **37**, 121, 1941.
- 90) 佐竹一夫 クロマトグラフ, 153, 昭27.
- 91) 佐野勇・日本医事新報, 1531, 26, 昭28.
- 92) 佐野勇・日本医事新報, 1533, 64, 昭28.
- 93) 森五彦, 小林茂三郎: 濾紙電気泳動法の実際, 昭30.
- 94) 橋慶一郎: 超生体染色に関する研究, 金沢, 昭6~7.
- 95) Cameron, G. : Tissue culture technique, 128, 1950.
- 96) Michaelis, L. : Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol., **12**, 131, 1947.
- 97) McIlvaine, T. C. : J. Biol. Chem., **49**, 183, 1921.
- 98) Oscar, W. R. Mc Clung's Handbook of Microscopical Technique, 687, Philadelphia, 1928.
- 99) Möllendorff, W. v. : Dtsch. med. Wschr., **41**, 1914.
- 100) Möllendorff, W. v. : Anat. H., **53**, 87, 1915.
- 101) Möllendorff, W. v. : Z. Kolloidchem., **18**, 81, 1916.
- 102) Möllendorff, W. v. : Arch. mikrosk. Anat., **90**, 503, 1918.
- 103) Möllendorff, W. v. : Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, **5**, 2, 97, 1928.
- 104) Möllendorff, W. v. : Arch. mikrosk. Anat., **90**, 463, 1918.
- 105) Möllendorff, W. v. : Kolloid Z., **23**, 158, 1918.
- 106) Schulemann, W. : Biochem. Z., **23**, 158, 1918.
- 107) Frey-Wyssling, A. : Submicroscopic morphology of Protoplasma, 1953.
- 108) Osterhout, W. J. V. : J. Gen. Physiol., **8**, 131, 1925.
- 109) Irwin, M. : J. Gen. Physiol., **9**, 561, 1926.
- 110) Irwin, M. : Ibid., **10**, 271, 1927.
- 111) Trim, A. R. & Alexander, A. E. : Symp. Soc. Exp. Biol., **3**, 1949.
- 112) Alexander, A. E. & Trim, A. R. : Proc. Roy. Soc., **133**, 220, 1946.
- 113) Burger, W. : Arch. Exp. Pathol., **106**, 102, 1925.
- 114) Loeb, J. & Beutner, R. : Biochem. Z., **41**, 1, 1912.
- 115) Overton, E. : Jahrb. Wiss. Bot., **34**, 669, 1900.
- 116) Overton, E. : Vierteljschr. Naturf. Ges., Zürich, **40**, 159, 1895.
- 117) Höber, R. & Nast, O. : Biochem. Z., **50**, 418, 1913.
- 118) Collander, R. : Trans. Faraday Soc., **33**, 985, 1937.
- 119) Weatherby, J. H. : J. Cellular. Comp. Physiol., **33**, 333, 1949.
- 120) Chargaff, E. : Arch. Sci. Physiol., **2**, 157, 1948.
- 121) Ponder, E. : Discussion Faraday Soc., **6**, 152, 1949.
- 122) Booij, H. E. : Ibid., **6**, 143, 1949.
- 123) Ferguson, J. : Proc. Roy. Soc., **127**, 387, 1939.
- 124) Monné, L. : Advances in Enzymology, **8**, New York, 1948.
- 125) 神田三郎: 岡山医学会雑誌, 印刷中.

Department of Pathology, Okayama University Medical School,
(Director : Prof. S. Seno)

Permeability Studies on Blood Cells by Supravital Stain

I. Supravital Stain of Leucocyte and Reticulocyte and the Hydrogen Ion Concentration of Media

By

Motomitsu Oguchi

Supravital staining of granulocyte, lymphocyte and reticulocyte was carried out with a series of dyes including both acidic and basic ones. On each dye the affinity to cells was observed in those media which pH were changed serially from 1 to 13 using McIlvaine's or Sørensen's buffer solution. On the other hand the increasing or decreasing effect of hydrogen ion concentration of media on the charges of dyes was observed electrophoretically. In general, strongly charged dyes, both positive and negative, failed to invade into cells in the whole range of pH, while the weakly charged dyes showed a positive stain in a certain region of pH, i. e. the acidic dyes in the acidic media and basic dyes in the basic media, showing the accelerated permeability of dyes to cells in their fairly discharged states. However, some dyes proved to be impermeable even in their weakly charged states. This impermeability was attributed to the large molecular weight of the dyes or to the sparing solubility to water, alcohol, ether and ether-alcohol.
