

Cyanine 系色素 Metachromasia 反応の組織化学的研究

第一篇 Cyanine 系色素の Metachromasia 呈色性について。

京都大学結核研究所病理学部 (主任教授 高松 英雄)

岡 田 彰

(38.8.30 受付)

緒 言

1877年 Ehrlich によって命名された Metachromasia 反応は、今日、酸性多糖類、核酸等の証明の方法として広く組織化学に利用されており、此等に関する研究は数多くみられる。然し乍ら、Metachromasia の本態は可成り複雑であって、用いられる色素の種類によって得られる成績の意味が異なることもあり、又同一色素溶液であっても、その濃度、温度、或は色素の純度、又は染色手技の如何によって、その成績に可成りの差が認められることは周知の事実である。

Metachromasia 反応を示す色素には、Kelly (1956)^{1a)} の報告によれば、thiazine-, oxazine-, azine- 色素等の約55種類の塩基性色素があり、又酸性色素、或はその他の染料の中にも本反応を示すもののあることが知られている。(Kelly 1956, 1958^{1b)}, Diezel 1958²⁾). 然し従来、metachromasia の研究は主として toluidine blue, azur A 等の thiazine 色素を用いて行われて来たために thiazine 色素による metachromasia の本態、及び組織化学的利用に関する検討は比較的詳細に行われたにもかかわらず、その他の色素の示す反応の機構に関しては未だ詳らかでない。又今迄の報告によっても、thiazine 色素による metachromasia の本態が他の色素の示す異染性の本態と必ずしも常に同一であるとは云い難いのである。

Cyanine 色素は感光色素としての特殊な機能を持つ色素であり、本邦に於ける此分野の研究は著しく進められており、現在千数百種類の色素が合成され、多方面に利用されている。

此色素の組織学的な利用は1935年に波多野、高松³⁾が 1,1'-diethyl-2,2'-carboxyisocyaninejodid を用いた Illuminol-R 染色法を創案し、組織又は血液の染色性に優れていることを認め、且本色素が単染色であっても一見 Giemsa 染色法の如き多染性と変色性を示すことを報告した。又、1959年 Schiebler, Schiessler⁴⁾ はN,N'-Diaethyl-6-6'-dichlorpseudoisocyanin-chlorid を用いた metachromasia 染色法によって酸化腓組織の Insulin の証明を行いこの反応が toluidine blue や methylene blue 等の他の色素では得られず、pseudoisocyanine に依ってのみ反応を示すことを報告している。従って cyanine 色素による metachromasia 反応の組織化学的利用は多くの優れた利点を有するものと考えられる。著者はこの観点から、入手し得た100種余の cyanine 色素について metachromasia 呈色性を組織切片並に試験管内実験によって検討した。

実験材料及び方法

1. 使用した色素は表 I に示す如く、monomethine 2種類, trimethine 22種類, pentamethine 10種類, trinucleous 41種類, styryl 22種類, hemicyanine 15種類, 計112種類であった。

この中36種類はこの研究のために日本感光色素研究所より提供を受けたものである。色素の分類は日本感光色素研究所に於ける感光色素合成一覧表(1959)⁵⁾ の分類に従い、色素番号は一覧表に収録されているものについてはNK番号を用いたが、該当しないものは虹波番号⁶⁾を用いた。此等の色素の水に可溶性のものは溜水で、組織染色には0.005%~0.01%に、試験管内実験には0.0005%~0.005%に稀釈し、水に不溶性の色素

表 I 実験に使用した Cyanine 色素
(数字は色素番号を示し、太文字は虹波番号、その他は NK 番号である)

hetero環 Cyanine	chinoline	thiazol	pyridine	oxazol	selenazol		例数
monomethine	64	62					2例
trimethine	3, 14, 42, 60, 166 251, 537, 609 87, 89	77, 535, 1071, 1059	306, 491	736	616 1072	(chino -thiazol) 140, 321 1194	22例
pentamethine	103	193, 195, 210 1164, 1195 1232			1235	(indolen) 82 83	10例
trinucleous	4, 9, 10, 30, 31, 16, 46, 49 98, 153, 157, 222, 223, 225 3, 34, 36, 37, 38, 39, 44, 51 52, 68, 77, 85, 88, 95, 97 100, 101, 102, 117, 118, 119 120	2, 664 48	192	325			41例
styryl	232, 382 6, 71, 164, 165, 166, 182, 183, 192, 194	89, 269, 376 698, 1142 23, 141, 159 160	8, 162				22例
hemicyanine	497, 499, 1449 10, 111, 126, 129, 163 186, 191	498 132	1448 113, 128				15例
例 数	69例	25例	8例	2例	3例	5例	112例

は少量の ethanol, methanol, 或は propylene glycol に溶解し、溜水で同様に稀釈して用いた。

ロ。染色試験には酸性多糖類を多量に含有し metachromasia 反応を示すことが知られている人の気管枝軟骨及び気管枝腺組織、人の臍帯の Formalin 固定 Paraffine 包埋切片を用いた。

ハ。試験管内実験には稀釈色素溶液の各々に、最も著明な metachromasia 反応の特性を有することが知られている chondroitine sulfate の 0.001% 溶液を数滴滴下して色調の変化を対照と比色し、同時に一部のものについて Beckmann 分光光度計による吸光測定を行い、色素濃度の変動による吸光の変化及び chondroitine sulfate 添加による変化を観察した。

実験結果

A. 組織染色試験における反応陽性例

(i) **monomethine group** は 2 例共反応は陰性であった。(表 II)

(ii) **trimethine group**: hetero 環に thiazol を持つ 4 色素のうち NK77 及び NK1071 に反応を認めた。NK77 は最も著明であって、気管枝軟骨基質、粘液腺、臍帯間質が黄橙色に染

り、固有の色調の帯紫紅色に染る他の組織と明確に織別し得る。

Chinoline 核を有するものの中 NK3, NK537, NK14, NK251 に反応を認めた。NK537 の溶液は僅に褐色を帯びた青紫色であるが、光線の照射によって極めて短時間に褪色し、染色標本の色調も同様に褪色するが、metachromasia を呈した軟骨基質は赤紫、赤緑、黄橙色に変化し比較的遅く迄色調が残る。NK14, NK251 も比較的光線の影響を受け易く、数時間乃至数十時間で褪色した。NK3 は Illuminol-R であり、その ethanol 溶液は pH5.6 であったが、軟骨基質、臍帯間質は濃い紺色に染り、赤血球は緑、細胞核は青色、その他は一般に赤紫色に極めて鮮明に染色された。然しこの溶液を pH3 に調整して染色した場合には metachromasia の色調は赤味紫となり他は一般に薄い青色に染色された。

左右の hetero 環に夫々 thiazol と Chinoline との異った核を持つ NK140 と NK321 は共に著明な反応を示した。色素溶液の色調はいづれ

表 II 異染色性陽性例

		mono-methine	trimethine	penta-methine	tri-nucleous	styryl	hemi-cyanine
実験例数		2例	22例	10例	41例	22例	15例
組織染色 反応	++			193 1235	2		498
	+		3, 77 140, 251, 321, 1072		222 48		497, 499 1448
	±		14, 537 1071	82, 83, 210	10, 192 98		
陽性例数		0	9例	5例	6例		4例
試験管内 反応	++		77	193			
	+		3, 14, 60, 251 321, 1071	82, 83 1235	10, 31 222		498 1448
	±		140, 537, 1072	1164	2, 192 48	232 376	499 497
陽性例数		0	10例	5例	6例	2例	5例

i 色素の固有の色調と全く異った色調を示したものを++, 多少共元の溶液の色調を帯びるが明らかな色の変化を認めたものを+, 色調の変化は明らかであるが, contrast の明確でないもの又は光線による褪色が著明であったものを±とした。

ii 例数を除く数字はすべて色素番号を示し, 太文字は虹波番号他は NK 番号である。

もコバルト青であり, metachromasia の色調は共に赤紫色であった。

(iii) **pentamethine group**: benzoselenazol を持つ NK1235 及び thiazol を持つ NK193 が著明な反応を示した。即ち NK1235 の溶液の色調は紫を帯びた青色, NK193 はコバルト青色であるが共に赤色の metachromasia を呈した。NK210 は光線による褪色が著明であった。

(iv) **trinucleous group**: NK2, 即ち紫光として知られる色素であるが, 青紫色から赤色への著明な metachromasia を示した。虹波48, 虹波98, NK192, NK10 はいずれも光線による褪色が著しい。

(v) **styryl group**: 著明な反応を呈したものはなかった。

(vi) **hemicyanine group**: NK498 が青紫色から橙色に反応を示し, 又 NK499 は赤紫色から橙色に反応を示した。又 NK497, NK1448 は共に濃い赤紫色であるが, 軟骨基質は NK497 は赤色, NK1448 は濃紺に染色し特に NK1448 は軟骨の matrix に濃染した。

B. 試験管内実験に於ける反応陽性例

第2図下欄に示す如く, 組織反応で陽性なのは概ね陽性であったが, その程度には可成差

がある。即ち trimethine では, NK77 は組織に於けると同様橙色に著明な色調の変化を示し, 此と類似の化学構造を持つ NK1071 は組織には反応が認められなかったが, 試験管内実験では僅に黄色を帯びた桃色に反応を示した。

又 NK77 の chondroitine sulfate 添加(以下コ添加と略記する)による変色は 60°C 以上に加温すると溶液の本来の色調に復し, 又冷却することによって metachromasia が再現した。

NK3 のコ添加による metachromasia の色調は組織標本に於けると同様紺色に示された。

Pentamethine group では NK193 が最も著明な反応を示したが, この場合の metachromasia の赤い色調は加温によっても変化しない。然し此溶液の一滴を濾紙上に滴下して吸着させると溶液の固有の色調である青色が現われた。又 NK1235 の metachromasia の赤い色調は加温によっても変化せず, 且濾紙に吸着させた場合にも可成の赤味を帯びた紫色に染った。styryl group では組織に反応を示すものはなかったが試験管内実験では NK232, NK375 に僅に反応を認めた。hemicyanine group では NK497 が組織では濃紫赤色から赤色に反応を示すが, 試験管内では少々青色が強く示される程度

で明らかな反応は認められなかった。

C. 分光光度計による所見

(i) NK77 と NK1071 の反応の比較

両者共 thiazol 核を有する trimethine であって、夫々の色調は共に帯紫紅色であるが、コ添加による metachromasia 及び組織染色に於ける反応の強さに著しい差が認められた。

この関係を Beckmann 分光光電比色計を用

いて夫々の透過度を測定し比較した結果、図 I, II の如く、濃度の変動による変化は少いが、コ添加によって吸収極大は両者共略々同様に約40 mμ 短波長側に移動した。然しこの場合、NK 77の 530mμ 附近の吸収極大はコ添加によって極めて小さくなるのに比して、NK1071 ではなおこの範囲に相当の吸収を示していることが認められた。

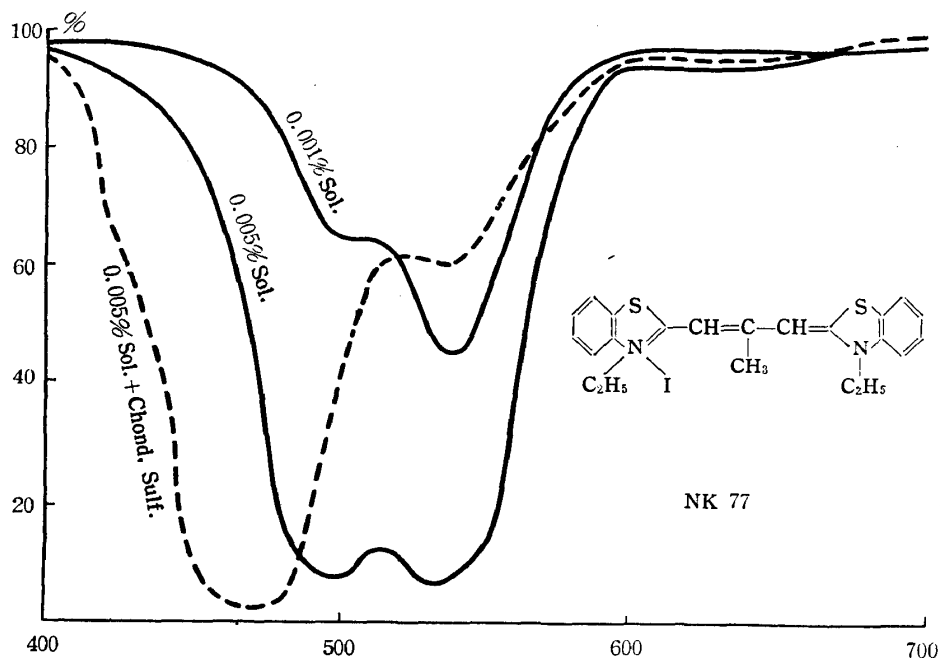


図 1 NK 77 溶液の透過率曲線

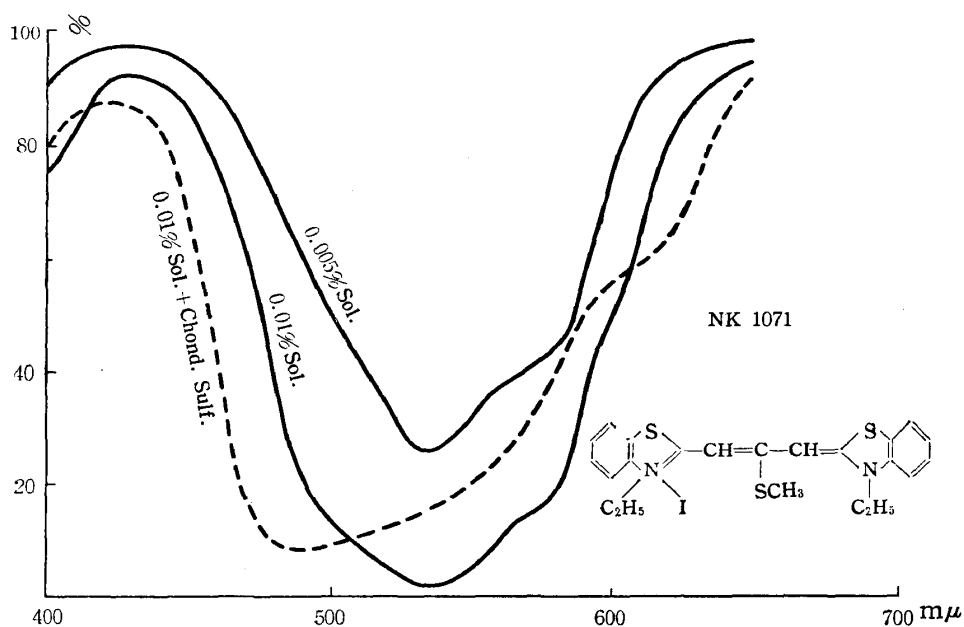


図 2 NK 1071 溶液の透過率曲線

(ii) **NK3** のコ添加による透過率曲線の変化
 前述の如く、NK3 の溶液の色調は薄い溶液では青色であるが濃度を増すと青紫色になり、又 metachromasia の色調は恰も逆の反応を思わせる紺色に示された。然し図Ⅲのように、吸光測定の結果では濃度を上昇させると β 吸収帯が著明となり、コ添加によって短波長域に新しい吸収帯が認められた。然し青の余色を示す 580

～590 $m\mu$ の波長の光の吸収も可成り強く認められる。

(iii) **虹波77** のコ添加による吸収曲線の変化
 虹波77の溶液の色調は spectrum green であって、コ添加による変色は殆んど認められないが、この場合にも図Ⅳに示す如く、吸収極大は短波長側に約 20 $m\mu$ の変位を示した。

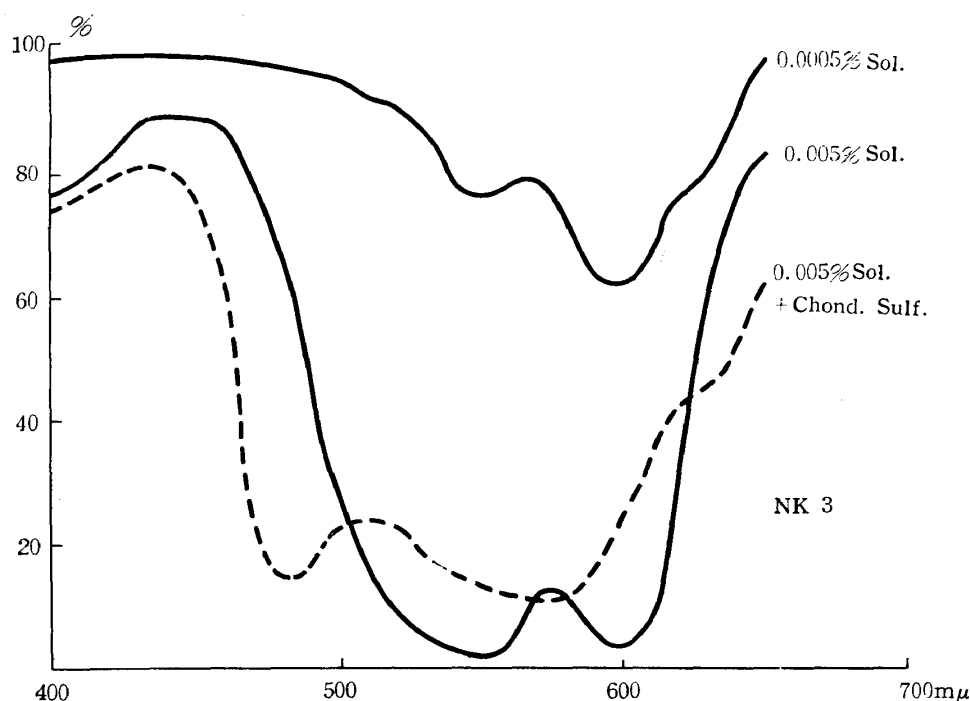


図 3 NK 3 溶液の透過率曲線

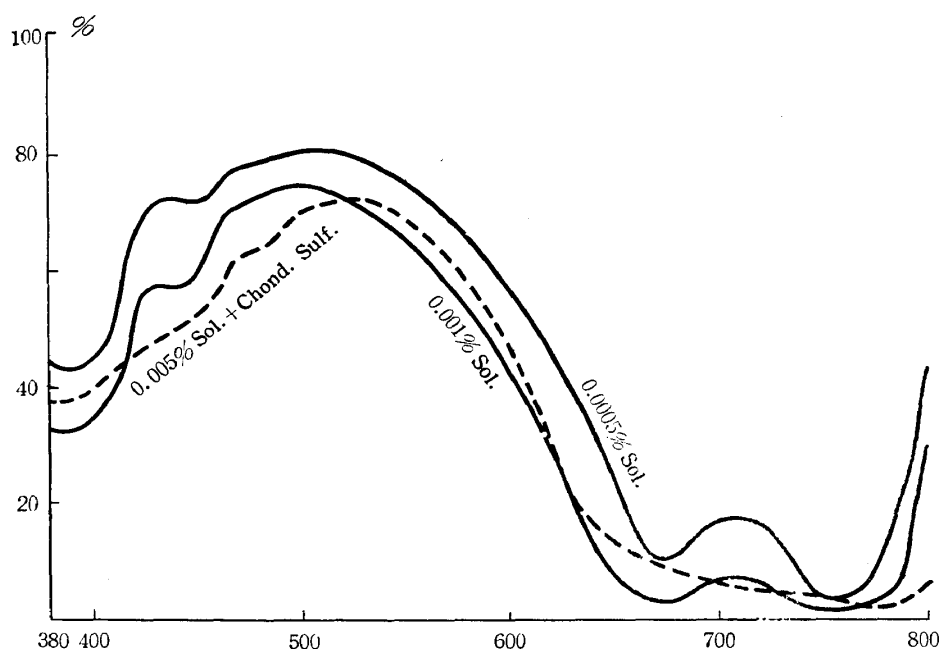


図 4 虹波 77 溶液の透過率曲線

考 按

1. metachromasia を示した cyanine 色素の化学構造上の特徴について

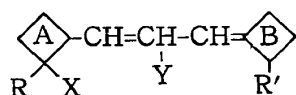
今日迄の metachromasia の研究によっても metachromasia を示す色素とそうでないものの化学構造上の差は明確でない。

第Ⅲ表は組織染色及試験管内に於いて多少共反応を示した cyanin 色素の化学構造を group 別に表示したものである。一般に色素の色調は

色素分子の発色団の共役二重結合の数, その基の分極率及び助色団の作用に関係するとされている。cyanine 色素では, hetero 環の N から N 迄の連鎖炭素数の多いもの程吸収極大は長波長側に移り, 又炭素数の同じものでは hetero 環が chinoline であるものが最も深色を示す。例えば trimethine では chinocyanine が殆んど青色であり thiocyanine が紅色であるが, pentamethine では thiocyanine が青色である。

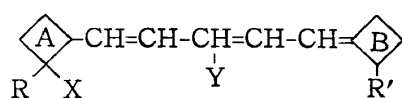
表 Ⅲ 反応陽性例の化学構造

A. trimethine



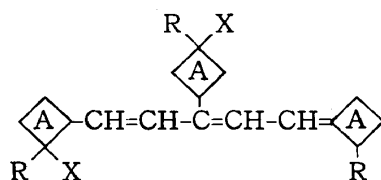
			R	X	y
3		A	C ₂ H ₅	I	
60		A	C ₃ H ₇	I	
14		A	CH ₃	I	
251		A	nC ₃ H ₇	I	
537	(CH ₃) ₂ N ⁺		C ₂ H ₅	I	
140			C ₂ H ₅	I	
321			C ₂ H ₅	I	
77		A	C ₂ H ₅	I	CH ₃
1071		A	C ₂ H ₅	I	SCH ₃
535	CH ₃ O	A	C ₂ H ₅	I	
1072		A	C ₂ H ₅	I	SCH ₃

B. Pentamethine



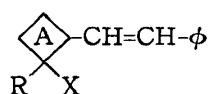
	A	B	R	X	y
1235		A	C ₂ H ₅	NO	U
82		A	CH ₃	I	U
83		A	CH ₃	I	Br
193		A	C ₂ H ₅	CL	CL
1164		A	C ₂ H ₄ Coo ⁻	I	CL
210		A	CH ₃	I	Cl

C. trinucleous



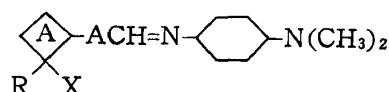
	A	R	X
NK 2		CH ₃	I
虹 48		CH ₃	I
NK 192		CH ₃	I
NK 222		C ₂ H ₅	I
NK 10		CH ₃	I
虹 99		C ₂ H ₅	NO ₃

D. Styryl



	A	R	X	φ
NK 232		nC ₇ H ₁₅	I	
NK 376		C ₂ H ₅	I	

E. hemicyanine



	A	R	X
NK 497		C ₂ H ₅	I
NK 498		C ₂ H ₅	I
NK 499		C ₂ H ₅	I
NK 1448		C ₂ H ₅	Br
NK 1449		C ₂ H ₅	I

(NK77 と NK193 を比較すれば明らかである。) Kelly¹⁾ は metachromasia 反応を示す色素には青の色調のものが多くことに疑問を持って、数種の色素について検討した結果, toluidine blue の metachromasia 性吸収極大の移動が色彩感覚の最大視感度のある 555m μ の波長域を跨っているために著明な反応を認め得るのであらうと述べている。然し著者の実験では、図 I, II に示したように NK77 では吸収極大の移動は 510m μ から 470m μ に、NK107/では 530m μ から 490m μ の範囲で行われており、NK77 の明らかな反応を最大視感度の関係によっては説明され得ない。ところが我々の眼で色をみわける能力 (色彩弁別域) は波長によ

って異っていて、二色を識別し得る最少の弁別域は図 V²⁾ に示すように、490m μ (青緑) と 590m μ (橙) 附近に最も鋭敏なところがあり、530m μ (黄緑) に少々鈍い所がある。即ち NK 77 では最も鋭敏な所に、NK1071 では少々鈍い所、紅波77では最も鈍感なところに吸収極大の移動があると云える。trinucleous group の特に chinocyanine には、虹波77のように可視部の長波長側に吸収極大があつて緑の色調を示すものが多く、コ添加によって吸収極大が多少移動しても、弁別域の極めて鈍いために変化した色を識別し得ない場合がある。従つて化学構造上、その色素の固有の吸収極大が色相弁別域の鋭敏な範囲にあるような構造を持つことも重

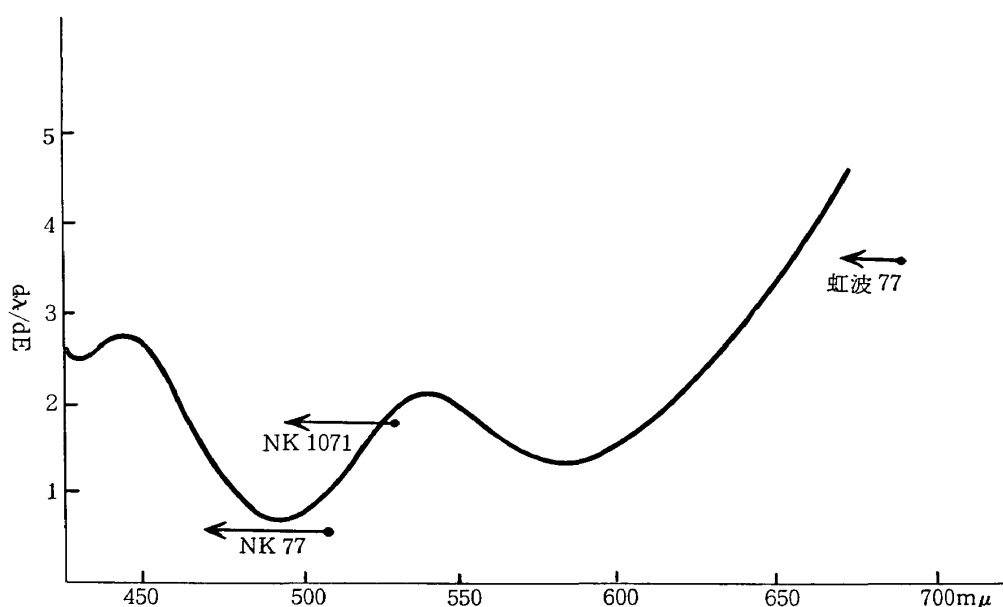


図 5 波長別色相弁別域

要であろうと考える。

又反応を示した色素では、Alkyl 基は C の n 数が小さいものが多く、又酸根では沃度を持つものが多い。此等は色素分子の溶液中に於ける解離に関係して metachromasia 反応に重要な影響を持つものと考ええる。

2. cyanine 色素による metachromasia の機構について

Thiazine 色素の metachromasia の本態については、Michaelis(1910) によって唱えられた色素分子の di-, polymerisation の仮説は、H.L. Booij (1949)⁸⁾ によって colloid 化学的な観点から Association hypothesis として進められたが、Sheibe と Zanker (1958)⁹⁾ の行った物理化学的な検討によって Association と Polymerisation が相互に関連することが証明されている。

著者は cyaninemetachromasia がこの様な thiazine 色素による反応と同一の機構によって示されるかどうかを検討するために、二、三の試験管内実験を行った。この結果、NK77 の反応は加温に依って可逆的な抑制を受け、NK193 の反応は加温では非可逆的な反応を示したが著者の考案した濾紙に反応液を吸着せしめる test では NK193 の固有の色調に戻った。更に NK1235 ではそのいずれにも可逆性は認められな

かった。metachromasia の色調が加温によって消失し、冷却によって再び現われることは thiazine 色素による反応に於いてよく知られる現象である。これは chromatrop の表面に micelle を形成した色素 cation が、温度の上昇によって溶液中の分子の運動が激しくなるために、chromatrop から離れて単一の色素分子となるためであると考えられる。従ってこのような結合は可成り弱い結合であると云い得る。又濾紙による試験では、濾紙が水に濡れるとその表面が負に帯電することが知られている。従って色素 cation が濾紙の索引力によって chromatrop から引き離されることが考えられる。この事は紙の上に拡がる色素が、水の拡がりより遙に少く且遅いことから推測される。従って NK193 の場合は分子運動が活潑になるだけではその chromatrop との結合は妨げられないが、濾紙の静電的な力によっては離されて了うのであり、又 NK1235 の場合には、そのいずれの場合にも妨得されない変化が、chromatrop と色素との間に行われたことが推測される。

総 括

112種類の cyanine 色素について、その異染性を検討した結果、軟骨基質、臍帯間質等に異染性を示すものが多数あることを認め、その中

でも NK77, NK1235, NK2, NK498, NK193 の色素が最も著明な反応を示すことを報告した。

又試験管内で metachromasia 反応を起させて実験を行い, 反応陽性例の化学構造上の特徴について検討し, 更に cyanine metachromasia 反応の機構について検討を加えた。

(終に臨み, 終始御指導頂いた高松教授, 御援助頂いた教室員の諸氏に感謝すると共に, 色素を合成, 提供して頂いた日本感光色素研究所の小合博士並びに伴野博士に深甚の謝意を捧げます。)

引用文献

- 1) a. Kelly, J.W., *staintechinol.* 31, 275-281, 1956.

- b. Kelly, J. W., *acta histochem. suppl.* I 86, 1958.
- 2) H. Schöll, I. Bennhold, P. B. Diezel., *Histochem I. Heff* 5 1959.
- 3) 波多野, 高松, 東京医事新報, No2 934 1935
- 4) T. H. Schiebler u S. schiessler., *Histochem I.*, 6, 1959.
- 5) 伴野他, 感光色素研究所報告, 第15号 1959
- 6) 阿部泰夫他, 薬学 Vol2, No1, 1948
- 7) 星野昌一, 色彩調和と配色
- 8) Booi, H.L., *acta Histochem. Suppl. I.* 1958.
- 9) Scheibe, G. u Zanker, V., *acta Histochem. Suppl I* 1958.