

耳下腺線条部組織および脛骨々端軟骨組織変性に 関する組織化学的研究

—カシンベック病流行地飲料水の影響補遺—

千葉大学医学部第二外科教室（指導 佐藤博教授）

長 尾 孝 一

KOICHI NAGAO

（昭和 41 年 3 月 15 日受付）

目 次

I. 緒 言	
II. 実験材料	
III. 固定法および染色法	
(1) 耳下腺検査方法	(1) 耳下腺線条部組織所見
(A) 一般染色法	① Hematoxylin eosin 染色所見
① Hematoxylin eosin 染色	② Succinic dehydrogenase 反応所見
② Feulgen 反応	③ Cytochrome oxydase 反応所見
③ Methylgreen-pyronin 染色	④ Acridine-Orange 染色所見
④ Alcianblue-Hematoxylin 重染色	⑤ Alcianblue-Hematoxylin 重染色所見
(B) 酵素反応	⑥ Feulgen 反応, methylgreen-pyronin 染色所見
① Succinic dehydrogenase (SDH)	(2) 脛骨々端軟骨組織所見
② Cytochrome oxydase	① Hematoxylin eosin 染色所見
③ Acridine-orange 染色	② Alcianblue-PAS 染色所見
(2) 脛骨々端軟骨組織検査方法	③ Toluidine blue 染色所見
① Hematoxylin eosin 染色	④ Alkaline phosphatase 染色所見
② Alcianblue-PAS 染色	⑤ Acid phosphatase 染色所見
③ Toluidine blue 染色	
④ Alkaline phosphatase 染色	V. 考 按
⑤ Acid phosphatase 染色	VI. 総 括
IV. 実験結果	VII. 文 献
	付 図

I. 緒 言

Kaschin-Beck 病は、19 世紀の中頃にソ連のシベリヤ地方で発見された地方病で、Kaschin と Beck によつて初めて記載された（1906 年）。その後、本病が満州地方にも広く蔓延していることが、高森等によつて、1935 年頃より報告され始めた。殊に高森、鈴木は、本病が内分泌腺と密接な軟骨変性を特徴とする骨病であることを明らかにした。

緒方、滝沢等は実験的無唾液腺症と本病が病理形態学的に一致した所見を得、唾液腺内分泌装置に原発性の変化があることを明らかにした。

カシンベック病の原因物質についての研究は

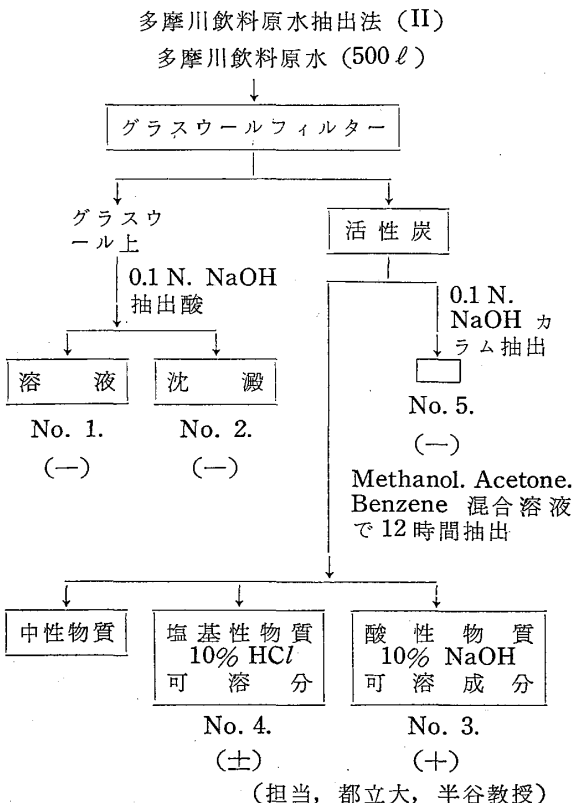
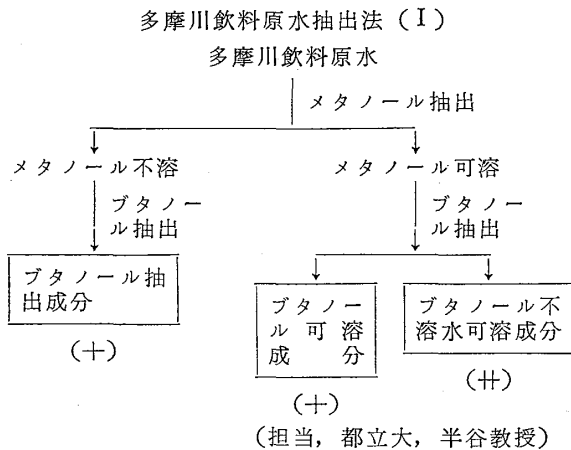
1945 年、野口、緒方、滝沢、半谷、は本病が飲料水の過マンガン酸加里消費量による有機物含量を平均すると罹患率と有機物含量とは正比例することを確かめ本病因物質は、飲料水に含まれる有機物であると推定した。

日本におけるカシンベック病に関しては、1956 年頃より滝沢等の広範囲に亘る本病の蔓延状況についての研究があり、北海道、九州その他、日本諸地域の植物異常分解成分に汚染された飲料水が耳下腺線条部組織および脛骨々端軟骨組織に変性を起こし、近年になつては、東京都内における植物腐蝕成分を多く含む丸子多摩川下流飲料水が同様な変化を起こすことを明らかにした。著者は、東京都立大学

理学部半谷教授分担による丸子多摩川下流飲料原水を用いて惹起された耳下腺線条部組織および脛骨々端軟骨組織の変性について、組織化学的検索を行なった。

II. 実験材料

上記半谷教授分担による丸子多摩川下流飲料原水をメタノール抽出後、ブタノール酸性不溶成分、および同飲料水のグラスウールフィルター濾液を活性炭に吸着せしめメタノール、アセトン、ベンゼン混合液で12時間抽出後、10% NaOH 可溶成分を70 g 前後の発育期、雑系雄ラッテ 30 匹に0.5 cc 宛、10日間連続皮下注射し、また対照群としては、生



理的食塩水を用い、注射終了5時間後に、エーテルをもつて屠殺し耳下腺線条部組織および脛骨々端軟骨組織を検索した。

III. 固定法および染色法

(1) 耳下腺検査方法

(A) 一般染色については、組織を冷ホルマリン、或いは、カルノア固定後、型のごとく、パラフィン切片について、次の染色を行なった。

① Hematoxylin eosin 染色

Mayer 氏 Hematoxylin を用いて染色を行なった。

② Feulgen 反応

冷ホルマリン固定後の薄切片を1 N, HCl で60°C, 10分, 加水分解し, Schiff 氏液に1時間入れ, 1 N HCl 10 cc と重亜硫酸ソーダ 10 cc に蒸留水を加えて, 20 cc とした液で分別, 水洗後, ライトグリーンにて対照染色を行なった。

③ Methylgreen-pyronin 染色

カルノア固定後の薄切片を脱パラ後, Methylgreen-pyronin 混合液 (Methylgreen 0.2 g, pyronin 0.2 g, 95% アルコール 2 cc および pH 4.2 醋酸緩衝液 100 cc, 混合液) にて, 10-20 分間染色し, ブタノールですばやく分別し, 透徹, 封入した。

④ Alcianblue-Hematoxylin 重染色

3% 醋酸溶で0.1% Alcianblue 溶液 ($1/10$ M, クエン酸, $1/5$ M 第2 磷酸ソーダを用いて, pH 7.0 としたもの) にて15分間染色, 水洗後, Mayer 氏 Hematoxylin 液で30秒間染色し, 透徹, 封入した。

(B) 酵素反応

組織片を-70°C 凍結後, 4-6 μ のクリオスタット切片とした。

① Succinic dehydrogenase (SDH)

Nachlas 法により Nitro Blue Tetrazolium を用い染色を行なった。

- { 0.2 M Phosphate buffer (pH 7.0)
- { 0.2 M Sodium succinate

を基質とし, この基質液と0.2% Nitro Blue Tetrazolium (SIGMA) を同量混じて, 反応液を作り37°C, 20分, 浸漬後, 10% 食塩ホルマリン液で10分固定, 水洗, アパチャーゴムシロップ (pH 7.0) で封入した。浸漬時間の1時間, 45分, 30分, 20分を比較すると, 20分が微細な変化を観察するのに, 最適であつた。

② Cytochrome oxydase.

Burstone 法により, n-phenyl-p-phenylene diamine を用いて証明した。

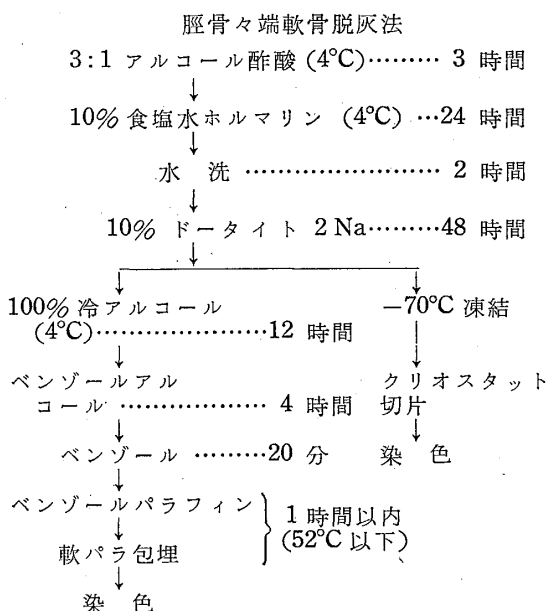
Coupler (1-hydroxy-2-naphthoic acid) 10 mg
n-phenyl-p-phenylene diamine 10 mg
ethanol (特級品) 0.5 ml
dist. water 35.0 ml
0.2 M tris buffer (pH 7.4) 150 ml

以上の液を良く混じた後、濾過する、室温で1時間浸漬後1% Cobalt acetate (10% neutral formalin を用いる) で1時間固定、水洗し、アパチーゴムシロップ (pH 7.0) で封入した。

③ Acridine-orange 染色

95% エタノール固定後、下降アルコールを経て、最後の50% エタノールより水洗に移り1% 醋酸で30秒浸漬する。直ちに蒸留水にて、30秒水洗、0.01% Acridine-orange 溶液 (pH 6.0 磷酸緩衝液) にて、15分染色を行なう。その後、pH 6.0 磷酸緩衝液にて5分ずつ3回洗滌し、0.1 M 塩化カルシウム溶液にて10分ずつ脱色、分別して、pH 6.0 磷酸緩衝液を滴下して、鏡検する。螢光装置は AHL 250, 光源フィルターとして Y 3 を使用した。

(2) 脛骨組織検査法



膝関節は3:1 アルコール、醋酸混合液で、3時間処理し、10% 食塩水ホルマリンに4°C 24時間入れた後、水洗し、同仁薬化学研究所製作の10% ドータイト 2 NA (エチレンジアミン四醋酸 2 ナトニウム) で4°C, 48時間脱灰、次いで100% 冷アルコールに12時間、ベンゾール、アルコール4時間、ベンゾール20分、52°C の恒温槽中にて、ベンゾール

パラフィン15分、軟パラ計45分入れた。後、包埋後薄切片とし染色を行なつた。また一部は、10% ドータイト 2 NA, 脱灰後、-70°C で凍結6μのクリオスタット切片とした。

① Hematoxylin eosin 染色

Mayer 氏 Hematoxylin 溶液を使用した。

② Alcianblue-PAS 染色

次の表に示す様な順序で PAS 反応後、1% Alcianblue (3% 醋酸) 染色を行なつた。

- | | | |
|---------------------|---------------|-------|
| ① 脱パラ (キシロール) | →100% アルコール | |
| | ...→70% アルコール | |
| ② リリー酸化剤 6 分 | →70% アルコール | 1 分, |
| ③ Reducer 2 分 | →70% アルコール | 1 分, |
| ④ Schiff 氏液 10 分 | →水洗 | 10 分, |
| ⑤ 1% Alcianblue 7 分 | →水洗 | 5 分, |
| | (3% 醋酸) | |
| ⑥ 磷モリブデン酸 3 分 | →水洗 | |
| ⑦ 脱水 | →封入 | |

③ Toluidine blue 染色

0.5% toluidine blue をクエン酸緩衝液にて、pH 7.0, 4.1, 2.5 の3種類をつくり、各液について染色を行なつた。

④ Alkaline phosphatase 染色

Gomori 氏のカルシウム、コバルト法により基質として、3% β-glycerophosphate を用いて証明した。脱パラは、リグロインを使用した。

3% Sodium β-glycerophosphate.....20 cc
2% Sodium diethyl barbitrate.....20 cc
Dist. water10 cc
2% CaCl₂40 cc
5% MgSO₄..... 2 cc

以上の基質液で37°C, 4時間浸漬し、水洗1分、2% cobalt nitrate 3分、水洗2分、1% ammonium sulfate 1分、水洗、脱水、封入、対照染色として、サフラニンを使用した。

⑤ Acid phosphatase 染色

Gomori 氏 Azo-dye 法によつて証明した。

Sodium-α-naphthyl phosphate 0.02 g
0.1 M acetic acid buffer (pH 5.0) 20 cc
Diazonium salt (Fast blue) 0.02 g

以上溶液を混じ、口過、22°C (室温) で浸漬、水洗後、アパチー液 (pH 7.0) にて封入した。

IV. 実験結果

(1) 耳下腺線条部組織所見

① Hematoxylin eosin 染色所見

対照群では、耳下腺線条部組織は円柱状の上皮細胞で、原形質内の線条構造は良く保たれ、基底部に規則的な配列を示し、核は円形または楕円形で正然と配列している。

実験群では、上皮細胞は扁平化し、原形質内の線条構造は不明瞭となり、大、小、不規則な空胞を有す。核は濃縮、変性萎縮し、不正円形でその配列も不規則になつている。なお、腺細胞も所々空胞を有しているものもある。

② Succinic dehydrogenase 反応所見

酵素活性は、主に線条部の胞体内に青黒色に見られ、大きい導管よりむしろ小さい導管に強い活性を示す。

対照群では、胞体内特に、内腔に接した部分と基底部に線条構造と一致して、規則的な酵素活性を示し、大きさの様な顆粒が充満している。

実験群では、大、小、不規則な顆粒が胞体内に不規則に充満し、それが乏しい部分もまた、空胞状に酵素活性が欠除している部分も認められる。また或る部の導管では胞体が膨れあがつているのも認められる。

③ Cytochrome oxydase 反応

Succinic dehydrogenase と同様に胞体内に茶褐色の酵素活性を示し、対照群、実験群、の所見は、Succinic dehydrogenase 程、明らかではないが、対照群では、内腔に面した部と、基底部に、規則的な酵素活性を示し、実験群では、大、小不規則なる顆粒が胞体内に充満していて、大体似た様な所見である。

④ Acridine-orange 染色

対照群では、線条部の内腔に面した核上部が、オレンジ色の蛍光を有し、基底部の胞体は、黄緑色蛍光を呈す。核は豊かな黄色蛍光を示している。

実験群では、核上部のオレンジ色の蛍光は全く失われ、核は黄色々調に乏しく、むしろ黄緑色に見える。なお、腺細胞については、対照群に比してオレンジ色蛍光が減少している。

⑤ Alcianblue-Hematoxylin 重染色所見

対照群における核は Alcianblue で陽性に、青緑色に染まる。

実験群では、変性萎縮核は Hematoxylin で陽性

に、淡紫褐色に染まるが、H. E 染色では未だ変性が起こっていない様に見える核も淡紫褐色に染まっている。対照群の耳下腺薄切片を脱パラ、アルコール脱水後、1 N HCl, 60°C, 60 分で処理後、Alcianblue-Hematoxylin 染色を行うと、Hematoxylin で淡紫褐色に染る核が増加し、実験群における所見と似て来る。

⑥ Feulgen 反応, methylgreen-pyronin 染色, の所見

Feulgen 反応では、対照群、実験群の間に核の染色性の差異は認められない。

Methylgreen-pyronin 染色では、対照群では、核の緑色々調は豊かであるが、実験群では、核の緑色々調に乏しい。

以上の耳下腺線条部組織の所見は、H. E 染色では、未だ、変性像が明らかでない程度においても、既に認められる所見である。

(2) 脛骨々端軟骨組織所見

① Hematoxylin-eosin 染色所見

対照群では、骨端軟骨層の発達は良く、増殖層、肥大層は規則的な配列を示し、軟骨細胞は、胞体豊かで、核の変性萎縮なく、骨梁はまっすぐに伸びて、軟骨突起形成、骨形成も良好である。

実験群では、骨端軟骨層の軟骨細胞に変性萎縮を呈するものが多数あり、そのために増殖層の配列の乱れや、肥大層の軟骨細胞は、大、小不規則となり、大、小、異なる空胞を有する、この為、増殖層、肥大層の巾が狭小となつている。骨梁は乏しくなり、石灰化した軟骨突起の数も少なく、所謂、“Knorpel Insel” があり、骨梁の形成不全や、強い吸収像を呈し、不規則に屈曲して發育するため、横走するもの、H型をなすものもある。

② Alcianblue-PAS 染色所見

対照群の骨端軟骨層では、軟骨細胞および、基質が Alcianblue で陽性に青色を呈するが、その傾向は、増殖層に強く、肥大層にやや弱い。軟骨細胞の原形質は均等に染色され、細胞被膜も規則的に染まっている。基質は、一部 Alcianblue と PAS で共に染まり赤紫色を呈する所もある。まっすぐ伸びた骨梁は石灰化が良く骨組織は PAS で桃色に染まっている。

実験群では、肥大層の軟骨細胞の胞体内には、大、小不同の空胞が対照群に比して多く見られ、その青色々調は減少しており、基質においても同様である。

③ Toluidine-blue 染色所見

対照群における骨端軟骨層の軟骨細胞、基質および、未だ石灰化を起していない骨梁では pH 7.0, 4.1, 2.5 の何れにおいても、Alcianblue 陽性の部分に一致して、明らかな Metachromasie を起こしているが、実験群では、対照群における秩序だつた軟骨の発育がみられぬことと相俟つて、軟骨の染色性に乱れがあり、骨梁の軟骨突起形成が不良で横骨梁を呈するものや、Knorpel Insel, の部分が明らかに Metachromasie を示している。

④ Alkaline phosphatase 染色所見

対照群では、骨端軟骨層の増殖、肥大層の軟骨細胞に酵素活性を認め、基質は弱陽性である。肥大層の軟骨細胞では、軟骨細胞被膜は一様に、規則的に活性（黒褐色）を示すが、実験群の肥大層では、反応陰性の軟骨細胞が混じている。

⑤ Acid phosphatase 染色所見

対照群では、骨端軟骨層の軟骨細胞の胞体内に活性を示し（黒褐色）、そして、その活性の強さは、増殖層から肥大層に移るにつれて弱くなっている。その他、骨破壊細胞に活性を認める。

実験群では、対照群と酵素活性の強さを比較するには、増殖層は酵素活性は高いため、見分け難いので、肥大層の軟骨細胞の活性の強さを比較すると、同部の軟骨細胞の酵素活性は対照群に比して減少し且つ、不規則な染り方を呈している。

V. 考 按

耳下腺の研究は黒沢 (1922) が高令者消耗疾患で耳下腺の腺細胞の脂肪変性について報告したのが始まりである。

耳下腺と骨の関係については、伴、滝沢 (1935) は白鼠の耳下腺導管結紮によつて、体重の減少と軟骨細胞の変性萎縮、骨芽細胞の減少が起ることを報告している。

カシンベック病と飲料水との関係については、1943 年、野口、緒方、滝沢等は満州の京田線沿線の本病陰性地 38 カ所、本病陽性地 42 カ所について、その井戸水の物理的、化学的变化を本病罹患の程度によつて 4 段階に分けて比較すると、物理学的ならびに無機物含量については、ほとんど差異は認められないのに対して、過マンガン酸加里消費量で示される水の有機物の含量が本病罹患と正の直線に近い平行関係を示したことから、本病の病因物質は飲料水中の有機物であると発表した。

日本におけるカシンベック病の研究は初め阿蘇火山病すなわち阿蘇地方の青年の成長期化骨異常を呈する疾患の検索に端を発している。この所見は満州におけるカシンベック病ならびに無唾液腺症の骨所見に類似しているので、本病は唾液腺内分泌と密接な関係にあるものとされている。

カシンベック病流行地飲料水を用いての動物実験は 1951 年滝沢、井出等が満州のカシンベック病蔓延地 3 カ所の地下水を 50 倍に濃縮し成長期の白鼠に皮下注射 (1—14 回注射) しその唾液腺線条部上皮細胞の変性、萎縮、崩壊、骨端軟骨細胞の変性、骨梁の吸収像その他の変化がカシンベック病の初期像に質的に一致していると述べている。

その後、滝沢等は日本各地におけるカシンベック病流行地の飲料水濃縮液を用いて動物実験を行ない同様な所見のあることを発表している。

Succinic dehydrogenase は Succinic acid の水素を適当な受容体に transfer し fumaric acid に酸化させることを触媒するきわめて広く分布して見出される酵素で Nitro Blue Tetrazolium による標本の電顕的観察によつて、Sedar et Burde (1965), Leene (1965) 等は Mitochondria 中のかなり詳しい局在性を見ている。

Cytochrome oxydase は Succinic dehydrogenase と同様、Novikoff (1959), Nachlas (1958) に依れば、Mitochondria に存する。

耳下腺線条部組織は、Mitochondria に富み、殊に胞体内線条構造の部分には、諸家の電顕像で判る様に Basalinfolding に隣接して、Mitochondria が規則的な配列を示している、このため Succinic dehydrogenase および Cytochrome oxydase 反応を用いて観察して見ると、原形質内基底部に、規則的な酵素活性として、認められる。実験群では、この酵素活性陽性顆粒 (Mitochondria) は不規則な配列となり、大、小不同な顆粒として認められる。この所見は、線条部上皮細胞が毒素のために、Mitochondria の変性を起こし、膨大し、その配列は乱れ、数個の Mitochondria が一塊となつて、この様な不規則な顆粒状を呈し、Mitochondria が完全に変性に陥り、酵素活性の減退が推定される。

Acridine-orange 染色については、1956 年 von Bertalanffy 等が固定組織細胞を酸性領域で A. O 処理後、さらに塩化カルシウムで分別することにより、核は黄色螢光を、細胞質は赤色螢光を呈し、それぞれ、DNA, RNA, によるものであることを見

出した。

本実験においては、対照群では、内腔に面した核上部原形質がオレンジ螢光を呈し、核の黄色螢光が豊かなのに対し、実験群では、核上部原形質のオレンジ色調が失われ、核の黄色螢光が乏しくなる。この所見は、上皮細胞の変性により核上部原形質の RNA が減少し、核の DNA と共に減少して、染色性の変化として、表われるものと考えられる。

Alcianblue は phthalocyanine 群に属する塩基性色素で Steedman (1950) に依つて導入され、Metachromasie と同様な証明の染色法であるとされている。大野 (1951) によれば、Toluidine blue をクエン酸緩衝液で pH 7.0, 4.1, 2.5 の3段階で染色すると、DNA の内、高重合のものは、pH 7.0 で Metachromasie を示すが pH 4.1 以下では起こさない、低重合のものは、pH 7.0, 4.1, 2.5 の3段階すべて Metachromasie を起こすという。

本実験においては、対照群では、核は Alcianblue (pH 7.0) で陽性に染まる。次に、対照群を Pears 等により 1 N HCl, 60°C, 60 分で処理後、Alcianblue-Hematoxylin 重染色を行なうと、核は Hematoxylin で陽性に染り、実験群と似た所見となる。また、Methylgreen-pyronin 染色では対照群で核は緑色々調が豊かであるが、実験群では、核は緑色々調が乏しい。Feulgen 反応では、対照群、実験群共に核の染色性は同じである。

以上の所見から対照群の核は Alcianblue (pH 7.0) で淡青色に染まり高重合の DNA が主であると考えられるが、実験群では、核の DNA は解重合し、Hematoxylin で淡紫褐色に染まり低重合の DNA が主となる。また、対照群を 1 N HCl, 60°C, 60 分で前処理により DNA の解重合を起こすと、Hematoxylin で陽性に染まる核が見られることと共通する所見である。そしてこの状態は、Acridine-orange では、核の黄色螢光の減退、また Methylgreen pyronin 染色では核の緑色々調の減退として、認められる、しかし、この状態では Feulgen 反応では、両群において染色上の差異を見ないことから上記の各種染色による DNA の変性は核の初期変化として重要な所見と考えられる。

II. 脛骨々端軟骨組織

本実験においてみられる、耳下腺線条部の変性とそれにもとづいた、脛骨々端軟骨層の軟骨細胞の変性萎縮、軟骨層の狭少、骨梁の軟骨突起の形成不全、等がみられたが、この所見は、滝沢等の研究と

一致している。

Alcianblue-PAS, Toluidine blue の所見については、本実験において、対照群では、軟骨層の軟骨細胞の原形質および基質（一部、中性多糖類も含まれ、その部分は赤紫色に見える）にコンドロイチン硫酸と考えられる Alcianblue 陽性物がむらなく均等に染色され、肥大層から骨梁に移行する部分では、軟骨突起の形成が良く、骨梁はまっすぐに伸び化骨も進んでおり、PAS 反応陽性となつている。この PAS 反応陽性部は toluidine blue の各 pH で陰性となる。実験群では、軟骨層において、軟骨細胞々体内にコンドロイチン硫酸（Alcianblue 陽性物質）の減少が見られる。また、基質の PAS 陽性物質（酸性粘液多糖類と結合した中性多糖類）の減少もある。肥大層から骨梁に移行する部分では、軟骨突起の形成不全があり、骨梁には所謂、軟骨島が見られる、この変化は toluidine blue の Metachromasie から推定される。

酸性粘液多糖類と化骨機転については、Sobel, Burger (1954) は酸性粘液多糖類は化骨機構の不活化を生ぜしめる。すなわち実験的に toluidine blue 溶液中に Ca イオンが約 15 mg/L 濃度では Metachromasie は増加するが、それ以上の濃度だと減少するそしてある一定濃度で化骨と Metachromasie は平行するが Ca イオンが増加すると、Metachromasie は破壊され、化骨は促進するという。また、林 (1959) は、実験的に唾液腺内分泌異常を起させた白鼠で、無唾液腺症では骨端部で Ca^{45} の減少を認めている。

本研究における実験群では、軟骨細胞の変性、萎縮が起こり、軟骨細胞のコンドロイチン硫酸を作る能力の減少、すなわち Sobel, Burger の実験から考えて、Ca 沈着を早め、早期化骨を生ぜしめる、このため、軟骨層は狭少となり、軟骨突起の形成不全が起こり、骨梁においては、Knorpel Insel を形成する、この結果骨梁において、Ca 沈着が完全に行なわれなくなり、不規則な Ca 沈着は横骨梁形成の原因となるという考え方の根拠となる。

本実験においては、Alkaline phosphatase 染色は、対照群では、軟骨層の基質と、増殖層、肥大層の軟骨細胞に酵素活性を見、また、肥大層の軟骨細胞被膜に一樣の酵素活性を示した。

実験群では、肥大層の軟骨細胞は、その被膜に不規則なる酵素活性を示すものや、酵素活性陰性のものもある。

Acidphosphatase 染色は対照群では、軟骨層に、酵素活性を示し、その活性は増殖層から肥大層に行くにつれて、やや弱くなっている。

実験群では、肥大層の軟骨細胞は、対照群に比して、酵素活性が減少しているものや、不規則な酵素活性を示すものもある。骨破壊細胞の酵素活性は、対照群に比して、高まっている様に思える。

Alkaline phosphatase については、Bevelander および Johnson (1950) は、豚の胎児で、石灰化に先立つて、骨芽細胞、軟骨細胞に Alkaline phosphatase が出現すると述べている。久保、高松 (1951) は、細胞に退行変性が生ずれば、Alkaline phosphatase は減少、消失すると発表している。玉真 (1963) は、白鼠の無唾液腺症で骨端軟骨層の Alkaline phosphatase を観察して、軟骨細胞に、その減少を認めた。

Acid phosphatase については、Schajowicz et Cubrini (1958), Burstone (1958, 1959) は Acidphosphatase は増殖層、肥大層の軟骨細胞と骨破壊細胞に酵素活性を認め、骨組織の吸収作用に関係があるのではないかとしている。

本実験においては、上記の考察によりその骨端軟骨層における軟骨細胞の酵素活性の著明な減退が推定され、第一次骨梁形成層の骨破壊細胞の酵素活性の亢進が推定された。

VI. 総 括

本実験により多摩川飲料原水をメタノール抽出後、ブタノール酸性不溶成分、および同飲料水のガラスウールフィルター濾液を活性炭に吸着せしめ、メタノール、アセトン、ベンゼン混合液で 12 時間抽出後、10% NaOH 可溶成分を 10 日間、70 g 前後の雑系雄ラッテに連続皮下注射により、耳下腺線条部組織の明らかな変性が起こり且つこの変性が骨端軟骨層の変性を起こすという今日までの多くの業績と一致して、本実験においても脛骨々端軟骨組織の変性も証明された。しかも耳下腺線条部の変性をその初期において、組織化学的検索によつて明らかにすることが出来た。Succinic dehydrogenase 反応では、Succinic dehydrogenase 陽性顆粒 (Mitochondria) は耳下腺線条部上皮細胞では大、小、不同となり、不規則な配列を示し、そこに酵素活性の減少を認めた。Cytochrome oxydase もその活性の減少を見た。Acridine orange 染色では、上記の上皮細胞の内腔に面した核上部の原形質のオレンジ

色陽性の RNA が消失し、核には黄色螢光陽性の DNA が乏しい。

Alcianblue-Hematoxylin 重染色では、Hematoxylin で陽性に染まる核が増加し、対照群を 1 N HCl, 60°C, 60 分、処理による DNA 解重合と同様の所見で、DNA の重合の低下が証明された。

以上の耳下腺線条部組織の所見は、H. E 染色では、未だ、明らかでない初期変性期においても、既に証明せられる所見である。

一方、脛骨々端軟骨組織については、Alcianblue-PAS, Toluidine blue (pH 7.0, 4.1, 2.5) 染色で対照群に比して、肥大層の軟骨細胞に、大、小不同の空胞を多く認め、その胞体と基質との Alcianblue 陽性物質の不規則な減少を認めた。Toluidine blue 染色では、軟骨層から骨梁に移る部分で、軟骨突起の形成不全が明瞭に認められる。Gomori 氏カルシウムコバルト法による Alkaline phosphatase では軟骨細胞被膜の酵素活性は不規則となり、全く染まらないものもある。

Azo-dye 法による Acidphosphatase では、肥大層の軟骨細胞は対照群に比して、その酵素活性の減少を認め、これに対して、骨破壊細胞では、対照群に比して、その酵素活性の増強を認めた。

以上の所見は唾液腺内分泌障害の研究上その初期変化の組織化学的証明ならびに汚染飲料水によるカシンバック病毒素の判定上重要な根拠を提示するものと考えられる。

稿を終るに臨み、終始、御懇篤なる御指導を賜りました佐藤博教授、病理学教室滝沢延次郎教授、林 豊助教授に衷心より感謝の意を捧げ、また御援助下さった、都立大学半谷教授、三浦学士、病理学教室岩瀬秀一博士、鈴木博一学士、熊本大学医学部病理学教室、川瀬教授に感謝致します。

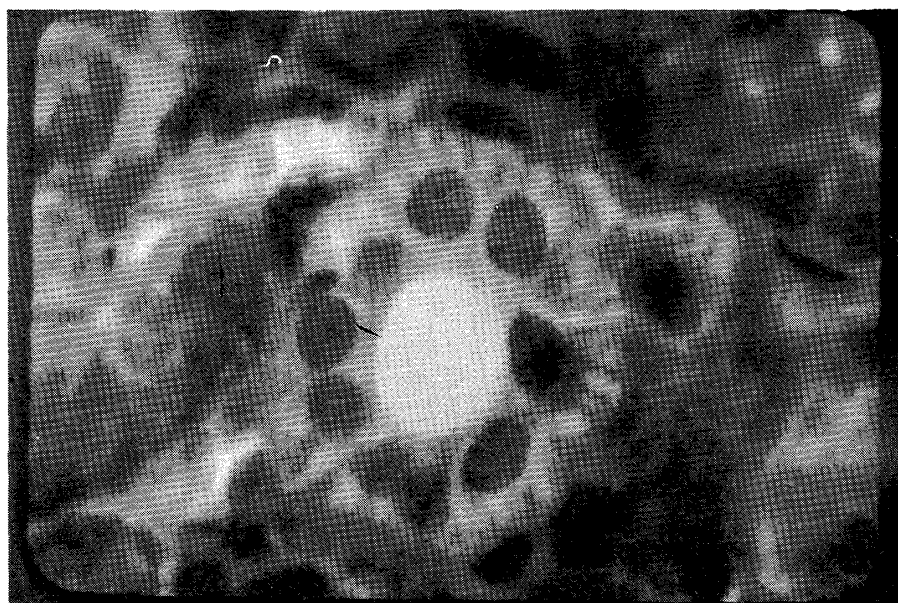
本論文の要旨は、第 54 回日本病理学会総会および第 10 回唾液腺シンポジウムに発表致しました。

VII. 文 献

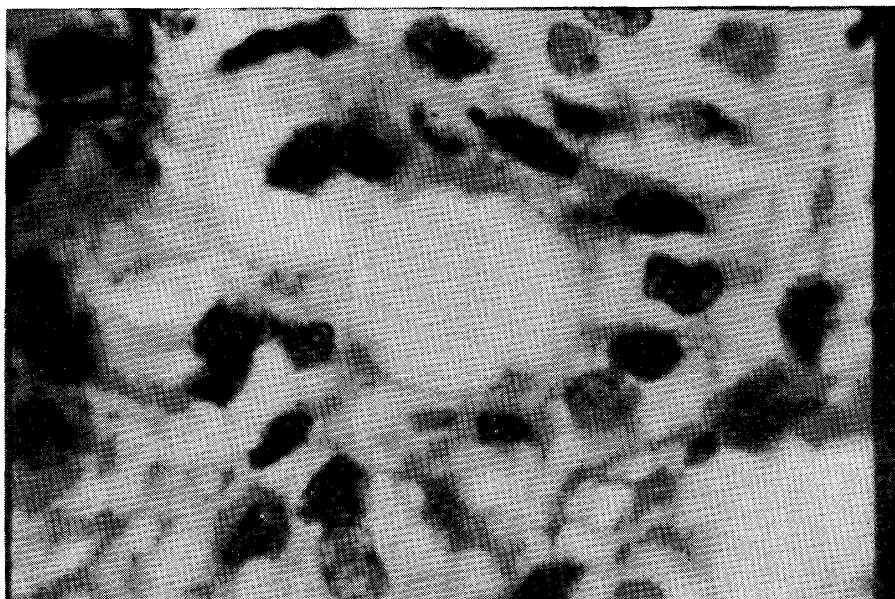
1. 黒沢佐仲：口腔唾液腺の研究，1，脂肪問題について，日病会誌，12，377-387，1962。
2. 伴 俊男・滝沢延次郎・草野信男：唾液腺内分泌と骨の発育生長の研究（第一報）日病会誌，25，510-511，1935。

3. 伴 俊男・滝沢延次郎・草野信男・速水 決：
唾液腺内分泌と骨の発育生長の研究（第二報）
日病会誌，26，529-530，1936.
4. 滝沢延次郎・草野信男・平山次郎・石井善一郎
・松本武四郎・遠藤兼相：唾液腺内分泌と骨
の発育生長の研究（第三報）
5. 湯浅 幸：唾液腺線条部の吸収作用に関する
実験的研究，日病会誌，30，244 1940.
6. 緒方知三郎・滝沢延次郎・若林 修・太田邦夫
・唐笠正二・福島万寿雄・平井正民・川瀬五郎
・孫錫璞・郭鳳来：Kaschin-Beck の研究（第
一報）日病会誌，31，278-284，1941.
7. 緒方知三郎・滝沢延次郎・若林 修・太田邦男
・唐笠正二・竹内 正・橋本敬祐・福島万寿雄
・平井正民・川瀬五郎・孫錫璞・郭鳳来：
Kaschin-Beck 病の研究（第三報）。Kaschin-
Beck 病の病理解剖学的知見補遺，第一唾液腺
所見について，日病会誌，32，448-452，1942.
8. 波多野輔久・杉本秀一・川上 淳・荒武富義：
阿蘇火山病の研究（第一報），火山灰中毒を思
わしむる，人体および牛馬の班状菌其他症状
について，日病会誌，32，453-457，1942.
9. 野口喜三郎・緒方知三郎・滝沢延次郎・若林
修・太田邦男・竹内 正・橋本敬祐・福島万寿
雄・鈴木造平・平井正民・川瀬五郎・孫錫璞・
鳥居鉄也：カシンベック病の研究（第6報），
カシンベック病の原因学的研究，第一，流行地
および非流行地における地球化学的研究，日病
会誌，33，328-332，1943.
10. 井出源四郎・伊藤弘完・野坂謙二・野口喜三郎：
カシンベック病の研究（第11報）流行地飲料
水の注射実験，日病会誌，40，102-103，1951.
（総会号）
11. 滝沢延次郎・井出源四郎：唾液腺内分泌の実
験的研究（第一報）日病会誌，41，351-353，
1952，地方号
12. 滝沢延次郎・野口喜三郎・弘法健三・松井正直
・山岸三郎・半谷高久・岩崎 勇・長尾孝一：
日本における Kaschin-Beck 病の研究（第10
報）日本における本病の新流行地と本病の病因
に関する研究，第54回日本病理学会総会記事
（1965）
13. 滝沢延次郎：日本におけるカシンベック病に
ついて 唾液腺シンポジウム，6，42-48，1964.
14. 滝沢延次郎：Kaschin-Beck 病，殊にその日
本における分布とその予防と治療，医学のあゆ
み，37，331-344，1961.
15. 玉真俊一：唾液腺内分泌障害における骨端軟
骨組織の組織化学的研究，千葉医学会誌，39，
330-336，1963.
16. 林 豊：放射性同位元素による唾液腺内分
泌の研究，千葉医学会誌，35，1273-1285，1959.
17. Burstone, M. S.: New histochemical tech-
nique for the demonstration of tissue
oxidase (Cytochrome oxydase), J. Histochem.
Cytochem. 7, 112-122, 1959.
18. Pears, A. G. and Scharpelli, D. G.: Cyto-
chemical localization of succinic dehydro-
genase in Mitochondria from Periplaneta
americana, Nature (London), 181, 702-703,
1958.
19. Albert, W. Sedar and Ronald M. Burde:
The demonstration of the succinic dehydro-
genase system in Bacillus subtilis using
tetranitroblue tetrazolium combined with
techniques of Electron Microscopy, J. Cell.
Biol. 27, 53-66, 1965.
20. Walker, O. G. and Seligman, A. M.: For-
malin fixation in the cytochemical demon-
stration of succinic dehydrogenase of mito-
chondria, J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 415-
428, 1961.
21. Von Bertalanffy, L. et al.: Use of acridine
orange fluorescence technique in exfoliative
cytology, Science. 124, 1024-1025, 1956.
22. Bevelander, G. and Johnson, P. L.:
A histochemical study of the development
of membran bone, Anat. Rec. 108, 1-21,
1950.
23. Gomori, G.: Microchemical demonstration
of phosphatase in tissue sections. Proc.
Soc. Exp. Biol. 42, 23-26, 1939.
24. 久保久雄・高松英雄：解磷酵素の組織化学的
研究，日病会誌，40，1-9，（昭和26）
25. Burstone, M. S.: Histochemical demon-
stration of acid phosphatase activity in
osteoclasts, J. Histochem. Cytochem. 7, 39-41,
1959.
26. Schajowicy, F. and Cubrini, R. L.: Histo-
chemical localization of acid phosphatase

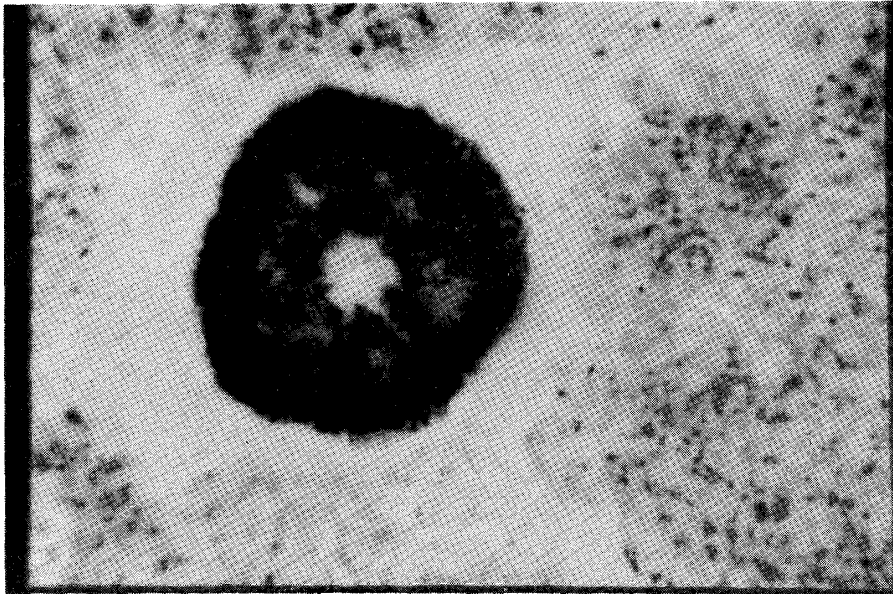
- in bone tissue, *Science*, **127**, 1447-1448, 1958.
27. **Pritchard, T. T.:** A Cytological and histochemical study of bone and calfilage formation in the rat, *J. Anat.* **86**, 259-277, 1952.
28. **Morse, A. and Grup, R. O.:** Effect of abnormal metabolic states upon histochemical distribution of alkaline phosphatase in the tibia of albino rat, *Ant. Rec.* **111**, 193-220, 1951.
29. **Sobel and Burger:** Investigation of the role of chondroitin sulfate in the calcifying mechanism, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **87**, 2-23, 1954.
30. 大野 乾・野附 巖・川井忠和：酸性多糖類の組織化学的研究，ヒアルロン酸の組織化学的確認法，*医学と生物学*, **19** (6), 326-328, 1951.
-



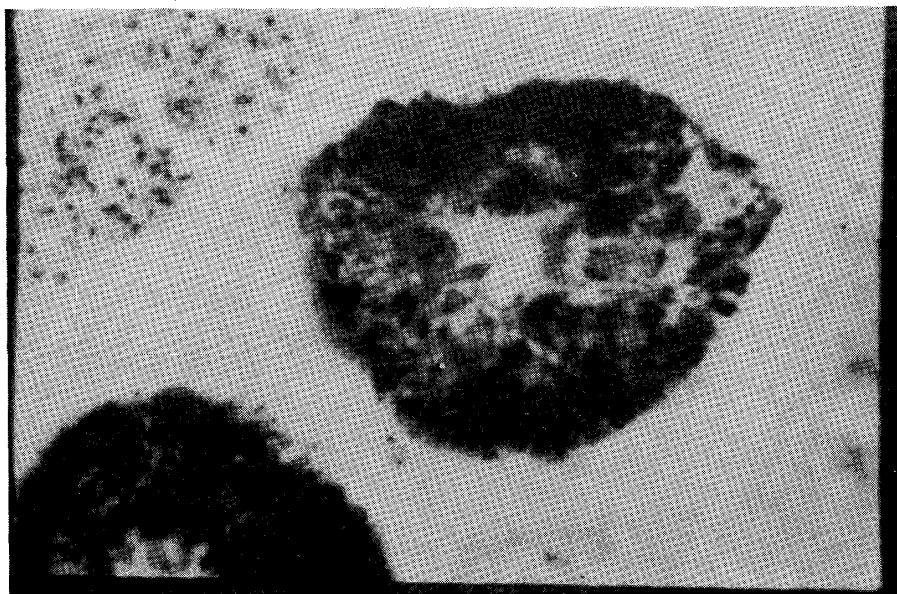
対照群，耳下腺線条部組織，H・E染色，線条構造は良く保たれ，核は円型で，整然と配列している。



実験群，耳下腺線条部組織，H・E染色，線条構造は不明瞭となり，核は変性萎縮におちいり配列が不規則になっている。



対照群，耳下腺線条部組織，コハク酸脱水素酵素反応，胞体内特に，内腔に接した部分と基底部に線条構造と一致して，規則的な酵素活性を示し，大きさの様な顆粒が充満している。



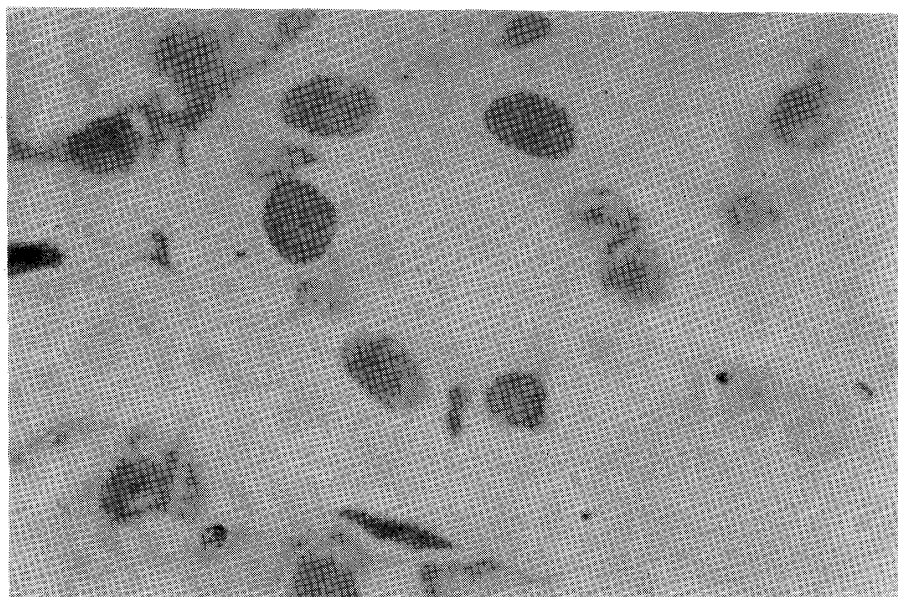
実験群，耳下腺線条部組織，コハク酸脱水素酵素反応，大，小不規則な顆粒が胞体内に不規則に充満し，それが乏しい部分も又，空胞状に酵素活性が欠除している部分も認められる。



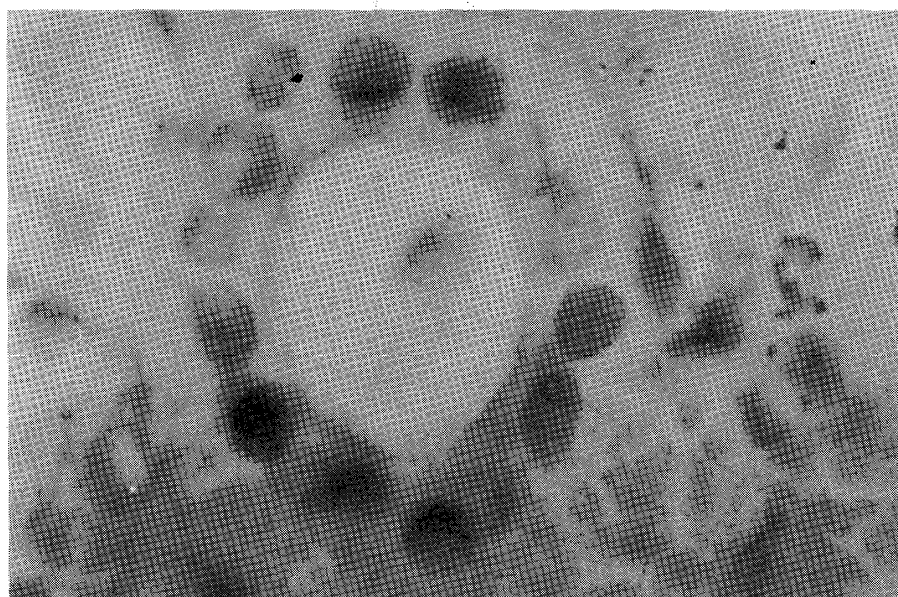
対照群，耳下腺線条部組織，Acridine-Orange 染色，線条部の内腔に面した核上部が，オレンジ色の螢光を有し，基底部の胞体は黄緑色螢光を有す，核は豊かな黄色螢光を示している。



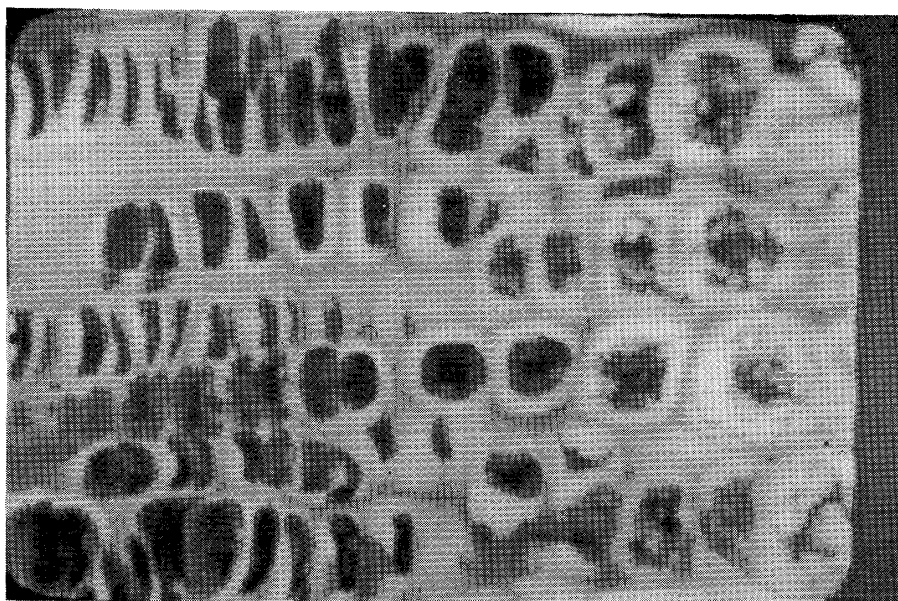
実験群，耳下腺線条部組織，Acridine-Orange 染色，核上部のオレンジ色の螢光は全く失なわれ，核は黄色々調に乏しく，むしろ黄緑色に見える。



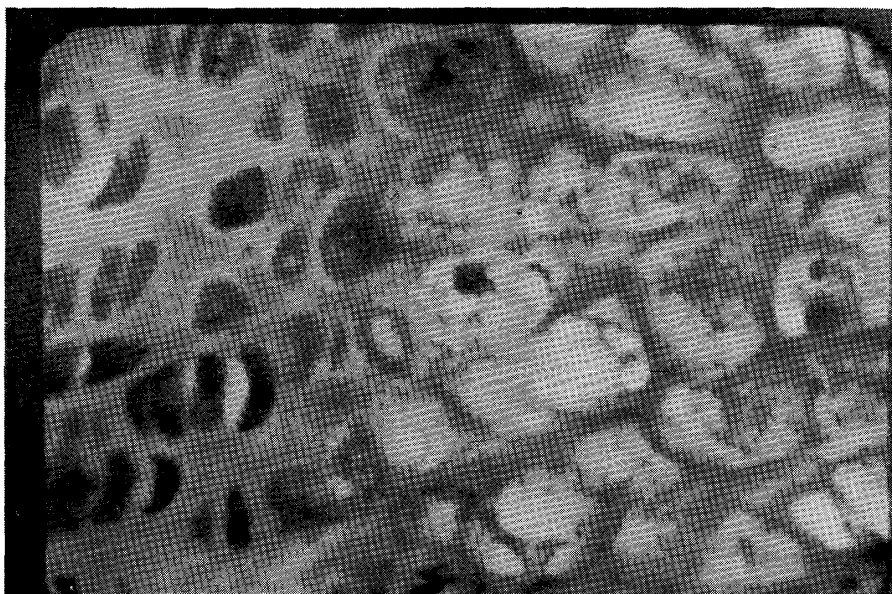
対照群，耳下腺線条部組織，Alcianblue-Hematoxylin 重染色，核は Alcianblue で陽性に青緑色に染まる。



実験群，耳下腺線条部組織，Alcianblue-Hematoxylin 重染色，変性核は Hematoxylin で陽性に，淡紫褐色に染まる。



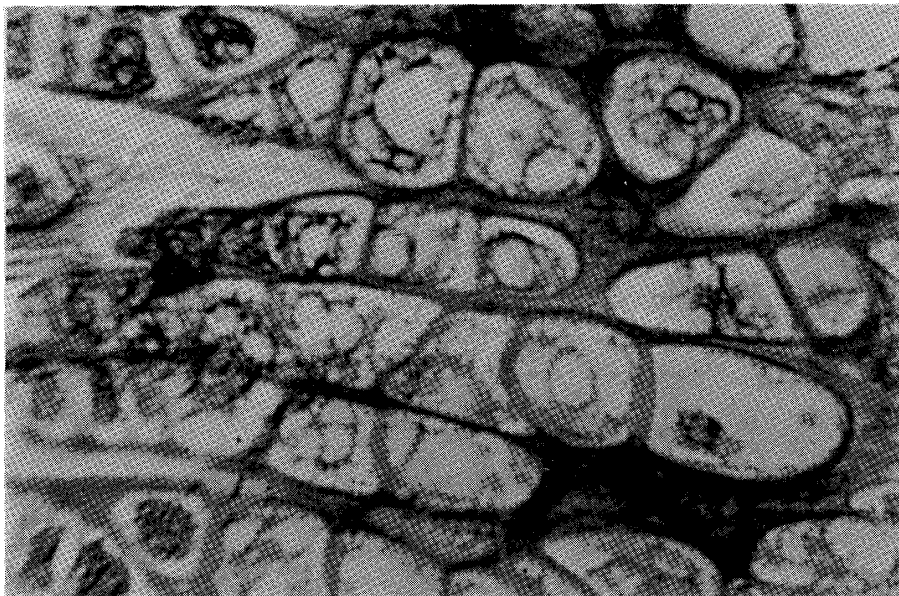
対照群，脛骨骨端軟骨組織，H・E染色，骨端軟骨層の発達は良く，増殖層，肥大層は規則的な配列を示し，軟骨細胞は胞体豊かであり，原形質の網状構造緻密である。



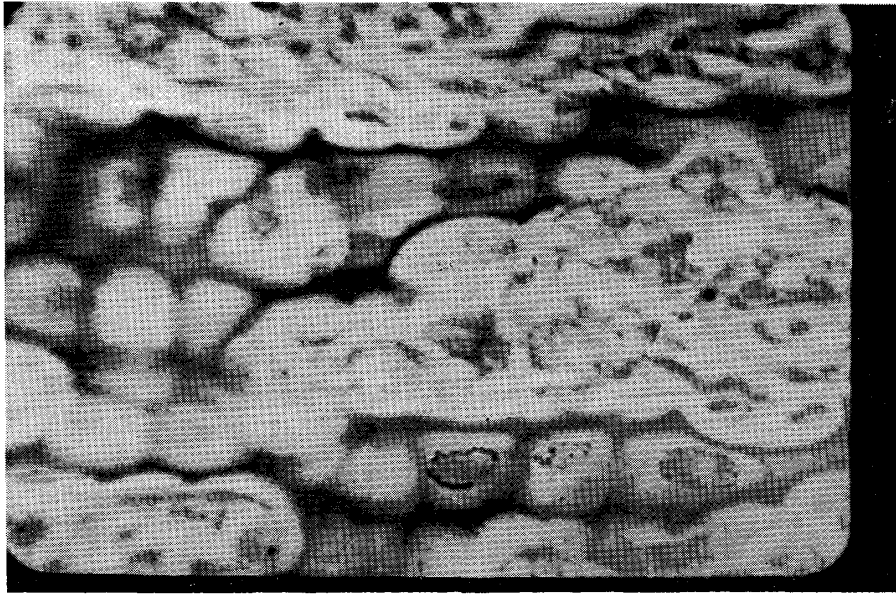
実験群，脛骨骨端軟骨組織，H・E染色，肥大層の軟骨細胞に不規則な空胞変性がある。



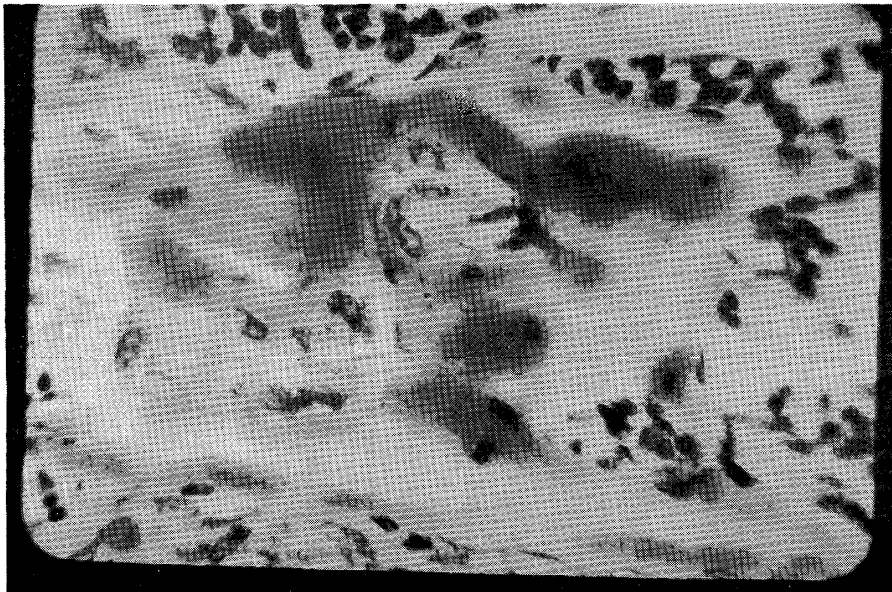
対照群，脛骨骨端軟骨組織， Alcianblue-PAS 染色，肥大層の軟骨細胞の原形質は Alcianblue で密に網状に染まっている。



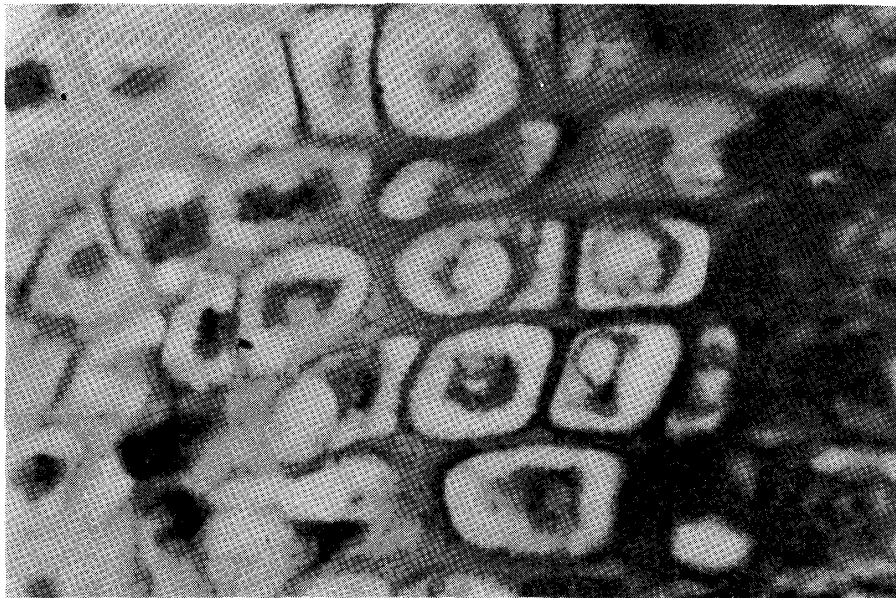
実験群，脛骨骨端軟骨組織， Alcianblue-PAS 染色，肥大層の軟骨細胞の原形質に，大，小不同の空胞が対照群に比して多く，その青色々調は減少している。



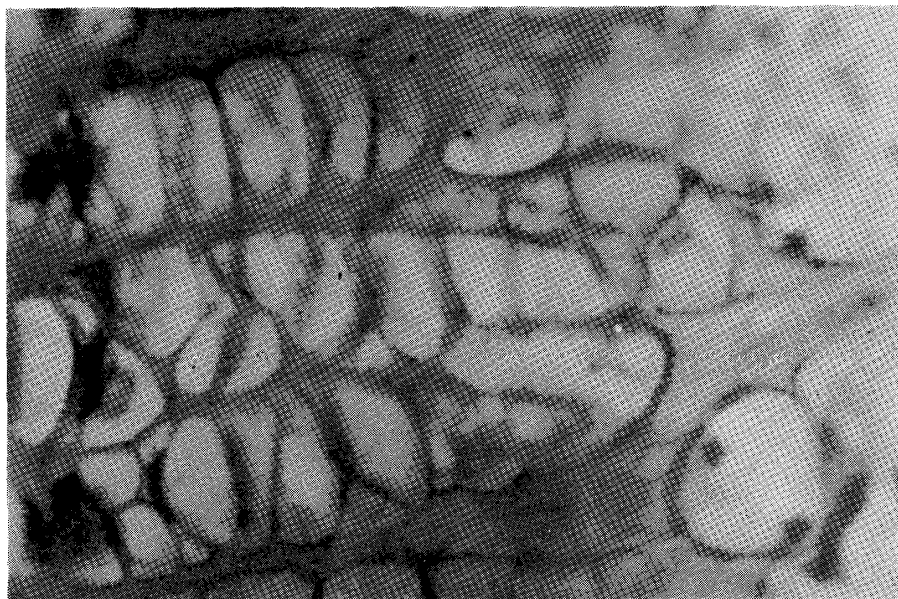
対照群，脛骨骨端軟骨組織， Toluidineblue 染色，骨梁は，まっすぐに伸び，軟骨突起の形成が良い。



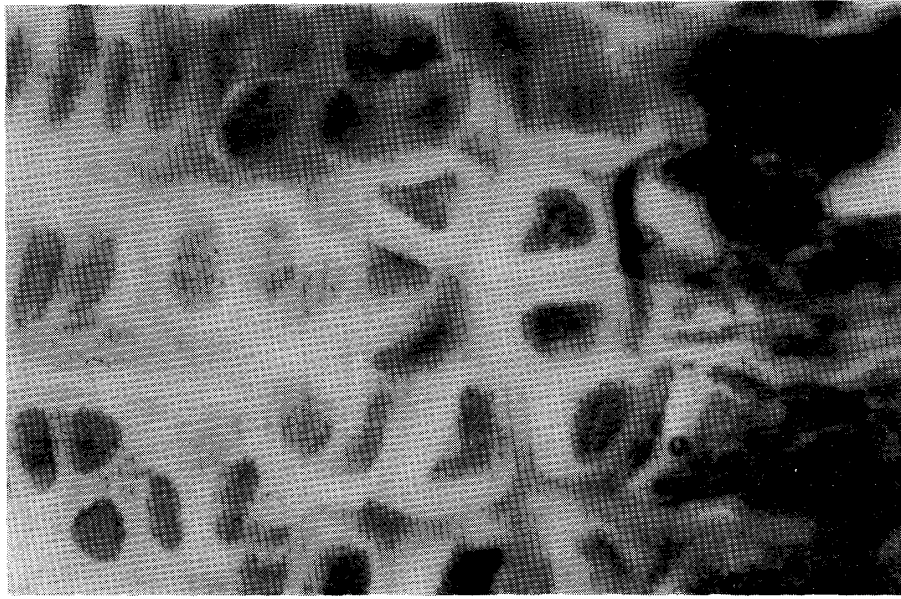
実験群，脛骨骨端軟骨組織， Toluidineblue 染色，横骨梁形成と，軟骨突起形成不全がある。



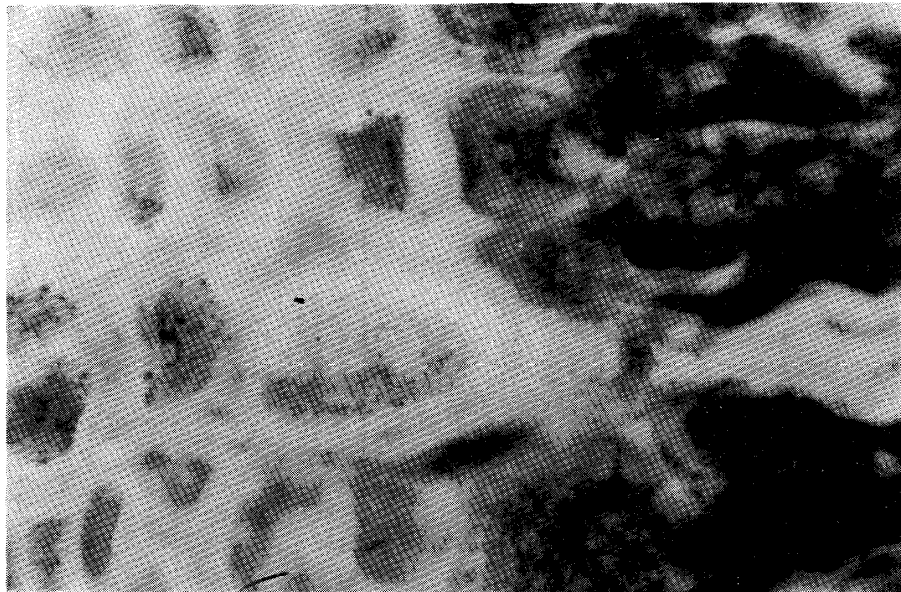
対照群，脛骨骨端軟骨組織，アルカリフォスファターゼ染色，肥大層の軟骨細胞被膜が
一様，規則的の酵素活性を示す。



実験群，脛骨骨端軟骨組織，アルカリフォスファターゼ染色，肥大層の軟骨細胞被膜の
酵素活性が不規則である。



対照群，脛骨骨端軟骨組織，酸性フォスファターゼ染色，肥大層の軟骨細胞の酵素活性一様，且つ著明。



実験群，脛骨骨端軟骨組織，酸性フォスファターゼ染色，肥大層の軟骨細胞の腫大と酵素活性の減少。