

京 都 大 学

結 核 研 究 所 紀 要

第 7 卷 第 2 号 増刊号

原 著

結核性肺病巣に於けるカルシウム塩の沈着機序に関する研究

[第 1 篇] 結核性肺病巣に於けるカルシウム塩の分布状態

京都大学結核研究所外科療法部 (主任 教授 長石忠三)

吉 田 誠

(受付 昭和33年 9 月20日)

目 次

緒 論

第 1 章 人の切除結核肺に於けるカルシウム塩の分布状態

第 1 節 実験材料並びに実験方法

第 2 節 実験成績

第 3 節 本章小括

第 2 章 燐酸基並びにカルシウムの各種

染色方法の検討

第 1 節 実験材料並びに実験方法

第 2 節 実験成績

第 3 節 本章小括並びに考按

第 3 章 綜括並びに考按

結 論

緒 論

肺結核病巣に於けるカルシウム塩の種類、分布状態、特にその沈着機序に関しては古来多くの学者による研究があり、多くの説が報告されている。

これ等は永井²²⁾の分類によると、次の4つに纏められる。即ち、1), コレステリン脂肪の分解により生じた脂肪酸が脂肪酸カルシウムの形で沈着するとする説 (Klotz,¹⁷⁾ Aschoff²¹⁾), 2), 組織内に遊離した燐酸基にカルシウムが結合し、沈着するとする説 (Robinson²⁸⁾, Wells and Long¹⁴⁾), 3), 2) の場合の燐酸基の由来を主として核酸に求める説 (服部¹²⁾,¹³⁾, 田村³¹⁾), 4), 糖蛋白質変性物質を基核とする

説 (西山²³⁾, 影山¹⁶⁾) 等である。

著者は、結核性肺病巣の生化学的並びに組織化学的研究の一環として、結核性肺病巣に於ける燐酸基並びにカルシウムの組織化学的検索を行う中、カルシウム塩の分布状態に2種類あり、その組織化学的性状にもいろいろ異なる点が多いことに気附いた。そこで、その各々の差違を組織化学的に追求することは、結核性肺病巣に於けるカルシウム塩の沈着の機序を解明することになると考え、実験的動物結核肺を対照としながら新鮮な人の切除結核肺に就いて検索し、カルシウム塩に関する諸問題を解明すると共に、カルシウム塩の沈着機序に就いても検討を加えたいと考えた。

結核性肺病巣に於けるカルシューム塩沈着の機序は、その反応の順序に従つて問題となる点を羅列して行くと次の通りになる。

即ち、1), カルシュームと塩を作る酸基の種類とその由来及びその存在の状態, 2), 結核性肺病巣のカルシューム塩沈着には基核が必要か否か, もし必要とすればその基核は何か, 3), 結核性肺病巣のカルシューム塩沈着に關与する諸因子及びそれ等と沈着の時期に於ける關係, 4), カルシューム塩が安定する為の条件等である。

結核性肺病巣に於けるカルシューム塩の大部分は、磷酸カルシュームである為、磷酸基に特異性のある染色法とカルシュームに特異性のある染色法とによつて、2つの方向から結核性肺病巣に於けるカルシューム塩の分布状態が検索されねばならない。

そこで、著者はこれ等を検討する為、先づ第1篇に於いて磷酸基並びにカルシュームに対する各種染色法により、人の新鮮な結核性肺病巣に於けるカルシュームと塩を作る各種の酸基の種類及びその分布状態を組織化学的に検討し、カルシューム塩の沈着機序に就いても一部言及している。

組織化学の本来の使命は、組織の形態学とその化学的組成の同時性解明にある。

結核性肺病巣のカルシューム塩に關する諸問題は、組織形態学的にのみ探究しても、又化学的見地からのみ探求しても、その問題の本質には到達し得ないと思われる。形態学的検索と化学的検索とが結び合つて、始めてカルシューム塩に關する諸問題が解明されるのである。

そこで、次の如き觀點に立脚してカルシューム塩の染色方法を検討した。

即ち、従来カルシュームの染色方法としては、Kossa氏硝酸銀法が代表的に用いられて来たが、これはその反応形式から考えてみて磷酸基の染色方法であり、これを以つてカルシュームの染色方法として凡てを律することは出来ないと思われる。その為、著者はアルカリ土類に特異性のあるアリザリンS法をカルシュームの染色方法として用い、磷酸基の染色方法と

しては、磷酸基に特異性のある岡本氏モリブデン酸法を用い、更に従来一般に使用されているKossa氏硝酸銀法をも補助的に使用することにしたのである。

このような觀點から、結核性肺病巣に於けるカルシューム塩の分布状態を検討し、各種のカルシューム塩とその分布状態との關係を追求し、その組織化学的性状を究明することにより、カルシューム塩沈着の機序に就いても言及したいと思う。

第1章 人の切除結核肺に於けるカルシューム塩の分布状態

第1節 実験材料並びに実験方法

実験材料としては、人の新鮮な切除肺を用い、肉眼的に十分検討した後、これをSerra, Carnoy, 10%ホルマリンにより固定し、パラフィン或はカーボワックスにより2~6 μ の切片を作成し、これに組織化学的検索方法として、岡本氏モリブデン酸法、アリザリンS法、Kossa氏硝酸銀法、スーダンⅢ及びスーダンブラックによる脂質染色法、pH 1.3~4.0又はpH 7.0のトルイジンブルーによるメタクロマジア染色方法、ヘマトキシリンエオジン染色、(以下H・E染色と略記) Mallory染色、格子線維染色、V. Giesonによる膠原線維染色方法、Bielschowsky-Maresch氏鍍銀線維染色法を用いて検索した。

第2節 実験成績

乾酪性病巣は病理組織学的並びに組織化学的にみて次の2つの形がある。

その1つは病巣の中心部が略々均一性にエオジンをとる無構造織でヘマトキシリンをとる部分は極めて少なく、僅かに核残渣が散在し、スーダンⅢ染色法で病巣の周辺部に脂質陽性部が層状に認められ、pH 4.0のトルイジンブルーのメタクロマジア染色法で膠原線維層に沿つてメタクロマジア陽性層が認められ、その外側に膠原線維層が層状に規則正しく配列するような乾酪性病巣である。このような乾酪性病巣に於いて、岡本氏モリブデン酸法とアリザリンS法及

び Kossa 氏硝酸銀法は略々一致した部分に於いて陽性を呈する。

このような場合の染色状態は、略々均一性に薄く雲翳状に認められ（第1図参照）、ヘマトキシリン染色によりこの部分が陰性を示すことが多い。

もう1つの形は最近の化学療法施行例に屢々みられるもので、病巣の一部又は全部が好中球による壊死巣と化した安平の所謂部分又は完全充実空洞の場合である。^{25), 36)}

スーダンⅡ染色法によつて、脂質陽性部は部分的に認められるか或いは陰性であり、膠原線維層も規則正しい部分と乱れた部分が混在している。併し、pH 4.0 のトルイジンブルーによるメタクロマジア染色法では膠原線維層の内側の部分には陰性を呈する機会が多いが、好中球壊死巣の核崩壊部はメタクロマジア陽性を呈し、ヒアルロニダーゼにより消化されない。

このような病巣に於いては、好中球壊死巣及びその附近が岡本氏モリブデン酸法とアリザリンS法と Kossa 氏硝酸銀法とにより、必らずしも一致して陽性を呈せず、その染色状態は濃く不均一性に染色せられ（第2図参照）ヘマトキシリン染色では、核崩壊部に一致して陽性を呈する機会が多い。

これ等磷酸基並びにカルシウムの各種染色法により陰性を示す病巣としては、硝子化した病巣、増殖性病巣、空洞、線維化巣等である。

第3節 本章小括

以上の成績から判るように、結核性肺病巣に於けるカルシウム塩の分布状態は、その磷酸基並びにカルシウムの染色法により2つに大別される。然もこの際注目すべきことは、アリザリンS法、岡本氏モリブデン酸法、Kossa 氏硝酸銀法、ヘマトキシリン法の各種染色の間に屢々不一致の場合があり、或る場合には、Kossa 氏硝酸銀法とアリザリンS法が一致して認められるが、岡本氏モリブデン酸法は陰性を示し、或る場合は岡本氏モリブデン酸法では陽性を示すが、アリザリンS法、Kossa 氏硝酸銀法では陰性を示している。（第2図及び第3

図参照）

第2章 磷酸基並びにカルシウムの各種染色方法の検討

カルシウム塩の分布状態の差違を検討することは、カルシウム塩の沈着機序を解明する一助ともなると考え、先ず各種の染色法の特異性の問題に就いて、以下の如き方法で基礎実験を試みた。

第1節 実験材料並びに実験方法

各種カルシウム塩を乳鉢にて細かく粉碎し、予め磷酸基並びにカルシウムの各種染色法で検討した後、ツェルロイジンにて包埋し、岡本氏モリブデン酸法、アリザリンS法、Kossa 氏硝酸銀法、ヘマトキシリン法にて染色を行い、夫々検討したがその成績は第1表の通りである。

第2節 実験成績（第1表参照）

実験成績で注目すべきことは、カルシウムの染色方法として広く一般に用いられている

第1表 アルカリ土類塩に対する磷酸基並びにカルシウム染色法の検討成績

アルカリ土類塩	染色法 モリブ デン酸 法	Kossa 氏硝酸 銀法	ヘマト キシリ ン法	アリザ リンS 法
磷酸カルシウム	+	+	±	+
炭酸カルシウム	-	+	±	+
矽酸カルシウム	-	+	±	+
サリチル酸カルシウム	-	+	±	+
脂肪酸カルシウム	-	+	-	/
塩化マグネシウム	-	+	-	-
塩化カルシウム	-	+	±	±

（±は部分的着色又は褐色）

Kossa 氏硝酸銀法が、塩化マグネシウムの如き酸基を含まぬアルカリ土類塩に対しても陽性を呈することである。又、ヘマトキシリン法によるカルシウム塩の検索方法は、以上の成績からも判るように極めて不確実であるが、これに就いての考察は後述する予定である。

第3節 本章小括並びに考按

以上の成績から、Kossa 氏硝酸銀法、及び

アリザリンS法は、結核性肺病巣に於けるカルシューム塩として最も普通に認められる磷酸カルシューム、稀に認められる炭酸カルシューム及び脂肪酸カルシュームをも染め得ることがあることを、本実験により証明し得ると共に、岡本氏モリブデン酸法による検索が、磷酸基のみを染色し得ることを併せ認め得たと思う。

そこで、磷酸基に特異性のあると思われる岡本氏モリブデン酸法、カルシュームに対して特異性があると思われるアリザリンS法及びカルシューム塩の染色方法として一般に広く用いられ、且つ本実験に於いて極めて不確実であつたヘマトキシリン法に就いて考察を加えてみたいと思う。

先ず、磷酸基染色法としての岡本氏モリブデン酸法及び岡本氏硝酸銀法の特異性と、その欠点に就いて文献を参照しながら考察を加える。岡本氏モリブデン酸法は、磷酸基を1%硝酸ウラニールによつて24時間処理することにより不溶解性の磷酸ウラニールを作り、これに1%醋酸溶液を作用させることにより、磷酸基のみを特異的に残し、これにモリブデン酸アンモニウムと0.2N硝酸、更に硝酸ストリヒニン等により3日間処置した後、塩化第一錫により還元し、後染色として核染色を行う方法である。又、硝酸銀法は、磷酸基を1%硝酸ウラニールで磷酸ウラニールを作り、これを1%醋酸溶液で処置して磷酸基のみを特異的に残すところまでは前法と同様であるが、その後の操作でモリブデン酸アンモニウムの代りに硝酸銀を用いて処置した後、還元剤により処置し、後染色として核染色する方法である。

モリブデン酸アンモニウムを用いる方法に就いては、Lison¹⁸⁾によると、磷は磷モリブデン酸塩の中間生産物として間接的に証明されるのであつて、分析化学の場合は、過剰のモリブデン酸アンモニウムを痕跡も残さず完全に除去出来るから良いが、組織学の場合はそのようにはゆかず、組織内の蛋白は著しい量の物質を吸着して、それを強く保持する能力がある為、モリブデン酸アンモニウムも亦この場合と同様に、如何に念入りに水洗しても、組織のコロイ

ドに吸着されたものは除去出来ない。故に、この反応は真の磷酸基の証明にはならないと非難している。併し、岡本²⁴⁾は硝酸ストリヒニン及び0.2N硝酸の使用により、この問題は解決されていると主張している。磷は生体内では、イオン状態で存在する場合と、有機物と結合した潜在的な形として存在する場合と2通りあるが、著者は後述のシェーブの場合に、この方法により有機物と結合した磷を染色していることを証明しているが、これはこの方法の0.2N硝酸の中に72時間処置することにより、有機物と結合している磷をイオンの状態に遊離させて、モリブデン酸アンモニウムによりそれが反応されるのだと考えている。この考えを裏書きするものとして次の文献がある。

Lilienfeld et Monti¹⁹⁾がKasselの指導により核の中の有機物と結合している磷を、組織化学的に検出せんとして、先ず組織を、モリブデン酸アンモニウムを含む硝酸で35°Cの状態処理すると、硝酸は有機物と結合している磷を遊離せしめオルト磷酸とした後、モリブデン酸アンモニウムによつて、この磷酸を不溶解性の磷モリブデン酸化物として沈澱させ、これを還元して検出したのである。併しながら、この方法に対しても尙、Bensley,⁴⁾ Scott,³⁰⁾及びPolicard²⁶⁾は核の磷を僅かでも遊離させることと、組織構造を保つこととは両立出来ないとして反対している。

Macallum²⁰⁾によれば、35°C30%の硝酸は、チモ核酸から、磷を遊離させることが出来るといい、Nasmith et Fidlak²¹⁾は罌丸から抽出した核蛋白に就いて、定量的に反応を調べ、30%の硝酸は10分間で、36%の場合は72時間で、100%遊離させると述べた。

岡本氏モリブデン酸法の場合は、0.2N硝酸で72時間処理する為、上記の理由から一応有機物と結合している磷の一部を遊離していると考えて差支えないと思う。但し、この方法は、磷モリブデン酸アンモニウムの青色が多少周辺に流れて見えるのが欠点である。

次にカルシューム染色方法としてのアリザリンS法の特異性と欠点に就いて考察を加える

と、アリザリンスルホン酸は、Cameron⁶⁾が唯一のカルシウム染色法として推賞している。元来アリザリンSとラックを作る金属陽根を検出する方法であるが、生体内特に肺結核病巣内で、各種の不溶解性の塩を作るカルシウム、マグネシウムの中、マグネシウムは、カルシウムに比べて比較的少ない為にカルシウムの検出に用いて差支えないが、勿論カルシウムに特異的な染色方法ではない。アリザリンのカルシウムとのラックは、酸及びアルカリに対して抵抗性があり、Cameron⁵⁾はこの特性を切片が著しく染色され過ぎた時、余分の色素を除去する為に利用した。著者もアルカリ性アルコール(10%アンモニアを含む)と酸性アルコールを交互に用いて、切片の地肌が脱色するまで処置して検索している。

Lison¹⁸⁾はカルシウム塩が凡てアリザリン及びその誘導体と陽性に反応し、ラックを作ることが認められるとしても、この反応は余り鋭敏ではなく、相当多量のカルシウムが存在せぬ限り、検出は不可能であるが、アリザリン及びその誘導体は、カルシウム特有の反応を妨げるような有機性の諸要素を染色することはなく、又脱灰された組織片では、アリザリン及びその誘導体は一般に著しく拡散した染色しか現さぬ為、カルシウムに対する反応と混同する虞れはないが、無機の陽イオンの存在は結果を誤らす為、注意が必要であると記載している。

Gierke⁸⁾によると肺及び傍気管支淋巴部の石灰化結節に於いては、鉄は認められない由である。このことと、本法の操作が極めて簡単であり、且つ他のカルシウム塩の染色のように、カルシウムそのものでなく、磷酸基その他酸基の染色方法と比べながら注意して用いると、本法は肺のカルシウムの特異的染色として極めて便利な方法である。

次にヘマトキシリン法に就いて考察を加えると、ヘマトキシリン、及びその酸化によつて生じたヘマティンはラック性色素である。ヘマトキシリンは水に溶けて無色、ヘマティンは僅かに黄色を呈するのみで、共に染色能力を持つて

いない。併し、そのラックは顕著な色彩を呈し、強い染色能力がある。一般にヘマトキシリンはカルシウムとラック形成をするといわれている。

併し、Lison¹⁸⁾はこれに反対して次のように報告している。in vitroで溶解性のカルシウム塩にヘマトキシリン溶液を作用させると、Macallum,²⁰⁾ Schusik,²⁹⁾ E. Cowper-Evans,⁷⁾ Cameron⁵⁾の観察したように、極めて薄い赤味がかかった或いは紫がかつた色彩が現われる。

不溶解性のカルシウム塩に作用させた場合は反応が極めて徐々に現われ、反応産物が次第に溶解し、溶液中に拡散する。

従つて、ヘマティン及びヘマトキシリンのカルシウムラックは殆んど無色で、且つ可溶性である。

又、Cameron⁶⁾の実験によると、薄い酸性溶液でカルシウム塩を溶解し去つた後にも尚、ヘマトキシリン溶液を作用させるとその部分はカルシウム塩を溶解し去らぬ前と同じく陽性を呈すると報告している。即ち、この場合のヘマトキシリンはカルシウム塩と親和性のある組織を染色しているのではないかと考えられる。

換言すれば、この方法はただ石灰沈着の基質の染色を行つているだけである。

その為、以後の検索に於いて病巣内に認められるヘマトキシリンで陽性の部分は、常にカルシウム塩と親和性のある組織を染色しているという考え方で、ヘマトキシリンで陰性で且つその部分にカルシウム塩を認めた場合と、一致した場合とを区別して検討することにした。

そこで、磷酸基に特異性のある岡本氏モリブデン酸法と、磷酸基及び磷酸基以外のカルシウム塩をも染色するKossa氏硝酸銀法の場合とを比較対照することによつて、磷酸基と炭酸基及び脂肪酸基等を判別し、岡本氏モリブデン酸法とカルシウムを染色するアリザリンS法とを比較対照することによつて、磷酸カルシウムの沈着部位が判別されるわけである(第2表参照)。

第2表 岡本氏モリブデン酸法と Kossa 氏硝酸銀法の染色上の差異

染色法	岡本氏 モリブデン酸法	Kossa 氏 硝酸銀法
磷酸カルシウム	+	+
潜在性磷酸基	+	-
脂肪酸カルシウム 炭酸カルシウム	-	+

第3章 綜括並びに考按

以上の結果より、岡本氏モリブデン酸法、アリザリンS法、並びにヘマトキシリン法の本質が略々明らかにされたが、この考えに立脚して第1章の人の切除結核肺に於けるカルシウム塩分布状態の実験成績を再検討してみると、次の如き結果になる。

強い滲出炎が乾酪変性に陥入り、その後間もなく被包化せられ安定したと思われる乾酪性病巣に認められるカルシウム塩は、磷酸カルシウムがその大部分であり、而もその染色像が極めて薄く雲霧状である。これに対して、乾酪巣内に好中球滲出による壊死巣が招来された場合のカルシウム塩沈着は、磷酸カルシウムの他に、炭酸カルシウム又は脂肪酸カルシウムの形である。更に、前者に於いては、カルシウム塩沈着がヘマトキシリン染色で陰性であることが多いのに対して、後者に於いては、ヘマトキシリン染色で濃染し、且つ核の崩壊部に一致して認められることが多いということは興味あることである。即ち、前者の場合には、滲出性細胞の崩壊により生じた磷酸基が、滲出液中のカルシウムイオンと結合して磷酸カルシウムが形成されるに伴って、寺松の所謂外部構造により外部と遮断され、pH が中性或いはアルカリ性に傾くと共に、安定した石灰沈着を来す。このような沈着状態は小葉大以下の病巣に多く、且つ均一性に分布することが多い。それ故に、このような薄い均質性のカルシウム塩の沈着は、炎症がこのような小病巣では繰り返して起ることが少なく、容易に収まり、従つて病巣の被包化が招来され易く、最初の反応で生じた磷酸カルシウムが殆んどそのまま沈着している為であると考えられる。このことは、こ

のような場合、肺胞構造がそのまま残っていること等からも推定されることである。

それに反して、好中球壊死巣に一致してカルシウム塩が認められる場合は、小葉大以上の場合が多く、カルシウム塩沈着が極めて不均一性で、而も磷酸カルシウム以外のカルシウム塩が認められることが多い。これはこのような病巣では、炎症が何回も繰り返して起り、従つて被膜の完成が遅れ、その為に最初に生じた磷酸カルシウムの一部又は全部が溶出し、その後再び種々の分解産物とカルシウムとの間に生じた各種のカルシウム塩が沈着する為である。又、この場合、ヘマトキシリン染色と一致するという事は、ヘマトキシリンがカルシウムを染色しているのではなく、その基核である磷酸基を含む高分子の核酸を染色しているものと推察する。そしてこのことは、Cameron⁶⁾の実験である酸性溶液によりカルシウムを溶解した後でも尙且つヘマトキシリンで陽性であるという事実からも裏書きされるわけである。又、この場合、pH 1.0~4.0のトルイジンブルーで染色すると、その部に一致してメタクロマジア陽性を呈し、ヒアルロニダーゼにより消化されないが、この場合のメタクロマジアは、核酸に由来したものと考えられる。従つてこの場合の磷酸カルシウム沈着の為の基核は、高重合の磷酸基を含む核酸の半分解物質と考えられるのである。

結核性肺病巣内に、薄く雲霧状に且つ均一性にカルシウム塩の沈着が認められる場合は、多くの場合に、被包化が完成し、寺松の所謂外部構造³³⁾が規則正しく配列している。これに反して、その部分にはヘマトキシリンが陰性の場合が多い。これはこのようなカルシウム塩の沈着には、ヘマトキシリン陽性を呈する高分子核酸より形成される基核よりも、寧ろ透過性の低い所謂外部構造の如きものが必要条件であることを示しているのに他ならない。

このように、カルシウム塩の沈着には基核が明らかに認められるものと、然らざるものがある。一般の炎症巣にはカルシウム塩の沈着が認められることが少なく、結核病巣に認め

られることが多いという事実は、カルシウム塩が永くその部に安定して存在するためには、結核性病巣にみられる如き、透過性の低い外部構造がこの種のカルシウム塩の沈着に必要であると思われるが、その点に就いては第2篇に記述する予定である。

結 論

燐酸基に特異性のある岡本氏モリブデン酸法とカルシウムに特異性のあるアリザンS法とを組合せ、同時に Kossa 氏硝酸銀法、脂質その他の染色方法の結果を検討することにより、次の結論を得た。

1) 結核性肺病巣内に認められるカルシウム塩には2種類ある。即ち、均一性に雲霧状に

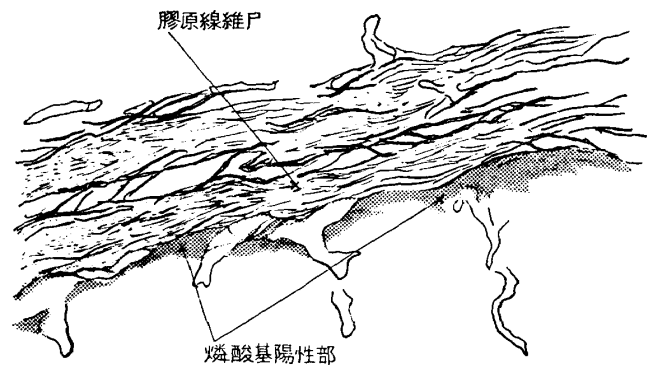
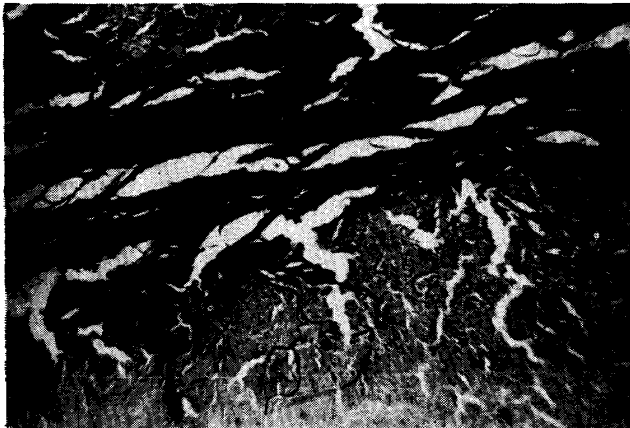
認められ、核崩壊部と必ずしも一致せぬ場合と、不均一性に核崩壊部に一致して認められる場合である。

2) 第一の場合は、カルシウム塩としては、燐酸カルシウムが大部分であり、第二の場合は、その他に、時に脂肪酸カルシウム、炭酸カルシウムが認められる。

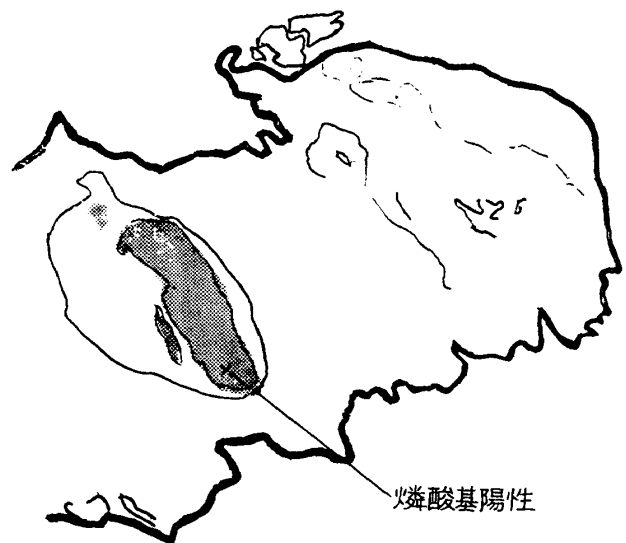
3) 最近の化学療法剤使用例の切除肺に於いては、第二の場合が大部分で、第一の場合は極めて少ない。

4) カルシウム塩の沈着には、透過性の低い被膜により被包化されることが必要条件である場合と、好中球壊死巣よりなる基核が必要条件である場合との2種類の沈着形式が考えられる。

第1図 乾酪性病巣周辺部 (岡本氏燐酸基染色法)



第2図 部分充実空洞 (岡本氏燐酸基染色法)



第3図 部分充実空洞 (アリザリンSカルシウム染色法)

