發育中の軟骨基質の次微視的構密度の變化

Veränderung der submikroskopischen Struktur-dichte
der Knorpelgrundsubstanz während der Entwicklung.

河 野 誠 Sei KONO.

（昭和 25 年 1 月 23 日原稿受附）

軟骨の發生に關して Roulet (1935) が 5—10 日の鶏胎の間葉組織を培養して觀察したところによると、初め原線維から成る網が出來、原線維の一部が細胞體に接してこれを包む様に走り、網眼に液體がある。この液體は固定により凝結し、Azan 染色により淡青に、Toluidin-青にては赤緑に染まつた。氏は細胞が突起を短くし、周圍から閉ぢ込められて圓形になり、細胞周圍の線維が肥厚して囊を形成するところまで追及し得た。

完成した普通の硝子軟骨の細胞間に出來た物質、即ち基質の化學的成分の研究は既に Mörner (1889), Schmiederberg (1890) 等により始められ、その後明らかになつたところを略記すると、基質は Chondromucoid, Chondroitin-硫酸, Kollagen, Albumoid から成る。そのうち先づ Chondromucoid は弱酸性で、アルコールと水に溶けず、アルカリ性溶液には易く溶け、組成は大體 N が 13%, C が 47%, H が 6%, S が 2%, O が 31% であつて粘素に似る。弱アルカリによつて Pepton-物質, Chondroitin-硫酸, Albuminat 等に分解する。次に Chondroitin-硫酸は Chondrin-球に多く存在するが、これは上述の如く Chondromucoid の形成にも與る高分子の硫酸エステルであつて、水に溶解し、鹽酸の存在の時にはアルコールにより沈澱する。Chondroitin-硫酸を分解すれば最初に硫酸と窒素を含有する Chondrosin を得、分解の最後に Glukuron-酸, Glukosamin 等を分つ。次に Kollagen は普通の膠原質である。最後に Albumoid は水に不溶で、酸とアルカリには比較的抵抗がある。

完成した硝子軟骨基質に於ては Chondromucoid と Chondroitin-硫酸は主に Chondrin-球に、Albumoid は主に領域間質に、また Kollagen は Chondrin-球にも領域間質にもある。而して基質の強い鹽基好性は Chondroitin-硫酸に、酸好性は Albumoid と Kollagen によることが早く Mörner (1888) 等により示された。後に Hansen (1905) が組織化學的に詳しく研究したところによれば、軟骨基質には鹽基好性と酸好性の物質が混在し、よく固定された材料では鹽基好性が優勢であるが、或る處置によれば鹽基

性が除かれて酸好性が現はれる。氏は酸性 Methylen-青と Säurefuchsin-Pikrin-酸を用ひて完成した硝子軟骨基質を染め分けて、細胞の周囲から第1—第2層は主に酸性 Methylen-青に、第3層は Säurefuchsin-Pikrin-酸に、第4—第5層は主に酸性 Methylen-青に染ることを見た。なほ氏は Albumoid が上述の第5層にて Pikrin-酸により顆粒状に染るのを見、又56歳の人の気管軟骨からアルカリにて Chondroitin-硫酸を除いたのち酸性オルセインにて染め、Albumoidの小顆粒のほか顆粒が連続して作る線維網を見た。

長松(大13)は胎生9月より68歳までの人の気管軟骨等を酸性 Methylen-青、Säurefuchsin-Pikrin-酸等にて染めて、細胞内の鹽基好性物質を内容とする分泌空胞から基質に向ひ鹽基好性物質が分泌されるのを見たと言ふ。

私(昭25)は鶏胎の軟骨の等電點を測定して、第9日には皮下組織のものと殆んど違はず、その後日とともに酸性側に移動し、孵化時には膝關節軟骨のアルコール固定のものにて1.6となるのを見た。

以上の如く軟骨基質の顯微鏡的構造と化學的成分については今日までに諸學者の努力により甚だよく明らかにされ、また物化學的にはその等電點も測定されたが、次微視的構密度の系統的觀察はまだなされてゐない。私はその觀察を行ふとともに、家兎と猫の生後の軟骨基質の等電點をも測定したのである。

I. 材 料 と 方 法

6, 14, 18, 20日の鶏胎の気管軟骨、膝關節軟骨、肋軟骨をアルコールに、又4, 5, 6, 9月の人胎兒の膝蓋軟骨、膝關節軟骨、肋軟骨をホルマリンに固定し、パラフィンに包埋して10 μ の厚さに切つた。なほ生後8日、1月完成の猫と、20日、1月完成せる家兎の膝關節軟骨、肋軟骨、気管軟骨をホルマリンに固定して同様に切片にした。そして何れにも Azan 染色を施したが、互に比較すべき一列の標本では染色、水洗、辨色、後處置等の諸條件と時間を一定にするために標本を同時に染色し、同時に水洗し、同時に辨色する方法を取つた。なほ等電點測定には前報の如く種々水素イオン濃度にて Ponceau P. R. (酸性染料) と Toluidin-青 (鹽基性染料) にて染めた、但し pH 1.0—2.0 は HCl と KCl で作つた。

II. 實 驗 成 績

a) 鶏胎の軟骨の構密度.

1. 脊柱軟骨. 胎生6日の脊索附近には Azan 染色にて星狀細胞が赤に

染り、細胞間に弱帶青の淡赤の無形物質がある。後者はよく見ると線維様顆粒様である。

2. 膝關節軟骨。基質は胎生 14 日(第 1 圖)で均等に淡紫に染り、軟骨囊がやや明瞭なところもある。細胞は大きく、細胞核は青味がかつた濃い赤に染まり、胞體は淡赤で内に紫の多くの顆粒を有する。軟骨膜は甚だ薄くして濃青に染り、近くの基質も比較的濃い紫に染る。18 日(第 2 圖)になると基質は淡紫に染るが、14 日の基質よりも青が増して、軟骨囊は一層明らかとなる。特に軟骨膜附近の基質は濃青に染る。20 日(第 3 圖)になると基質は更に青を増し、軟骨囊は更に明瞭に青に染る。細胞核は青のかかつた濃赤に甚だ濃く染り、胞體は顆粒様で淡紫に染る。軟骨膜は濃青で附近の基質も強く青い。

3. 肋軟骨。基質は 14 日から 20 日に向ふに従つて青染性を増し、即ち構密度は低くなり、軟骨囊も一層明瞭に青を取る様になる。細胞核は 20 日には 14—18 日よりやや染色性を増し、胞體は關節軟骨と同じ様に紫で顆粒様線維様である。

第 1 表 鶏胎の軟骨基質の構密度變化

		6 日	14 日	18 日	20 日
脊 柱 軟 骨	青	± +			
	赤 橙				
膝 關 節 軟 骨	青		+	++	+++
	赤 橙				
肋 軟 骨	青		++	+++	+++
	赤 橙				
氣 管 軟 骨	青			++	+++
	赤 橙				

4. 氣管軟骨。基質は均質に青に染るが、成長するに伴つて青が増し、即ち構密度は低くなる。細胞の成長による染色性の變化は不明瞭であるが、核は明らかに赤を増し、構密度がやや高くなる。胞體は顆粒様線維様に紫染する。

b) 人胎兒の軟骨の構密度。

1. 肋軟骨. 4月の肋軟骨では基質は均質で比較的廣く, 赤の勝つた紫に染る. 軟骨囊は基質よりも青が濃く, 細胞核は赤に, 胞體は帶赤青の顆粒を持つ. 5月では基質は明らかに青が勝つて染り, 軟骨囊も濃青に染る. 細胞核は赤を一層増し, 胞體は4月と變らない. 9月には基質は更に青染を増し, 構密度は低くなる. 細胞は5月と餘り變化はない.

2. 膝關節軟骨. 4月では基質は淡紫に染るが肋軟骨よりも青が濃い. 5月になると明らかに青が勝ち, 細胞核は4月よりも赤調を増し, 胞體も幾分赤を増して顆粒様線維様に染る. 9月には基質が青を増すほか5月に於けるとあまり變りない.

第2表 人胎兒の軟骨基質の構密度變化

		4 月	5 月	9 月
膝 蓋 軟 骨	青	+	++	+++
	赤	++	—	—
	橙	—	—	—
膝 關 節 軟 骨	青	+	++	++
	橙	++	—	—
	赤	—	—	—
肋 軟 骨	青	+	++	+++
	赤	++	—	—
	橙	—	—	—

3. 膝蓋軟骨. 4月(第4圖)では基質は肋軟骨と關節軟骨よりも青染が強く, 5月(第5圖)になると基質は明らかに青色を増し, 細胞核と胞體はやや赤調を増す. 9月(第6圖)には5月よりも基質が青を増すほかあまり變化がない.

c) 生後家兎の軟骨の構密度.

1. 肋軟骨. 20日(第7圖)の基質は青染し, 細胞は濃赤に染るが, 胞體は核よりやや淡く顆粒狀に染る. 軟骨膜は比較的強く紫に染り, その附近の基質は一層強く青を取つてゐる. 1月(第8圖)になると基質は20日よりやや青染性を減ずるが, かすかに赤が現はれ始める. そして細胞は2—3の群を作りその周囲には濃く青に染まる Chondrin-球が現はれる. 完成(第9圖)のものになると様相は全く變り, 基質は濃橙に染り, 大きな細胞群によりて著しく狭められる. 細胞の周囲には軟骨囊が細く濃青に染り, Chondrin-球は不明瞭になる. 細胞は核も胞體も一層赤を強く取り, 軟骨膜は濃赤に染つて, 基質は軟骨膜に近くに隨つて橙から赤に變つて来る.

2. 氣管軟骨・20日から完成せる軟骨に成長するに随つて基質は青, 赤, 橙に變つて構密度は高くなるが, 完成せる軟骨に於ても青を取つてゐるのは肋軟骨と違ふ. 細胞は核も胞體も赤染性を増して構密度は高くなる.

第3表 生後家兎の軟骨基質の構密度變化

		20 日	1 月	完 成
膝 關 節 軟 骨	青	卅	卅	卅
	赤	--	—	+
	橙	—	—	—
肋 軟 骨	青	卅	卅	—
	赤	—	±	卅
	橙	—	—	—
氣 管 軟 骨	青	卅	卅	卅
	赤	±	+	—
	械	—	—	+

3. 關節軟骨・基質が濃青に染る20日から成長すると共に青染性を増すが, 完成せるものでは濃青に染る基質の中にかすかに赤が現はれる. 細胞には肋軟骨, 氣管軟骨の様な著しい變化はない.

d) 生後猫の軟骨の構密度

1. 肋軟骨・基質は生後家兎の軟骨の如く成長と共に構密度は高くなるが, 家兎の如く橙, 赤を取らず, 完成した軟骨でも深部に赤を取るのみである. 細胞は成長するにしたがつて強く赤染して構密度は高くなり, 軟骨膜も完成したものでは構密度が高くなつて赤に染まる.

第4表 生後猫の軟骨基質の構密度變化

		8 日	1 月	完 成
膝 關 節 軟 骨	青	卅	卅	卅
	赤	—	+	卅
	橙	--	—	—
肋 軟 骨	青	卅	卅	卅
	赤	—	+	卅
	橙	—	—	—
氣 管 軟 骨	青	+	卅	—
	赤	—	+	卅
	橙	—	—	—

2. 氣管軟骨・基質は肋軟骨の如く成長と共に構密度は高くなり、完成せるものでは殆んど赤のみを取る。細胞も成長と共に構密度は高くなる。

3. 關節軟骨・基質は8日(第10圖)で青染して、1月(第11圖)になると青の基質に僅かに赤を混ざる様になり、完成(第12圖)せる軟骨になると肋軟骨、氣管軟骨が強く赤を取るに反し、僅かに赤を混ざる強い青に染り、即ち構密度はあまり高くない。細胞核は赤染し、胞體は紫の顆粒様線維様に染るが、成長に伴ふ變化は明らかでない。

III. 考 察

1. 胎生時の軟骨・第1と第2表に示す如く Azan 染色に於て軟骨基質は成長と共に青染性を増し、即ち構密度は低くなり、軟骨嚢は一層判然と青を取る様になる。細胞の變化はそれほど著しくないが、核は赤を増して構密度が高くなるやうである。胎生時の軟骨基質が成長するにしたがひ構密度が低くなるのは、幼若未分化なる時代には Kollagen, Chondromucoid, Chondroitin-硫酸等の蛋白分子はまだ方向不定に存在するが、だんだん分化して蛋白分子が一定方向に配列して分子鎖または原線維の形になるに従つて分子鎖または原線維間隙が廣くなり、即ち疎構の線維が生じて、これに大きな粒子の Anilin-青が強く吸着する様になるからであらう。又軟骨膜附近に深層よりも基質が青を強く取るのは、そこではかかる線維性分化が一層よいからであらう。

2. 生後の軟骨・第3と第4表に見る如く、生後の家兎と猫の肋軟骨と氣管軟骨に於ては成長とともに構密度が高くなるが、これは一旦上述の如く生じた大小の疎構の線維が作る骨格を Albumoid 又は無形物質なる Chondromucoid と Chondroitin-硫酸が埋めることによると解せられる。關節軟骨のみが完成後にもなほ青を強く取るのは、この軟骨は常に自由面から壓力による刺戟が加へられるに對抗して、線維が、特に自由面に平行によく發達してゐるによると考へられる。

肋軟骨にも氣管軟骨にも基質の密度は常に深部に高く、軟骨膜に近くに随つて低いが、これは疎構線維が表層に多いことと物質の沈着が血管に近い場所に多いことによらう。

一般に生後の軟骨になると、Chondrin-球が明瞭になり、他の部よりも密度が低く現はれるが、ここは組織液の流動し易いのが明らかで、即ち細胞の榮養に好都合の筈である。

次に細胞に就いては、肋軟骨と氣管軟骨に於ては完成すれば明らかにその密度が高くなつて來るが、關節軟骨のみは完成しても胞體は紫に線維様

顆粒様に染つて、密度のあまり高くないのが特異である。

3. 軟骨の等電點. 軟骨基質、特に Chondrin-球は鹽基好性の強い Chondroitin 硫酸により遮蔽されてゐるので、等電點測定が容易でない。今 pH の低いところから Toluidin-青で染めて行くと、或る pH に於て軟骨基質の顆粒狀物質が急に強染し始め、即ち顆粒はここに等電點を持つのである。

生後家兎に於て 20 日の肋軟骨ではかかる基質物質の等電 pH 値は 2.6, 1 月にて 3.3, 完成したもので 3.5 であり、氣管軟骨では 20 日で 2.6, 1 月が 3.7, 完成したものが 3.6 である。次に關節軟骨では 20 日で 2.9, 1 月で 3.4, 完成したもので 3.5 で、何れの軟骨にても成長とともに等電點は高くなつて行く。

次に生後の猫の軟骨に於ても、等電 pH 値は肋軟骨では 8 日の 2.1 から完成時の 3.6 へと高くなり、氣管軟骨、關節軟骨では夫々 2.3 から 3.4 へ、2.2 から 3.6 へと高くなる。

IV. 結 語

1. 6 日の鶏胎の脊索附近と 14, 18, 20 日の肋軟骨、氣管軟骨、關節軟骨の切片に Azan 染色法を施して基質の次微視的構密度を検したところ、何れの軟骨も成長とともに濃く青を取つて、構密度の低くなることを示した。

2. 4, 5, 9 月の人胎兒の膝蓋軟骨、肋軟骨、膝關節軟骨の基質の構密度も成長とともに低くなる。

3. 生後 20 日と 1 月と完成の家兎で檢するに、肋軟骨と氣管軟骨の基質の構密度は成長とともに高くなり、特に完成せるものでは急に上昇する。ただ關節軟骨の基質のみは成長するに随つてますます青を強く取り、それとともに赤はただ僅かに増し、完成の後にも密度は肋軟骨と氣管軟骨のものに比しかなり低い。これは疎構の線維が基質内によく發達するからであらう。細胞は、肋軟骨と氣管軟骨に於ては成長とともに明らかに核も胞體も密度を増し、核と胞體の限界が不明瞭になるが、關節軟骨の細胞のみは完成後もなほ胞體が紫に顆粒様線維様に染り、密度のあまり高くないのが特異である。基質の等電點は何れの軟骨にも成長とともに上昇する。

4. 生後 8 日と 1 月と完成の猫の肋軟骨、氣管軟骨、膝關節軟骨に就て云へば、家兎の場合と同じく、肋軟骨と氣管軟骨にては成長とともに基質の密度が著しく高くなるが、關節軟骨にてはただ僅かに高いのみである。細胞も肋軟骨と氣管軟骨では密度が明らかに高くなるが、關節軟骨ではあ

まり高くならない。基質の等電點は何れにも成長とともに上昇する。

Autoreferat.

Die Messung der Strukturdichte erfolgte an Knorpeln von Hühner- und Menschenembryo an verschiedenen Tagen, sowie von Kaninchen und Katzen verschiedenen Alters, und zwar mit Hülfe von Säurefarbstoffen verschiedener Dispersität (nach der Azanfärbung). In der Fetalperiode vermindert sich die Dichtigkeit der Knorpelgrundsubstanz mit der Entwicklung. Nach der Geburt erhöht sich die Dichtigkeit der Grundsubstanz von Rippen- und Trachealknorpel, bis schließlich die Grundsubstanz nur mit fein dispersen Farbstoffen anfärbbar wird. Dagegen bleibt die Grundsubstanz des Gelenkknorpels in beträchtlich lockeren Zuständen, was offenbar auf die reichliche Bildung von lockeren Fasern in ihr zurückzuführen ist.

文 献

Hansen, K. : Untersuchungen über die Gruppe der Binde-substanzen. I. Der Hyalinknorpel. Anat. H. 27 (1905). — **河野 誠** : 鶏胎の結合組織, 軟骨, 脳皮質の細胞間質の等電點. 日組録. 1 (昭 25). — **Mörner, C. Th.** : Histochemische Beobachtungen über die hyaline Grundsubstanz des Trachealknorpels. Z. physiol. Chem. 28 (1888). — Chemische Studien über den Trachealknorpel. Skand. Arch. 1 (1889). — **長松英一** : 硝子軟骨細胞の研究. 福醫誌. 17 (大 13). — **Roulet, F.** : Studien über Knorpel- und Knochenbildung in Gewebekulturen. Arch. exp. Zellforsch. 17 (1935). — **Schmiederberg, O.** : Über die chemische Zusammensetzung des Knorpels. Arch. exp. Path. u. Pharm. 28 (1890).

附 圖 説 明

第 1—第 3 圖は鶏胎の膝關節の軟骨, 第 4—第 6 圖は人胎兒の膝蓋軟骨, 第 7—第 9 圖は家兎生後の肋軟骨, 第 10—第 12 圖は猫生後の膝關節軟骨. すべて Azan 染色.

Erklärung der Tafelabbildungen.

Abb. 1—3 Knorpel des Kniegelenks aus Hühnerembryonen,
Abb. 4—6 derselbe der Kniescheibe aus Menschenembryonen,
Abb. 7—9 derselbe der Rippe aus postnatalen Kaninchen,
Abb. 10—12 derselbe der Kniegelenks aus postnatalen Katzen.
Alle nach der Azanmethode gefärbt.

1. Kniegelenkknorpel
des Hühnerembryos
von 14 Tagen.

2. Derselbe von
18 Tagen.

3. Derselbe von
20 Tagen.

4. Kniescheibenknorpel
des menschlichen Em-
bryos von 4 Monaten.

5. Derselbe von
5 Monaten.

6. Derselbe von
9 Monaten.

7. Rippenknorpel des
Kaninchens im 20.
Lebenstage.

8. Derselbe im 30.
Lebenstage.

9. Derselbe des
Erwachsenen.

10. Kniegelenkknorpel
der Katze im 8.
Lebenstage.

11. Derselbe im 30.
Lebenstage.

12. Derselbe des
Erwachsenen.