PCB 投与によるラットエブネル腺の微細構造的変化

九州歯科大学口腔解剖学第2講座 (指導: 嶋村昭辰教授)

下 田 妙 子

昭和63年2月22日受付

Electron Microscope Study of Effects of Polychlorinated Biphenyls on von Ebner's Gland of the Rat

Taeko Shimoda

Second Department of Oral Anatomy (Director: Prof. Akitatsu Shimamura)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Ultrastructural changes of the von Ebner's gland of the rat were examined by transmission electron microscopy with use of 0.1% polychlorinated biphenyls diet (PCB group) and vitamin-A-deficient diet (V.A def. group). Weaning male rats aged 3 weeks, weighing 38-45g, were used in this study.

The results obtained are as follows:

1. Pair-fed controls increased their body weight during the experimental period. Growth rates of the two experimental groups were markedly decreased as compared with their controls. The animals fed PCB began to show depilation, diarrhea and eye mucus.
2. Vitamin A content in serum of the rats fed on 0.1% PCB diet decreased to one-third of that of controls, suggesting that PCB causes reduction of vitamin A in serum.
3. The secretory granules of the acinar cells of the rats fed on 0.1% PCB diet were stained less by toluidin blue than those of the rats given control diet.
4. Electron microscopically, the nuclei of the acinar cells showed irregular outlines and pyknosis after 0.1% PCB diet feeding. Rough endoplasmic reticulum cisternae were remarkably enlarged. Golgi apparatus was atrophied and it produced myelin figures. Some mitochondria contained myelin figures and irregularly arranged cristae. Large vacuoles and autophagic vacuoles were increased in number. Lumen and intercellular canaliculus were expanded. Myelin figures and/or membraniform substances appeared in the lumen.
5. Structural changes of the acinar cells induced by vitamin A deficiency were the same as those induced by PCB except for myelin figures in mitochondria. Namely, the nuclei of the acinar cells showed pyknosis. Cisternae of the rough endoplasmic reticulum were strongly enlarged and contained less electron-dense amorphous substances. Autophagic vacuoles contained scroll-like lamellae and lipid droplets. Large vacuoles contained myelin figures and amorphous substances. The secretory granules

fused with each other. These fused granules appeared less dense than the nonfused granules. Acinal lumen and intercellular canaliculus distended and they contained membraniform substances.

6. The granules of the duct cells treated with PCB were fewer than controls. Many dense granules were observed in the apical portion of the vitamin-A-deficient epithelia and the apical surfaces of the cells showed apocrine processes.

Key words: *Polychlorinated biphenyls/von Ebner's gland/Electron microscope/Vitamin A deficiency/Rat*

緒 言

PCB (Polychlorinated Biphenyls) は工業的に広い用途をもつ化学物質で、自然に分解されないために、今や地球全体が汚染されているといっても過言ではない。しかも生物界の濃縮現象により、ほとんどすべての動物体内に蓄積している¹⁻³⁾。

PCB は、わが国ではすでに使用が禁止されており、環境中への新たな放出がほぼなくなったとはいえ、いまだに母乳や食品材料中に残留していることが報告されている^{4,5)}。しかも生体内に取り込まれた PCB は極めて残留性が高いことが知られている⁶⁾。

1968年に西日本を中心に発生したカネミ油症の原因物質が PCB であると判明し⁶⁾、以後人体に対する毒性と病状が調べられてきたが、未解明の部分が少なくない。油症患者の主な口腔所見は、口唇、歯肉などの口腔粘膜の色素沈着、歯牙破折、味覚異常および口渴などが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。これまでのラット、ウサギおよびサル等を使った PCB 投与実験において、口腔諸組織の病理学的所見としては、歯肉炎、歯肉粘膜上皮の角化の亢進、角質嚢胞、歯根膜の破壊およびエナメル芽細胞の萎縮などが報告されている¹¹⁻¹⁴⁾。しかしながら、PCB の唾液腺に及ぼす影響についての報告は見られない。

印南ら (1974)¹⁵⁾、Innami ら (1974, 1975, 1976, 1982)¹⁶⁻¹⁹⁾ および永山ら (1985, 1985)^{20, 21)} は PCB の生体に対する影響について栄養学的観点から検討し、PCB はラット体内のビタミン A (V.A) 貯蔵量を著しく低下させることを明らかにした。さらに、V.A 欠乏状態のラットでは、唾液腺に影響が現れ、腺房の萎縮、導管上皮の化生、導管の拡張などが報告されている²²⁾。油症患者の場合も、初期の訴えの中に唾液の分泌量の低下があげられている。これらのことから、PCB が唾液腺に何らかの変化を与えていることは十分に推測される

ことである。

本研究は、PCB が唾液腺にどのような影響を及ぼすかを調べる目的で、ラットの唾腺 (von Ebner's gland) の微細構造を観察し、V.A 欠乏の組織像と比較し検討したものである。

実 験 方 法

1. 実験動物

生後3週齢 (体重38—45g) の Wistar 系雄ラット30頭を用いた。

2. 実験条件

ラットを V.A 添加食群 (20頭) と V.A 欠乏食群 (10頭、以下 V.A 欠乏群という) に分け10日間予備飼育後、V.A 添加食群をさらに対照群と PCB 投与群 (以下 PCB 群という) の2群に分けた。金網籠に1頭ずつ入れて飼育し、飼料は pair-feeding、水は自由摂取とし、実験期間を約6週間とした。

3. 飼料組成

基本的な飼料組成を Table 1 に示した。V.A 欠乏粉末飼料をオリエンタル酵母 (株) より購入し使用した。PCB は4塩化物を主成分とするものを和光純薬 (株) より購入して用い、あらかじめサラダ油に溶かした後、0.1%になるように飼料に混合した。対照群と PCB 群には飼料100g 中に retinol acetate (Sigmachemical, 米国) を1,000 IU 混合した。

4. 試料調製方法

実験終了後、エーテル麻酔下で舌を取り出し、舌根部有郭乳頭の周りを細切して、 $\frac{1}{2}$ Karnovsky 固定液²³⁾ (0.1M Na-cacodylate 緩衝, pH 7.4) で数時間浸漬固定した。同緩衝液で一晩洗浄後、1% オスミウム液 (同緩衝) で、2時間後固定を行い、エタノール系列で脱水後、Epon 812 に包埋した。電顕用超薄切片を Porter-Blum 型ミクロトームで作製し、uranyl acetate, lead

Table 1 Composition of basal diet

Constituent	%
Corn starch	38.0
Vitamin-free Casein	25.0
α -starch	10.0
Cellulose flour	8.0
Soybean oil	6.0
Sucrose	5.0
Mineral mixture	6.0
Vitamin mixture (V.A free)	2.0

- 1) Control group : V.A-acetate 1,000IU/Basal diet 100g.
- 2) PCB group : V.A-acetate 1,000IU+0.1% PCB/Basal diet 100g.
- 3) Basal diet : Commercial flour diet (Oriental Co., Japan).

citrate による二重染色を施して, JEM 100C 透過型電子顕微鏡 (電顕) で観察した. さらに, $1\mu\text{m}$ の準超薄切片を調整し, 0.1% トルイジン・ブルー染色を施し, 光学顕微鏡 (光顕) に供した.

5. V.A の血中濃度の測定

エーテル軽麻酔下で腹部大動脈から採血し, 血清を得た. 勝井ら (1982)²⁴⁾の方法に準じて, 血清をそのまま溶媒抽出し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって定量した. カラムは Nucleosil C₁₈ (4.6 i.d. $\times$ 250mm), 溶媒としてはメタノール:水 95:5 を用い, 流速 0.5ml/min とした. 検出は励気波長 340nm, 蛍光波長 460nm にて行った.

6. 分泌顆粒の染色能の測定

分泌顆粒のトルイジン・ブルー結合能を定量化するために, 顕微分光測光法 (OLYMPUS MMSP-TU SYSTEM) による吸光度を測定した. 準超薄切片を, 通常の 1/10 濃度である 0.01% トルイジン・ブルー染色液 (pH 7.4) で染色した. 吸収波長 400—700nm, 直径 $3\mu\text{m}$ の spot size 1 を分泌顆粒に設定し, その吸光度を測定した. なお, データ処理は HEWLETT PACKARD 社 HP 98622A personal computer を用いて行った.

結 果

I. 体重変化ならびに一般的観察

PCB を 6 週間, V.A 欠乏食を 7 週間投与したときの体重の変化は Fig. 1 に示す通りである. PCB 群においては, 約 3.5 週目 (投与開始後約 2 週間後) までは

Fig. 1 Growth curves of rats fed on the experimental diets.

●—●, Control; ■—■, Vitamin A deficient; ▲—▲, 0.1%PCB.

対照群との間に体重差はほとんどなく順調に発育した. しかし, その後の体重の増加は突然止まり 5 週目にかけ急激な減少を示した. PCB 群のラットでは約 3 週目より, 下痢, 目ヤニ, 毛並の異常, 歩行異常などが認められた. その中の 2 頭は死亡した.

V.A 欠乏群では, 3 週半ばまで対照群と同様な体重の増加傾向が認められた. しかし, その後体重増加率は徐々に減少して, 体重が一定値を保つ時期 (plateau stage) が続き, 5 週目より体重は減少し始めた.

II. 血清 V.A 量

各群における血清 V.A 量は Fig. 2 に示すとおりで, 対照群における量は 205ng/ml, PCB 群では対照群の約 $\frac{1}{3}$ 量の 68ng/ml, V.A 欠乏群では対照群の約 $\frac{1}{5}$ 量に相当する 39ng/ml であった.

III. エブネル腺の形態変化

1. 光顕的所見

対照群の腺房細胞はピラミッド形を呈し, 核は楕円形で細胞の基底側寄りに位置している. 細胞の腺腔側 $\frac{2}{3}$ にはトルイジン・ブルーに濃染する分泌顆粒が多数含まれる. 一部の細胞の基底側には脂肪滴も認められる. 腺細胞に続く導管には一層の立方上皮細胞が並ぶ. それらの細胞は明るく, 核は細胞の中心部に位置している (Fig. 3).

PCB 群における腺房細胞の分泌顆粒は, 対照群に比

Fig. 2 The content of vitamin A in serum of rats.

Fig. 3 Light micrograph of von Ebner's gland of control rats. Arrow: lipid droplet Toluidine blue ×740

しトルイジン・ブルーに対する染色態度がやや弱く、不鮮明である。腺房細胞の基底側には脂肪滴が多数観察される。腺腔や導管腔は概して拡大傾向を示す。腺細胞の中には全体が空胞化しているものも認められる (Fig. 4)。さらに小葉間結合組織には、トルイジン・ブルーに対し異染性を示す顆粒を多数含む遊走細胞の出現が観察される。

V.A 欠乏群の腺房細胞のほとんどは局所の細胞萎縮変性を起こしている。また腺腔と導管腔は共に拡大傾向を示し、導管腔に面する上皮細胞の形質膜も不規則な形状を呈する (Fig. 5)。

2. 電顕的所見

A. 終末部

i) 対照群 (Fig. 6)

a. 核

Fig. 4 Light micrograph of von Ebner's gland of rats given PCB. Large vacuoles (V) are seen in the basal zone of cell.

D: Duct lumen, L: Acinar lumen
Toluidine blue ×740

Fig. 5 Light micrograph of von Ebner's gland of Vitamin-A-deficient rats. D: Duct lumen Toluidine blue ×640

核は楕円形で細胞の中心からやや基底側寄りに位置する。核の輪郭はやや不規則である。核周囲部には全般的にオスミウム好性の核周囲クロマチンが集密している。核中心部や核小体の周りは比較的明るい分散クロマチンによって満たされている。

b. 粗面小胞体

細胞基底部には、よく発達した粗面小胞体の層板状配列が認められる。

c. ゴルジ装置

核周囲部にはよく発達したゴルジ装置がゴルジ野を形成し、濃縮空胞、ゴルジ小胞および未熟な分泌顆粒が観察される。

Fig. 6 Electron micrograph of control acinar cells. Apical two-thirds of the cells is filled with secretory granules. The endoplasmic reticulum is arranged in parallel arrays in the basal portion of the cells. $\times 6,600$

d. ミトコンドリア

楕円形ないし円形を呈する中型のミトコンドリアが細胞質全体に散在し、クリスタは長軸方向に垂直で比較的良好に発達している。ミトコンドリアの中には形質膜に接しているもの (marginated mitochondria) も見られる。

e. 分泌顆粒

核上部の細胞質には、直径 $0.5\text{--}1.4\mu\text{m}$ のほぼ均質な分泌顆粒が多数見られ、電子密度の高いものと低いものが混在しているが、概して密度の高いものが多く存在する。分泌顆粒の間には嚢状あるいは管状の粗面小胞体が介在している。そのほか、遊離のリボゾームも認められる。

ii) PCB 群

a. 核

核の多くはピクノーシスを呈して縮小化している。す

なわち、核中心部の電子密度は高くなり、クロマチンの分布形態も不明瞭になっている (Fig. 7)。また、まれに分葉した核も認められる。

b. 粗面小胞体

粗面小胞体の多くは膨大し、内腔には雲絮状物質を含む (Fig. 8)。

c. ゴルジ装置

ゴルジ装置は萎縮傾向にあって、濃縮空胞は減少し、対照群に比べて未熟な分泌顆粒も少ない。電子密度の高い限界膜が成熟面にしばしば見られ、その近くに限界膜由来とみられるミエリン様構造物が認められる (Fig. 7)。ゴルジ装置の成熟面は空胞化している。

d. ミトコンドリア

基底部に存在するミトコンドリアの輪郭形態は不規則となり、クリスタの数の減少、Fig. 9 に示すようなミエリン様構造物の出現および inter-mitochondrial bridges の形成などが認められる。

e. 分泌顆粒

分泌顆粒の大きさは直径 $0.5\text{--}1.3\mu\text{m}$ で、一様に電子密度の低い顆粒と雲絮状の顆粒が混在している。対照群に見られた電子密度の高い顆粒はほとんど観察されない (Fig. 10)。数個以上の分泌顆粒が癒合して形成されたとみられる大きな顆粒も観察される (Fig. 8)。

f. 脂肪滴

基底側には径 $0.6\text{--}4.0\mu\text{m}$ の脂肪滴が対照群に比べ多数観察される。多いもので十数個数えられる (Fig. 10)。

g. ライソゾームと自家食胞

細胞のいたるところにライソゾームや小胞を含有している多胞体、自家食胞 (autophagosome, autolysosome) が多数認められる。自家食胞の中には小胞体のほかに脂肪球、結晶様構造物、電子密度の高い不正形小体やミエリン様構造物が認められることがある (Fig. 11)。細胞の基底側における粗面小胞体間の細胞質には、限界膜のない周期性を持った結晶様構造物も認められる。

h. その他

腺腔の拡大とともに細胞間分泌細管にも拡大傾向が認められる。腺腔には、長径 $1.6\mu\text{m}$ 前後のミエリン様構造物 (Fig. 12) や開口分泌像 (Fig. 13) がしばしば観察される。細胞質内に径 $0.5\text{--}4.0\mu\text{m}$ の空胞が認められ (Fig. 10)、さらに一部の細胞は、細胞質のほとんどが空胞化し、核が基底側に圧平化していた。

iii) V.A 欠乏群

a. 核

Fig. 7 Electron micrograph of acinar cells after administration of PCB. Nucleus is pyknotic and has condensed chromatin. Myelin figures (arrows) are produced in Golgi apparatus.

×13,200

Fig. 9 Electron micrograph of part of basal acinar cells of rats treated with PCB. The irregularly-shaped mitochondria contain myelin figures and irregularly-arranged cristae. Inter-mitochondrial bridge is observed (arrow). ×19,000

Fig. 8 Part of acinar cell of rats treated with PCB. Cisternae of the rough endoplasmic reticulum are strongly enlarged and contain less electron-dense amorphous substance. Fused granules are observed (FG).

×12,000

Fig. 10 Electron micrograph of acinar cells of rats treated with PCB. The lumens increase in size. A large watery vacuole (V) is observed. The zymogen granules (Z) are less dense than the control granules. F: Lipid droplet ×10,000

Fig. 11 Higher magnification of acinar cells of rats treated with PCB. Autophagic vacuoles contain ER, numerous small vesicles and a lipid droplet. $\times 32,000$

Fig. 12 Apical region of acinar cells of rats treated with PCB. Myelin figures (arrows) are found in the lumen (L). $\times 16,600$

Fig. 13 Acinar cells of rats treated with PCB. The lumen (L) increases in size. Its irregular borders indicate sites of fusion with zymogen granules. C : Intercellular canals

$\times 13,200$

障害の強い細胞ではピクノーシスを引き起こし、核縁がかなり不規則な形状を呈している (Fig. 14).

b. 粗面小胞体

粗面小胞体は不規則に拡張し、内部に電子密度の低い雲絮状物質を含む (Fig. 14).

c. ゴルジ装置

ゴルジ装置の成熟面の一部の限界膜は電子密度が高く、ミエリン化している (Fig. 15).

d. ミトコンドリア

ミトコンドリアはクリスタの数が減少し (Fig. 14), 変性ミトコンドリアの電子密度は増大し、さらに基質内に **dense granule** や空胞が観察される。またミトコンドリアの外形も不規則で「C」型を呈するものも認められる。

e. 分泌顆粒

分泌顆粒のほとんどは径 $0.8-1.7\mu\text{m}$ を呈する。顆粒の中で、やや電子密度の低い顆粒同士が互いに癒合しているものも観察される (Fig. 16).

f. 脂肪滴

脂肪滴の数と大きさなどは対照群とほとんど変わらない。

g. 自家食胞

自家食胞の中には膜状物質、脂肪球、結晶様構造物などが観察される (Fig. 14).

h. その他

細胞が全体的に退行変性を呈し、細胞質の中には小管状の粗面小胞体がまばらに分布し、空胞が多く観察される。

比較的障害の弱い腺房細胞では、細胞質内に雲絮状物質を含む径 $4.0\mu\text{m}$ 前後の空胞が見られ、その膜の内側に沿ってミエリン様構造物が観察される (Fig. 15)。ミエリン様構造物は拡大気味の腺腔や細胞間分泌細管にも膜状物質とともに認められる。細胞間の接着装置として、腺腔側には細胞間結合装置 (**intercellular junctional complex**) がみられるが、基底側ではデスモゾームが見られず、微絨毛様突起による嵌合のみが見られ、全般的に細胞間隙が拡大している。

B. 導管上皮細胞

対照群：導管上皮細胞は立方形で、基底側寄りに楕円形の核が存在する。核の周囲には粗面小胞体やミトコンドリア、ゴルジ装置などの細胞小器官の各々が観察される。上皮細胞の管腔側には、中等度の電子密度を持つ径 $0.4-1.0\mu\text{m}$ の球形の分泌顆粒が数個認められる。細胞の自由表面には長さ $0.3\mu\text{m}$ 前後の少数の微絨毛が見ら

れ、隣接面にはデスモゾームが認められる。

PCB 群：上皮細胞には、核膜の乱れ、分葉核の出現、さらにはピクノーシスを起こしたものなどが認められる。分泌顆粒の大きさは径 $0.5-0.8\mu\text{m}$ であるが、数は対照群に比べ少ない。ゴルジ装置の成熟面にはミエリン様構造物が認められ、分泌顆粒内に封じ込められようとしている像も観察される (Fig. 17)。

V.A 欠乏群：上皮細胞の形態が不揃いで、管腔面は拡大している。分泌顆粒の大きさは径 $0.4-0.8\mu\text{m}$ で、対照群と比べ数には変化がみられない。粗面小胞体の内腔は拡大し、電子密度の低い雲絮状物質を含み、一部のリボゾームの脱落現象が見られる。管腔に面する細胞質の一部はアボクリン様に突出する像が観察されるが、その中には分泌顆粒は存在していない (Fig. 18)。

IV. 分泌顆粒の染色能の測定結果

対照群と **PCB** 投与群の両群とも最大吸収波長は 580nm で、吸光度は前者で 0.32 、後者で 0.19 を示す (Fig. 19)。このことから、**PCB** 投与により、分泌顆粒内の物質がなんらかの変化をきたし、トルイジン・ブルーに対する染色性が低下したものと考えられる。

総 括 考 察

1. 成長などに及ぼす影響

Fig. 1 に示すように、**PCB** 投与開始後約3週間で、対照群に比しかなり急激な体重減少が認められた。この傾向は印南ら (1974年)¹⁵⁾ の **PCB** 投与 (ラット) 実験データによく類似している。さらに **V.A** 不足飼料に **PCB** を添加すると、**V.A** 欠乏症状が早く現れること、**V.A** の添加は **PCB** による成長抑制をかなり防止することなどが報告されている¹⁶⁾。今回の実験では飼料 100g あたり $1,000\text{IU}$ の **V.A** を添加しているが、この程度では成長抑制の防止効果は認められない。**PCB** 投与により血清 **V.A** 濃度が低下していることから、**PCB** によるラットの成長抑制は **PCB** の毒性に加えて、体内 **V.A** の減少が原因と思われる。

また、吉原ら (1979)¹¹⁾ は赤毛ザルに **Kanechlor-400** (0.5mg/kg/day) を投与し、投与開始後1カ月で対照群に比し、かなり急激な体重減少を認めており、この体重減少は相対的な食餌の摂取不足に起因すると報告している。しかしながら、著者の実験においては、**PCB** 群の食餌の摂取量が対照群と (**V.A** 群とも) ほぼ同量になるように管理されている。したがって、**PCB** 群の体重減少は食餌の摂取不足に起因すると言うよりはむしろ、**PCB** の毒性自体によって生じたものではないかと

Fig. 14 Basal part of an acinar cell of vitamin-A-deficient rats. Cisternae of the rough endoplasmic reticulum (ER) are strongly enlarged and contained less electron dense amorphous substance. Large autophagic vacuoles (AV) contain scroll-like lamellae and/or a lipid droplet. N : Nucleus $\times 16,600$

Fig. 15 An acinar cell containing a large vacuole (V) vitamin-A-deficient. The vacuole contains myelin figures and amorphous substances. $\times 13,200$

Fig. 16 TEM view of a vitamin-A-deficient acinar cell. The fused granule (FG) is less dense than nonfused granule (SG). M : Mitochondria $\times 16,600$

Fig. 17 TEM view of a epithelia of duct treated with PCB. Golgi apparatus produce myelin figures. Granules are less number than control one. $\times 10,000$

Fig. 18 TEM view of a vitamin-A-deficient epithelia. The apical surfaces of epithelial cells show various features. The dense granules are largely observed in the apical portion. $\times 13,200$

Fig. 19 Absorbance profile of semi-thin section of von Ebner's gland.

考えられる。

外見的な体調所見としては、下痢、目ヤニ、毛並の異常などが見られ、今までのラットの報告例と共通の症状が見られた。ラットでは毛並の乱れ、目ヤニの発現のほか両眼がふさがって死にいたる¹⁶⁾。サルでは性差とともに個体差が認められているが、連続投与後1.5ヵ月から4ヵ月後にはいずれも眼瞼の浮腫と共に頭部、上腕部に脱毛が観察され、さらに中毒症状が重いものにおいては脱毛が上半身に及ぶこと、投与を中止すると、徐々に体重が回復し発毛することなどが報告されている^{11, 12)}。以上のごとく、実験動物によって PCB の毒性の発現状況は異なっている。又、PCB の濃度差によっても症状が異なることが示唆されており、症状の違いは実験条件の違いからも生ずるものと思われる。

2. エブネル腺の光顕的特徴

諸種の哺乳動物のエブネル腺の組織構造に関して、光顕的、組織化学的研究は少ない。その中でラット^{25, 26)}、マウス²⁶⁾、ハムスター²⁶⁾の齧歯目のエブネル腺は、ほぼ同じ所見を示す。すなわち、終末部の腺房細胞はピラミッド形を呈し、狭い腺腔を囲み、核は比較的明るく楕円形で細胞の中心部よりやや基底側寄りに位置する。細胞質は塩基好性で、腺腔側にはトルイジン・ブルーに濃染する分泌顆粒を多数含有している。これらの所見は漿液細胞の特徴をそなえており、本研究の対照群の所見と一致する。さらに、終末部に続く導管は、一層の立方細胞が並び、細胞質は比較的明るく、核は細胞のほぼ中心部に位置する。腺腔側にはトルイジン・ブルーに青染する分泌顆粒が少数認められ、大唾液腺の介在部に類似した構造をなす^{25, 26)}。これらの特徴も本研究の対照群の所見と一致する。

PCB 群のエブネル腺では、腺腔や導管腔の拡大、脂肪滴の増加、空胞の細胞質内出現などの変化が見られ、明らかに対照群の光顕像とは異なっていた。

Trowbridge (1969)²²⁾は V.A 欠乏食で50日間飼育したラットのエブネル腺を光顕的に観察し、腺房の萎縮、導管腔の拡大および導管上皮の扁平上皮化生などの所見を報告している。本研究の V.A 欠乏群においては、局所の腺房細胞は萎縮し、導管腔の拡大および導管腔面形質膜の不規則化などが観察されたが、導管上皮の扁平上皮化生はみられなかった。

3. 腺の病理組織学的変化

A. 終末部

ラットに対する PCB 投与の本実験において、エブネル腺の終末部細胞が受ける変化をあげると、核の萎縮、

ゴルジ膜の部分的ミエリン化、分泌顆粒の明調化、粗面小胞体の拡張、ミトコンドリアの変性、自家食胞や空胞の出現、腺腔や分泌細管の拡張、脂肪滴の増加、ミエリン様構造物の腺腔内出現などであった。V.A 欠乏群の腺細胞が受けた変化は PCB 群とほぼ類似しているが、ミトコンドリアの基質にみられたミエリン様構造物は PCB 群にのみ観察された。以下個々の変化について考察する。

1) 分泌顆粒

電顕所見によれば、PCB 投与によって電子密度の高い顆粒がほとんどなくなり、電子密度の低い顆粒と雲絮状物質を含む顆粒が増加している。MMSP での検索においてもトルイジン・ブルーの分泌顆粒の結合能は約1/2となり明らかに低下していることが分かる。従って、PCB 投与により腺房細胞の分泌顆粒内の物質の性状に変化が起きたことが推察される。

武田 (1976)²⁶⁾はラットのエブネル腺の分泌顆粒を組織化学的に観察し、顆粒はトルイジン・ブルーに対して異調性を示さないが、PA-TCH 反応に弱陽性を示すことを報告している。このことから、ラットのエブネル腺の腺房細胞は少量のムコ物質を含む漿液細胞であると述べている。市川 (1977)²⁷⁾は漿液細胞の分泌顆粒の特徴として、その電子密度は含まれる物質の化学組成を反映し、一般に、ムコ糖成分の含有量が多いものほど電子密度が低くなると述べている。また渡ら (1969)²⁸⁾は、V.A 過剰投与ラットの腺外分泌細胞を観察し、核萎縮により mRNA 形成が阻害されて、粗面小胞体の分泌物形成機能が低下した結果、透明な空胞状の分泌顆粒が増加すると報告している。

以上のことから、PCB 投与及び V.A 欠乏ラットにおけるエブネル腺の腺房細胞では何らかの代謝変化が生じ、分泌顆粒内のムコ物質が増加したと考えられる。今回の実験で PCB 群および V.A 欠乏群において核の障害が認められていることから、mRNA の形成が妨げられて、細胞質での粗面小胞体の分泌物形成機能が低下したと考えられる。粗面小胞体で形成された分泌物は、ゴルジ装置へ転送されて糖質の添加および濃縮がおこなわれ、濃縮胞を経て分泌顆粒となり一時的に細胞内に貯蔵される。PCB 群および V.A 欠乏群において、粗面小胞体での蛋白合成能の低下によってゴルジ装置に運ばれる分泌物が減少し、それに基づく分泌顆粒の明調化が起こるのではないかと考えられる。

2) 粗面小胞体

PCB 群と V.A 欠乏群において粗面小胞体内腔に観

察された雲絮状物質は、V.A 過剰投与例^{28,29)}にも報告されている。渡ら (1969)²⁸⁾は、粗面小胞体の分泌物形成機能がある程度保たれている場合、ゴルジ装置が急激に萎縮すると、小胞体囊の中に形成された分泌物はゴルジ装置に転送されず、小胞体内に貯留し、小胞体囊を強く拡張させる、と述べている。本実験で観察された粗面小胞体の変化もゴルジ装置に転送されるべき物質の貯留によって生じたものと考えられる。

3) ミエリン様構造物

PCB 群および V.A 欠乏群の腺腔には、対照群ではほとんど観察されなかったミエリン様構造物が認められた。この場合、ゴルジ装置の成熟面の膜のミエリン化が見られることから、ミエリン様構造物は分泌顆粒の中に分泌物と共に封じ込められ、開口分泌によって腺腔に分泌されたものと考えられる。未発表ながらこのことを裏づける像をチャイニーズハムスターを使った PCB 投与実験でも観察している。また V.A 欠乏群の腺腔には膜様物質も多数観察された。

4) ミトコンドリア

PCB 群にはミトコンドリア内および隣り合ったミトコンドリアの間にミエリン様構造物 (inter-mitochondrial bridge) が出現した。しかも *marginated mitochondria* に多く観察された。渡ら²⁸⁾は *marginated mitochondria* の所見に関する報告において、ミトコンドリアの細胞形質膜への接着については、ミトコンドリアが単に機械的に遍在移動して接着したものではなく、必要なエネルギーを細胞外液から直接摂取するためか、あるいは形質膜を介しての物質交換のためのエネルギーを供給しているためかも知れない、と述べている。

ミトコンドリアの変性については、さまざまな病的環境下での報告がある。その中で、V.A 過剰投与ラットにおける膵臓外分泌細胞²⁸⁾と銅キレート剤 *cuprizon* を投与したマウスの肝細胞³⁰⁾に今回の実験結果と同様な所見が報告されている。また、リボフラビン欠乏食飼育マウスの肝細胞でミトコンドリアの空胞変性が認められている³¹⁾。山元ら (1971)³²⁾は、油症患者の肝細胞にも巨大ミトコンドリアおよび封入体の高頻度出現などの形態異常を認めている。この症例では、血中トリグリセリドの異常高値を招来していることから、肝細胞において脂質代謝異常が起り、ミトコンドリア膜の磷脂質構成に異常があることを反映したものであると報告されている。若林 (1982)³⁰⁾は、ミトコンドリアの巨大化は細胞環境の変化に対する適応現象の一つと推定し、ミトコンドリア内でのミエリン様構造物の出現はミトコンドリア

の巨大化に先だって現れる変化であると述べている。

PCB 投与によって肝臓 V.A 量の著明な低下と過酸化脂質の上昇およびミクロゾームのチトクローム P-450 の誘導が報告されている^{20,21)}。以上のことから、ミトコンドリア内に見られたミエリン様構造物は、PCB によって細胞環境が変化しミトコンドリアの膜が二次的に傷害されたことにより生じたものと考えられる。

5) 脂肪滴

脂肪滴は本実験の対照群にも見られるが、PCB 群においてはその数が増加している。エブネル腺を取り囲む舌筋を電顕で観察すると、対照群には見られない脂肪滴様の空胞が多数観察された。Hand (1970)²⁵⁾は正常ラットのエブネル腺腺房細胞に電子密度の低い空胞が存在し、これが脂肪滴であることを指摘している。

また油症患者の肝細胞³²⁾や PCB 中毒サルの歯肉¹³⁾に脂質の空胞様構造物が多数観察されたことが報告されている。PCB 投与によって細胞内に脂肪様の物質が沈着する経過について、山元 (1979)³³⁾は次のように述べている。ウサギにカネクロール400を連続投与 (10mg/kg/day) すると肝細胞質全域に滑面小胞体が増殖して、小胞体は小腔状を呈し、内腔に脂肪様の物質が貯留する。肝細胞にはライソゾームも増加し、細胞壊死の状態を呈する。一方、微量ずつ PCB を長期間飼料に混ぜて経口投与した場合には、滑面小胞体の増殖によって PCB に対応する一方で、細胞としての諸機能を保持し、脂肪が沈着する。この場合は蛋白質合成能が低下するために、リポ蛋白質 (VLDL) の生成機能の低下が起っていると報告している。

エブネル腺と肝細胞では細胞の機能に大きな違いがあるものの、PCB が腺細胞の機能を低下させて空胞様構造物の出現を引き起こしたものと考えられる。

B. 導管部

ラットやマウスの耳下腺、ハムスターとマウス (雌) の顎下腺などの介在部は恒常的に分泌顆粒が認められ、分泌機能を営んでいると考えられている。また、介在部は腺実質の修復機転にあたる *cell reservoir* としての役割を果たすものと考えられている²⁷⁾。エブネル腺の導管は大唾液腺の介在部と同様な構造をしていることから、機能的にも類似していると考えられる。

PCB 投与群と V.A 欠乏群の腺房細胞は類似した変化を示したが、導管上皮においてはやや異なっていた。PCB 投与群の導管上皮細胞にみられる変化は、核膜の乱れや分葉核の出現、分泌顆粒の減少、ゴルジ膜のミエリン化であった。一方、V.A 欠乏群では分泌顆粒の数

の変化はなく対照群とほとんど同じであった。一部の上皮自由面はアポクリン様の突出を示していた。

PCB 投与による分泌顆粒の減少は、核、粗面小胞体およびゴルジ装置の変化から考え合わせると、細胞の機能低下によると考えられる。一方、V.A 欠乏では分泌顆粒の形成は衰えず、しかもアポクリン様分泌機能を思わせる構造を呈していた。アポクリン様突起についてはマウス、ラット、ハムスターの耳下腺線条部³⁴⁾やナキウサギの顎下腺線条部³⁵⁾に観察されているが、その機能については明らかでない。導管上皮細胞が腺房細胞の cell reservoir 的役割を担うとするならば、V.A 欠乏によって腺細胞の機能低下が生じたことにより、一部の導管上皮細胞が腺細胞の代わりを担っているのかもしれない。しかし一方の PCB 群における導管上皮では、そのような構造は観察されなかった。

4. 血清 V.A 量に与える影響

各群の血清 V.A 量を測定すると、Fig. 2 に示すごとく PCB 投与群は対照群の約 $\frac{1}{2}$ に低下していた。Innami ら (1976)¹⁸⁾は0.1% PCB 投与10日目の肝臓 V.A 量が対照群の $\frac{1}{2}$ 以下、血清中のレチノール結合タンパク質は $\frac{1}{2}$ に減少したことを報告している。PCB は動物に V.A 欠乏を起させるように作用し、ひいては V.A の要求量を増大させるもので、PCB の毒性の一部は V.A 代謝障害を介して現れる可能性がある。PCB は、DDT やディルドリン等の有機塩素系化合物やアルコールなどと同じく肝臓 V.A の分解に関与する物質であることが知られているが、その機構についてはいまだ明らかでない。

5. PCB の影響

PCB をラットに投与すると、その諸臓器に一定の病変を惹起することが武内ら (1969)³⁶⁾によって報告されている。その主な病理変化としては皮膚及びその付属器官、食道、前胃 (ラット) の上皮の角化亢進、目のマイボーム腺の増殖と排出管上皮の増殖および角化亢進、肝障害などがあげられている。これらの変化が肝障害に続発する V.A 欠乏症と見るか、あるいは PCB の直接作用と見るかは明らかでないが、PCB 中毒症と V.A 欠乏症との因果関係は十分検討の余地があると述べられている。

PCB を長期間、ラットに投与すると肝に腫瘍性の変化が生じること³⁷⁾、また培養 Hela 細胞の細胞膜に強い変化が現れ、細胞の収縮、突起形成、バルーン形成、破裂の経過をとり死滅すること³⁸⁾などが報告されている。さらに傷害を受けた細胞質の一部は平滑な限界膜で

囲まれた自家食胞あるいは watery vacuole²⁸⁾と同様な空胞を形成したり、またライソゾーム膜を不安定化し、細胞質の傷害を促進するという報告^{39, 40)}もある。

藤田ら (1975)⁴¹⁾は Kanechlor 400 (PCB) が多くの種類の動物に対し溶血作用があること、その本態は血球膜の脂質部分に対する Kanechlor 400の親和性にあることを報告している。このことは、³H-Kanechlor 400が肝臓のライソゾームに取り込まれること⁴²⁾、またライソゾーム膜が一重の lipoprotein⁴³⁾よりなることから支持されている。さらに、*in vivo* の場合には PCB 投与による脂質の過酸化^{20, 21)}も膜の不安定化の要因をなしているものと考えられている。

PCB はエブネル腺にも障害をもたらすし、しかもその障害の一部は PCB が生体内 V.A の分解を介して現れるものであろうことが上述の文献的比較考察の上からも十分考えられる。エブネル腺が障害を受けることによって、分泌機能は低下し、味覚乳頭溝を洗い流して新しい味質液の感受に備えるという本来の機能に対応できなくなり、結果的には味覚の感受機構に影響を与えるものと考えられる。日常の食生活において、PCB を含む種々の汚染物質を何らかの形で摂取している現在、口腔内ひいては体全体の健康を維持するためにも、我々は栄養的防衛手段を講じなければならないであろう。

結 論

Polychlorinated Biphenyls (PCB) 投与 (飼料中 0.1%) がエブネル腺の組織構造にどのような影響を及ぼすかを知るためにラット (Wistar 系雄、3 週齢、体重 38—45g) 30頭を用いて実験を行い光顕的および電顕的に観察した。なおビタミン A 欠乏との関係を知るためにそれらの組織像と比較検討した。

主な結果は次の通りであった。

1) PCB 群は、PCB 投与後 2 週半ばまで対照群と同様に体重が増加したが、その後減少し始め、脱毛、下痢および目ヤニの付着などの PCB 中毒特有の症状を示した。V.A 欠乏群は 3 週半ばまで対照群と同様に成長し、その後 plateau stage が続き、5 週目より体重は減少し始めた。

2) 光顕的には、PCB 群の腺房細胞は分泌顆粒の染色性の低下、脂肪滴の増加、腺腔の拡大および多くの空胞様構造物の出現などの著明な変化が観察された。

3) 電顕的には、PCB 群における腺細胞の核はピクノシスを呈し、分泌顆粒は一樣に電子密度の低い顆粒と雲絮状物質を含む顆粒とが混在していた。粗面小胞体

の内腔は拡張し、雲絮状物質で満たされていた。ゴルジ装置は一般に萎縮傾向を示し、その成熟面にはミエリン様構造物が観察された。ミトコンドリアではクリスタの数の減少とミエリン様構造物の出現および inter-mitochondrial bridge の形成などが認められた。さらには、多数の自家食胞や watery vacuole などが観察された。そのほか、腺腔内には膜様構造物やミエリン様構造物が多数認められた。

4) V.A 欠乏群では核濃縮、粗面小胞体の拡張、ゴルジ装置の膜のミエリン化、ミトコンドリアの変性および分泌顆粒の明調化や癒合、空胞の多数出現および腺腔内や分泌細管内のミエリン様構造物、膜様物質の出現などの変化が認められた。本群では PCB 投与群にみられたミトコンドリア内のミエリン化はほとんど観察されなかった。また脂肪滴の数は対照群と比較し変化がなかった。

5) 導管上皮細胞の管腔面に存在する分泌顆粒は

PCB 投与群で減少していたが、V.A 欠乏群では変化がなく管腔面の細胞質の一部はアポクリン様突起として観察された。

6) トルイジン・ブルーに対する分泌顆粒の染色性を定量化すると、最大吸収波長は対照群、PCB 投与群とも 580nm で、吸光度は PCB 投与群が対照群の約 1/2 に低下していた。

以上のことから、PCB がエブネル腺に与える影響の一部は V.A 欠乏を介して現れるものでないかと考えられる。

本研究の一部は昭和59年文部省科学研究補助金、奨励研究 (A) 59771301によって行われた。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました嶋村昭辰教授ならびにご支援をいただきました教室の各位に深謝の意を表します。

引用文献

- 1) Risebrough, R.W., Rieche, P., Peakall, D.B., Herman, S.G. and Kirven, M.N.: Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature* 220: 1098—1102, 1968.
- 2) Koeman, J.H., ten Noever de Brauw, M.C. and de Vos, R.H.: Chlorinated biphenyls in fish, mussels and birds from the river rhine and the Netherlands Coastal Area. *Nature* 221: 1126—1128, 1969.
- 3) Tatsukawa, R.: PCB pollution of the Japanese environment. In: *PCB Poisoning and Pollution*. Kodansha, Tokyo, 1976, 147—179.
- 4) 村上保行・桑原克義・松本比佐志・前田浩一郎・田中之雄・池辺克彦・尾花裕孝・堀 伸二郎・田中涼一・榎本 隆: 大阪地区の各種汚染物摂取量調査(V). 大阪府立公衛研所報 食品衛生編 14: 59—64, 1983.
- 5) 薬師寺 積・前田浩一郎: 母乳および血液中の PCB 等について (第11報). 日公衛誌 30(11附録): 611, 1983.
- 6) 塚元久雄 ほか33名: 油症患者が使用したライスオイル中の有毒物質の化学的検索. 福岡医誌 60: 496—512, 1969.
- 7) 青野正男・岡田 宏: 油症患者の口腔所見について. 福岡医誌 60: 468—470, 1969.
- 8) 奥村英彦・池尻 茂・古本克磨・六反田 篤・中山種秋・深水康寛・梅田玄勝: 油症患者の口腔所見. 日災害医誌 24: 638—643, 1976.
- 9) Rokutanda, A., Fukamizu, Y., Kiyomoto, K., Murakami, K. and Nakayama, T.: Oral examination of Yusho patients. Part 1 pigmentation. *J. Kyushu Dent. Soc.* 30: 107—129, 1976.
- 10) 曾我宏世: 塩化ビフェニール中毒症 (油症) の口腔現象. 第1報 口腔粘膜所見と皮膚症状について. 日口科誌 25: 64—73, 1976.
- 11) 吉原新一 ほか22名: サルの PCB 中毒症に関する予備的研究. 福岡医誌 70: 135—171, 1979.
- 12) 福山 宏・赤峰昭文・青野正男: 実験的 PCB 中毒サルにおける口腔所見について. 福岡医誌 72: 155—

184, 1981.

- 13) 橋口 勇・赤峰昭文・中野嗣久・青野正男・福山 宏：実験的 PCB 中毒サルにおける歯肉上皮の微細構造について。福岡医誌 74：246—254, 1983.
- 14) 橋口 勇：PCB 投与ラットにおける歯牙硬組織への影響について。福岡医誌 76：221—228, 1985.
- 15) 印南 敏・東条仁美・宇津木良夫・中村敦子：PCB の毒性と栄養 (第 1 報) PCB の毒性とビタミン A. 栄養学雑誌 32：58—66, 1974.
- 16) Innami, S., Nakayama, A. and Nagayama, S. : Polychlorobiphenyl toxicity and nutrition. II. PCB toxicity and vitamin A (2). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 20 : 363—370, 1974.
- 17) Innami, S., Nakamura, A., Kato, K. and Miyazaki, M. : Polychlorinated biphenyls toxicity and nutrition. IV. PCBs toxicity and vitamin A (3). *Fukuoka Acta Med.* 66 : 579—584, 1975.
- 18) Innami, S., Nakamura, A., Miyazaki, M., Nagayama, S. and Nishide, E. : Further studies on the reduction of vitamin A content in the livers of rats given polychlorinated biphenyls. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 22 : 409—418, 1976.
- 19) Innami, S., Ikegami, S., Saito, M., Nakamura, A. and Nagayama, S. : Lack of responsibility of lipid peroxidation for reduction of vitamin A in the liver of rats given polychlorinated biphenyls. *Nutrition Reports International* 25 : 931—940, 1982.
- 20) 永山スミ子・池上幸江・斉藤衛郎・印南 敏：ラット肝臓におけるビタミン A 貯蔵量と過酸化脂質の生成に及ぼす PCB と DDT 複合投与の影響。栄食誌 38：265—272, 1985.
- 21) 永山スミ子・池上幸江・斉藤衛郎・印南 敏：PCB と DDT の複合投与による肝臓内ビタミン A の減少と過酸化脂質の生成に対する飼料脂質の影響。栄食誌 38：273—278, 1985.
- 22) Trowbridge, H.O. : Salivary gland changes in vitamin-A-deficient rats. *Archs oral Biol.* 14 : 891—900, 1969.
- 23) Karnovsky, M.J. : A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27 : 137A—138A, 1965.
- 24) 勝井五一郎：ビタミン A 定量法。ビタミン 56：97—101, 1982.
- 25) Hand, A.R. : The fine structure of von Ebner's gland of the rat. *J. Cell Biol.* 44 : 340—353, 1970.
- 26) 武田正子：エブネル腺腺房細胞および導管細胞分泌顆粒の電子顕微鏡的研究。歯基礎誌 18：60—74, 1976.
- 27) 市川 厚：消化腺細胞。動物細胞学 I (小川和朗・他編)。朝倉書店、東京、1977, 47—69.
- 28) 渡 仲三・鳥沢和義・佐伯 暁・高田一也：ビタミン A 長期投与による腭臓の変化の電子顕微鏡的研究。*J. Electron Microsc.* 43 : 973—986, 1969.
- 29) Regeji, J.A. and Rowe, N.H. : Morphologic effects of hypervitaminosis A on rat submandibular gland. *Archs. oral Biol.* 17 : 1609—1618, 1972.
- 30) 若林 隆：ミトコンドリアの病理。蛋白質 核酸 酵素 27：30—48, 1982.
- 31) Tandler, B. and Hoppel, C.L. : Ultrastructural effects of riboflavin deficiency on rat hepatic mitochondria. *Anat. Rec.* 196 : 183—190, 1980.
- 32) 山元寅男・平山千里・入佐俊武：油症患者肝臓の形態学的所見補遺。福岡医誌 62：85—88, 1971.
- 33) 山元寅男：小胞体と薬物代謝。電子顕微鏡 14：2—9, 1979.
- 34) 峰田天雄：ヒトおよび諸種哺乳動物唾液腺の組織学的、組織化学的ならびに電子顕微鏡的研究。V. ハムスター耳下腺の電子顕微鏡的研究。歯基礎誌 14：59—100, 1972.
- 35) Suzuki, S., Ago, A., Nishinakagawa, H. and Otsuka, J. : Fine structure of the mandibular gland in pika (*Ochotona rufescens rufescens*). *Exp. Anim.* 34 : 267—276, 1985.
- 36) 武内忠夫・富尾延江・衛藤光明・松本英世・藤崎明子・児玉光昭・須古修二：カネクロール (塩化デフェニ

- ール化合物) 混入米ぬか油中毒に関する実験病理学的研究. 熊本医誌 43:63—86, 1969.
- 37) Kimura, N.T. and Baba, T.: Neoplastic changes in the rat liver induced by polychlorinated biphenyl. *Gann* 64:105—108, 1973.
- 38) 森良一・藤田晃一・山口みどり・吉村英敏・山本弘明: ポリ塩化ビフェニール (PCB) の培養 HeLa 細胞に及ぼす影響. 福岡医誌 66:568—573, 1975.
- 39) 高橋慶吉・佐伯清太郎・加藤敬太郎: ラット肝リソゾーム膜に及ぼすポリ塩化ビフェニールの影響. 福岡医誌 70:93—98, 1979.
- 40) 伊藤保之・西村顕治・村田敏郎: コイ膀胱ライソゾームに及ぼす PCB の影響. 日水誌 46:469—472, 1980.
- 41) 藤田晃一・森良一・山口みどり・吉村英敏・山本弘明: ポリ塩化ビフェニール (PCB) の溶血作用および血球凝集様作用. 福岡医誌 66:574—578, 1975.
- 42) 藤田節治・辻宏・加藤敬太郎・佐伯清太郎・塚元久雄: Biphenyl Chloride 誘導体のラット肝ミクロゾームに与える影響. 福岡医誌 62:30—41, 1971.
- 43) de Duve, C. and Wattiaux, R.: Functions of lysosomes. *Ann. Rev. Physiol.* 28:435—492, 1966.