

# 葉酸이 白鼠口腔粘膜에 미치는 影響에 關한 組織化學的 研究

서울大學校 齒科大學 口腔解剖學敎室

(指導 金 永 昌 敎授)

邊 碩 斗

.....> Abstract <.....

## HISTOCHEMICAL STUDY ON THE ORAL MUCOSA OF FOLIC ACID-ADMINISTERED ALBINO RATS.

Byun Suk Doo, D.D.S.

(Directed by Prof. Kim Young Chang, D.D.S.)

Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, S.N.U.

The effects of folic acid on the oral mucosa of albino rats were histochemically studied in the twenty four male rats, weighing about 100gm.

Seven groups of 3 each were injected with 0.2ml folic acid (folic acid 0.5mg. was dissolved in physiological saline 0.2ml) subcutaneously, during 1, 2, 3, 5, 7, 10 and 14 days respectively.

Oral mucosa of rats were removed from upper molar region and fixed in 10% formalin, cold absolute alcohol, Carnoy's solution and acetone.

The serial sections were histochemically stained by McManu's PAS reaction, Mowry's metachromasia, alloxan-Schiff reaction, and azo dye method for alkaline phosphatase. The comparative staining method was hematoxylin-eosin stain.

The results were as follows:

- 1) Alkaline phosphatase reaction of stratum spinosum and stratum granulosum tended to increase after 7 and 10 days of folic acid administration.
- 2) PAS reactions of basement membrane and lamina propria increased after folic acid administration.
- 3) Metachromasia of stratum spinosum and stratum granulosum were slightly increased after 3, 5 and 7 days of folic acid administration and returned to the level of Control after 10 days.
- 4) In the oral mucosa, alloxan-Schiff reaction increased after 7 days of folic acid administration.

—目 次—

I. 緒 言  
 II. 研 究 方 法  
 III. 研 究 成 績  
 IV. 考 按 言  
 V. 結 言  
 參 考 文 獻

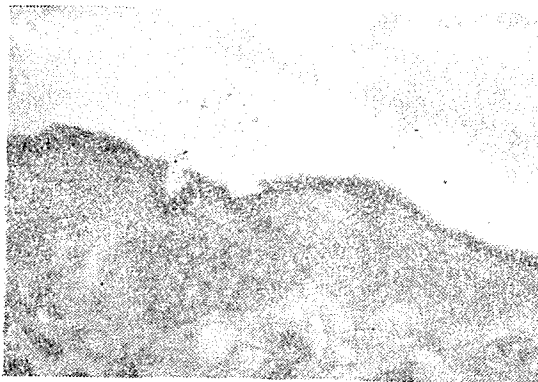
I. 緒 言

生體內的 蛋白—核酸合成에 있어 葉酸(Folic acid or pteroylglutamic acid)는 核酸代謝 特히 uracil, thymine合成에 Vitamin B<sub>12</sub>와 더불어 必要하며 또 「아미노」 酸代謝에서 serine 및 methionin合成에 關聯을 가지는데 이는 活性炭素을 中心으로 하여 C<sub>1</sub> 中間體 CooH의 生成과 轉位에 依함이라고 思考되어 오고 있다.

近來 口腔粘膜에 關한 組織化學的研究가 많이 報告<sup>3, 4, 5, 10, 14</sup>) 되었으나 特히 葉酸이 口腔粘膜에 미치는 影響에 關한 業績을 接見할 수가 없어 著者는 白鼠口腔粘膜에 있어 鹽基性解磷酵素, 多糖類 및 蛋白質等의 動態를 組織化學的方法으로 追求할 目的下에 本 研究을 試圖하였다.

II. 研 究 方 法

一定한 飼料로서 一定期間 飼育한 體重 100gm內外의



第 1 圖 Alkaline phosphatase反應：  
葉酸 7日間 投與群, 10×16

健康한 雄性白鼠 24頭를 選擇하여 中 葉酸(辰己化學製, 日本)을 投與한 實驗群에 21頭와 正常群에 3頭를 使用하였다.

實驗群은 그 投與日數에 따라 1日, 2日, 3日, 5日, 7日, 10日 및 14日間의 7個群에 3頭式 配定하고 各 投與期間에 1日 1回式 葉酸 0.5mg(生理的 食鹽水 0.2ml 에 溶解)를 背部皮下에 注射하였다.

實驗動物은 그 投與期間의 最終 注射日로 부터 24時間 經過後 各各 斷頭하여 犧牲시킨 後 上顎白齒部에서 齦頰移行部の 口腔粘膜을 剔出하여 生理的 食鹽水로 洗滌하고 10% formalin, 無水 alcohol, Carnoy氏液 및 acetone에 各各 固定하였다. 固定後 7 $\mu$ 의 paraffin連續切片을 만들어 下記의 染色法에 따라 各各 對照 染色 및 各組織化學的染色을 實施하였다.

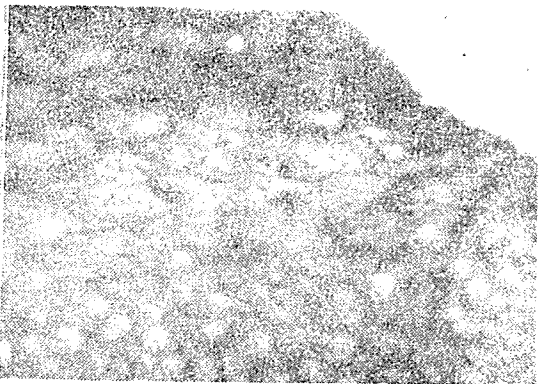
이때 各群에서 一部分의 切片을 取하여 全群의 切片을 同一染色液으로 同一時間동안 染色한 標本에서 相互 比較하여 檢鏡하였다.

- a) 鹽基性解磷酵素(alkaline phosphatase); azo色素法<sup>10)</sup>
- b) 多糖類(中性); McManus의 PAS反應<sup>7)</sup>
- c) 多糖類(酸性); 0.05% toluidine blue染色<sup>8)</sup>
- d) 蛋白質; 安間, 市川의 alloxan-Schiff反應<sup>9)</sup>
- e) Hematoxylin-cosin 二重染色

III. 研 究 成 績

1) alkaline phosphatase 反應에 依한 所見;

口腔粘膜上皮의 角化層直下의 一部에 細胞周緣部 乃至 細胞間隙에 僅少한 暗紫色微細顆粒狀 乃至 瀰漫性的 alkaline phosphatase反應을 認定한 以外는 正常群은



第 2 圖 Alkaline phosphatase反應：  
葉酸 10日間 投與群, 25×16

거지만 陰性이었다. 粘膜下層의 毛細管壁은 陽性反應의 傾向이었다.

實驗群의 alkaline phosphatase反應은 葉酸 7 및 10日間 投與群에 있어 粘膜上皮에 比較的 強度의 alkaline phosphatase 陽性反應이 認定되었다.

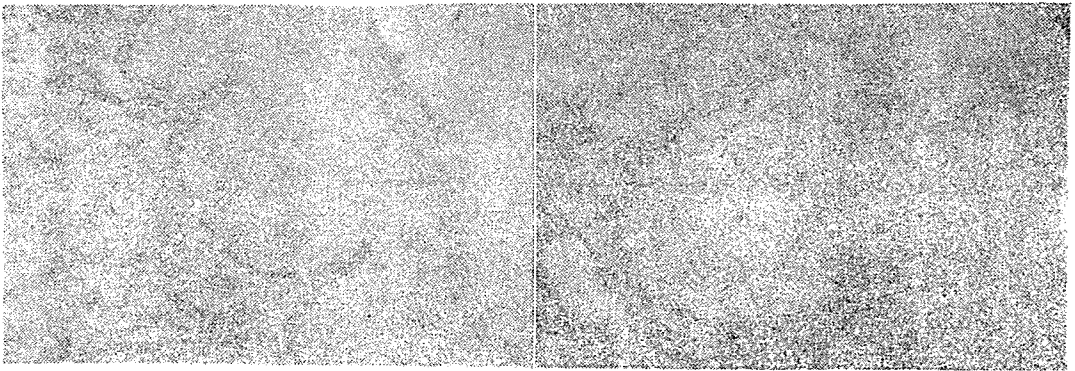
即 正常群에서 觀察되지 않았던 顆粒細胞層으로부터 棘細胞層上部에 걸쳐 同一한 陽性反應을 示現하였다. 그리고 反應部位는 細胞周緣의 細胞膜 및 細胞間質에서 強한 陽性反應이었고 核은 正常群, 實驗群에서 全部의 細胞에 있어 陰性이었다.

實驗群의 粘膜下結合組織은 正常群과 比較하여 別般

反應度의 差異가 없어 보였다.

## 2) PAS 反應에 依한 所見:

正常群 및 實驗群 粘膜上皮에 있어 顆粒細胞層은 輕微한 淡紅色의 陽性反應이었고 棘細胞層의 細胞膜은 強陽性이었으나 細胞質은 거지만 陰性反應이었고 基底細胞層의 細胞膜은 紅色의 中等度로 顯色하였다. 基底膜 및 粘膜下層은 葉酸 1日, 2日, 3日 및 5日間 投與群에서 正常群에 比해 中等度로 増染되며 葉酸 7日, 10日 및 14日間 投與群에서는 極히 増強된 深紫色으로 増染되었고 또한 基底膜은 粘膜下層에 比해 反應度가 強하였다.



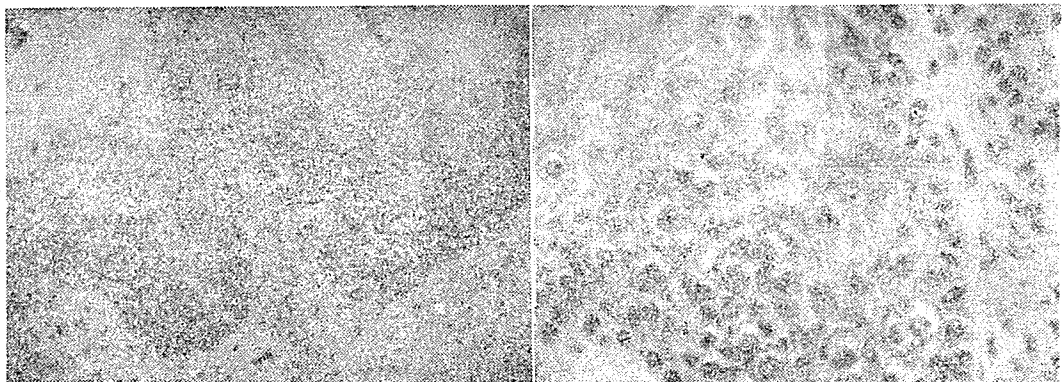
第 3 圖 PAS反應: 葉酸 4日間 投與群, 10×16

第 4 圖 PAS 反應: 葉酸 4日間 投與群, 25×16

## 3) Toluidineblue 染色에 依한 所見:

正常群에서 粘膜上皮의 基底細胞層 및 棘細胞層에서

異染되는 細胞質에 靑染色 顆粒이 充滿되어 紫色調로 보였다. 葉酸 3日, 5日 및 7日間 投與한 實驗群의 基底細胞層 및 棘細胞層에서는 正常群에 比해 異染性이 輕



第 5 圖 Metachromasia 反應:  
葉酸 3日間 投與群, 10×16

第 6 圖 Metachromasia反應:  
葉酸 3日間 投與群, 25×16

微하게 增加되었으나 葉酸 10日間 投與群에서 그 反應이 甚히 減少되며 葉酸 14日間 投與群에서는 거의 異染色을 볼 수 없었다. 正常群 및 實驗群의 粘膜下層은 膠原纖維는 靑染 基質은 靑紫色으로 보였다.

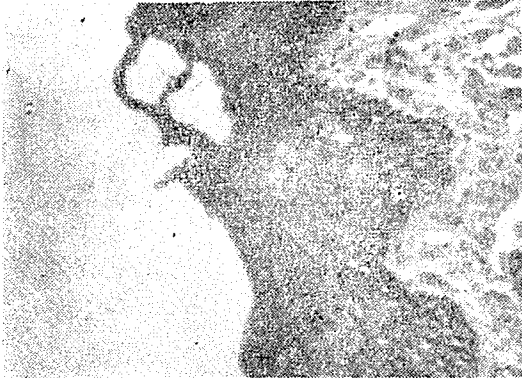
#### 4) Alloxan-Schiff 反應에 依한 所見;

正常群의 粘膜上皮에서 角化層은 中等度の 赤色反應을 보였고, 顆粒細胞層, 棘細胞層 및 基底細胞層은 그

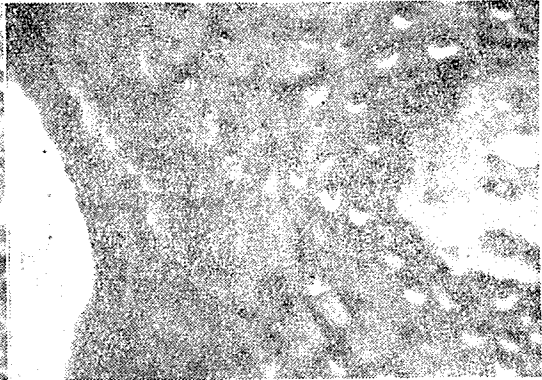
反應이 極히 輕微하여 淡赤色으로 呈染되었다.

實驗群中 葉酸 2日, 3日 및 5日間 投與群에서 粘膜上皮的 各層이 모두 減染되는 傾向이였으나 葉酸 7日間 投與群에서 부터 増染되기 始作하여 葉酸 10日 및 14日間 投與群에서 그 反應이 顯著히 增加하였다. 特히 角化層이 顯著하여 濃赤染되었다.

粘膜下層은 正常群 및 實驗群 共히 肥滿性으로 淡赤染되는 傾向이였고 別般 差異를 認定할 수 없었다.



第 7 圖 Alloxan-Schiff反應：  
葉酸 10日間 投與群, 10×16



第 8 圖 Alloxan-Schiff反應：  
葉酸 10日間 投與群, 25×16

### IV. 考 按

一般으로 口腔粘膜上皮的 大部分은 不全角化의 狀態下에 놓여 있고 角化層을 만드는 keratin은 적어도 2種以上の 蛋白質의 複合體라고 思考되며, 粘膜上皮的 各層中 角化層을 除外한 全層에서 RNA의 合成이 이루어 지므로 蛋白合成도 이들 各層에서 營爲된이라고 推則된다. 또한 上皮組織의 角化 即 keratin의 合成과 glycogen의 蓄積에 相互 關聯性을 가진다고 보며 後者는 前者를 爲한 供給을 提供한다고도 思考되어 오고 있다.

水解酵素의 하나인 alkaline phosphatase는 正常口腔粘膜組織에서는 上皮細胞에는 없고 겨우 粘膜下組織의 毛細血管에서 認定된다고 數多한 研究者들에 依하여 報告되어 왔는데 本 實驗에서도 葉酸投與로 粘膜上皮組織에서는 그 活性의 變動을 볼 수 없었고 다만 粘膜下組織에서 活性의 上昇을 認定하였다. azo色素에 依한 組織化學的인 alkaline phosphatase의 呈色反應에 있어 色調에 依한 物質의 存在 및 量的關係에 對하여 言及할 境遇에는 恒常 充分한 注意가 더욱 必要하다고 생각된다.

現今 組織化學的인 染色反應으로 널리 應用되는 perio-

dic acid-Schiff反應(PAS)은 McManus에 依하여 最初에는 粘液質의 組織化學的인 判定에 利用되었으나 後 Marchese에 依하여 否定되었는데 粘液質에 特異性은 없고 現在에는 一般으로 中性多糖類(糖原, 中性粘液多糖類, 糖蛋白質, 糖脂質) 및 遊離「아미노」酸等に 陽性이고 過沃素酸의 酸化가 低溫이며 短時間에 實施한 條件下에서는 더욱 特異性을 招來하므로 PAS陽性物質의 主部는 中性粘液多糖類겠지만 어떤 種類의 蛋白質이 反應될 것이다.

鹽基性色素인 toluidine blue, methylen blue 등은 DNA와 RNA를 好染하고 多數의 物質이 非特異性으로 染色된다. toluidine blue의 異染性(metachromasia)에 關한 機序는 高分子酸性基物質과 鹽基性 anilin色素가 結合하면 色素分子가 共鳴構造를 喪失하여 光의 吸收가 短波長으로 移行하여서 長波長의 赤色을 呈示하며 이 境遇에 SO<sub>4</sub>基, COOH基을 가진 酸性多糖類의 順序로 異染性이 弱하여진다고 한다. 또한 이와같은 異染性物質로서 酸性多糖類以外에 酸性基를 가진 脂質의 存在를 留意하여야겠다. 그리고 Lison<sup>6)</sup>은 異染性의 安定性에 關하여 아직도 統制할 수 없는 各種의 要因이 많은 故로 染色結果의 判定을 慎重히 하여야 한다고 強調한 바 있다.

本實驗의 蛋白質反應에 應用한 alloxan-Schiff法은 alloxan의 作用으로 COOH基과 NH<sub>2</sub>基으로 된 CHO基을 Schiff試藥으로 染色시키는 方法인 故로 「아미노」酸 또는 peptide chain의 終末에 있는 NH<sub>2</sub>基(α-amino)를 證明하여 大體로 組織細胞의 總蛋白質量을 推定하는데 必要하다 하겠다.

本 研究成績을 綜覽하면 上皮의 各層의 alloxan-Schiff反應이 葉酸投與로 初期에는 染色性이 減弱되었다가 葉酸 7日間 投與群부터 漸次 顯著하게 増染됨을 보아 口腔粘膜炎에 있어 蛋白質代謝의 助長을 賦與함 이라 생각된다.

## V. 結 言

100gm內外의 實驗白鼠에게 葉酸 0.5mg을 連日一回 式 皮下注射로 投與한 後 口腔粘膜炎을 組織化學의 方法으로 檢索한 結果 다음과 같은 知見을 얻었다.

- 1) 葉酸 7 및 10日間 投與群에서 顆粒細胞層, 棘細胞層의 鹽基性磷酸酶反應이 増染하였다.
- 2) 葉酸投與로 上皮組織의 PAS反應은 正常群, 實驗群에서 別般 差異가 없으나 基底膜·粘膜炎下層에서 는 増染되는 傾向이었다.
- 3) 葉酸 3, 5 및 7日間 投與群에서 顆粒細胞層, 棘細胞層의 異染色性이 輕微하게 増染된 後 葉酸 10日間 投與群부터 漸次 減染하였다.
- 4) 葉酸 7日間 投與群부터 上皮組織의 alloxan-Schiff反應이 増染되는 傾向이었다.

## 參 考 文 獻

- 1) Carbrini, R.L. & F.A. Carranza: Histochemical study on alkaline phosphate in normal gingivae, varying the pH and the substrate, J.D. Res. 30:28, 1951.
- 2) 川勝賢作, 森昌彦: 人の口腔肉肉粘膜炎上皮代謝의 組織化學的研究, 日本口腔科學會誌, 7:123, 1958
- 3) 高在丞 外三人: α-tocopherol 投與한 白鼠口腔粘膜炎에 있어 肥滿細胞의 細胞化學的反應, 最新醫學 11: 172, 1968.

- 4) 金榮喆: α-tocopherol 投與한 白鼠口腔粘膜炎의 組織化學的研究, 綜合醫學, 12:853, 1967.
- 5) 李勝雨: Calciferol이 白鼠口腔粘膜炎多種類에 미치는 影響에 關한 組織化學的研究, 最新醫學, 9:821, 1966.
- 6) Lison(今泉正譯): 組織化學および細胞化學, 白水社, 東京, 1962.
- 7) McManus, J.F.A. & Mowry, R.W.: Staining methods, Hoeber Medical Division, New York, 1963.
- 8) 森昌彦 外二人: Alkaline phosphatase의 組織化學에 於ける 固定と 證明法에 關する 吟味, 阪大齒誌, 4:145, 1959.
- 9) 岡本耕造 外二人: 顯微鏡的組織化學, 醫學書院, 東京, 1958.
- 10) 朴致善: Inositol이 白鼠唾液腺의 phosphatase 및 esterase에 미치는 影響에 關한 組織化學的研究, 最新醫學, 11:523, 1968.
- 11) Pearse, A.G.E.: Histochemistry, volume 1, Little, Brown, Boston, 1968.
- 12) Sauberlich, H.E.: Methionine, homocystine, choline, folic acid and vitamin B<sub>12</sub> in the nutrition of the mouse, J. Nutr. 68:141, 1959.
- 13) Schultz, S.: Observations of the acid mucopolysaccharides of human gingival, Odont. T.Kr. 66:1, 1953.
- 14) 申曼澈: Menadione投與한 白鼠口腔粘膜炎上皮的 糖原 및 核酸에 關한 組織化學的研究, 現代醫學, 7: 877, 1967
- 15) Wagner, A.F. & Folkers, K.: Vitamins and Coenzymes, John Wiley & Sons, New York, 1964.
- 16) Wislocki, G.B. et al.: Some histochemical reactions of mucopolysaccharides, glycogen, Lipids and other substance in teeth, Anat. Rec. 101:487, 1948.
- 17) Zander, H.A.: The distribution of phosphatase in gingiva tissue, J.D. Res. 20:347, 1941.