

Pyridoxine 投與한 白鼠琺瑯質形成에 있어

組織化學的 磷酸反應에 關한 研究

서울大學 齒科大學 口腔解剖學教室

<指導 金 永 昌 教授>

金 永 植

HISTOCHEMICAL PHOSPHORIC ACID REACTION ON AMELOGENESIS OF WHITE RAT APPLIED WITH PYRIDOXINE.

Kim, Young-Sick. D.D.S.

Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, S.N.U.
(Directed by Prof. Kim, Young-Chang. D.D.S.)

» Abstract «

The effect of pyridoxine on the incisors were histochemically studied for the purpose of identifying the phosphoric acid.

The microscopic observations were carried out by means of phosphoric acid reaction (Serra et Queiroz-Lopes method), mucoprotein reaction (Clara method), periodic acid-Schiff reaction (McManus method), methylene blue stain and hematoxylin-eosin stain.

In the experimental result, it was found that phosphoric acid reactions of ameloblast, Tomes' process and preenamel were remarkably increased after pyridoxine administration.

— 目 次 —

- I. 緒 言
- II. 材料 및 方法
- III. 結 果
- IV. 考 察
- V. 結 言
- 參考文獻

I. 緒 言

Amino酸 合成에 重要한役割을 營爲하는 pyridoxine

은 amino酸에 窒素를 含有시킬뿐 아니라, 그分子를 改變하는 助酵素로서, 脫炭酸反應에 關與하며, 磷과 結合한 pyridoxal phosphate는 serine, threonine, methionine, tryptophan等의 代謝에도 密接한 連關係를 가진다고 한다.

齒牙硬組織形成에 있어 pyridoxine이 琺瑯質, 象牙質의 發育成長 또는 形成障礙에 미치는 影響에 關한 研究는 基本 稀少하여 Chase²⁾, Rinehart & Greenberg¹¹⁾, 南⁹⁾等의 業績이 있으며, 著者は pyridoxine을 過剰投與한 幼若白鼠의 琺瑯質形成過程에서 主로 磷酸分布를 組織化學的方法에 依하여 觀察하였다.

II. 材料 및 方法

雌常한 50g内外의 雄性白鼠 32頭를 實驗動物로 選擇하여 一定期間 飼育한 後 그中 正常群을 除外한 pyridoxine 投與群(28頭)은 投與期間 1.3.5.7.10.14. 및 21日間의 7群으로 區分하고서, pyridoxine hydrochloride 5mcg 을 生理的食鹽水 0.2ml에 含有시켜 1日 1回式 一定時에 該當 白鼠背部에 皮下注射하였다.

各 實驗動物은 그投與期間에 따른 最終注射의 24時間 經過後 各各 犧牲시키고서, 左側下頸切齒部의 組織片을 切取하여 固定은 Serra液, Zenker液, Zenker-formalin液 및 Carnoy液을 利用하였고, Lorch液으로 脱灰한 後 paraffin包埋하여 7μ의 連續切片을 만들여 下記의 各 染色法을 實施한 標本에서 比較檢鏡하였다.

1. 鐻酸 ; Serra et Queiroz-Lopes法
2. 糖蛋白 ; Clara法
3. 中性多糖類 McManus法의 PAS反應
4. basophilia; 0.01% methylen blue染色
5. hematoxylin-eosin染色

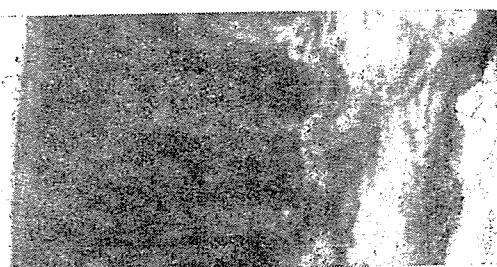
III. 結 果

正常群 白鼠下頸切齒의 發育端에서 鐻酸反應產物은 全般的으로 微細한 顆粒狀을 呈現하여 珍珠器內外의 未分化細胞內에서는 極히 微量의 反應產物이 不規則하게 分散되어 보이었다. 分化가 完了한 造珍珠細胞가 Tomes突起를 具備하고 珍珠質이 形成되면 原形質의 核周邊에 陽性物質이 出現하여 顆粒狀의 反應產物로 認定되고 基質形成의 終末期에 이르러 Tomes突起가 退縮되고 細胞의 길이가 短小하게 되면 造珍珠細胞와 Tomes突起의 陽性反應이 合流되어 彌漫性으로 보이었다. 그리고 中間層細胞와 外珍珠上皮細胞의 反應產物은 不規則한 分散狀의 微弱한 反應性이었고 珍珠髓과 珍珠前質의 基質은 거의가 陰性反應으로 認定되었다.

Pyridoxine 1 및 3日間 投與群의 鐻酸反應은 正常群所見과 別般 差異를 認定할수 없었으나 pyridoxine 5日間 投與群에서 造珍珠細胞의 原形質內에 微細한 帶青綠色調의 顆粒性인 陽性物質이 處處에 散見되어 Tomes突起內에 大小의 粗大한 陽性顆粒이 增加하여 보이었고 未石灰化珍珠前質의 基質이 陽性顆粒을 含有한 中等度의 青染色이었다.

Pyridoxine 7 및 14日間 投與群에서는 造珍珠細胞原形質內에 粗大한 深青色調의 顆粒性陽性物質이 細胞核을 識別할수 있는 程度로 充滿되어 보이었고 Tomes突起部은 造珍珠細胞의 長軸에 併行하는 深青色의 線條樣 陽性反應產物과 그 사이에 介在한 反應이 微弱한 部位가 明確하게 區別되었고 未石灰化珍珠前質은 濃淡의 差

異가 認定되는 青色調의 二層으로 보이었다. 또한 中間層細胞와 外珍珠上皮細胞의 鐻酸反應도 顯著하게 陽性反應產物이 增加하여 深青色調로 呈現하였고 珍珠髓의 陽性反應도 部分的으로 青染되었으나 陰性反應의 部位도 呈現되었다(第1圖).

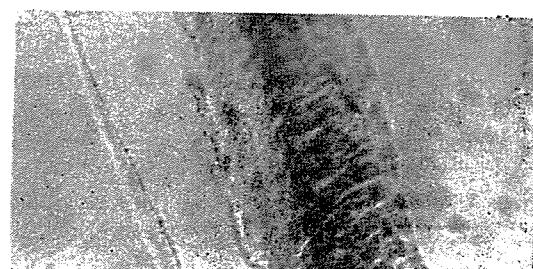


(第1圖) 鐻酸反應

Pyridoxine 21日間 投與群의 鐻酸反應은 7日 및 14日間 投與群에 比하면 若干 減弱한 陽性反應이었다. 그리고 石灰化한 成熟珍珠質은 脱灰操作을 實施하였으므로 鐻酸反應을 檢出할수 없었다.

糖蛋白中 mucine을 證明하는 Clara法에 依하여 造珍珠細胞와 珍珠前質의 基質에서 陽性反應이 上昇됨이 pyridoxine 10日間 投與群에서 認定되었고, 14 및 21日間 投與群에서도 正常群과 對照하면 染色性의 增強을 觀察할수 있었다(第2圖).

中性多糖類檢出의 PAS反應에서 造珍珠細胞의 陽性反應이 pyridoxine 7日間 投與群부터 上昇되었으며, 珍珠前質의 基質은 7 및 14日間에서 造珍珠細胞보다 增染된 所見이 있고, 好鹽基性物質의 染色性은 pyridoxine 5日間 投與群부터 造珍珠細胞原形質의 青染毛 顆粒性物質이 增加하였고, 7日間 投與群 以後에서 中間層細胞, Tomes突起 및 珍珠前質의 基質은 淡青染이 輕度이나 染色性이 上昇되는 傾向으로 觀察되었다(第3圖).



(第2圖) 糖蛋白反應



(第3圖) 中性多糖類反應

IV. 考 察

動物體에서 磷化合物의 主要部分은 磷酸化合物이고, 그中 無機磷酸鹽은 Ca鹽, Mg鹽, K鹽으로 存在하며 有機磷酸鹽은 細胞 또는 組織에 含有한 磷蛋白, 核蛋白, 磷脂質等이고, 本 實驗의 Serra et Queiroz-Lopes法是有機磷酸鹽의 仮面을 離脫시키고서 磷酸化合物의 磷酸을 ion形成하여 磷酸의 ion反應을 證明함에 있다.

白鼠切齒의 齒根端에는 齒胚組織이 常在하며 이齒胚部에서 恒時 造琺瑯細胞가 新生되어 琥珀基質이 生產되고 漸次 石灰化함에 따라 成熟琺瑯質이 形成됨은 周知된 바이다. 琥珀質을 直接 形成하는 造琺瑯細胞가 基質物質 또는 前段階物質을 合成 및 分泌하여 그基質의沈着이 起起됨은 組織化學, 自記放射射, 電子顯微鏡等의 研究手段에 依하여 宪明되어 가고 있어, 即 造琺瑯細胞가 keratin樣物質을 合成한다지만 基質物質의 生成이如何한 機轉에 依하는가는 아직도 不明한 實情이다.

또한 琥珀基質의 石灰化가 造琺瑯細胞 또는 基質自體의 化學的 및 物理化學的性狀에 依함인가도 宪明되지 못하였고, 造琺瑯細胞以外에 中間層細胞, 琥珀髓, 外琺瑯上皮細胞의 役割도 無視할수 似으며, Suga & Gustafson¹⁴⁾¹⁵⁾은 琥珀基質의 形成完了와 더불어 造琺瑯細胞에 依하여 一旦 形成沈着한 基質成分의 二次的脫却으로 因하여 石灰鹽結晶의 沈着이 起起됨이라 論述한 바 있고, Weinmann¹⁶⁾은 成熟期琥珀質은 顯著한 Ca과 P의 增量과 더불어 有機質과 水分의 減量을 招來한다고 하며, 또한 Watson¹⁷⁾은 琥珀質形成은 造琺瑯細胞內에서가 아니고 細胞外에서 이루어진다는 說이 有力視되고 있으나 琥珀質의 形成機構에 對하여는 많은 研究가 必要하다고 思惟한다.

Vitamin類인 pyridoxine의 酸化還元酵素系의 助酵素로서 生命維持와 創傷治癒에 必須要素라고 星川¹⁸⁾은 強調한바 있고, Chase²⁾는 pyridoxine缺乏 飼養鼠에서 琥珀器의 退行變性과 琥珀質의 形成障礙를 觀察하였으

며, Boose¹⁹⁾에 依하면 pyridoxine缺乏은 collagen 生成을 低下시킨다는 業績이 있고, 南²⁰⁾은 pyridoxine投與가 造象牙細胞層의 磷酸反應을 顯著하게 增強시킨다고 觀察한바 있다.

齒牙硬組織의 無機鹽沈着에서 apatite結晶의 核形成時 磷酸ion을 重要視하는 Dulce²¹⁾는 石灰化部位의 磷酸濃度가 높아진다고 하며, Glimcher & Krane²²⁾에 依하면 核形成에 磷酸ion이 結合되면 磷酸ion이 =N-P 또는 =O-P와 같은 alkylamide나 ester를 만들어 Ca⁺⁺과 結合이 容易하다고 報告하였고, Neiland & Stumpf¹⁰⁾는 pyridoxal phosphate의 磷酸鹽은 無機磷酸鹽으로 變化하지 않는다는 實驗結果가 있다.

또한 人胎의 琥珀質에서 中性可溶性蛋白과 酸溶性蛋白의 磷酸量을 高壓電氣泳動法으로 分割하니 磷酸은 serine 또는 serine을 含有한 peptide에 付着됨을 보아 이와같은 磷酸이 apatite結晶形成의 核으로 重要한 役割을 하여 蛋白과 無機物結晶을 結合시킨다고 思考하고 있다⁶⁾.

無機物沈着의 基礎가 되는 有機性構成材料로서 齒牙硬組織의 非線維性基質은 Sobel¹³⁾, Leblond⁸⁾에 依하면 硫酸을 含有한 酸性粘液多糖類가 石灰化의 local factor라 하며, 組織化學的으로는 石灰化基質이 PAS陽性이지만 chondroitin sulfate의 存在를 確定할만한 好鹽基性反應이 似다고 하며, Scheinmann¹²⁾等은 琥珀器에서 glycogen以外의 粘液多糖類가 McManus法에서 琥珀髓가 強陽性이고 造琺瑯細胞는 陽性이며, metachromasia가 琥珀髓에서 顯現됨을 觀察하였고, 須賀²³⁾는 石灰化가 進涉되는 琥珀基質에서 酸性粘液多糖類反應을 檢出하였으며, Engel⁴⁾은 發育齒胚의 造琺瑯細胞 및 琥珀基質에서 多糖類 또는 糖蛋白複合物의 存在를 報告하였는데, 本 實驗結果에서 pyridoxine 10日間投與群의 造琺瑯細胞 및 未石灰化琥珀基質의 糖蛋白陽性反應의 上界와 pyridoxine 7, 10 및 14日間投與群에서 PAS陽性物質의 增加는 琥珀質의 基質合成과 石灰化를 어느 程度助成함이라 推定된다.

그리고 組織化學의 磷酸所見을 綜合하여 보건대 pyridoxine投與로 말미암아 造琺瑯細胞의 陽性反應의 增強과 Tomes突起 및 未石灰化琥珀基質에서 陽性物質의 增加는 有機磷酸鹽인 磷蛋白, 核蛋白, 磷脂質等의 生成이 助長됨이라 思惟되고 反面 琥珀基質의 石灰化促進의 一端을 示唆함이라 하겠다.

V. 結 言

著者는 pyridoxine hydrochloride를 連日 繼續하여 1. 3. 5. 7. 10. 14 및 21日間에 걸쳐 各群의 幼若白鼠에게

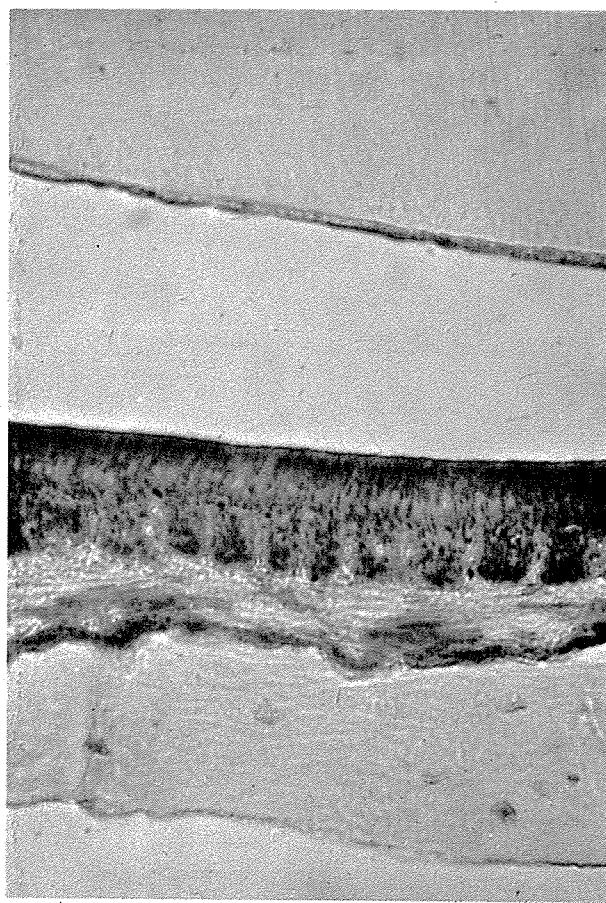
皮下注射로 投與하고 下顎切齒의 琥珀質形成에서 造琥珀細胞, Tomes突起, 琥珀前質의 酸反應과 糖蛋白 및 中性多糖類反應, 아울러 0.01% methylen blue 및 hematoxylin-eosin 染色을 實施하여 檢鏡乳所見은 다음과 같다.

- 1) 酸反應은 造琥珀細胞, Tomes突起 및 琥珀前質에서 顯著하게 增強되어 보이었다.
- 2) 糖蛋白 및 中性多糖類反應은 造琥珀細胞, 琥珀前質의 基質에서 增加되어 보이었다.

參 考 文 獻

- 1) Boose & Axelord (1948). Wound healing in rats with biotin, pyridoxine or riboflavin deficiencies. Proc. Soc. exper. Biol & Med., 67 : 418.
- 2) Chase (1940). The interrelation of maturation and the histogenesis of hypoplasia in dental enamel. Proc. Dental Center, Celebr., 425.
- 3) Dulce (1960). Zur Biochemie der Verknochenung. Hoppe Sejlers Zeitschrift f. physical chemie., 319:257.
- 4) Engel (1948). Glycogen and Carbohydrate -protein complex in developing teeth of the rat. J. Dent. Res., 27:681.
- 5) Glimcher & Krane (1962). Studies of the interaction of collagen and phosphate. (1) The nature of inorganic orth-phosphate binding: (McLean: Radioisotopes and bone, Blackwell Scientific publ., Oxford) p. 393.
- 6) Glimcher & Krane (1964). The identification of serine phosphate in enamel proteins. Bioc-hem. Biophys. Acta., 90:477.
- 7) 星川(1965). ビタミンの補給. 外科治療. 12:399.
- 8) Leblond et al. (1955). Formations of bones and teeth as viscerized by radioautography. Ann. N.Y. Acad. Sci., 60:631.
- 9) 南(1967). Pyridoxine의 白鼠象牙質形成에 미치는 影響에 關한 組織化學的研究. 綜合醫學. 12:235.
- 10) Neiland & Stumpf(1964). Outline of enzyme chemistry, John Wiley & sons, Inc. New York.
- 11) Rinehart & Greenberg(1956). Vitamin B₆ Deficient in Rhesus monkey with particular reference to the occurrence of atherosclerosis, dental caries and hepatic cirrhosis. Am. J. Clin. Nutr., 4:318.
- 12) Scheinmann et al. (1962). Histochemical study of the ameloblast and the enamel matrix in rat molars. J. Dent. Res., 41:1293.
- 13) Sobel (1955). Local factors in the mechanism of calcification. Ann. N.Y. Acad. Sci., 60: 713.
- 14) Suga & Gustafson(1963). Studies of the development of rats enamel by means of histochemistry, microradiography and polarized light microscopy. From Advances in Fluorine Research and Dental Caries Prevention, ORCA. Paris, Pergamon Press pp., 223.
- 15) Suga & Gustafson (1963). Studies on the maturation(Secondary mineralization) of guinea pig enamel by means of microradiography, autoradiography and tetracycline labeling. J. Dent. Res., 44:11.
- 16) 須賀(1964). エナメル質の 形成機序. 口腔生物學の研究. 5:147.
- 17) Watson (1960). The extracellular nature of enamel in the rat. J. Biophys. Biochem. Cytol., 7:489.
- 18) Weinmann et al. (1942). Correlation of chemical and histological investigations on developing enamel. J. Dent Res., 2:171.

金永植 論文 寫真附圖



Phosphoric acid reaction
(Serra et Queiroz-Lopes method)