

Methionine 投與의 白鼠口腔粘膜炎 關한 組織學的研究

서울大學校 齒科大學 口腔解剖學教室

(指導 金 永 昌 教授)

李 鍾 洪

HISTOCHEMICAL STUDY ON THE ORAL MUCOSA OF METHIONINE ADMINISTERED RATS.

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

Lee Chong-Hong, D.D.S.

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

The buccal mucosa was observed histochemically in male rats which were injected with methionine.

The staining methods were proceed by means of periodicacid-Schiff reaction, toluidine blue stain, alloxan-Schiff reaction, Mallory's aniline blue stain, Lillie's modification of Bielschowsky method and hematoxylin-eosin stain.

The results of the experiment were summarized as follows:

- 1) PAS reactions of basement membrane and lamina propria increased after 3 and 5 days of methionine administration.
- 2) Metachromasia of stratum spinosum increased after 3 days of methionine administration.
- 3) Alloxan-Schiff reactions of stratum granulosum and stratum spinosum increased after 7 days of methionine administration.
- 4) In the lamina propria, aniline blue staining of collagenous fibers increased after 7, 10 and 14 days of methionine administration.

— 目 次 —

I. 緒 言

II. 實驗材料 및 方法

III. 實驗結果

IV. 考 按

V. 結 言

參考文獻

I. 緒 言

必須 amino酸의 하나인 methionine는 Vitamin U의 構成成分이고, coenzyme으로서 methyl基轉移에 關與함이 알려지고 있다¹³⁾.

Amino酸의 過剩投與가 口腔粘膜炎에 미치는 影響을 組織化學의으로 檢索한 報告는 金⁴⁾, 申¹¹⁾等의 實驗의 研究가 接見되며, 反面 林⁶⁾은 methionine이 白鼠齒牙硬

組織形成에 미치는 影響을 檢討한바 있다. 著者는 methionine을 過剩投與한 白鼠口腔粘膜에서 몇가지의 組織化學的方法에 依하여 얻은 實驗結果를 이에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

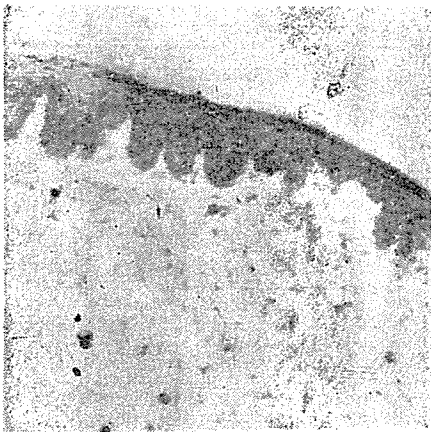
1) 實驗方法

實驗動物은 一定期間 飼育한 體重 50g內외의 雄性白鼠48頭을 使用하였고, methionine(Merck製) 5.0mg을 生理的食鹽水 0.5cc에 稀釋하여 正常對照群(6頭)을 除外한 投與群白鼠의 背部皮下에 一日一回式 一定時에 注射하였다.

投與期間은 1, 2, 3, 5, 7, 10 및 14日間の 7群(6頭式)이며, 最終注射後 24時間이 經過한 直時로 ether 麻醉下에 犧牲시키어 左右側下顎白齒部의 頰粘膜을 切除하고서 이를 各各 無水酒精, Carnoy液, Zenker液 및 Orth液에서 固定한後 paraffin包埋의 7 μ 切片을 制作하였다.

染色方法 :

- 1) McManns法의 PAS 反應⁷⁾.
- 2) 大野, 野附, 川井法의 toluidine blue 染色(pH 7.0, pH 4.1, pH2.5)⁷⁾.
- 3) 安間, 市川法의 alloxan-Schiff反應⁷⁾.
- 4) Mallory法의 aniline blue 染色⁹⁾.
- 5) Bielschowsky銀染色의 Lillie變法¹⁾.
- 6) heamatoxylin-eosin 染色.



第1圖 PAS反應
methionine 3日間投與群 (8 \times 16)

III. 實驗結果

白鼠口腔粘膜에 있어 上皮組織의 基底細胞層, 棘細胞層, 顆粒細胞層, 角化層 및 基底膜과 固有層의 結合基

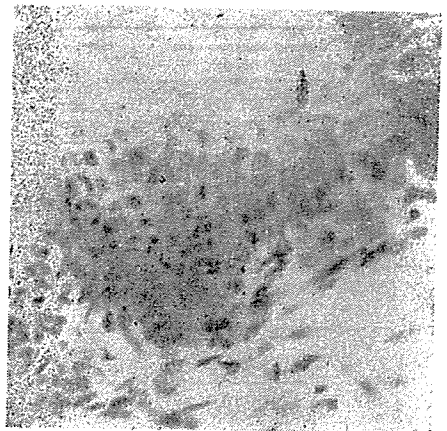
質, 結合纖維을 觀察한 所見은 다음과 같다.

1) PAS反應所見 :

粘膜上皮에 있어 正常群 및 實驗群의 顆粒細胞層의 keratohyalin顆粒은 淡赤色의 陽性反應이었고, 細胞質은 淡紅染되었으며, 棘細胞層의 細胞質은 甚히 輕微한 染色性이어서 거지반 陰性에 가까웠으나 細胞膜은 赤染되어 보이었다. 基底細胞層의 細胞質은 輕度의 淡紅染이고, 細胞膜은 中等度의 赤紅染으로 顯色되었다. 基底膜 및 粘膜下固有層은 methionine 3 및 5日間投與群에서는 正常群에 比하면 増染되어 中等度의 赤紫色으로 보이었으며 基底膜의 PAS陽性度는 粘膜下固有層 보다 濃染되었고, methionine 7, 10 및 14日間投與群에서는 漸次 減弱된 傾向이였다. 結合纖維의 PAS反應은 中等度의 赤染色이었고, 正常群과 methionine 投與群에 있어 그 染色性을 判別하기 困難하였다.

2) toluidine blue 染色所見 :

正常群 및 實驗群의 粘膜上皮에서 棘細胞層의 細胞質內에 靑染色性顆粒이 散在하여 보이었고, 細胞質은 淡靑色으로 顯色되나 特히 methionine 3日間投與群에서는 輕微한 metachromasia(pH 4.1, pH7.0)가 認定되었다. 顆粒細胞層의 keratohyaline顆粒은 大部分이 靑染되며 基底細胞層은 棘細胞層에 比하여 靑染色性이 若干 強하였

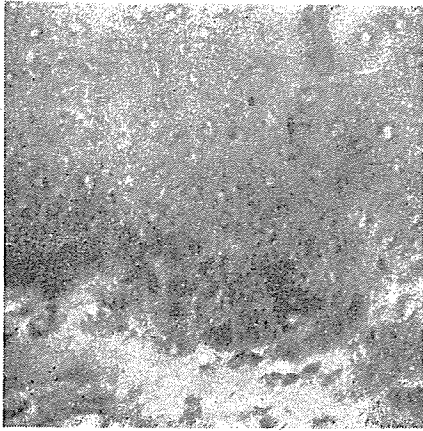


第2圖 PAS反應
methionine 5日間投與群 (10 \times 16)

으나 正常群 및 實驗群 多같이 差異를 認定할 수 없었다.

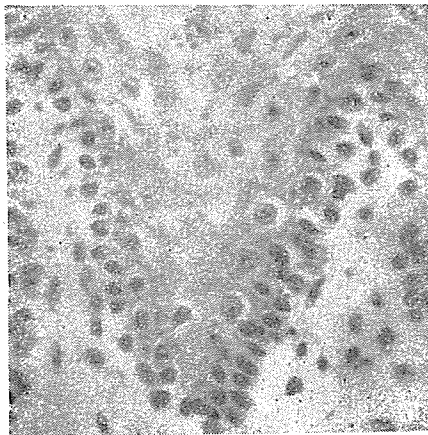
그리고 methionine 1, 2, 5, 7, 10 및 14日間投與群에서는 metachromasia을 認定하기 어려웠다. 또한 正常群과 實驗群의 結合基質은 靑染되었고, 結合線維는 帶靑紫色으로 보이었다.

3) alloxan-Schiff反應所見 :



第3圖 toluidine blue染色
methionine 5日間投與群 (10×16)

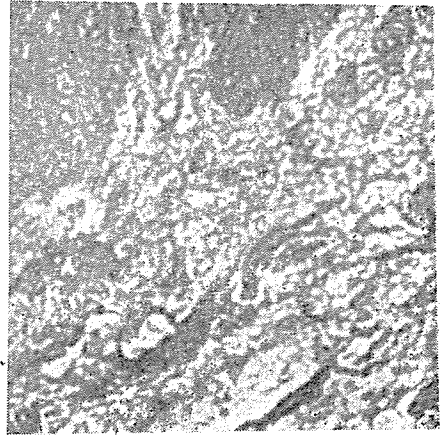
正常群에 있어 粘膜炎의 基底細胞層, 棘細胞層, 顆粒細胞層은 淡赤色의 微弱한 反應度이었다. methionine 3 및 5日間 投與群에 있어 粘膜炎의 各層이 漸次로 染色이 増染되기 始作하여 7日間 投與群에서는 基底細胞層, 棘細胞層의 細胞質이 中等度로 赤染되어 見이었고, 粘膜炎下固有層의 alloxan-Schiff反應은 正常群, 實驗群에서 淡赤으로 顯色하였다.



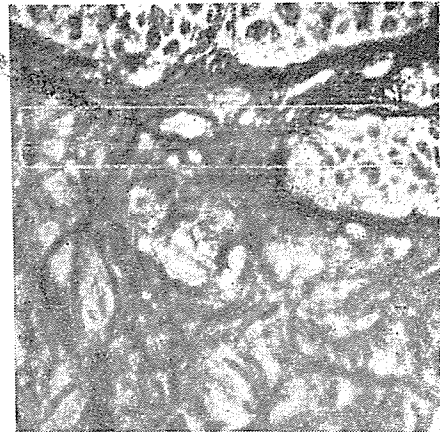
第4圖 alloxan-Schiff反應
methionine 7日間投與群 (25×16)

4) aniline blue染色所見 :

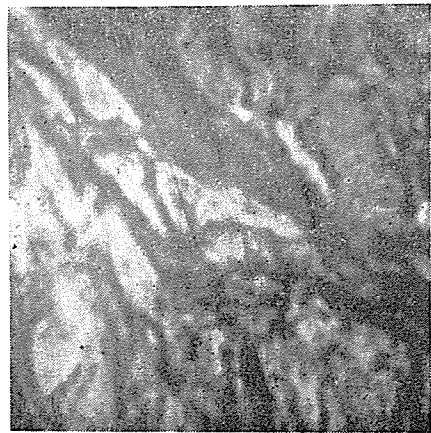
正常群 및 實驗群에서 全般的으로 粘膜炎下固有層의 結合基質은 淡靑으로 呈染되었고, 膠原纖維는 靑染되어 見이었는데, methionine 7, 10 및 14日間 投與群에서는 濃靑染된 膠原線維가 散見되었다. 그러나 上皮下에 介在한 乳頭層의 結合基質과 膠原纖維는 微弱한 帶淡靑으로 見이였다.



第5圖 aniline blue染色
methionine 10日間投與群 (10×16)



第6圖 Bielschowsky 染色(Lillie變法) (25×16)
methionine 2日間投與群



第7圖 Bielschowsky 染色(Lillie變法) (90×10)
methionine 14日間投與群

5) Bielschowsky銀染色所見:

正常群 및 methionine投與群의 粘膜下固有層에 있어 膠原纖維는 黑染된 大小의 纖維束으로 無數히 走行하였고, 그사이에 淡黑色의 纖細한 小線維가 散見되었다.

IV. 考 按

口腔粘膜上皮組織은 重層扁平上皮이며, 棘細胞層의 棘細胞는 그 形狀이 크고 細胞間橋을 낸 最일 完全한 細胞이다. 棘細胞에 含有된 PAS陽性物質은 細胞構成成分보다 energy發生源에 利用되는 多糖類가 大部分을 占有하고 있다. 또한 原形質內에 蓄積된 多糖類는 嫌氣性 多糖類이고, energy의 發生은 解糖에 依하니, 多糖類가 原形質內에 充分하게 蓄積되면 새로운 棘細胞가 生成되고서 metaspinoocyte로 移行한다. metaspinoocyte로 된 細胞는 蓄積된 多糖類를 嫌氣性解糖過程에 依하여 分解 生成된 energy를 使用하여서 顆粒層細胞로 移行한다. 그러므로 棘細胞層에는 多量의 多糖類가 存在하며, 이것이 顆粒細胞層, 角化層에 이르면 따라 消失되어 代身 keratin과 脂質을 낸다고 한다^{2,8)}.

本實驗結果에서 粘膜上皮에 出現하는 PAS陽性物質은 中性多糖類(糖原, 中性粘液多糖類, 糖蛋白, 糖脂質)이며, methionine 3 및 5日間投與群에서 基底膜과 粘膜下固有層에 PAS反應의 上昇는 上皮細胞의 新生成殖을 促進하는데 關與함이라 생각된다. 그리고 PAS反應의 染色過程에서 過水素酸化가 低温이고, 더욱 短時間의 操作에서 그 特異性이 良好함을 알수 있었다.

酸性粘液多糖類의 證明에서는 從來 toluidine blue, thionin, methylen blue 등의 色素에 依한 異染色性反應이 利用되며, metachromasia이라 함은 어떤 色素가 組織內物質을 染色할때에 可染性物質은 色素와 다른 色調을 顯色함이며, 溶液의 溫度, pH에 依하여 色調가 變化하는 것이다. 口腔粘膜上皮에 있어 比較的 棘細胞層이 toluidine blue에 呈染이 잘되며 메로는 metachromasia을 惹起하는데, 本實驗結果의 上皮細胞層에서 methionine 3日間投與群에서 微弱한 metachromasia가 發現되었으나 pH 4.1 및 pH 7.0에서 顯色함을 보아 주로 hyaluronic acid이라 생각된다. hyaluronic acid는 組織培養한 造線維細胞에서 合成이 잘된 다하며, 一般으로 幼若組織細胞에 多含되고 年齡의 增加에 따라 減少 된다고 한다³⁾.

Alloxan-Schiff反應은 蛋白(α -amino acid)의 證明法에서, 本實驗結果의 棘細胞層 및 基在底細胞層이 methionine 7日間投與群에서 顯著하게 増染됨을 보아 組織細胞의 總蛋白이 增加함이라 推定되니, 口腔粘膜의

蛋白代謝가 助長된이라 생각한다.

口腔粘膜下의 固有層을 構成하는 結合組織에 있어 線維間의 基質은 多糖類-蛋白複合體가 單位이고 그 合成機序는 아직 究明되지 않았으나, 이合成을 調節하는 要因이 高次的 機序에 依함이라 思考되고 있다²⁾. 本實驗結果에서 methionine 7.10 및 14日間投與群의 濃靑染된 膠原纖維가 aniline blue染色에서 觀察됨은 固有層의 結合組織에 있어 多糖類-蛋白代謝의 一面을 示唆함이라 하겠다.

V. 結 言

健常雄性白鼠에게 methionine 5.0mg을 一日一回式 投與하고서, 口腔粘膜에 미치는 影響을 PAS反應, toluidine blue染色, alloxan-Schiff反應, aniline blue染色 및 Bielschowsky銀染色(Lillie 變法)에 依하여 組織化學的方法에서 鏡檢한 結果는 다음과 같다.

- 1) PAS陽性物質은 3 및 5日間投與群의 基底膜 및 粘膜下固有層에서 增加되는 傾向이었다.
- 2) toluidine blue染色에서 輕微한 metachromasia가 棘細胞層에서 보이었다.
- 3) alloxan-Schiff 陽性物質은 7日間投與群의 基底細胞層 및 棘細胞層에서 增加되는 傾向이었다.
- 4) aniline blue 染色에서 粘膜下固有層의 膠原纖維는 7, 10 및 14日間投與群에서 微弱하게 増染되는 傾向이었다.

REFERENCES

- 1) Conn, H. J. et al. : Staining procedures, The Williams & Wilkins Company. Baltimore, 1960.
- 2) Farber, S. J. et al. : Connective tissue, intercellular macromolecules. Little, brown & Company. Boston. 1964.
- 3) Grossfeld, A. et al. : Mucopolysaccharides produced in tissue culture, J. Biophys. Biochem. Cytol. 3:391, 1957.
- 4) 金朝桓: Lysine 및 histidine이 家兎口腔粘膜에 미치는 影響에 關한 組織化學的研究, 中央醫學, 10:625 1966.
- 5) 川勝賢作, 福田道男: 組織化學と その現狀(その2), 齒界展望, 22:19. 1962.
- 6) 林奉燮: Methionine이 白鼠齒牙硬組織形式에 미치는 影響, 綜合醫學, 11:1211, 1966.

- 7) 岡本耕造 外二人：顯微鏡的組織化學 醫學書院，東京。1958.
 - 8) Pearse, A.G.E. : Histochemistry, Volume I. Little, Brown. Boston. 1968.
 - 9) Preece, A. : A manual for histologic technicians., Little, Brown. Boston, 1965.
 - 10) Schnitz, S. : Observation of the acid mucopolysaccharides of human gingiva, Odont. T. Kr. 66:1, 1953.
 - 11) 申旻撤 : Menadione 投與한 白鼠口腔粘膜炎上皮的 糖原 및 核酸에 관한 組織化學的研究, 現代醫學, 7 : 877, 1967.
 - 12) 渡邊詳望, 大高裕一 : 酸性ムコ多糖體の 組織化學的證明法, 醫學のあゆみ. 49 : 653, 1964.
 - 13) Wagner, F. and Karl Folkers : Vitamins and coenzymes, John Wiley & Sons. New York. 1964.
-