

人齒胚의 齒乳頭에 있어
粘液多糖類 生成과 上皮橫隔에 關한 研究

서울大學校 齒科大學 口腔解剖學敎室

(指導 金 永 昌 敎授)

金 文 祚

HISTOCHEMICAL STUDY ON THE MUCOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS
AND EPITHELIAL DIAPHRAGM IN THE DENTAL PAPILLA OF THE
HUMAN TOOTH GERM

Kim, Moon-Jo, D.D.S.

Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, Seoul National University.

<Directed by Prof. Kim, Young-Chang, D.D.S.>

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

The author observed the mucopolysaccharide reactions of the dental papilla in the stage of tooth development concerned with the dentinogenesis and the epithelial diaphragm formation.

The jaws were removed from 10 human fetuses, ranging from 3 to 6 months of age and 3 human infants, ranging from 0 to 6 months of age. They were fixed in 10% formalin, absolute alcohol, Carnoy's solution or formol-alcohol. Some of them were embedded in paraffin with vacuum pump without the decalcification. The others were decalcified in the EDTA solution (pH 7.4) and embedded in paraffin.

The histological and histochemical staining methods were carmine stain(Best), periodic acid-paradiamine method (Spicer), combined dialysed iron-PAS reaction (Ritter and Oleson), alcian blue-PAS reaction (Mowry), aldehyde fuchsin stain (Halmi and Davis), mixed diamine method (Spicer), colloidal iron-hematoxylin stain (Mowry), toluidine blue O and hematoxylin-eosin stain. For the observation of the variation of the cell shape, the objective micrometer (Carl Zeiss) were used.

The results were as follows:

1. When the dentin was produced, PAS reaction of the dental papilla was reduced and according to the conversion of the dental papilla to the pulp, the substances stained with carmine were decreased.

2. The mucopolysaccharides in the dental papilla were mostly hyaluronic acid. These acid mucopolysaccharides were reduced at the apex of the dental papilla in which the dentin was produced.
3. The cytoplasm of odontoblasts was shown to contain the PAS positive materials, but their acid mucopolysaccharide reactions were nearly negative.
4. According to the apposition of dentin, the basophilic substances of the fibroblasts were decreased, their sizes were reduced and the nuclear chromatin substances were condensed.

—目 次—

I. 緒 言	V. 結 言
II. 研究方法	參考文獻
III. 研究成績	寫真附圖
IV. 考 按	

I. 緒 言

齒牙의 發生學의 研究는 이미 오래前부터 先進學者에 依하여 그業績이 報告되어 왔으며, 더욱 近來에 와서는 齒牙硬組織形成(琺瑯質, 象牙質)에 關한 組織化學의 研究方法이 多方面으로 探究되어 오고 있다.

그런데도 發育期齒牙의 齒乳頭에 關한 詳細한 檢討는 比較的 稀少하므로, 著者는 象牙質形成에 關與하는 齒乳頭에 있어서의 粘液多糖類生成과 上皮橫隔의 造成에 따르는 關聯性의 一端을 窺知하려고 本實驗을 企圖하였으며, 여기 그 結果를 報告하는 바이다.

II. 研究 方法

A) 研究材料

胎齡 3乃至 6個月의 人胎兒(10例) 및 生後 0 乃至 6個月의 乳兒(3例)에서 取得한 齒胚를 顎骨과 더불어 下記의 染色法에 따라 固定한 後 非脫灰의 眞空包埋法에 依한 7~10 μ 의 paraffin連續切片과 一部는 EDTA (pH 7.4)에서 脫灰한後 同一한 方法으로 製作한 paraffin切片을 使用하였다.

B) 染色方法

(1) carmine染色(Best, 1906). 固定液: absolute alcohol. 糖原은 赤染된다.

(2) periodic acid-paradiazine方法 (Spicer, 1966). 固定液: Carnoy液. 中性粘液多糖類는 褐染된다.

(3) combined dialysed iron-PAS反應 (Ritter & Oleson, 1950). 固定液: formol-alcohol. 中性粘液多糖類는 紫赤染, 酸性粘液多糖類는 靑染되고, 大部分의 蛋白構造物은 淡靑染된다.

(4) alcian blue-PAS反應 (Mowry, 1963). 固定液: absolute alcohol. 中性粘液多糖類는 赤紫染, alcinophilic substances (hyaluronic acid, sialomucin, acidic sulfated mucosubstance)는 靑染된다.

(5) aldehyde-fuchsin 染色 (Halmi & Davies, 1953). 固定液: absolute alcohol. sulfated mucosubstance는 紫染된다.

(6) mixed diamine方法 (Spicer, 1966). 固定液: absolute alcohol. 大部分의 sulfated acid mucosubstance는 黑褐染된다.

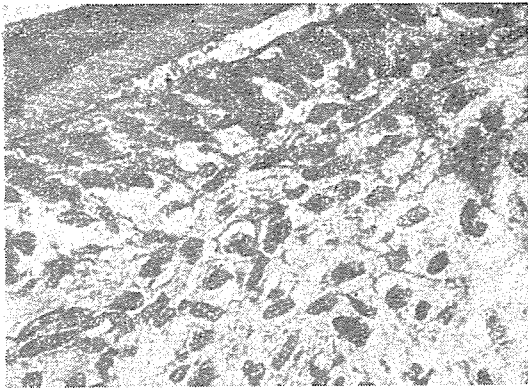
(7) colloidal iron-hematoxylin染色 (Mowry, 1963). 固定液: 10% formalin. acidic mucosubstance는 紺靑染된다.

(8) toluidine blue 0 染色. 固定液: absolute alcohol. 0.05%液(pH4.7)에서 γ -metachromasia는 赤染된다. 그리고 60°C, 24時間 作用시킨 切片에서 齒乳頭(造纖維細胞)의 basophilia를 觀察하였고, 그 細胞形態는 0.01 mm objective micrometer (Carl Zeiss)를 利用하여 檢鏡하였다.

(9) hematoxylin-eosin染色

III. 研究 成績

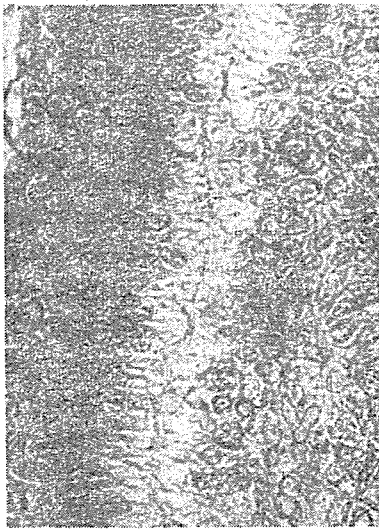
人齒胚가 帽狀期에서 鍾狀期로 移行하면 內琺瑯上皮, 外琺瑯上皮, 琺瑯髓와 齒乳頭가 分化하고, 齒乳頭와 相接한 內琺瑯上皮에서 造琺瑯細胞로의 分化가 成熟하여지면, 齒乳頭頂에서 造象牙細胞에 依하여 象牙質의 基質形成이 開始되어 繼續적으로 象牙質形成이 添加됨에 따라 齒乳頭는 漸次 齒髓로 變換한다.



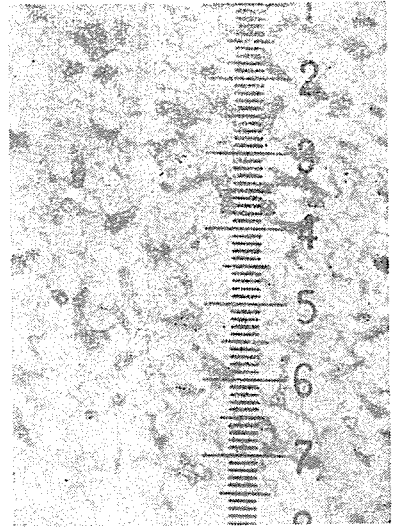
carmine stain, $\times 400$.

齒冠部象牙質의 形成이 完了된 後, 白堊珐瑯境界部의 上皮橫隔에서 發育端(象牙質의 新生部位)의 齒乳頭에는 造纖維細胞가 分化하여 齒根部象牙質이 繼續的으로 形成되는데, 齒乳頭, 齒髓 및 造象牙細胞에서 糖原, 中性粘液多糖類 및 酸性粘液多糖類의 染色所見은 別表와 같다.

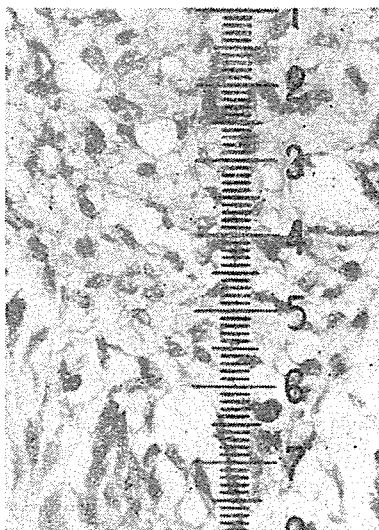
齒乳頭組織의 0.055% (pH 7.4) toluidine blue O染色에서 象牙基質形成과 基質石灰化에 相應하여 漸次로 basophilia가 減少되니, 卽 造象牙細胞와 造珐瑯細胞가 相接한 齒胚部位에서는 造纖維細胞의 細胞質內에 鹽基性顆粒이 減少하여지고, 象牙基質形成과 더불어 細胞體가 若干 縮小되며, 또한 象牙質形成과 齒乳頭의 減少에 따라核內의 染色質이 濃縮되어 顯色하였다.



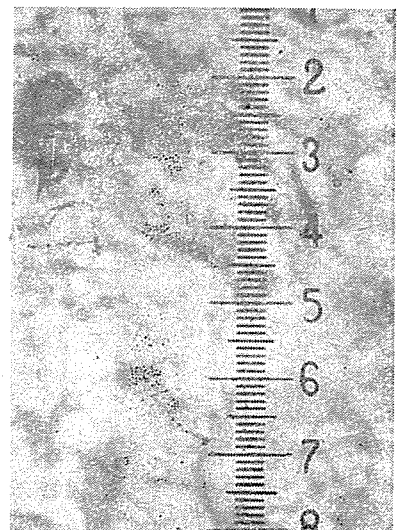
periodic acid-paradiamine method, $\times 400$.



toluidine blue O, basophilia, $\times 400$.



toluidine blue O, basophilia, $\times 400$.



toluidine blue O, basophilia, $\times 900$.

Histochemical reactions in human dental papilla

staining methods	dental papilla	dental pulp	odontoblast	positive substances
carmines	+	±	+	glycogen
periodic acid-paradiazine	++	+	+	neutral mucopolysaccharide
combined dialysed iron-	++	+	-	acid mucosubstance
PAS	+	-	+	neutral mucosubstance
alcian blue-	++	+	-	acid mucosubstance
PAS	+	-	+	neutral mucosubstance
colloidal iron-hematoxylin	++	+	-	acid mucosubstance
aldehyde-fuchsin	+++	+	-	sulfated mucosubstance
mixed diamine	+	+	-	sulfated mucosubstance
toluidine blue O (pH4.7) metachromasia	+	+	-	hyaluronic acid

IV. 考 按

齒牙硬組織發生過程에 있어 齒乳頭는 象牙質形成의 原基가 되며, 杯狀齒胚에서 珐瑯器下部의 幼若한 間胚葉細胞가 密集하여 齒乳頭가 되고, 그 密集이 顯著하므로 疎性結合組織과의 區別이 容易하며 血管도 豊富하게 分布되었다. 結合組織의 構成要素로서는 細胞 및 纖維以外의 所謂 不定形基質이고, 生體內에서 不定形基質에는 chondroitin sulfate나 hyaluronic acid의 酸性粘液多糖類가 蛋白質과 結合하여 巨大한 複合體로서 存在하며, 이와같은 巨大分子가 纖維間을 充填하여 接合質의 役割을 가진다고 한다.

人齒牙形成時의 組織化學的檢索에서 齒乳頭(齒髓)의 中性多糖類에 關한 證明을 綜合하여 보면, PAS 陽性物質을 Wislocki et al. (1948)²²⁾, Wislocki & Sognnaes (1950)²³⁾, 鈴木(1956)¹⁹⁾, Nagasaka (1960)¹⁶⁾가 認定하였고, 本研究의 combined dialysed iron-PAS, alcian blue-PAS 및 periodic acid-paradiazine에서도 糖原以外의 PAS 陽性物質 即 中性粘液多糖類, 糖蛋白質 및 糖脂質이 象牙質形成期에서 觀察되었고, 또한 發育成長이 活潑하여지면 發育期齒胚에서는 一般으로 糖原을 含有하였다가 漸次 減少한다고 Nagasaka (1960)¹⁶⁾,

Symons (1961)²⁰⁾가 指摘하였는데 本研究에서도 同一한 所見이었다.

그리고 中性多糖類에 包含된 糖原檢出에 있어 鼠의 齒乳頭(齒髓), 造象牙細胞에 若干 含有되었다는 Engel (1948)⁷⁾, Glastone(1958)⁹⁾, 豚의 齒乳頭에서의 Bevelander & Johnson (1955, 1956)^{4), 5)}의 報告가 있고, Ten Cate (1962)²¹⁾는 人齒髓에는 全然 含有되지 않았다고도 하며, Wislocki et al. (1948)²²⁾은 發育期의 人齒髓에는 糖原이 存在하나 完成齒에서는 消失된다고 報告하였는데, 本研究成績에 있어도 carmine染色性이 齒乳頭에서 顯色되며, 象牙質形成이 開始되어 齒髓로 變換되면 減少됨을 認知할수 있었다.

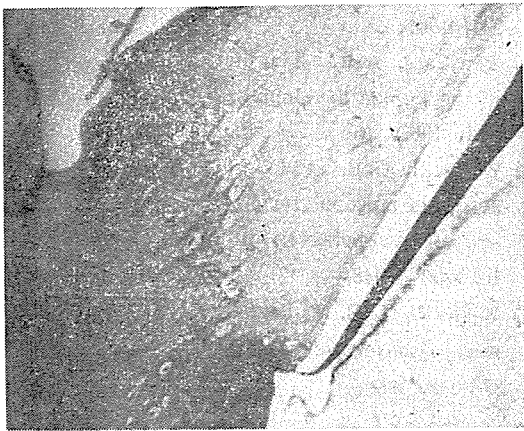
人齒胚에 있어 齒乳頭(齒髓)의 酸性粘液多糖類에 關한 組織化學的檢索에서 Wislocki et al. (1950)²³⁾, Fullmer & Alphen (1958)⁸⁾, 枝 (1964)⁵⁾ 등은 metachromasia를 認定하였고, 또한 pH2.2의 toluidine blue에는 metachromasia를 示顯하지 않으나, pH4.0~7.0에서 發現되어 chondroitin sulfate가 含有되지 않았고 hyaluronic acid라고 強調하였는데⁵⁾, 著者는 本研究成績의 dialysed iron, alcian blue 및 colloidal iron에서 酸性粘液多糖類를 認知하였고, aldehyde-fuchsin에서는 그 陽性物質의 大部分이 S 含有의 蛋白反應이라고 생

각되며, Engfeldt et al. (1954)⁶⁾은 放射線同位元素³⁵S로 標識한 齒髓에서 S含有蛋白質 (cystine, cystein)을 定性的으로 檢出한바 있으며, 著者는 mixed diamine의 陽性反應物質에는 non-sulfated acid mucosubstances도 含有되었고, 그大部分이 hyaluronic acidprotein이 存在한다고 思料된다.

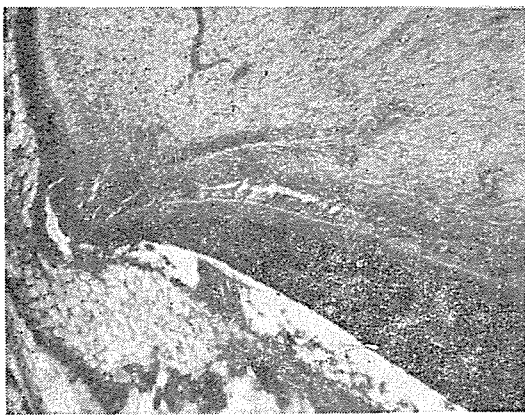
糖蛋白複合體에는 chondroitin sulfate-protein과 hyaluronic acid-protein이 있는데, 後者는 non-sulfated acid mucosubstance이고 hyaluronic acid가 이에 屬한다. 結合組織에 있어 細胞間接合質에 內包된 hyaluronic acid는 sulfate를 含有하지 않았다하며¹¹⁾, toluidine blue의 組織化學的反應에서 0.055%, pH3.5液에는 造纖維細胞의 粘液多糖類가 顯色되고, 0.055%, pH4.7液에서 0.1% ribonuclease로 培養하면 造纖維細胞의 核蛋白을 證明할 수 있고¹²⁾, Hurier's syndrome의 造纖維細胞에는 glycosaminoglycans가 集積된 異染

性顆粒이 出現하고, Marfan's syndrome에서는 hyaluronic acid가 增加한다는 報告가 있다¹³⁾.

齒冠部象牙質의 正常的厚徑이 完成된後 齒根部象牙質形成은 Hertwig上皮靴의 誘導로 營爲되며, 未來의 白堊瑛質境界에서 이 Hertwig上皮靴가 垂直位로 成長하는 同時에 水平位로 重折된 部分을 上皮橫隔이라 한다. 即 Hertwig上皮靴의 上皮橫隔이 瑛質器의 下端에서 下方으로 延長되어 齒根形態를 豫形함과 同時에 齒乳頭細胞에서 造象牙細胞가 分化되면 造象牙細胞는 이 上皮下의 基底膜의 介在에 依하여 齒根部象牙質을 形成하는 것이다. 그리고 上皮橫隔의 內瑛質上皮와 接壤한 齒乳頭凹部에서 多數의 間胚葉性細胞가 密集하였는데 이는 造象牙細胞의 分化促進과 糖蛋白複合體의 生産助長을 由來함이며, 本研究의 結果에 依하면 發育端과 切齒端(咬頭端)에 있어 齒乳頭의 粘液多糖類生成은 同一한 範疇의 染色所見이었다.



H-E stain, epithelial diaphragm, ×100.



H-E stain, epithelial diaphragm, ×400.

V. 結 言

- 1) 齒乳頭의 PAS 陽性物質은 象牙質形成에 따라 減少되고, 齒乳頭가 齒髓로 置換되면 carmine好染色性이 減弱되어 보였다.
- 2) 齒乳頭의 酸性粘液多糖類는 大部分이 hyaluronic acid이었고, 象牙質形成이 開始된 發育端에서 減少되어 보였다.
- 3) 造象牙細胞에는 PAS陽性物質이 存在하며, 酸性粘液多糖類反應은 거의 陰性으로 보였다.
- 4) 造纖維細胞는 象牙質發生의 進展에 따라 그 形狀과 細胞質內의 鹽基好性物質이 減退하는 反面, 核內의 染色質은 濃縮되어 보였다.

參 考 文 獻

- 1) Balazs, E.A.: Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix. Academic Press. London & New York. 1970.
- 2) 朴斗桓: 人齒胚의 發育期 象牙質에 있어 纖維成分과 粘液多糖類에 관한 組織化學的研究. 最新醫學, 17: 933, 1974.
- 3) Bevelander, G. & Johnson, P.L.: The histochemical localization of glycogen in the developing tooth. J. Cell. Com. Physiol., 29: 129, 1956.
- 4) Bevelander, G. & Johnson, P.L.: The localization of polysaccharides in developing teeth. J. Dent. Res., 34: 123, 1955.

- 5) 枝 重夫：人齒象牙質形成に關する組織化學並びに Microradiography による研究(II)。齒醫學報, 64: 788, 1964 b.
- 6) Engfeldt, B. et al.: Studies on mineralized dental tissues. I. A microradiographic & autoradiographic investigation of tooth & tooth germs of normal dog. Exp. Cell. Res., 7: 381, 1954.
- 7) Engel, M.B.: Glycogen and carbohydrate-protein complex in developing teeth of the rat. J. Dent. Res., 27: 681, 1948.
- 8) Fullmer, H.M. & Alpher, N.: Histochemical polysaccharide reactions in human developing teeth. Lab. Investigation, 7: 163, 1958.
- 9) Glaston, S.: Glycogen in the developing teeth of rodents. Brit. Dent. J., 105: 156, 1958.
- 10) Grassfeld, H. et al.: Mucopolysaccharides in tissue culture. J. Biophys. Biochem. Cytol., 3: 391, 1957.
- 11) Laurent, T.C.: Structure of hyaluronic acid. from 1).
- 12) Listgarten, M.A.: The development of a cementum layer over the enamel surface of rabbit molars. Arch. Oral Biol., 14: 961, 1969.
- 13) Listgarten, M.A.: A light and electrons microscopic study of coronal cementogenesis. Arch. Oral Biol., 13: 93, 1968.
- 14) Mancini, R.E. et al.: A histochemical and radioautographic study of the participation of mucopolysaccharides in connective tissue. J. Histochem. & Cytochem., 9: 278, 1961.
- 15) Matalon, R. & Dorfman, A.: Intracellular glycosaminoglycans in human fibroblasts. from 1).
- 16) 長坂 甫：人胎兒の齒牙發生に關する組織化學的研究。齒科醫學, 23: 2302, 1960.
- 17) Ogston, A.G.: The biological functions of the glycosaminoglycans. from (1).
- 18) Sicher, H. & Bhaskar, S.N.: Orban's Oral histology and embryology. The C.V. Mosby Co. 1972.
- 19) 鈴木 清：人胎兒齒牙の石灰化に關する組織化學的研究。大阪大醫學會誌, 8: 13, 1956.
- 20) Symons, N.B.B.: A histochemical study of the intertubular and peritubular matrices in normal human dentin. Arch. Oral Biol., 5: 241, 1961.
- 21) Ten Cate, A.R.: The distribution of glycogen in the human developing teeth. Arch. Oral., 7: 1, 1962.
- 22) Wislocki, G.B. et al.: Some histochemical reaction of mucopolysaccharides, glycogen, lipids and other substances in teeth. Anat. Rec., 101: 487, 1948.
- 23) Wislocki, G.B. & Sognnaes, R.F.: Histochemical reactions of normal teeth. Am. J. Anat. 87: 239, 1950.

<寫眞附圖說明>

- | | |
|---|-------|
| Fig. 1 alcian blue-PAS reaction (Mowry). | ×100. |
| Fig. 2 combined dialysed iron-PAS reaction (Ritter and Oleson). | ×400. |
| Fig. 3 mixed diamine method (Spicer). | ×400. |
| Fig. 4 colloidal iron-hematoxylin (Mowry). | ×400. |
| Fig. 5 toluidine blue O stain. | ×100. |
| Fig. 6 aldehyde-fuchsin stain (Halmi and Davies). | ×100. |

一金文祚論文寫真附圖一

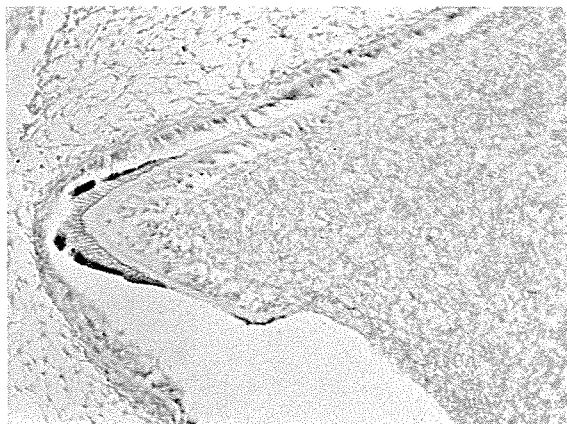


Fig. 1

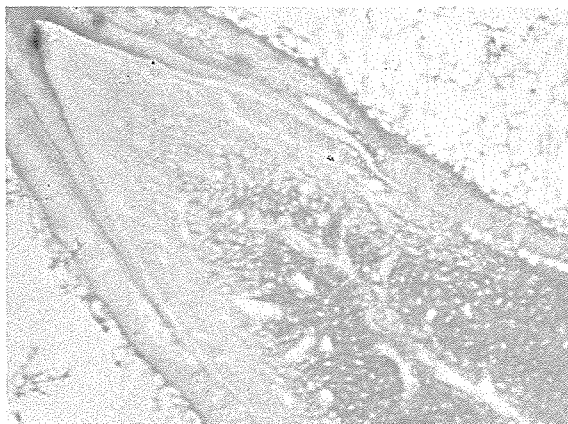


Fig. 2

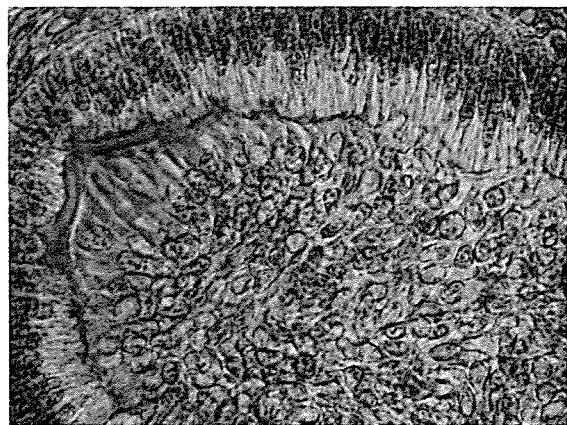


Fig. 3

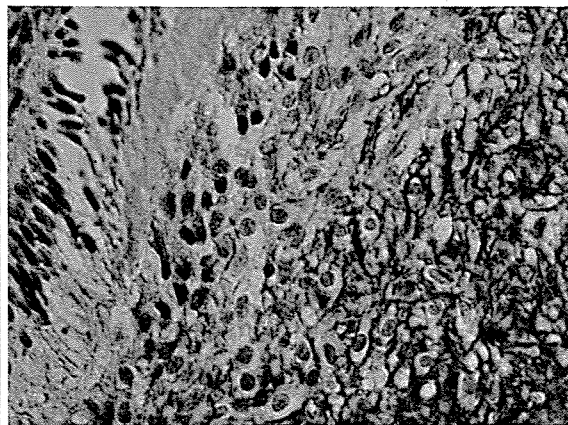


Fig. 4

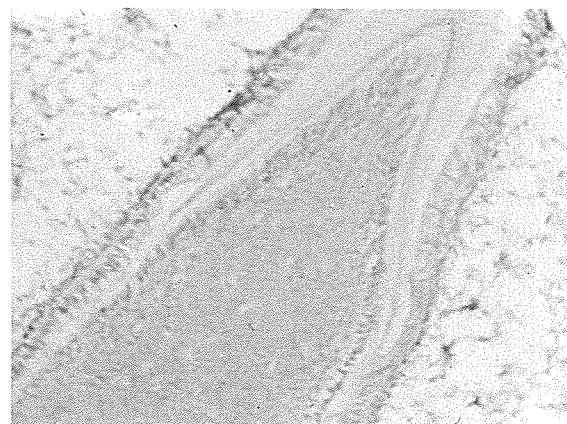


Fig. 5

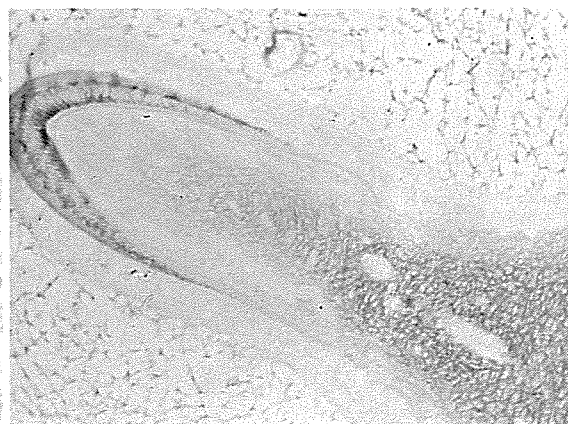


Fig. 6