

— 原 著 —

酢酸鉛注射による硬組織内時刻描記法の 不脱灰切片への応用

姥 山 良 雄

新潟大学歯学部歯科薬理学教室 (主任 三村 二教授)

(昭和46年8月25日受付)

An Application of the Time Marking Method in Hard Tissues by Lead
Acetate Injection to Various Undecalcified Sections

Yoshio UBAYAMA

*Department of Dental Pharmacology, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Tasuku Mimura)*

緒 言

発育中の硬組織 (歯牙・骨) の生長速度を調べるためには、硬組織中に沈着してそのまま消えずに残り、あとで切片上で観察できるような薬物、例えば酢酸鉛¹⁾、テトラサイクリン²⁾ 或いはカルセイン³⁾ 等を生体に投与して、その硬組織内沈着部分が時間の経過とともに石灰化現行面 (通常切片上では線をなしている) からどれだけ離れて行くかを観察する方法がよく用いられる。この種の方法の中では酢酸鉛注射による硬組織内注射時刻描記法 (以下酢酸鉛法と略す)¹⁾ は鉛の沈着部分が硬組織中で極めて薄い層をなし、それが脱灰薄切した組織片中に細く均一で明瞭な線 (鉛線) として顕微鏡下で観察でき、注射した時刻にどの部分が形成されつつあったかを正確に読みとることが出来るので、硬組織の発育速度や薬物の硬組織形成に及ぼす影響等を研究するための手段としてしばしば用いられてきた。しかしその方法では、長時間にわたるかなり複雑な操作が必要であるし、そのままでは脱灰組織片についてのみ観察が行なわれるような方法なので硬組織中の無機成分の観

察には適しないところがあった。

このたび、その酢酸鉛法を一部改変して、不脱灰標本についても短時間のうちに鉛線を観察できるように応用法を考案したので報告する。この方法によれば標本上に石灰化の状態がそのまま残されるので、これ迄の方法と違って無機成分の経時変動をも観察できるし、組織片の脱灰・薄切が不要のため観察する迄に要する時間が大幅に短縮され、成長度測定に関しては正確さも従来の酢酸鉛法と変わらない。

実験材料及び方法

〔I〕 観察に用いた硬組織

- 1) 家兎、下顎切歯の象牙質とエナメル質
- 2) ラット、下顎骨と脛骨

この実験では、上記の組織について観察を試みたが、発育中の動物の硬組織であれば何でも研究対象になり得るし、逆にある硬組織が発育中かどうかを判定するための手段としても、この方法を使用することができる。

〔II〕 投与薬物

- 1) 家兎切歯象牙質観察のために

- 1%酢酸鉛水溶液
- 2) 家兎切歯エナメル質観察のために
2%酢酸鉛水溶液
- 3) ラット顎骨及び脛骨観察のために
0.2%酢酸鉛水溶液

この濃度の溶液を用いて、象牙質の観察には動物の体重1kg当り1~2mg、そしてエナメル質及び骨の観察には体重1kg当り5mgの酢酸鉛を投与した。2mg/kgの酢酸鉛の投与によっても骨中に鉛線が出現するが、それは極めて色の淡いものである。

投与方法は家兎では耳静脈から、ラットでは足静脈から静かに注入した。この操作は酢酸鉛法の原法と変わるものではない。

〔Ⅲ〕 観察迄の操作

必要な時間を経過した動物を屠殺してからその硬組織を観察する迄の操作は次の通りである。

第1法 (通常法)

- 1) 硬組織をとり出し、10%中性ホルマリンで固定。
- 2) 附着組織を取り除いて水洗。
- 3) アルコールによる脱水。
- 4) レジン等で包埋。
- 5) 適当な厚さ(1~5mm)に標本を切断し、断面を平らにする。
- 6) 硫化水素飽和0.05規定蟻酸液中に室温で10分間浸漬。
- 7) 水洗し、空気中で自然乾燥。
- 8) 実体顕微鏡、金属顕微鏡などによる反射光での硬組織切断面の観察。

観察に用いた標本はいつまでも使用できる。なお、蟻酸液中に硫化水素を飽和させるには、キップの装置で発生する硫化水素ガスを用いるのが便利であるが、この方法では使用する硫化水素の量が大変少なくてすむので、他の化学的方法で得られるものでもよい。飽和度も厳密である必要はなく、硫化水素ガスを通した蟻酸液を無色の酢酸鉛溶液中に数滴たらした時に、ただちに液が黒化するのを一応の目安とすればよい。

第2法 (簡便法)

- 1) 組織を10%ホルマリン液で固定。

- 2) 硬組織を切断し、断面を平らにする。
- 3) 硫化水素飽和10%ホルマリン液(弱酸性)に数時間浸漬するか、或いは第1法と同じように硫化水素飽和0.05規定蟻酸液(もしくは塩酸液)に10分間浸漬する。
- 4) ただちに観察。

第1法及び第2法によって白い硬組織の切断面中に細く走る黒褐色の明瞭な鉛線が観察できる。

第2法は第1法を簡略化したもので、第1法で長時間を必要としたレジン包埋のための操作をすべて省いてある。また、蟻酸液の代りにホルマリン液を使用するので、第1法でみられる硬組織表面の酸による僅かな浸蝕も更に少なくすることができる。しかし、レジン包埋をしない場合には標本の保存はむずかしい。組織切片中の鉛線をもっと濃いものにするには、0.1%塩化金酸液に数分間浸漬すればよいが、そうすると鉛線以外の部分も汚れてくる。いずれの方法を採るにせよ対象は不脱灰切片であるから、切片を非常に薄く切断しない限り、反射光によって観察を行なわねばならず、この点が酢酸鉛法の原法と根本的に異なるところである。

結 果

この方法によって、種々な硬組織の切断平面中に黒褐色の細い明瞭な線として観察される鉛線は従来の酢酸鉛法による脱灰切片中の鉛線と同じ生長線であって、2本の鉛線に挟まれた部分は時間的に2回の酢酸鉛注射の間に形成された硬組織である。

標本の顕微鏡写真を撮る場合には、第1法によってレジン包埋をしたものの方が処理しやすい。以下に示すいくつかの例に於いて、特に断っていないものは、すべて第1法によった標本を写真に撮ったものである。

〔I〕 象牙質について

家兎の耳静脈から、2mg/kgの酢酸鉛を4日間隔で3回注射した場合、下顎切歯の不脱灰横断切片の象牙質切断面中に明瞭な細い鉛線が歯髓のまわりにほぼ同じ間隔をおいて同心円をなすように出現した(図1)。

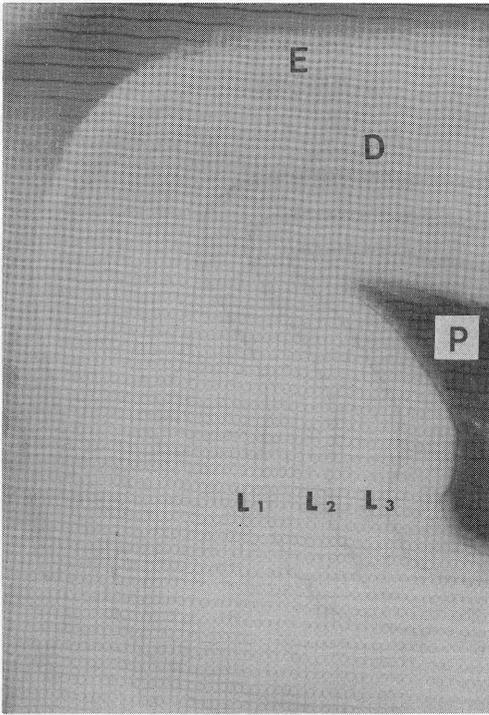


図1 家兎下顎切歯横断面 (×50)

L₁, L₂, L₃: 鉛線
 E: エナメル質
 D: 象牙質
 P: 歯髄

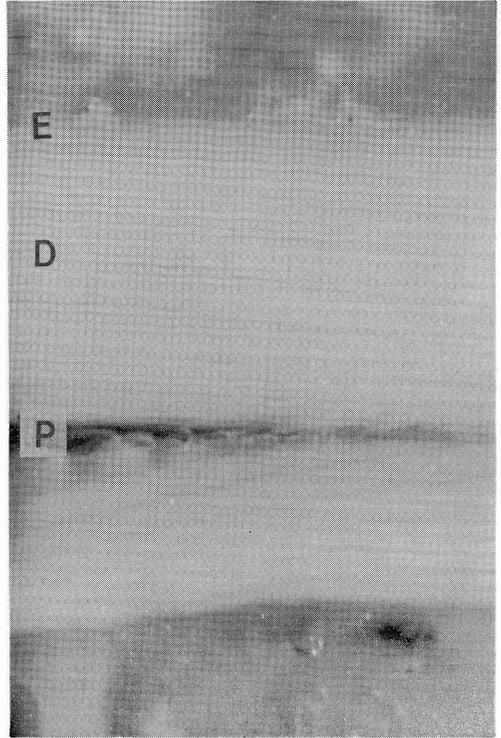


図2 家兎下顎切歯縦断面 (×32)

E: エナメル質
 D: 象牙質
 P: 歯髄

L₁, L₂, L₃ がその順序に形成された鉛線で、鉛線と鉛線の中の象牙質は4日間で形成されたものである。表面の鉛以外の無機成分は殆んどそのままである。

同量の酢酸鉛を7日間隔で連続投与した家兎の下顎切歯の縦断面中には、鉛線は図2の如くに出現した(図2)。

注射の回数に応じて、鉛線は何本でも描記され切歯象牙質の形成される状態がよくわかる。

次に家兎から取り出した下顎切歯に対して、直ちに第2法(簡便法)を応用した場合に出現する鉛線は次の通りであった(図3)。

外側のL₁は2mg/kgの酢酸鉛を投与した時に象牙質中に現われた鉛線であり、内側のL₂は1mg/kgの酢酸鉛投与によるものである。

L₂はL₁と比べて線の着色がうすい。家兎でも

ラットでも象牙質の観察用には、体重1kg当たり1~2mgの酢酸鉛を投与すればよいが、その量は酢酸鉛法の原法と同じである。

標本の保存ができない欠点があるが、単に硬組織の発育速度をみる場合には、この簡単な方法で十分である。

〔II〕骨について

5mg/kgの酢酸鉛を4日間隔で3回投与した体重100g位のラットの脛骨横断不脱灰切片の断面にみられる鉛線は次の如くであった(図4)、(図5)。

この図はラットの脛骨の中央部分を横断した場合のもので、大腿骨寄りの部分では鉛線はかなりくずれてくる。2mg/kgの酢酸鉛でも脛骨に鉛線は出現するが、極めて細く色もうすいので観察しにくい。骨中にははっきりした鉛線を観察するために

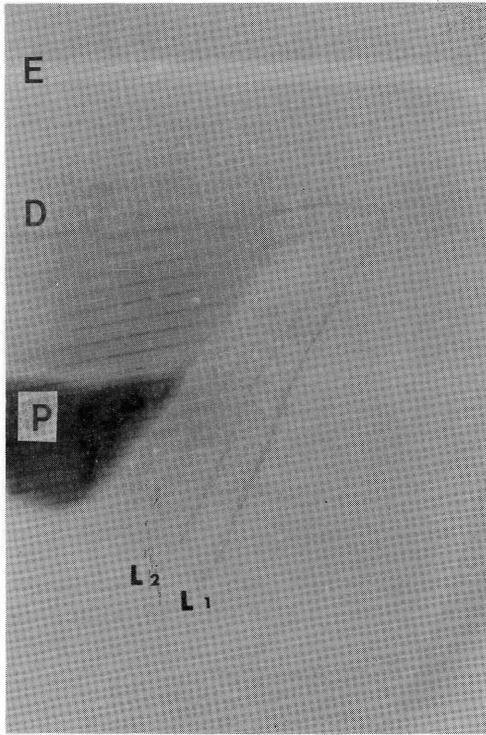


図 3 家兎下顎切歯不包埋切片横断面 (×50)

L₁, L₂: 鉛線
 E: エナメル質
 D: 象牙質
 P: 歯髄

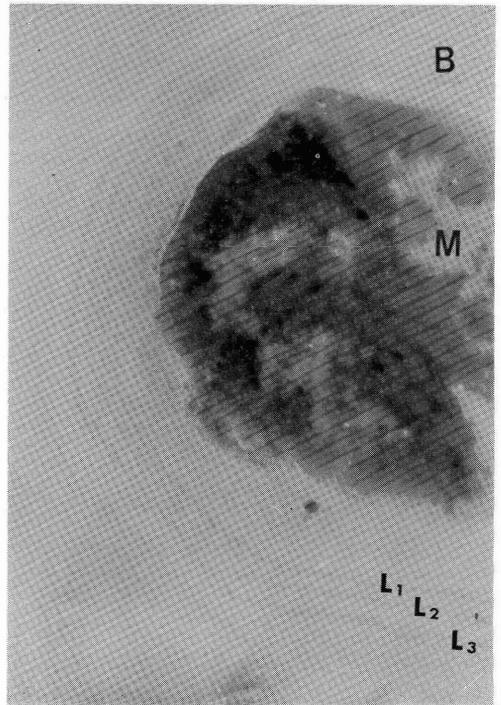


図 4 ラット脛骨横断面 (×50)

L₁, L₂, L₃: 鉛線
 B: 骨
 M: 骨髄

は、5 mg/kg の酢酸鉛の投与が必要であった。この図から脛骨も局部的にほぼ等速の発育をすることがわかった。

図 5 の l_1 , l_2 , l_3 は脛骨の骨内膜側にみられる鉛沈着線である。この図から明らかなように、ラット脛骨は外骨膜下の骨形成のみでなく、正常な場合でも骨内膜面の部分で骨形成を行なうことがあり、その形成量が鉛線によって計測できる。ただし、骨内膜面での骨形成は何らかの理由で外骨膜性の骨形成が抑制された場合に盛んになることが多い。

同様に酢酸鉛を投与したラットの切歯を横断するような面で切断した下顎骨の発育状態も、この方法でよく観察できる (図 6)。

下顎骨では各所で規則的な発育が行なわれているが、また、ある期間は全く発育をしない部分も

多くみられる。形成の速度は象牙質に比べてかなり遅いのが図からわかる。

【Ⅲ】 エナメル質について

原法ではエナメル質中に鉛線を見出すことは殆んど不可能であったが、この方法によれば幼若エナメル質部分に鉛線を観察することができる (図 7)。

7 図は 5 mg/kg の酢酸鉛を投与した家兎の下顎切歯の縦断切片の幼若エナメル質中に鉛線を出現させたものである。象牙質や骨の中にみられる鉛線と比べると、鋭い線ではなくて着色も極めて弱い。更に酢酸鉛の投与量を増加しても、エナメル質中の鉛線は濃いものにならなかった。また、成熟したエナメル質中には鉛線を見出すことができなかった。

【Ⅳ】 酢酸鉛による硬組織の形成障害について

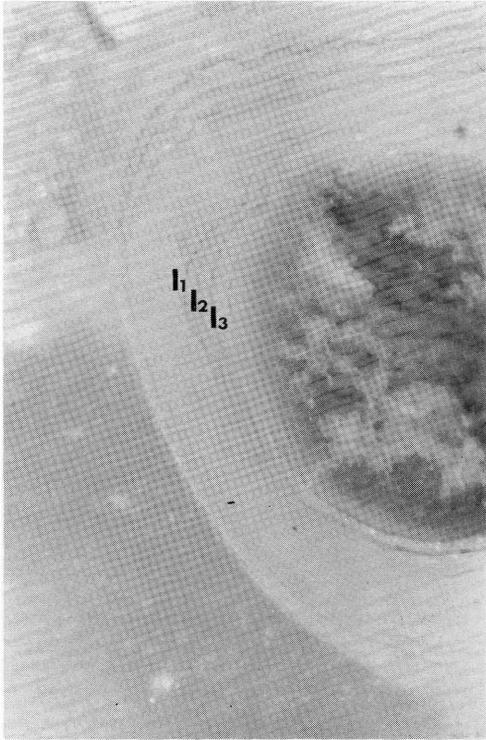


図5 ラット脛骨横断面(×50)
l₁, l₂, l₃: 鉛線

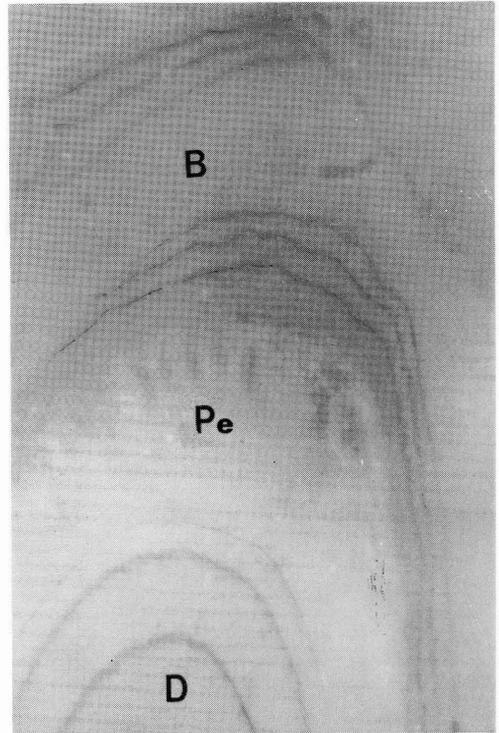


図6 ラットの下顎切歯と顎骨(×80)
D: 象牙質
Pe: 歯根膜
B: 顎骨

家兎及びラットの切歯象牙質中では、1～2 mg/kgの酢酸鉛の投与で明瞭な鉛線を観察することができたが、骨及びエナメル質では5 mg/kgの投与が必要であったので、その量の酢酸鉛が硬組織形成に何らかの異常をもたらすかどうかを家兎及びラットの象牙質、骨について調べたところ、不脱灰切片では何も異常が見出せなかったが、脱灰切片では、家兎の象牙質にのみ、ヘマトキシリン染色像の異常が現われた(図8)。

2度の、5 mg/kgの酢酸鉛投与によって、象牙質中に2本の鉛線が観察されるが、その鉛線の直下(歯髓側)に幅のせまいヘマトキシリン不染層があらわれ、更にその内側にかなり幅の広いヘマトキシリン濃染層が出現する。その他にも、鉛注射以後に形成される象牙質には、ヘマトキシリン染色像に軽度の異常がみられる。従って、この量の酢酸鉛を投与した場合には、象牙質を観察するこ

とは避けた方がよいと思われる。

考 察

この方法では、硬組織の切断面中に線状に沈着した白色の鉛塩が、酸性溶液中の硫化水素によって黒褐色の硫化鉛に変えられ、一方その他の無機成分(大部分はカルシウム塩)は硫化水素によって着色変化をうけないために、はっきりとした鉛線が実体顕微鏡で観察できるのである。また、組織片中のカルシウム塩等は短時間の蟻酸やホルマリンによる処理によって、表面がほぼ均等に、ほんの僅か浸蝕をうけるけれども、硫化鉛はそれらの酸性溶液に対して安定なために、溶出されずに組織片中に残るので、微量の鉛でも観察できるのである。

この方法によれば、大変簡単に、しかも短時間の操作で、原法によるものと同じ鉛線が硬組織の

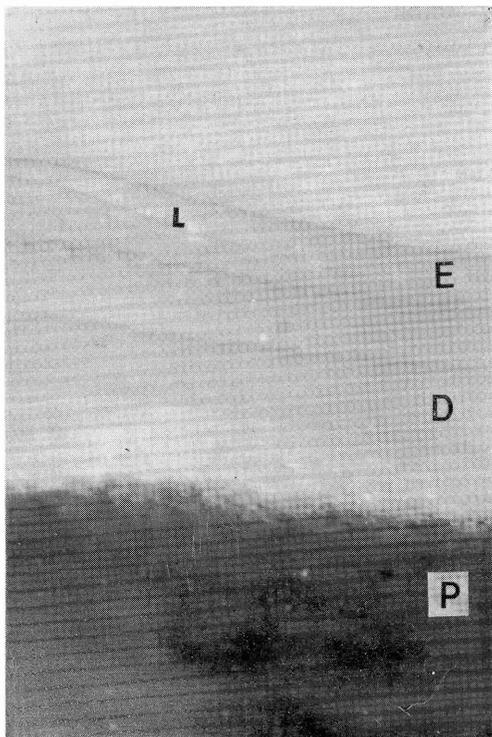


図 7 家兎下顎切歯縦断面 (×80)

L: 鉛線
E: エナメル質
D: 象牙質
P: 歯髄

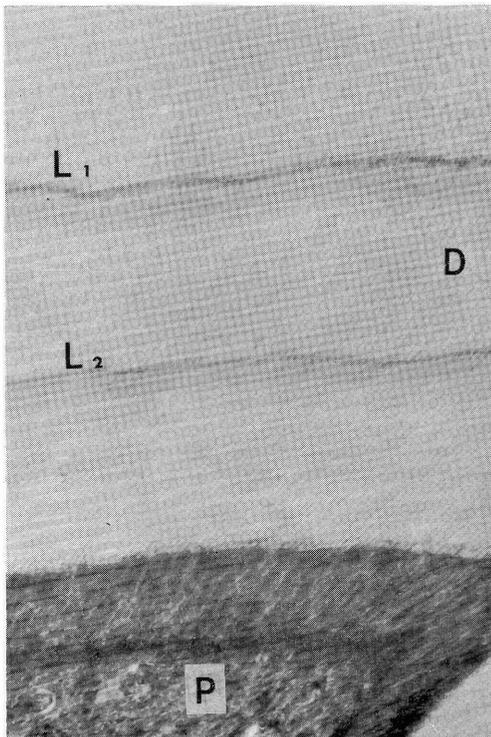


図 8 家兎下顎切歯脱灰横断薄切片の
ヘマトキシリン染色像 (×100)

L₁, L₂: 鉛線
D: 象牙質
P: 歯髄

不脱灰切片中に観察できるのであるが、原法と比べて精度がわるいという事はなく、幾多の操作が簡略化されるので、むしろ組織の変形や鉛の流出が少なくすむ。従って、硬組織の部分的な発育度を調べるには、この方法で十分と考えられるだけでなく、適用範囲が原法よりも、ずっと拡大されたのである。従来、脱灰操作を伴う原法では適用が困難であった長管骨やエナメル質にもこの方法は使用できるので、骨内膜面にみられる骨形成等の興味ある現象も観察された。

また、この方法では無機成分をそのまま残した組織片中の鉛線が観察できるので、これ迄は考えられなかった硬組織の無機相に対する時刻描記が可能となり、例えば、薬物の投与等によって生ずる石灰化状態の変化や無機成分の性状の変化などについて、その異常の発生過程を組織片上に経時

的に知るためにも用いられる。

更に、硬組織の切断研磨面に鉛線を出現させた後に、ヘマトキシリン染色を試みれば、原法によるヘマトキシリン染色像と同じものが観察できるものの、基質成分についてのこまかな観察には、通常の顕微鏡を用いる原法の方が、像を正確に大きく拡大して観察できる点ではるかに有利である。これらの点で、原法とこの応用法とは、明らかに使用目的を異にするものである。

ところで、鉛は生体にとって大変有害な物質なので、投与する量はできる限り少量にすべきである。しかし、骨やエナメル質で鉛線を観察するためには 5 mg/kg の酢酸鉛が必要であった。それは、骨や幼若エナメル質中のカルシウム沈着度が象牙質よりもわるく、従って、鉛の沈着度もわるいためと考えられる。 5 mg/kg の酢酸鉛では、明らかに

家兎の象牙質に形成異常がもたらされるので、象牙質を観察する場合と骨やエナメル質を観察する場合とでは、用いる酢酸鉛の量を変えるべきである。

更に、エナメル質中の鉛線については、幼若エナメル質部分にのみ観察できて、しかも他と比べて大変着色がうすく、鋭いものではないことの原因が不明で、その点を目下検討中である。

総 括

1) 酢酸鉛法は硬組織の脱灰薄切切片について観察する方法であり、その変法として、薄切しない不脱灰組織片中の鉛線を実体顕微鏡や金属顕微鏡で観察する方法を考案した。

2) 非常に簡便な方法である。

3) 石灰化したままの組織中に鉛線が検出できるので、組織片中の無機相に対しても、注射時刻が描記できる。

4) 適用範囲が原法よりも拡大されて、長管骨やエナメル質の観察にも使用できる。

5) 観察する硬組織によって、酢酸鉛の投与量

を変える必要がある。

稿を終るにあたり、御指導下された三村二教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) 布施貞夫, 松田 登: 酢酸鉛による硬組織の生体染色法
(その I) 歯界展望, 15: 297-302, 1958.
(その II) 歯界展望, 15: 541-546, 1958.
(その III) 歯界展望, 15: 649-651, 1958.
(その IV) 歯界展望, 15: 863-867, 1958.
- 2) Cleall, T. F., Perkins, R. E. and Gilda, T. E.: Bone marking agents for longitudinal study of growth in animals. *Archs oral Biol.*, 9: 627-646, 1964.
- 3) Kariyama, M., Akai, M. and Nishijima, S.: Three-colour fluorescent labelling method for calcified tissues in a reptile, *Caiman Crocodilus*. *Archs oral Biol.*, 14: 1349-1350, 1969.