

硬組織成長線鉛描記法と類骨組織染色法の 同時応用に関する検討

遠藤 実 熊谷 啓二 田中 久敏
武田 泰典*

岩手医科大学歯学部歯科補綴学第一講座

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座*

〔受付: 1985年5月16日〕

抄録: EDTA鉛による硬組織成長線鉛描記法に若干の改良を試みるとともに、硬組織成長線鉛描記法と類骨組織染色法の同時応用に関して検討を行った。

体重200g前後のウィスター系雄ラットに1%EDTA鉛水溶液(EDTA鉛30mg/kg)を5日間ごとに2回背部皮下に注射した。2回目の皮下注射より5日後にエーテル麻酔下にて屠殺、上下顎骨および大腿骨を摘出した。固定完了後、3~5mmの厚さに切り出し、実験系を2群に分けその染色性を検討した。第I群は硫化ナトリウム加10%EDTA脱灰液にて脱灰後約1mmの厚さに細切し、0.1%塩化金によるブロック染色を行った。その後5%チオ硫酸ナトリウムで洗滌し、通法に従がいパラフィン包埋した。7μmのパラフィン切片を作製し、脱パラフィン後に0.1%塩化金溶液による鍍金染色を施した。第II群は固定完了後、塩化シアヌル溶液による後固定を行った後に、第I群と同様の操作を行った。

その結果、第I群は切歯象牙質ならびに骨組織において、アルコール脱水列の影響を受けずに明瞭な成長線を認めることができた。また、第II群においては、類骨組織と同時に硬組織成長線を観察することができた。

Key words: lead-disodium-EDTA, osteoid matrix, labeling

I 緒 言

硬組織の発育度計測のために用いられる生体染色法の一法として、岡田・三村¹⁾によって開発された酢酸鉛描記法がある。この方法は脱灰薄切切片において石灰化が進行しつつある硬組織の鉛による時刻描記線をきわめて細い明確な線として見ることを可能とした。しかし、この方法は切片作製操作が煩雑で、かつ熟練を要

し、脱水系列などのアルコールによって硬組織内の硫化鉛の成長線が消失してしまうため、アルコール脱水が行えないことなどの問題点がある^{2,4)}。見明ら⁵⁾はこの岡田・三村の原法¹⁾に改良を加え、原法より簡便で、しかもパラフィンをはじめ種々の包埋剤を用いた成長線の観察法を考案した。しかし、彼らの改良法では必ずしも一定の良好な結果が得られるとは限らない。

一方、脱灰切片において類骨組織を明確に成

The newly developed double staining of growth-line and osteoid matrix in paraffin-embedded decalcified hard tissues

Minoru ENDO Keiji KUMAGAI Hisatoshi TANAKA and Yasunori TAKEDA*

(Department of Prosthodontics I, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, Iwate 020)

(Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, Iwate 020*)

岩手県盛岡市中央通1-3-27 (〒020)

*岩手県盛岡市内丸19-1 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 10:78-84, 1985

熟硬組織と識別できる方法は吉木ら⁶⁻¹⁰⁾によって考案された。本法は形成期の骨組織を定量的に観察しようとする場合に有用な方法として用いられているが、脱灰操作を行うために、硬組織の成長線は消失し認め難い。そこで、われわれは硬組織成長線鉛描記法のパラフィン包埋標本の染色性を、より安定させるため、ブロック染色法を用いて若干の改良を試みた。さらに、同一切片を用いて、これと吉木らにより考案された類骨組織染色法を併用し、類骨組織の染色と同時に硬組織成長線を観察する方法の有用性を検討した。本法により安定した結果が得られれば、硬組織成長線鉛描記法と類骨組織染色法の同時応用を可能とすることになり、硬組織の形態学的研究にとって大きな意義があると考えられる。今回その概要を報告する。

II 実験材料と方法

ラットの硬組織成長線と類骨組織を観察するため、体重 200 g 前後のウイスター系雄ラットに、1% EDTA 鉛水溶液 (EDTA 鉛 30mg/kg) を 5 日間隔で 2 回背部に皮下注射を行った。2 回目の皮下注射より 5 日後にエーテル麻酔下にて屠殺し、上下顎骨および大腿骨を摘出した。軟組織は可及的に取り除き 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定した。固定完了後、上下顎骨は切歯部と臼歯部に 2 分割した。また、大腿

骨は 3~5 mm の厚さで切り出し、実験系を 2 群に分けてその染色性を検討した。

第 I 群は図 1 に示す通り、見明らの方法に改良を加えた我々の硬組織成長線鉛描記法である。硫化ナトリウムを加えた 10% EDTA 脱灰液で脱灰完了後、切歯部および大腿骨は約 1 mm の厚さに細切し、図 1 の手順にしたがって操作を行った。まず、蒸留水による水洗後、進藤らの方法¹¹⁾を参考にして 0.1% 塩化金溶液によるブロック染色を実体顕微鏡下で過染色に注意しながら約 1 時間行った。次いで、5% チオ硫酸ナトリウムで 20 分間充分洗滌した。パラフィン包埋後、7 μ m のパラフィン切片を作製した。次いで、見明らの方法⁹⁾とは逆に、脱パラフィンをまず行った後に 0.1% 塩化金溶液による鍍金染色を 1~2 時間施した。

第 II 群は図 2 に示した方法で検討を行った。すなわち、吉木により考案された類骨組織染色法と我々の硬組織成長線鉛描記法の改良法との同時応用の可否を検討することにした。標本を水洗後、上昇エタノールにて脱水し、塩化シアルム溶液に 2 日間固定することにより、吉木の類骨組織染色法を行った。次いで、下降エタノールで加水し、蒸留水で水洗した後に、硫化ナトリウムを加えた 10% EDTA 脱灰液で 2~3 週間脱灰を行った。以下、図 1 の方法にしたがって硬組織成長線鉛描記法の改良法を行った。

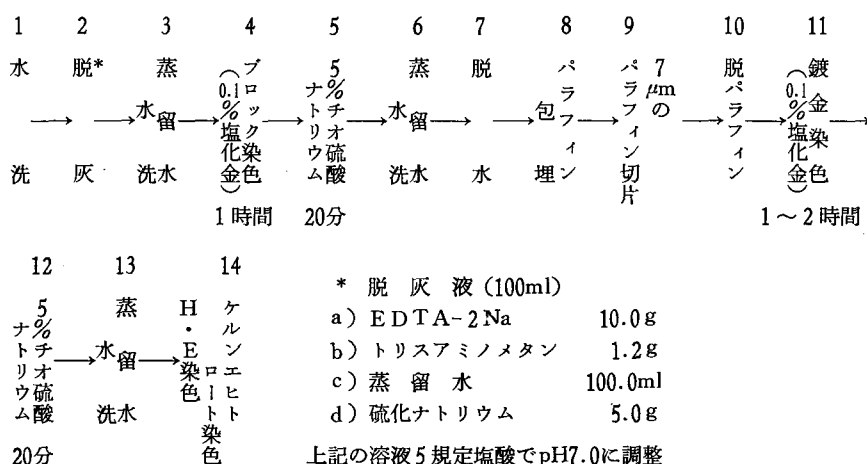


図 1 硬組織成長線鉛描記法の改良法における操作過程

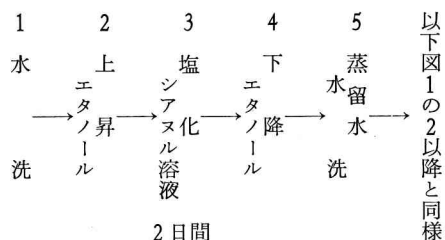


図2 硬組織成長線鉛描記法と類骨組織染色法の同時応用における操作過程

Ⅲ 結 果

1. 改良法による硬組織成長線鉛描記法の所見

硬組織成長線は、アルコール脱水を行いパラフィン包埋したにもかかわらず明瞭に認めることができ、しかもヘマトキシリン・エオジン染色を施した場合でも、一定の染色性が得られた。すなわち、図3に示すように、切歯象牙質において同心円状に、岡田・三村らの原法にはほぼ近い明瞭な成長線を認めることができた。外側の成長線は、1回目のEDTA鉛注射により得られたもので、内側の成長線は2回目のEDTA鉛注射により得られたものである。また図

4に示すごとく、骨組織においても骨辺縁部に注射回数に一致した2本の明瞭な成長線を認めることができた。上方の成長線は、1回目のEDTA鉛注射により得られたものであり、下方の成長線は2回目のEDTA鉛注射により得られたものである。

2. 硬組織成長線鉛描記法と類骨組織染色法の同時応用の所見(図5)

骨辺縁部に好酸性の類骨組織が带状に認められ、その下方に注射回数に一致した2本の成長線が観察された。しかし、1回目のEDTA鉛注射による成長線は、やや不明瞭となっていた。

成長線のみの観察であれば、脱パラフィン後の鍍金染色だけでも充分であったが、ヘマトキシリン・エオジン染色、ケルンエヒトロート染色を施すことにより、成長線はより明瞭となった。しかし、骨の成長線のみの観察することを目的とし、類骨組織の観察が不必要な場合にはケルンエヒトロート染色のほうが、ヘマトキシリン・エオジン染色より成長線を明瞭に認めることができた。

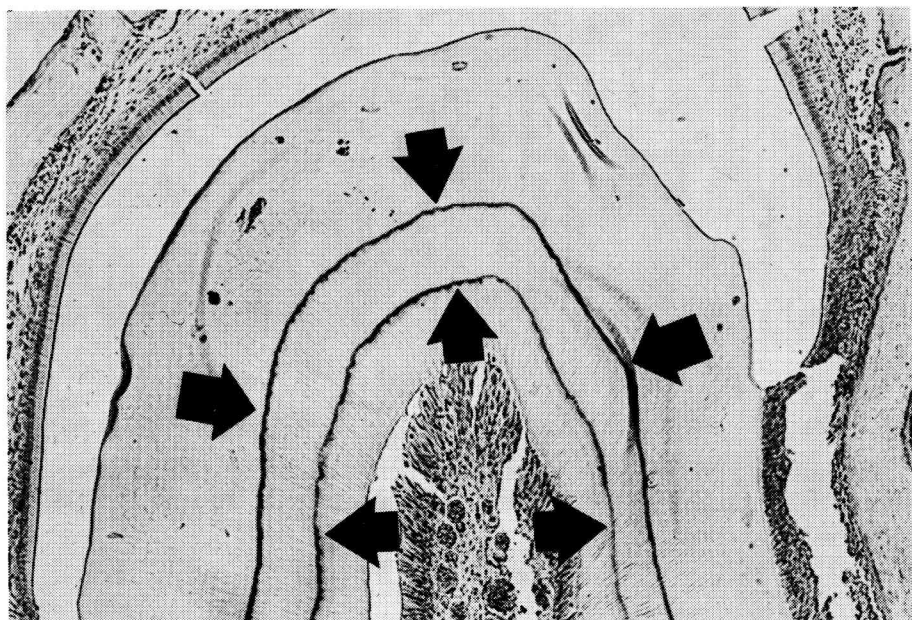


図3 切歯横断面における硬組織成長線 切歯象牙質において、同心円状に2本の明瞭な成長線が認められる(↑)。ヘマトキシリン・エオジン染色、×25

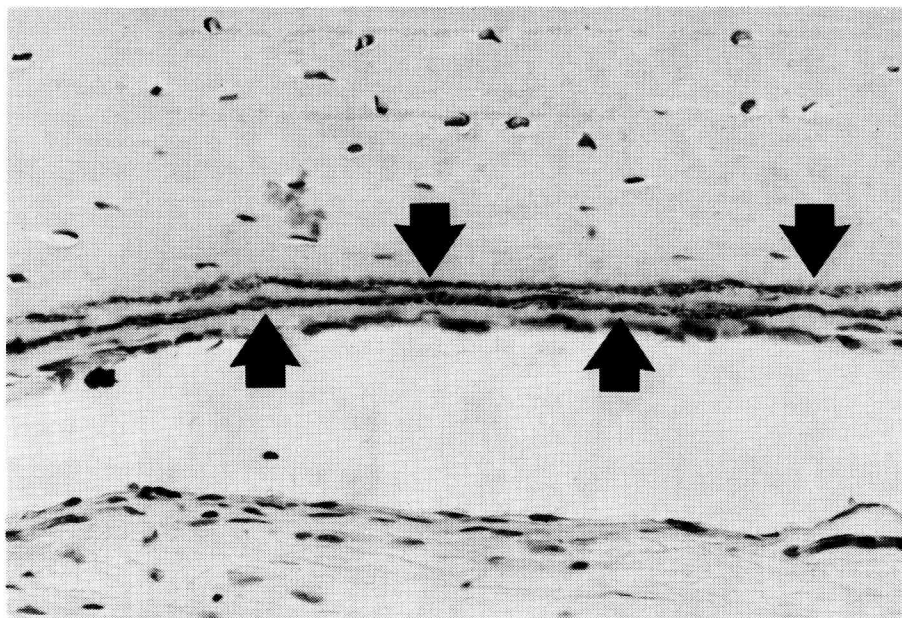


図4 上顎骨縦断面における硬組織成長線 骨辺縁部に2本の明瞭な成長線が認められる(↑)。ケルンエヒトロート染色, ×50

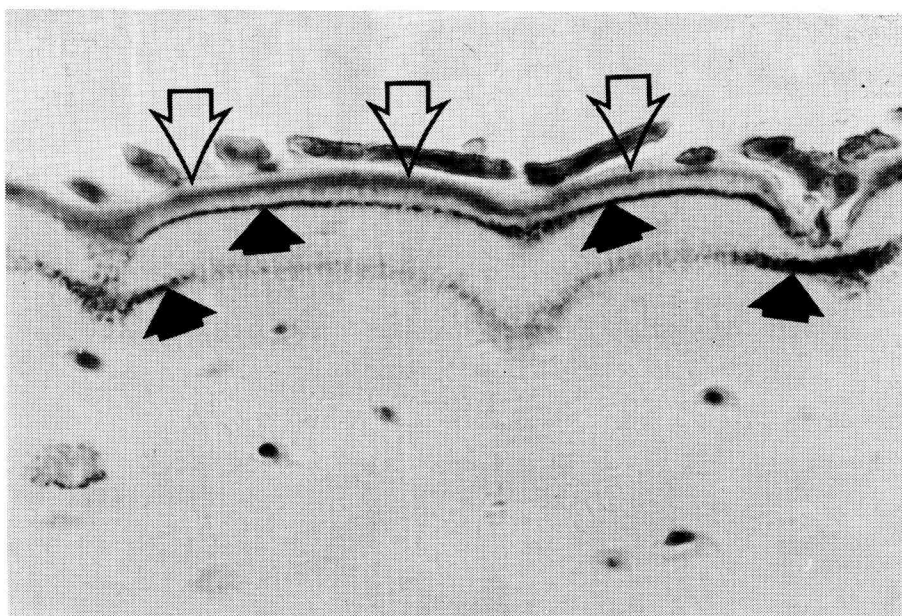


図5 大腿骨横断面における硬組織成長線と類骨組織 骨辺縁部に好酸性の類骨組織が帯状に認められ(↓), その下方に2本の成長線が認められる(↑)。ヘマトキシリン・エオジン染色, ×500

Ⅳ 考 察

硬組織の生体染色法における time-marker

としては、鉛やテトラサイクリンなど¹²⁻¹⁴⁾が用いられている。テトラサイクリンは硬組織の石灰化が進行しつつある部位のアパタイト結晶

の表面でカルシウムと結合し、鉛は結晶のカルシウムと置換すると考えられている¹⁹⁾。そのため、テトラサイクリンは非脱灰標本のみに応用され、しかも十分に薄い標本にしなければ、明瞭な細い線としては観察されない⁴⁾。

岡田・三村ら¹⁾により考案された酢酸鉛注射による硬組織の発育度計測のための生体染色法は、脱灰標本により石灰化が進行しつつある硬組織において、鉛による成長線をきわめて細い明確な線としてみる事が可能である。しかも、脱灰薄切切片においてこれを観察しうるので、凍結切片という制限はあるが、その範囲内で組織の微細な構造を同時に観察することができる。しかしながら、切片作成操作が煩雑で、かつ熟練を要し、脱水系列などのアルコールにより硬組織内の硫化鉛の成長線が消失してしまうため、アルコール脱水が行えないなどの問題点がある。見明ら⁵⁾はこの点に検討を加え、岡田・三村らの原法より簡便で、しかもアルコール脱水や種々の包埋剤を用いて鉛の沈着線を観察する方法を考案した。しかし、この方法では脱パラフィンせずに鍍金染色するため、鉛の沈着線以外に塩化金が沈着し易く、鍍金染色後にヘマトキシリン・エオジン染色を施した場合には、必ずしも良好な染色結果が得られないようである。

進藤¹⁵⁾は酢酸鉛による硬組織内時刻描記法を電子顕微鏡的に応用しようと試みた。すなわち、脱灰後に組織片を0.1%塩化金溶液でブロック染色を行った後、アルコール脱水系列によりエポン包埋した。その結果、ブロック染色を施すことにより、酢酸鉛沈着線がより明瞭に描記できたことを報告している。このブロック染色による方法は切片染色にくらべ、硫化鉛となって硬組織内に沈着している化合物の硫黄が遊離しないと推測されている¹¹⁾。

我々はこれらの点に着目し、見明らの方法に改良を加え、より安定した硬組織成長線鉛描記法を考案した。すなわち、硫化ナトリウムを加えた10% EDTAにより脱灰後に0.1%塩化金溶液によるブロック染色を行い、5%チオ硫酸

ナトリウム溶液にて洗滌後、アルコール脱水、パラフィン包埋した。さらに、薄切切片の鍍金染色を脱パラフィン後に施した結果、脱パラフィン前に鍍金染色したものと比較して、ヘマトキシリン・エオジン染色で良好な染色性が得られた(図3)。これは、脱パラフィン前に鍍金染色した場合には、脱パラフィン後に鍍金染色したものと比較して、鉛沈着線以外に沈着した塩化金を取り除くことが困難であるためと考えられる。

また吉木により考案された類骨組織染色法は、脱灰切片において類骨組織を明確に識別できる方法であり、形成期の骨組織を定量的に観察しようとする場合には有用な方法であるが、脱灰切片を用いるために、従来の方法では硬組織の成長線は認め難い。

吉木による類骨組織染色法と硬組織成長線鉛描記法の改良法を同時応用した結果、塩化シアン溶液の固定によっても、鉛沈着線はなんら影響をうけなかった。すなわち、塩化シアン溶液への浸漬によって、類骨組織の酸好性は増加するが、成熟硬組織においては石灰塩の存在により、塩化シアンとの反応が妨げられるため⁶⁻¹⁰⁾、鉛沈着線に対して何らの影響も与えなかったものと思われる。また、吉木らによる類骨組織染色法は、固定、脱灰、染色の全過程を通じ、可能な限り中性域の薬液で処理するのが原則である⁶⁻¹⁰⁾。そこで、今回の改良法においては、見明らの方法の脱灰液をpH 7.0に調整し、脱灰液を毎日交換するとともに、各操作での蒸留水による洗滌は充分に行った。このことにより、我々は類骨組織と同時に骨組織の成長線を観察することを可能にした。したがって、硬組織成長線鉛描記法と類骨組織染色法の同時応用は、硬組織の形態学的研究にとって大きな意義を有すると考えられる。しかしながら、今回の硬組織成長線鉛描記法の改良法において、2~3 mmの厚さの標本をブロック染色した場合その後の5%チオ硫酸ナトリウムによる洗滌が不十分であると、染色封入した切片に点状の小さな塩化金の沈着が認められることもあっ

た。また、時には類骨組織の染色性が低下したこともあったので、常に良好な染色性を得るためには、5%チオ硫酸ナトリウム溶液によるブロック染色後の十分な洗滌ならびに全過程を通じての慎重な操作を行うことが必要であると考えられる。

V 結 論

1) EDTA 鉛による硬組織成長線鉛描記法に

Abstract : An improved double staining method was discussed for labeling of growth lines in hard tissues as well as identification of osteoid matrix simultaneously. For the experimental study, following procedures were made.

Male Wistar rats were injected subcutaneously with 1.0% lead-disodium-EDTA (30mg/kg), followed by a second injection five days later. Five days after the second injection, the animals were sacrificed by ether anesthesia. Their upper and lower jaws and femur were dissected and fixed in 10% neutral buffered formalin immediately. The specimens were cut in 3-5 mm thickness to observe the staining quality of growth lines and osteoid matrix as well. After these procedures, two experimental studies were made.

The first study was made for labeling of growth lines in hard tissues. Specimens were demineralized in a 10% EDTA solution containing 5% sodium sulfide at 4°C for 2-3 weeks. After demineralization, they were submitted into block staining in 0.1% gold chloride solution for 60 minutes, and rinsed in 5% sodium thiosulfate solution for 20 minutes. After that, they were dehydrated in ascending ethanol, and embedded in paraffin. Then, 7 μ m thin sections were made. After deparaffinization, sections were stained with 0.1% gold chloride solution for 1-2 hours, and rinsed in 5% sodium thiosulfate solution for 20 minutes.

The second study was made for labeling of growth lines in hard tissues and osteoid matrix. Specimens were dehydrated in ascending ethanol. And then, they were immersed in freshly prepared 0.5% cyanuric chloride in anhydrous methanol containing 1.0% N-methyl morpholine for approximately two days at room temperature. Remaining procedures for the staining were the same of that first study.

Growth lines in hard tissues were clearly observed with no disadvantageous effects caused by the dehydrating in the first study. In the second study, labeling lines in hard tissues and osteoid matrix were observed in the paraffin-embedded specimens simultaneously.

文 献

- 岡田正弘, 三村 二: 鉛塩=依ル骨及歯牙組織新生石灰部位生体染色法, 口病誌, 11: 365-366, 1937.
- 布施貞夫, 松田 登: 酢酸鉛による硬組織の生体染色法(そのII), 歯界展望, 15: 541-546, 1958.
- 小椋秀亮: 鉛塩注射による硬組織の生体染色, 歯界展望, 35: 893-900, 1970.
- 小椋秀亮: 硬組織内時刻描記法, 須賀正一, 田熊庄三郎, 佐々木哲編: 歯の研究法, 医歯薬出版, 東京, 157-184, 1973.
- 見明康雄, 高田克重, 荒木 寛: 象牙質の鉛ラベリング法の改良について, 歯科学報, 83: 399-405, 1983.
- 吉木周作: 脱灰, H-E染色を用いたosteoidの簡単な証明法, 骨代謝, 7: 43-45, 1973.
- 吉木周作: 脱灰切片による硬組織内未石灰化基質の証明法, 歯界展望, 42: 769-775, 1973.
- S. Yoshiki, H. Tohda and I. Chiba: Further considerations on a simple histological method for identification of osteoid matrix, *Stain Technol.* 49: 367-373, 1974.
- S. Yoshiki, T. Ueno, T. Akita and M. Yamanouchi: Improved procedure for histologi-

若干の改良を加え, パラフィン切片において良好な結果を得た。

- EDTA 鉛による硬組織成長線鉛描記法と吉木らによる類骨組織染色法を同時応用することにより, 同一切刃上に類骨組織と硬組織の成長線を同時に観察することができた。

- cal identification of osteoid matrix in decalcified bone. *Stein Technol.* 58: 85-89, 1983.
- 10) 吉木周作: 脱灰, H-E 染色法によるオステオイドの簡単な証明法, 高橋栄明編集: 骨形態計側ハンドブック, 西村書店, 新潟, 61-66, 1983.
 - 11) 進藤 修: 酢酸鉛による硬組織内時刻描記法の電子顕微鏡的応用, 歯科学報, 79: 1199-1223, 1979.
 - 12) 須賀昭一: 硬組織と Tetracycline, 歯学, 53: 137-143, 1965.
 - 13) 須賀昭一: テトラサイクリンによるラベリング法, 須賀昭一, 田熊庄三郎, 佐々木哲編: 歯の研究法, 医歯薬出版, 東京, 1973.
 - 14) 大野康亮: テトラサイクリンによる形成硬組織のラベリング像に及ぼす諸条件について, 歯基礎誌20: 252-269, 1978.
 - 15) 岡部知之: 血中における硬組織沈着型鉛塩の研究, お茶の水医誌18: 175-185, 1970.