大阪大学歯学部, 第 2 口腔外科学教室 (主任: 川勝賢作教授)
Dept. of Oral Surgery, Dental School, Osaka Univ., Kitaku, Osaka
(Head: Prof. Dr. K. KAWAKATSU).

正常唾液腺の組織化学的研究. IV. Acid phosphatase の組織化学的証明.

Histochemical Studies of Normal Salivary Glands.

IV. Distribution and Localization of Acid Phosphatase in the Salivary Glands in Experimental Animals.

川勝賢作, 森 昌彦, 藤田訓也, 谷 孝夫
Kensaku KAWAKATSU, Masahiko MORI, Kuniya FUJITA,
Takao TANI.

(Received January 16, 1960.)

酸性 phosphatase の組織化学的証明は 1941 年 Gomori²⁾ の創案による硫化鉛法が発表され, 今日迄この方法が多く利用されている. 近年, Azo 色素結合法がアルカリ性 phosphatase の証明のみならず酸性 phosphatase にも応用され, Grogg と Pearse (1952), Burton (1954), Gomori (1956) 等によりその成績が報告されている.

アルカリ性 phosphatase と酸性 phosphatase は生化学的性状のほか生体内分布が相違することから異つた生物学的意義を有するものと解され, 特に酸性 phosphatase は Gomori の方法による染色に於ては反応成績が非常に不安定であり, 又アルカリ性 phosphatase に比べ酵素の性状に不明確な点を多く残している. 今回吾々は Grogg と Pearse 並びに Burton の方法を参考にして唾液腺の酸性 phosphatase を Azo 色素結合法で証明した. この成績は先に川勝等 (1959a, 1959b, 1959c) の発表した正常唾液腺のアルカリ性 phosphatase 反応, esterase 反応等と比較検討し, 唾液腺分泌の機構との関係, 或いは唾液腺粘液多糖体の形成機序等の参考資料になるものと考えられる. 尚, 現在の所唾液腺の酸性 phosphatase の組織化学的証明の報告は少く, この方面の研究結果が望まれている現状である.

I. 実験材料と研究方法.

マウス, ラット, モルモット, 家兎, 犬の顎下腺, 舌下腺, 耳下腺を摘出し, 直ちに 10% 冷ホルマリンで短時間固定, -20°C の cryostat で $10-15\mu$ 厚の切片としてスライドガラスにはり付け, 次の azo 色素結合法で酸性 phosphatase を証明すると共に前回報告したアルカリ性 phosphatase の証明をも併せて行った.

α -naphthyl phosphate (Na)	10 mg,
Naphthanil diazo blue B	20 mg,

M/10 Acetate buffer pH 5.8 20 ml.

α -naphthyl phosphate の場合, 酸性 phosphatase 陽性部位は暗紫黒色に, 弱陽性部位は灰褐紫色に反応する. α -naphthyl phosphate の代りに 6-Benzoyl-2-naphthyl phosphate (Na) を用いる場合は青紫色に着色する. α -naphthyl phosphate は Na 塩の代りに Ca 塩を用いてもよいが, Ca 塩の溶解性は悪い. また β -naphthyl phosphate は青紫色素の反応色調を示すが, 鋭敏度並びに局在性の点より観察すると結果は必ずしも良好とは云えない.

反応温度は 20°C 以下で 30 分程行う. アルカリ性 phosphatase (ALPase) の場合の方が反応時間が短い (10—20 分) が, 酸性 phosphatase (ACPase) の場合は十分に時間をかけた方がよい結果が得られる.

パラフィン包埋を行うと, ACPase は ALPase よりも著しく破壊され, ACPase 反応の弱い組織は陰性となることが多いので凍結切片がよい. 而し凍結切片に於いてはパラフィン切片の如く細胞内の詳細な分布状況は判明しないが, 組織学的スケールに於いては大なる障碍とはならない.

II. 実験成績.

マウス.

顎下腺の腺細胞に強い酵素反応を認め, 腺細胞原形質は全般に濃暗紫色に着色し核の部分が白くぬけて見える. 腺条部に僅かな反応が認められ, 導管部は僅か或いは殆んど反応しない. 耳下腺の終末細胞には痕跡程度乃至軽度の反応が認められ, 線条部, 導管部は極めて軽度に反応する.

ラット.

顎下腺の腺細胞の酵素反応は軽度乃至中等度である. 線条部並びに太い導管には, 腺細胞より稍高度の酵素反応がみられる. 舌下腺の酵素活性はマウスに類似し, 細胞基底部に比較的明瞭な反応が見られ, 細い分泌管の酵素反応は稍高度で, これに反し太い導管部は酵素活性が低下している. 耳下腺は顎下腺に類似し腺細胞には強い反応は認められず, 腺条部には中等度の反応が認められた.

モルモット.

顎下腺, 耳下腺共に腺細胞に僅かな酵素反応が認められる程度で, 細い導管部 (線条部) の酵素活性が腺細胞より稍増加するのが観察された. 舌下腺の腺細胞の反応は軽度で, 特にその基底部に於いて明らかである.

家兎.

顎下腺々細胞には強い酵素反応を一様に認め, 線条部は軽度に反応している. 耳下腺の腺細胞原形質は軽度乃至中等度に反応し, 酵素反応の強い細胞と弱いものが混在している. 線条部には軽度の酵素活性が存在する.

犬.

顎下腺腺細胞基底部に中等度の反応が認められ, 腺細胞原形質中の酵素反応は

軽度である。線条部は中等度の反応を有している。舌下腺は比較的不明瞭な軽度陽性反応が認められ、管腔側は反応しない。これに反して、ALPase 反応は分泌側である管腔側に極めて強い酵素活性が認められ、対照的である。耳下腺の腺細胞は不明瞭な弱い反応が認められ、線条部は中等度乃至軽度陽性の反応を認める。

以上の如くマウス、ラッテ、モルモット、家兎、犬の3大唾液腺の ACPase 反応はマウスと家兎の顎下腺々細胞に最も強い反応が見られ、他の動物の腺組織には一般に軽度の反応が存在するに過ぎない。各動物共に耳下腺々細胞中には軽度陽性反応が認められる。唾液腺中の ACPase 反応は一般に線条部と考えられる intra-lobular duct の酵素活性が腺細胞の酵素活性より稍増強されている傾向が窺れる。

以上各種動物の唾液腺に於ける ACPase 反応を総括し、表示すると大体図1の如くなる。

1. Intensity of the histochemical reaction for acid phosphatase in the salivary glands in various animals

	Submandibular gland		Sublingual gland		Parotid gland	
	A	D	A	D	A	D
Mouse	+++	+	++	+~-	+	+
Rat	+~±	++	++	++	++~±	++
Guinea pig	+	++	+	++	+	++
Rabbit	+++	++			++~+	+
Dog	++	++	+		+	++~+

A : acinar cell, D : duct cell. Intensities of the reaction : - negative, ± questionable, + weak, ++ stronger, +++ very strong.

III. 考 察

ACPase の Azo 色素結合法に依る組織化学的証明法は Grogg と Pearse (1952) が α -naphthyl phosphate と diazo blue B (BB) を用いて M/10 Michaelis buffer pH 5.0 で行い、Burton (1954) は acetate buffer pH 5.8 を用いて行った。その後 Rutenberg と Seligman (1955) により sodium 6-benzoyl-2-naphthyl phosphate を基質に用いる方法が発表せられ、また Gomori (1956) は glycerophosphate, α - または β -naphthyl phosphate, 6-Bromo-2-naphthyl phosphate, 6-Benzoyl-2-naphthyl phosphate, 2,4-dichloro- 又は 2,4-dibromo- α -naphthol の phosphate を用いて ACPase の組織化学的証明を行った。これらの結果、摂護腺、肝臓、脾臓、卵巣、腎臓上皮が殊に強い ACPase を含んでいることが明らかにされたが、唾液腺の phosphatase に関する文献は少なく、ALPase の組織化学的証明を取り扱った文献が散見されるのみで、唾液腺の ACPase についての報告は稀である。そのうち Hill と Bourne (1954) は Gomori の硫化鉛法を用いて、兎、猫、モルモット、ラット、マウスの唾液腺の ACPase を検索し、その反応が、一般に導管上皮細胞よりも腺細胞

に強く, また原形質よりも核に強いと述べている。

唾液腺に於ける ALPase と ACPase 反応は動物の種類により相当の異同を示すことが前回の報告とともに本研究で判明した。吾々の所見によると, ALPase は正常動物に於いては毛細血管を主とし, 原則的に腺細胞基底部に証明されるが, ACPase は腺細胞原形質中に比較的明瞭に存在するものが多い。即ち, ACPase の反応はマウスと家兎の顎下腺の腺細胞中に最も強く見られるが, ALPase の反応は細胞基底部をとり囲む籠状の毛細血管様構造物に強く見られるのである。従ってこの両腺組織は ACPase を分泌する可能性がある。また腺分泌と関連して, 多くの唾液腺の腺条部と考えられる intralobular duct に比較的明瞭な ACPase を証明したのは, この部位の上皮組織の機能上の特性を考え合わせると興味ある問題と云えよう。

Hill と Bourne (1954) も細胞中の ACPase 反応の分布及び局在性の意義には不明のところが多いが, その反応が非常に微弱であるモルモットの顎下腺には特に線条部の分泌側に集中的に強陽性反応が現われ, 大きな導管では原形質と核の全体が微弱な彌漫性陽性を呈し, ACPase 反応の局在は mitochondriallike bodies にあるといっている。これらの点を考慮して線条部の分泌機能との関連性を伺うことが出来るものと考えられる。

また吾々の所見に於いてラットの顎下腺, その他 2—3 の動物の耳下腺の ACPase 反応が腺細胞よりも線条部に常に僅かに高いことから, この部位で分泌される唾液中の ACPase を再吸収している可能性も考えられる。また, 犬の舌下腺々細胞の分泌側には強い ALPase 反応が認められ ACPase 反応は反対にその基底部に存在している事実も, ALPase と ACPase の両者の関係を伺わしめる一示唆を与えるものである。犬の顎下腺の ACPase 反応は Esterase 反応に類似し, 主として細胞の基底部に強く現われ, 顎下腺粘液多糖体形成に何らかの関係を有することが示された。また各動物共に耳下腺は漿液腺でこの場合の ACPase 反応が弱く出現する事より考えると, 漿液腺に於ける唾液形成と ALPase と ACPase の間に密接な関係が存在しないことも示唆された。

IV. 結 語.

マウス, ラット, モルモット, 家兎, 犬の 3 大唾液腺の酸性 phosphatase の分布及び局在性を Grogg と Pearse 並びに Burtone の方法を参考にし, azo 色素結合法により組織化学的に検し, アルカリ性 phosphatase の分布等との比較検討を試みた。

1. 唾液腺に於ける酸性 phosphatase 反応は, アルカリ性 phosphatase 反応と同様, 動物の種類により相当の異同を示めた。

2. 酸性 phosphatase は, 腺細胞原形質中に比較的明瞭に証明され, アルカリ性 phosphatase が腺細胞基底部及びその周囲を取り囲む毛細血管様構造物に強い反

応を認めさせた。即ちその局在部位に相異があった。

3. 唾液腺の導管の腺条部には比較的明瞭に酸性 phosphatase が証明された。殊にラットの顎下腺, 其の他 2—3 の動物の耳下腺等に於いて, 酸性 phosphatase 反応は腺細胞よりも線条部に僅かながらも高いことが認められた。

Author's Abstract.

The distribution of acid phosphatase in normal major salivary glands were investigated histochemically using azo dye coupling method as referred to the techniques of GROGG PEARSE, BURSTON etc. The examination was performed in various kinds of animals, such as mice, rats, guinea pigs, rabbits and dogs, and the results were compared with those of alkaline phosphatase reaction.

1. The distribution and intensity of acid phosphatase reaction in the salivary glands were different in different animals as in the case of alkaline phosphatase.

2. The acid phosphatase was found more distinctly in the cytoplasm of acinar cells, whereas the alkaline phosphatase was more strongly demonstrated in the basal part of the acini cells as well as in blood capillaries surrounding them.

3. The acid phosphatase reaction was in the cells of the striated portion of the duct stronger positive than in the acini cells, especially in the submandibular gland of rat and the parotid gland of some animals.

References.

- Burtone, J. F.:** Histochemical demonstration of acid phosphatase by an improved azo dye method. *J. Histochem. Cytochem.* 2 (1954). P. 88-94. — **Gomori, G.:** Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. *Arch. Path.* 32. (1941) P. 189-199. — Histochemical methods for acid phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 4 (1956). P. 453-461. — **Grogg, E. and A. G. E. Pearse:** A clinical study of the histochemical techniques for acid phosphatases with a description of azo dye method. *J. Path. Bact.* 64 (1952). P. 627-636. — **Hill, C. R. and G. H. Bourne:** The histochemistry and cytology of the salivary glands duct cells. *Acta. anat.* 20 (1954). P. 116-128. — 川勝, 森, 福田, 藤田, 保志: 正常唾液腺の組織化学的研究, I. コハク酸脱水素酵素の組織化学的証明, 阪大歯誌: 4 (1959 a). 頁 421-438. — 川勝, 森, 藤田, 福田, 川越: 正常唾液腺の組織化学的研究, II. エステラーゼの組織化学的証明, 阪大歯誌. 4 (1959 b). 頁 439-454. — 正常唾液腺の組織化学的研究, III. アルカリ性フォスファターゼの組織化学的証明, 阪大歯誌. 4 (1959 c). 頁 455-470. — **Rutenberg, A. M. and A. M. Seligman:** The histochemical demonstration of acid phosphatase by a post-incubation coupling technique. *J. Histochem. Cytochem.* 3 (1955). P. 455-470.
-

Explanation of the Figures.

All of the figures illustrate the distribution and localization of acid phosphatase in major salivary glands of normal animals.

Fig. 1. Submaxillary and sublingual gland of mouse, the former demonstrates marked activity of the acid phosphatase in the acinar cells, and the latter demonstrates its moderate activity. But the duct cells of both glands show the reaction slightly. $\times 100$

Fig. 2. High power magnification of Fig. 1. $\times 400$

Sublingual gland shows a diffuse staining of the ground cytoplasm of acinar cells. The staining is stronger in the basal part of acinar cells.

Fig. 3. Submaxillary gland of rat, showing stronger reaction in the duct cells than in acinar ones. $\times 100$

Fig. 4. High power magnification of Fig. 3 $\times 400$

Fig. 5. Sublingual gland of rat resembles to that of the mouse. Fairly positive reaction is seen in the basal parts of acini. $\times 100$

Fig. 6. High power magnification of Fig. 5. $\times 400$

Fig. 7. Parotid gland of rat, similar to submaxillary gland, showing a weak positive reaction of acinar cells and moderate reaction of duct cells. $\times 100$

Fig. 8. Acinar cells in sublingual gland of guinea pig. They are stained diffusely, but outlined by a stronger stained basal part of cytoplasm. $\times 100$

Fig. 9. Submaxillary glands of guinea pig exhibits more intense reaction in duct cells than in acini. $\times 100$

Fig. 10. Submaxillary gland of dog shows moderate positive reaction in the basal part of acinar cells and slight reaction in other parts of the cell body. $\times 100$

Fig. 11. Rabbit submaxillary gland presents the most intensive Reaction in the cytoplasm of acinar cells. $\times 100$

Fig. 12. High power magnification of Fig. 11. $\times 400$