唾石表層にみられた多層膜構造物の形態的観察 ——タンニン酸グルタルアルデヒド混合固定法による——

三宅 実・大林由美子・西原 実 男
長畠駿一郎・森川 雅之*・高橋 常男**

Morphologic study of multilamellar bodies in the surface layer of sialolith ——Application of glutaraldehyde and tannic acid mixing fixation——

Minoru MIYAKE・Yumiko OHBAYASHI・Jitsuo NISHIHARA
Shunichiro NAGAHATA・Masayuki MORIKAWA*・Tsuneo TAKAHASHI**

Abstract : Fixation by adding tannic acid to ordinary aldehyde solution has been reported to be a useful means for the ultramicroscopic visualization of phospholipids.

Sialolithiasis is a common disorder of the salivary glands. Although the mechanism of calcifying sialoliths remains to be elucidated, it was reported that biochemically sialoliths contain a lipid-enriched matrix. The lipids in this matrix are associated with mineral deposition in sialoliths. Therefore, using an ultramicroscope with a fixative containing tannic acid we examined human sialoliths to ascertain whether the phospholipids contained in the sialoliths are related histologically to the mechanism of mineralization.

Multilamellar bodies (MLB) were found in the surface layer of the sialoliths. MLBs were composed of alternating dark and light layers and their cycle length measured about 4~6 nm (approximately 5 nm). Morphological characteristics of MLBs are similar to the lamellar bodies in pulmonary surfactant. These MLBs clearly represented phospholipids and the view that phospholipids are involved in mineralization in sialoliths was supported by these histologic findings.

Key words : tannic acid(タンニン酸), sialoliths(唾石), phospholipids(リン脂質), multilamellar bodies (多層膜構造物)

緒 言

香川医科大学医学部歯科口腔外科学講座
(主任：長畠駿一郎教授)

* 岡山大学歯学部第1口腔外科学講座
(主任：西嶋克巳教授)

** 神奈川歯科大学口腔解剖学講座
(主任：高橋和人教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Kagawa Medical School (Chief: Prof. Shun-
ichiro Nagahata)

* Department of Oral and Maxillofacial Surgery
I, Okayama University Dental School (Chief:
Prof. Katsumi Nishijima)

** Department of Oral Anatomy, Kanagawa
Dental College (Chief: Prof. Kazuto Takaha-
shi)

受付日：平成6年1月20日

タンニン酸は電顕固定法の1つとして、1971年 Mizuhira ら^{1,2)}により導入され、特に microtubule や microfilament などの細胞内小器官、膜構造などを明瞭にするために有用な固定剤である。近年、前固定液としてグルタルアルデヒドと混合し用いることで、タンニン酸が生体膜、肺胞サーファクタントなどを構成するリン脂質のコリン基と反応し、その複合体にオスミウムが結合することで不溶性の沈澱物を形成し、従来の固定法では脱水操作の過程で溶出していたリン脂質を電顕的に可視化できることが報告されている^{3~9)}。

唾石症は、唾液腺疾患の中で比較的頻度の高い疾患であるが、唾石の成因形成機序については、諸説はあ

るものの不明な点も多い。唾石の有機成分では脂質類が比較的豊富に含まれていることは従来から知られており¹⁰⁻¹²⁾、またそれが石灰化に関与している可能性を示唆する報告もある¹¹⁻¹³⁾。しかしながら石灰化については、唾石自体が結晶体の集合であり細胞成分をほとんど含まないため、その機序や形態学的解析も困難であった。そこでわれわれは、手術材料より得られた唾石について石灰化超微構造を中心に観察し、特にタンニン酸グルタルアルデヒド混合前固定法により出現した 4~6 nm の一定の周期幅をもつ多層膜構造物に注目し、唾石の形成要因としてのリン脂質の役割について形態学的に若干の知見を得たので、この多層膜構造物と唾石の成因あるいは石灰化の関連性について考察を加え報告する。

材料および方法

観察材料は、観血的に摘出した導管内あるいは腺体内の顎下腺唾石計 6 個 (直径 1.5 mm~13×18 mm) を用いた。観察方法は、摘出後、一部をただちに可及的に細碎し、1.5%タンニン酸 (Sigma 社 N0. T-0125) を含む 2.5%グルタルアルデヒド 0.2 M カコジレート緩衝液 (4°C, pH=7.2, 以下は TA-GA 固定法と略す) とタンニン酸を含まない群 (GA 固定法と略す) に分け、浸漬前固定を行った。前固定後、両群ともさらに細切し 1% OsO₄ (4°C) で後固定を行った。通法にしたがいアルコール上昇列で十分時間をかけ脱水、酸化プロピレンで置換し、減圧下でエポキシ樹脂に包埋した。樹脂の浸透については実体顕微鏡と 0.5 μm の準超薄切片で確認しながらブロックのトリミングを行った。試料は非脱灰のままダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製し、酢酸ウラニル・鉛の二重染色を施し、日本電子 JEOL1200EX (加速電圧 80 kv) で観察した。

また一部の標本はリグラック (ポリエステル系樹脂包埋剤) に包埋し、EXAKT 社 BS-3000 を用い 200 μm に薄切、同社 MG-4000 で 30~40 μm の研磨標本を作製し、1%トルイジンブルー単染色を施し光顕観察を行った。

結 果

1. 光顕所見

研磨標本 (写真 1) では、唾石の中心に不規則な核様の構造が認められた。その周囲は明瞭な層状構造を呈しており、層構造の周期幅は一定でなく場所によって異なっていた。

唾石はその 70%ほどが無機質 (炭酸カルシウム、リン酸カルシウム) であり、未脱灰状態では、十分な脱水と減圧下での樹脂包埋を行っても唾石の全層、特に

写真 1 研磨標本

中心部に不規則な核様構造が認められる。その周囲には明瞭な層状構造を呈している (トルイジンブルー単染色, ×20)。

高石灰化層には十分な樹脂の浸透が得られなかったが、表層から 100~200 μm までの層では石灰化は高くなく、上述の方法で十分な樹脂の浸透が得られた。エポキシ包埋した 0.5 μm の厚切り切片標本 (写真 2) では、ごく表面にトルイジンブルーで淡染する 30~40 μm の有機物の層が認められ、導管の内皮細胞が脱離したと思われる細胞の残渣、白血球、リンパ球、組織球などがごく疎に観察された。その下層にはトルイジンブルーに濃染する層があり、そのなかには円形から楕円形のトルイジンブルーに淡染する構造物がみられた。さらにその下層ではその構造物はやや大きく、間質は疎でトルイジンブルーにやや濃染していた。

2. 電顕所見

表層の石灰化層では、石灰化は均一には生じず、石灰化の高い層と低い層が散在性に認められた。石灰化の比較的低い層では、小針状の石灰化結晶が濾胞状に観察された (写真 3 a)。索状に認められる部分では、針状結晶物が密になり、濾胞腔の内部では結晶構造は疎となり全体として篩状構造を呈していた。また針状の石灰化構造物をさらに拡大すると電子密度の高い緻密な石灰化結晶の間に電子密度が中等度の均質な物質が介在しているのが観察された (写真 3 b)。以上の所見は前固定液にタンニン酸を含まない群 (GA 群)、1.5%のタンニン酸を含む群 (TA-GA 群) の両群にも同様に観察された。

さらに拡大を上げて観察すると TA-GA 群には、石灰化針状結晶の周囲を明暗の一定の周期構造を有する多層膜構造物 (multilamellar body: 以下 MLB と略す) が観察された (写真 4 a)。MLB は石灰化針状結晶に連続して観察された (写真 5 a, b)。しかし GA 群においては MLB は認められなかった (写真 4 b)。TA-GA 群においてさらに MLB を拡大し、電子密度の異なる明暗の層状の周期幅の測定を行った。1~2

写真 2 0.5 μm エポン準超薄切片

ごく表層には細胞成分が散見される。内部は楕円状のトルイジンブルーに淡染する構造が観察される (トルイジンブルー単染色, $\times 100$)。

写真 3 a : 表層の石灰化層の TEM 像

針状結晶が緻密な索状部分と疎な部分からなる濾胞状を呈している (ウラン鉛二重染色, $\times 3,000$)。

b : 石灰化層の拡大像

電子密度の高い緻密な石灰化結晶の間に電子密度が中等度の均質な物質 (*) が介在している (ウラン鉛二重染色, $\times 25,000$)。

写真 4 a : TA-GA 群

石灰化結晶 (Cc) に連続して MLB が認められる (ウラン鉛二重染色, $\times 4,000$)。

b : GA 群

石灰化結晶間 (Cc) の周囲には MLB は認められない (ウラン鉛二重染色, $\times 40,000$)。

nm 程度のばらつきは認められたものの周期幅はほぼ一定しており 4~6 nm (平均 5 nm) であった (写真 6 a, b)。

考 察

リン脂質は、生体内では通常細胞膜の構成成分として存在し、細胞膜の代謝や機能のうえで重要な役割を果たしている。また生理的にそれを分泌 (dipalmityl lecithin : 肺胞サーファクタント) することで機能を果たす B (II) 型肺胞上皮細胞などが知られている^{3,5)}。リン脂質の構造は 1 分子中に親水基を含む極性部と疎水基を含む脂肪酸鎖からなる非極性部からなっている (図 1)。界面下においてこのような脂質は極性基対極性基、疎水基対疎水基が一列に並び規則的な周期配列を示す。TA-GA 固定法を用いることでコリン基を有するリン脂質に対し、コリン-タンニン酸複合体を作り、さらに後固定に OsO_4 を用いることで不溶性のコリン-タンニン酸- OsO_4 の沈澱物が形成される³⁻⁹⁾。こ

をかけて行った。つまりリン脂質類は今回の試料作製過程でかなりの量が溶出した可能性は否定できない。今回の観察でリン脂質類がすべて固定され不溶性の沈澱物として電顕的に可視化されたわけではなく、観察された MLB はごく一部ではないかとも考えられた。観察された MLB が出現する部位や状態にかなりばらつきがあったのはこのためであると考えている。したがって今後 MLB の出現頻度や出現部位、大きさなどを正確に観察するには現状の方法では難しく、新たな固定方法も考慮することが必要であると考えられた。

リン脂質と石灰化のメカニズムについては、生化学的には一般的な生体内の骨において Ca-Phospholipid- PO_4 複合体がその石灰化に関連していることが示唆されている¹⁷⁾。これは石灰化の初期段階で基質小胞の膜上でこの複合体が形成されることにより Ca イオンを捕捉し Hydroxyapatite crystal の形成が行われるというものである。唾石の石灰化についても、比較的豊富に含まれる脂質類のなかに Ca-Phospholipid- PO_4 複合体が存在しており、同様に石灰化に関与していることを示唆する報告¹²⁾もある。生化学的には、このリン脂質類が石灰化に何らかの役割を果たしている可能性は強く示唆されているが、形態学的な所見は全くなかった。しかし TA-GA 固定法を用いることでリン脂質類の可視化が可能となり、超微形態学的に石灰化針状結晶に連続する MLB を確認した。これは唾石の石灰化にリン脂質類が関与していることを形態学的に裏付ける所見と考えられた。つまり観察された MLB は、コリン基を有するリン脂質であることは明らかであり、また唾石内のリン脂質の分布についても中心部よりまだ十分に石灰化してない表層部に多いとされる¹¹⁾ことより唾石の初期石灰化の段階でリン脂質が重要な役割を演じていることは十分に考えられる。

唾石に含まれるリン脂質の由来については、分泌唾液や細菌の菌体膜のものではなく、唾液腺組織の細胞膜からのものであるとする意見^{12,14)}はあるがまだ詳細は不明である。今回の光顕的観察では、唾石の 30~40 μm のごく表層には導管の剝離細胞や白血球等の細胞成分が散見されたが、それらが石灰化に関与するすべてのリン脂質であるとは考え難い。この点については今後さらに研究、検討が必要である。

結 語

手術材料より得られた唾石について、その表層部の石灰化超微構造を中心に透過型電顕で観察を行い以下の結果を得た。

- 1) 唾石の石灰化は、超微形態的にも均一には生じず、石灰化の高い層と低い層が散在性に観察された。
- 2) 石灰化層の低い層では、石灰化構造は針状結晶が緻密な索状部分と疎な部分からなる濾胞状を呈して

いた。

3) 前固定液としてタンニン酸グルタルアルデヒド混合液を用いることで、多層膜構造物 (Multilamellar body : MLB) が観察された。

4) MLB は明暗の規則的な周期構造を呈し、その幅は 4~6 nm であった。

5) MLB は唾石に含まれるリン脂質であり、石灰化に強く関与していることが示唆された。

本論文の要旨は、第 39 回日本口腔科学会中国四国地方会 (平成 3 年 11 月 6 日、岡山) にて発表した。

引 用 文 献

- 1) Mizuhira, V. and Futaesaku, Y. : On the new approach of tannic acid and digitonine to the biological fixatives. *Proc Electron Microsc Soc Am* 29 : 494 1971.
- 2) Mizuhira, V. and Futaesaku, Y. : New fixation for biological membranes using tannic acids. *Acta Histochem Cytochem* 5 : 233-236 1972.
- 3) Kalina, M. and Pease, D. C. : The preservation of ultrastructure in saturated phosphatidyl cholines by tannic acid in model systems and type II pneumocytes. *J Cell Biol* 74 : 726-741 1977.
- 4) Kalina, M. and Pease, D. C. : The probably role of phosphatidyl cholines in the tannic acid enhancement of cytomembrane electron contrast. *J Cell Biol* 74 : 742-746 1977.
- 5) 上田太郎, 斎藤 潤, 他 : 肺表面被覆層に関する形態学的研究 (VIII) —Tannic acid 併用固定液によるリン脂質類・Surfactant への固定効果について—。日界面医誌 21 : 57-73 1990.
- 6) 高橋常男, 永井宏人, 他 : 骨形成細胞にみられる多層膜構造物の電顕的研究 (第 1 報) —グルタルアルデヒド・タンニン酸併用固定法の応用—。日界面医誌 21 : 36-45 1990.
- 7) 高橋常男, 中村社綱, 他 : 骨形成細胞にみられる多層膜構造物の電顕的研究 (第 2 報) —*in vitro* study—。日界面医誌 21 : 46-56 1990.
- 8) 高橋常男, 松尾光行, 他 : 骨形成細胞にみられる多層膜構造物の電顕的研究 (第 3 報) —多層膜 (ラメラ) 構造物の出現に関する各種化学的固定剤の影響—。日界面医誌 22 : 1-13 1991.
- 9) 高橋常男, 松井宏通, 他 : 骨形成細胞にみられる多層脈構造物の電顕的研究 (第 4 報) —多層膜 (ラメラ) 構造物の出現に関する固定時の pH の影響—。日界面医誌 22 : 14-28 1991.
- 10) Mandel, I. D. and Eisenstein, A. : Lipids in human salivary secretions and salivary calculus. *Arch Oral Biol* 14 : 231-233 1969.
- 11) Anneroth, G., Eneroth, C-M., et al. : The relation of lipids to the mineral components

- in salivary calculi. J Oral Pathol 6 : 373-381 1977.
- 12) Boskey, A. L., Boyan-Salyers, B. D., et al. : Lipid associated with mineralization of human submandibular gland sialoliths. Arch Oral Biol 2 : 779-785 1981.
- 13) Ennever, J., Vogel, J. J., et al. : Lipid and calculus matrix calcification *in vitro*. J Dent Res 52 : 1056-1059 1973.
- 14) Slomiany, B. L., Murty V. L. N., et al. : Lipid composition of the matrix of human submandibular salivary gland stones. Arch Oral Biol 27 : 673-677 1982.
- 15) 上田眞太郎, 河村宏一, 他 : 肺表面被覆層に関する形態学的研究 [VI] 一肺以外の部分 (胸膜腔, 血管腔, 胃腔) における肺 Surfactant 類似物質について (1). 日界面医誌 17 : 132-156 1986.
- 16) Yamashima. T., Yamashita, J., et al. : Pulmonary Surfahtant-like multilamellar bodies in human arachnoid villi. J Hirnforsch 31 : 795-802 1990.
- 17) Boskey, A. L. and Posner, A. S. : The role of synthetic and bone extracted Ca-Phospholipid- PO_4 complexes in hydroxyapatite formation. Calcif Tiss Res 23 : 251-258 1977.
-