



Title	皮膚および顎下唾液腺の実験的上皮性腫瘍の発癌過程における非特異性エステラーゼの変動に関する研究
Author(s)	吉村, 安郎
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/30091
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

(/)

皮膚および顎下唾液腺の実験的
上皮性腫瘍の発癌過程における
非特異性エスチラーゼの変動に
関する研究

吉村 安郎

Studies on the non-specific esterase

alterations during experimental carcinogenesis

of the skin and submaxillary salivary gland

Yasuro YOSHIMURA

表題脚注

大阪大学医学部口腔外科学第二教室
(主任 川勝賢作教授)

本論文の要旨は昭和43年9月に第
5回歯々癌シンポジウムにおいて
発表した。

序 言

腫瘍の非特異性エスチラーゼ(Non. SE)についての研究は、生化学的には1954年大橋等¹⁾による肝の発癌の研究以来、いくつかの肝癌系統の腫瘍についての報告がある。^{2), 3), 4)} これらは esterase の活性の低下などには変化を認めないとするものであつて、その esterase 活性の低下も癌性変化に直接依存してるものとは解釈されず、この方面の研究者の注目を引くことなく今日に至つてゐる。一方酵素組織化学的研究における腫瘍組織は正常組織に比較して活性の低下を認めるもの^{5), 6)} と相反した結果が得られてゐる。また本酵素の分布局在性についての検討でも腫瘍の分化度には関係しないとする報告もあるが⁷⁾ 一般に Non. SE は上皮性腫瘍組織の角化部などに角化に接する細胞群に強い活性が認められるので

、角化現象には何らかの点で関与してゐる可能性が示唆されてゐる。^{9), 10), 11)}

従来より esterase が isoenzyme より成立つてゐることは知られていたが、^{12), 13)} Non-SE は基質特異性が低いこと、¹⁴⁾ 又何種の multiple form の

esterase が各臓器に存在するかも明るかでなく
^{13), 14), 15), 16), 17), 18), 19)}

生理的、機能的意義は十分解明されてゐない。しかし最近に至り、他の isoenzyme

と同様に腫瘍における esterase zymogram pattern を癌性変化の示す指標として検討され立様となつた。

本実験は実験的上皮性腫瘍およびその発癌過程について、Non-SE 活性と isoenzyme pattern の変動を追求すると同時に、発生母組織が果る上皮性腫瘍の角化現象に関与すると考えるれる esterase の性格を明らかにするため、酵素組織化学および電気泳動の観点より観察した。

実験材料と方法

1 実験動物と発癌剤

実験材料としては ddO 系成熟雄性マウス(体重 20~30gr) を用い、皮膚および頸下唾液腺の発癌には 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) を使用した。

2. 実験的腫瘍

(1) 皮膚における実験腫瘍形成

0.5% の DMBA アセトン溶液を抜毛したマウス背部(約 1cm × 1cm 大の面積)に週2回の割合で塗布し、これを 8 週まで継ぎ、8 週以後は上皮癌が形成されることに目安とした。²¹⁾

病理組織学的には、乳頭腫は hyperkeratosis を伴う有棘細胞層の増殖と乳頭状の外側への増大を示し、基底細胞層は明確な境界をもって皮下結合組織と区別される。正常組織で認められた皮脂腺、毛囊は消失しており場所によって炎症性細胞侵潤が認められる。12 週以後に形成される皮膚の腫瘍は周囲からく隆

起し表面が凸凹不整で中心部が陥没した腫瘍である。組織像は腫瘍実質細胞の中心部に角化部なしし錯角化部を含んだ角化傾向の著しい類上皮癌であった。

(2) 頸下唾液腺における腫瘍形成

0.2mg DMBA カーボワックスペレットをエチル麻酔下で外科的に頸下唾液腺中に挿入した。14週以上を経過すると、頸下部に腫瘍を形成し始め、小指頭大以上の大きさに達したものと材料とした。頸下唾液腺に発生した腫瘍は上皮性腫瘍、非上皮性腫瘍、および両者が混在した Collision tumor であった。上皮性腫瘍は adenoid cystic, medullar, keratotic type に分類出来たが^{10) 22)} 本実験では、上皮性腫瘍を非角化型、角化型に大別した。実験対象とした腫瘍は、皮膚に発生したすべての角化型上皮性腫瘍、頸下唾液腺では非角化型、角化型の上皮性腫瘍である。1 ミリースの実験に要したマウスは皮膚腫瘍では 50匹、頸下腺腫瘍では 100匹であった。

2. 生化学的観察法

(1) 實驗材料

摘出された正常なし腫瘍組織を $0.25M$ 冷
蔗糖液中で洗滌し、附着血漿や壞死部を除去
した後秤量し、約5倍量の $0.25M$ 冷蔗糖液に
glass-homogenizerで homogenate を作成し、ガーセーで
濾過したものと initial sample とした。

(2) Non. SE の活性測定

Nachlas-Seligman の方法により Non. SE の活性値
を測定した。反応液は $1.8ml$ の $0.1M$ リン酸
緩衝液 ($pH 7.4$)、enzyme sample $0.5ml$ 、 N,N -dimethyl
formamide $1ml$ 中に $1mg$ の β -Naphthyl acetate 溶解
した溶液 $0.2ml$ 、蒸留水で溶解した $1mg$ の
Fast Red RR salt $0.5ml$ より成る。 $37^\circ C$ 30分間
反応させたのち、 $1ml$ の 40% 三塩化酢酸で反
応を停止させ、生成したアゾ色素を 15分後に
酢酸エチル $5ml$ で抽出し、 $3000g$ 10分間遠沈
した上清 $3ml$ を日立自動分光光度計 (EPS-3T)
にて $520 m\mu$ における吸光度で測定した。

(3) 蛋白量の測定

蛋白量は Folin-Ciocalteu ²⁴⁾ に従って測定した。
standard solution には bovine serum albumin を使用した。Non. SE の比活性値は μ moles liberation of β -Naphthol/mg protein/hr. で示した。

(4) 細胞分画法

正常なラビット皮膚腫瘍組織については Hogeboom の方法 ²⁵⁾、頸下唾液腺の材料では石田等 ²⁶⁾ の方法に従い、各分画に分りそれぞれの Non. SE 活性と蛋白量を測定した。

3. Zymogram 的観察法

(1) 電気泳動法

皮膚などに頸下唾液腺より摘出した組織を湿重量の3倍量の0.2% Cetyl trimethyl ammonium bromide(CTAB) で homogenize し、この homogenate を 9000 g 30 分間遠沈し、その上清部 0.004 ml を泳動用材料とした。電気泳動は polyacrylamide gel を支持体とする荻田の方法 ²⁷⁾ に従って調節した。泳動条件は 4~10°C の恒温槽内で $1mA/cm^2$ で通電し、bromphenol blue の泳動先端が約 4 cm 原点より離れるまで泳動させた。これに

要する時間は約40~45分であった。

(2) Non. SE の染色法

Burstone ^等 の同時アゾ色素発色法を用いた。

すなわち泳動後の polyacrylamide gel plate に、し

strips を次の処方による反応液にて37°Cで、

α -naphthyl acetate が基質の場合は45分

間、Naphthol AS-D acetate を基質とした場合は60

分間反応させた。反応液は 0.2% N,N-dimethyl

formamide 溶液とした α -naphthyl acetate;

Naphthol AS-D acetate の 1/100 の基質液 1ml

、0.1M の磷酸緩衝液 (pH 7.4) 30ml, 30mg の

Fast Red RR salt の 3 者より成り立っていた。

(3) Densitometry による %活性の測定

Joyce double-beam microdensitometry (Model MK III. CS serial

No. 952) を使用した。Densitometry のための

Zymogram は α -Naphthyl acetate を基質として、反応

を 25 分間で停止させた。Densitometry は 1 は 2 種

の Wedge すなわち Wedge Number B 823 (slope 0.85A/cm,

useful range 1.53A), B 603 (slope 0.13A/cm, useful range 2.34A)

を用い、arm length ratio は 5.0 であった。

(4) Eserine, Diisopropylfluorophosphonate (DFP) による阻害実験

Eserine (10^{-3} M~ 10^{-7} M) および DFP (5×10^{-4} M~ 5×10^{-8} M) の溶液中に泳動後の polyacrylamide gel strips を 20 °C で 15 分間浸漬したのを、脱イオン水で洗浄し、反応液と反応させた。对照 strips は基質を含まない緩衝液に同時にだけ侵漬させた。

(19)

3. 組織化学的観察法

実験材料を -20°C のクリオスタート内で 16~18 μ の凍結切片を作成し、室温で乾燥し、一部の切片は未固定のまゝ他の一部のものはアセトン固定した。Zymogram 的観察と同一組成の反応液で、同一時間反応させ Non. SE の証明を行った。

実験結果

1. Non. SE の生化学的所見

(1) Non. SE の 比活性

1) Non. SE の 比活性

a) 皮膚および乳頭腫, 上皮癌: 正常皮膚組織および乳頭腫, 上皮癌それぞれ 10 例, 7 例, 6 例において比活性は 2.49 ± 0.671 , 2.88 ± 0.854 , $3.91 \pm 0.732 \mu\text{moles of } \beta\text{-Naphthol liberation/mg protein/hr.}$ であり, 腫瘍化が進行するにつれて活性の増強が認められる (Fig. 1)

b) 正常顎下唾液腺および顎下唾液腺上皮性腫瘍: 正常組織 10 例, 上皮性腫瘍 6 例において 1.56 ± 0.483 , $2.82 \pm 0.428 \mu\text{moles of } \beta\text{-Naphthol liberation/mg protein/hr.}$ なる活性値を示す。すなわち顎下腺の上皮性腫瘍は平均値で正常組織に比べ 1.8 倍の活性を示す (Fig. 2)。

2) Non. SE の 細胞内分布

a) 正常皮膚および上皮癌: 正常皮膚, 上皮癌ともに $105000g$, 30 分 分画 (Fraction III) に最高の活性が認められる。正常組織と癌組織の比較をすると, 癌組織において Fraction II supernatant にも比活性の増加が認められるが,

Fraction III にその増加率は高い (Table I)

b) 正常顎下唾液腺および顎下腺上皮性腫瘍：両組織における比活性は Fraction III = 最大値が認められ、特に腫瘍において Fraction III に比活性が他の Fraction II, supernatant に比べて一層増強している (Table II)

2. Non. SE Zymogram 所見

(1) Non. SE zymogram の対照実験と分類基準

基質

対照実験のため基質と diazonium 塩を除いた場合を比較検討した。Fast Red RR salt を除くと polyacrylamide gel は無色透明である。基質を除くと活性帯は認められず、Zymogram 上示される Band はすべて酵素反応によるものである (Fig. 7)。

pH(5.5~8.8) 変動による esterase

の活性パターンは著しい変化は認められない。また α -, β -Naphthyl acetate, Naphthol AS-D acetate。

の基質差による Zymogram pattern の変化はほとんど認められない。Non SE を電気泳動度の大さきより、A-esterase, B-esterase, C-esterase

と便宜上分類しておく¹⁹⁾(Fig. 8)

(2) 正常皮膚および乳頭腫, 上皮癌

正常皮膚の Non. SE は規則正しい A-, B-, C- esterase に分類され, A-esterase 群はさほど陽極側の活性の高い A-I esterase と A-II esterase とに分かれ。A-I esterase の陽極側に細い活性帯を認めることもある。正常皮膚の Zymogram には Variation があり, A-II esterase の活性が弱く Zymogram でわざかに認められる場合もある。B-esterase は 3 群の esterase 中, 一番活性が弱く, 2 の subband より成立している。C-esterase はやや幅の広い活性帯と細いの 2 の subgroup より構成されている。各 esterase の % 活性比率を観察すると A->C->B- esterase である。正常皮膚より乳頭腫, 上皮癌と発癌過程が進行するに従って, A-esterase の活性が増強し, B-, C-esterase は活性が低下する。そのため Zymogram pattern はあたかも活性の増強を伴ひながら A-esterase の方へ集合した傾向を示す様になる (Fig. 3, 9)

(3) 正常顎下唾液腺および顎下唾液腺

上皮性腫瘍

Non-SE は A-, B-, C-esterase 群に分類である。

一般に A-esterase は A-I esterase が主体で
 し、A-II esterase は活性が弱い。B-esterase
 は diffuse の幅の広い band を示す。C-esterase
 は細い band とこれより原点側の幅のやや広
 い band より成立している。活性度から
 観察すれば C->B->A-esterase である (Fig. 12)

顎下唾液腺上皮性腫瘍の zymogram pattern は皮膚
 の上皮性腫瘍と同様に A-esterase の方向へ集
 合した pattern を示し、3種類の pattern に分類
 である。すなわち (a) A-I esterase のみが活性の
 増加を認めるもの、(b) A-I, A-II esterase とともに
 活性の増加したもの、(c) A-I esterase の活性は
 弱く、A-II esterase の活性が著しく高いもの、
 の3種である (Fig. 13, 14)。唾液腺より発生
 した上皮性腫瘍を非角化型、角化型のものと
 つりて、代表的な症例を各 esterase の % 活性
 を比較観察すると、いつも Non-SE の全活性

のうち A-esterase の占める割合は著しく増大している (Fig. 4)

(4) Eserine DFP の阻害実験による所見

1) Eserine

A-I esterase は eserine の $10^{-4}M$ でほとんど阻害を受けない。A-II esterase は同一濃度で著しい阻害を受けるが、 $10^{-5}M$ では著しい阻害を受ける。B-esterase は $10^{-3}M$ では阻害を受けるが $10^{-4}M$ では阻害は著しくない。C-esterase は $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ で阻害を受ける (Fig. 10)

2) DFP

A-I esterase は $5 \times 10^{-4}M$ でほとんど阻害を受けない。A-II esterase は $5 \times 10^{-5}M$ におけるものの阻害は著明である。B-esterase は元来活性は弱いけれども、 $5 \times 10^{-6}M$ においても対照に比較して活性の低下が認められる。C-esterase は $5 \times 10^{-5}M$ の濃度では阻害を受けている。しかし $5 \times 10^{-6}M$ では阻害は著明でない (Fig. 11)

Eserine, DFP に対する阻害実験より A-I esterase

は arylesterase, A-II esterase は Cholinesterase, おそらく pseudocholinesterase であろうと推測され,

B-esterase は Aliesterase, C-esterase は Cholinesterase

であろうと考えられる。 (3).29)

3. Non SE の組織化学的所見

(1) 正常皮膚および乳頭腫, 上皮癌
正常皮膚の数層の表皮細胞には強々活性が認められる。皮膚附属器官である皮脂腺, 毛囊には表皮と同等なし, それ以上に強々活性が認められる。皮下結合組織維に時々中等度以上の陽性反応が認められる (Fig. 15A)。

基質が α , β -Naphthyl acetate, Naphthol AS-D acetate の場合も Non SE の局在性には差異は認められまい。しかし上皮性腫瘍においては基質特異性パターンが認められる。すなわち α -naphthyl acetate では角化部を除き, 腫瘍細胞にはほぼ均等に強々陽性反応を示すから “周辺部活性パターン” (Fig. 15B, C) であるが, Naphthol AS-D acetate では腫瘍実質細胞の中心部の角化部なしし角化してある細胞群に強々活性を示すから “中心部活性パターン” であり, 正常組織の基底細胞や棘細胞には

相当する周辺部位は弱い活性から中等度の反応が認められる (Fig. 16A, B)

(2) 正常顎下唾液腺および顎下唾液腺上皮性腫瘍

α -ナフチル β -Naphthyl acetate を基質とした場合には、腺上皮細胞、導管上皮細胞に強い活性が認められる (Fig. 17A)。Naphthol AS-D acetate では導管上皮細胞には強度陽性反応を認められても腺上皮細胞には弱い活性が認められる (Fig. 17B)。非角化型上皮性腫瘍では α -、 β -Naphthyl acetate、Naphthol AS-D acetate の基質によつても腫瘍実質細胞に中等度染出し、強度の陽性反応を示す。囊胞状内腔における扁平な細胞にも弱な染出中等度の活性が認められる (Fig. 18A)。角化型上皮性腫瘍では基質特異性のパターンが認められる。すなわち α -ナフチル β -Naphthyl acetate では腫瘍実質細胞にはほぼ均等に高い染色性を示していふ。角化部自体にはせめて弱陽性反応を示すにとどまり。Naphthol AS-D acetate を基質とした場合には

“中心部活性パターンを示す(Fig 18 B,C)。

考 察

Non-SEの分類は現在なお統一されていないが電気泳動法を基礎とした Augustinsson^[3] の分類かしづかに用いられている。分類の基本とはていうものは哺乳動物血漿の Non-SE を蛋白泳動位置より観察し、泳動度の大モル Albumin 相当位の Arylesterase, α -globulin 位置の aliesterase α - β globulin 位置の Cholinesterase の 3種類に分類し、相対的な基質特異性, eserine, Organophosphate 等に対する阻害や、種々の賦活剤に対する態度より総括したものである。本実験はこの分類を基本としたが必ずしも泳動位置と阻害剤に対する態度は一致しなかった。一般に Non-SE が multiple form で存在することを利用して、臟器特異的、種属特異的パターンが追究された。^{[7] [8] [9]}しかし本酵素の生理的意義は

acetylcholinesterase が神経組織において transmitter との関係において取扱えられた以外には、今だ十分明瞭とはなっていはず。神経組織以外の臓器では、特に肝では pseudocholinesterase は解毒作用に関与しているとする報告もあり³⁰⁾、esterase には次の様な機能を有する可能性が検討されている。(1) 細胞内での物質の運搬作用³¹⁾、(2) 皮膚の皮脂腺³²⁾、脂肪組織における脂質代謝への関与^{33) 34)}、(3) 腸管における脂肪の分解、運搬^{35) 36)}、(4) 蛋白分解酵素様作用³⁷⁾、(5) 卵巣におけるステロイド形成への関与³⁸⁾、(6) 皮膚におけるメラニン形成への関与などである。今後も工学上深く追求されるだろう。

1. 上皮性腫瘍における A-esterase 活性の増大と B-, C- esterase 活性低下

腫瘍組織は脱分化(正常分化パターンを示し、細胞増殖は盛んとなり正常組織本来の分化にあづかる機能が低下、はりし消失する傾向にあるとする考え方)は広く認められた事

実である。腫瘍性変化と平行して Non-SE の活性の低下を認めた研究では、esterase は分化にあづかる酵素であって、癌化により細胞増殖系の酵素の活性が増加し、機能分化に関与した esterase の如き酵素は活性の低下を来たしたものであると考察している。³⁾ Esterase zymogram の観察において種々の正常臓器では臓器特異性のパターンを示すが、腫瘍では Non-SE pattern は単純なしかも活性の弱い方向へ移行するとか報告されている。²⁰⁾しかしどの様な単純なパターンにはかく具体的に示さず Greenstein の法則で示された様に“腫瘍組織は発生部位のいかんにかかわらず単純な類似したパターンを示す”と結論している。本実験はこれらの実験をさらに一步前進させ、Non-SE が癌過程上おいて、癌化とともに活性の低下を伴う group の esterase と活性の増強を伴う group の esterase の両者を有しながら単純なパターンに移行していくことを明示化したのである。可及的易動度の高い A-esterase の活性

増強と、B-, C-esterase¹⁾ の活性低下を伴うのが
から集合した。本実験において示された腫瘍組織の A-I esterase 活性増加は、Myers の報告⁴¹⁾
の様に癌細胞の亢進した蛋白代謝亢進⁴²⁾ esterase 活性の増加が関係しているものではなかと推測もできる。またマウス顎下唾液腺より抽出した上皮性細胞増殖促進作用のある蛋白質が esterase 活性を有していたことが明らかにされており⁴³⁾。上皮性腫瘍のみでなく白血病でも fast moving band の活性が増加したとの報告⁴⁴⁾もあるが、いかなる esterase であるか明るかでない。マウス皮膚の発育段階で検討された様に A-I esterase は個体発生上ます最初に形成される esterase であること、主要マウス臓器には必ず存在していることから今までの esterase 中一番基本的な esterase であることが推測され⁴⁵⁾、細胞の新生増殖に関係あることが示唆されるのである。同時に腫瘍における A-I esterase の活性が増加し、他の B-, C-esterase の活性が低下していった事実は、あたかも発生初期の

パターンは類似して、癌における未分化ペ
ターンを isoenzymal state より示し得ることは興
味深い。

2. Non SE の細胞内分布

Non SE は一般に細胞内の organelle の desmo-
esterase と上清部の lyo-esterase が存在する
されてい。その desmo-esterase の存在部位に
acid phosphatase, β -glucuronidase と並んで lysosome と
されてい。³¹⁾ 生化学的細胞分画法では lysosome
が light mitochondrial fraction に位置するこ
とが $105000g$ 分画の microsomal fraction に活性が高
^{46) 47)} い。本実験においても正常組織、癌組織ヒ
モに microsomal 分画に比活性が高い。正常組
織に比較して腫瘍組織で増加してい。Non SE
は lysosome に存在してい。か mitochondria
と考えられる Fraction II や supernatant に
もわずかであるが活性は増加してい。最近
の電子顕微鏡的観察では、核膜、ミトコン
ドリア膜、リゾソーム、上清部に esterase が広
く存在することが証明されている。⁴⁸⁾しかし

これら membraneous, non-membraneous esterase がはたして何處へどのグループの A-, B-, C-esterase が一組とは、各分画に存在するのか、それとも機能的意味を反映して特定の esterase が局在するか否かは今後の興味ある問題である。

3. 酵素組織化學と Zymogram pattern の関連性

(1) 皮膚の Non-SE 上にについて

正常皮膚組織において Non-SE 活性を示す組織は皮膚の上皮性細胞と皮脂腺、毛囊等の皮膚附屬器官であり、皮膚より発生した乳頭腫や上皮癌においては附屬器官は消失し、腫瘍組織における主なる組織構成要素は腫瘍細胞と間質である。腫瘍における Non-SE 活性の主体は腫瘍実質細胞であることが、Zymogram で証明されてゐる A-esterase は腫瘍実質細胞由来すると推論され、発癌過程で各 esterase の泳動位置には変化がないので、正常表皮にはやはり A-esterase が主体となつることも推定される。

(2) 腹下唾液腺の Non-SE 上について

顎下唾液腺における上皮性腫瘍の非角化型
、角化型ハグレのタイプにおけるても Non SE は
腫瘍実質細胞に陽性反応を示したが、角化型
上皮性腫瘍では、Naphthol AS-D acetate を基質と
(左場合非角化型腫瘍に比較して活性は高く
、特に角化部と非角化部に接する部位では著し
い活性の増強が認められ、又同時にこの様な
腫瘍では Zymogram 上 A-II esterase の活性が増強
していることより、A-II esterase 活性の増減が
腫瘍における角化現象に関与していることを
推定しこれに関する既に別紙に報告した。⁴⁵⁾
しかし発生母組織がもともと扁平上皮である皮膚より発生した顎上皮癌と顎下唾液腺の
導管上皮細胞の扁平上皮化生を経て、その後
化生上皮細胞の癌性変化により生じたと考えら
れてある角化型上皮性腫瘍^{10), 49)} について A-I,
A-II esterase の活性% 比率を比較検討すると、
皮膚の発癌過程における A-I, A-II esterase の活
性比率に著しい変化は認められないが、顎下
唾液腺上皮性腫瘍では腫瘍組織の角化の程度

ト呼応して A-I/A-II 比率が決定され、角化傾向の強いものほど A-I/A-II 比率は小となり値を示すと考えられる (Fig. 6)。

皮膚および顎下唾液腺角化型上皮性腫瘍のこれらの組織においても組織化学的には基質差によるパターンが認められたにもかかわらず、Zymogram ではほぼ同様な所見を得たことは腫瘍細胞個々について観察すれば、その腫瘍が分化型であれば、その細胞の環境域、あるいは細胞自体の分化に対する potentialityによって細胞代謝が Non-SE 1 つたりあげても相違して、3 つとを組織化学的に示し得たのであって、生化学的にはいわゆる "mush chemistry" では取扱えられず、所見であり、今後ますます生化学的研究法と組織化学的研究法の両者から検討すること下重要な事柄となるだろと思われる。

総括するに結論

実験的上皮膚および顎下唾液腺に上皮性腫瘍を形成した、その発癌過程および上皮性腫瘍における Non-SE の変動と生化学、Zymogram、組織化学の立場より追求し次の結果を得た。

1) 生化学的所見では非特異性エステラーゼの活性は発癌とともに増加し、その増加を示す esterase は主に細胞内の microsome 分画に存在した。

2) zymogram 的所見では非特異性エステラーゼも電気泳動度の大キモのより A-, B-, C-esterase と分類したところ、上皮性腫瘍組織において易動度の高い A-esterase の活性が高まり、相対的に B-, C-esterase の活性が低下した。そのため発癌における非特異性エステラーゼパターンはあたかも A-esterase の活性の増強巨伴ながら集合するパターンを示すことを明かとした。

発癌過程における活性の増加する A-esterase はさうに泳動度の大キモ A-I esterase とより小さく、A-II esterase を分類したと

こう、A-I esterase は eserine, DFP には阻害され
ない arylesterase, A-II esterase は両者に感受性有
ある pseudocholinesterase であると推測された。

3) 組織化学と Zymogram の総合所見より 頸下唾
液腺上皮性腫瘍を非角化型のものと角化型の
ものに大別すると、A-I esterase の活性パター
ンを示したものは非角化型上皮性腫瘍、A-II
esterase 活性パターンは角化型上皮性腫瘍であ
ると考えられる。

稿を終えうにあたり、終始ご指導、ご鞭撻
を賜り、左川勝賛作教授、森昌彦助教授、谷
岡博昭博士、はじめにご助言、ご校閲を戴い
た口腔病理学教室、寺崎太郎教授、生化学教
室、竹田義郎教授に衷心より謝意を表します
。あわせてこゝ研究に対する種々ご協力下さ
た教員諸氏に感謝します。

文献

- 1) Ohasi, M., Mori, K., Ichii, S. (1954): Phosphatase and esterase of serum and liver of fed hepatic carcinogens. Gann. 45, 33-39.
- 2) Reid, E. (1962): Significant biochemical effects of hepatocarcinogenesis in the rat: A review Cancer Res., 22, 398-430.
- 3) 大塚陽一郎 (1969): 癌細胞の性状変化に関する研究—腹水肝癌 AH-13 の組織培養とその培養細胞の生物学的ならびに酵素組織化学的性状について— 獣本医学会雑誌 43(4) 297-311 昭和44年
- 4) Kalant, H., Murray, R.K., and Wilhelmina Mons (1964): Effect of EDTA on leakage of protein from slices of normal rat liver and DAB-induced hepatoma. Cancer Res., 24, 570-581.
- 5) Oka, R. (1969): Cytology and histochemistry of oral carcinoma. Cytology and enzyme histochemistry of squamous carcinoma of the hamster cheek pouch and human oral mucosa, Gann, 60, 631-648.

- 6) Kawakatsu, K. and Mori, M. (1963): Histochemical evaluation of enzymatic activities in human squamous-cell cancer. *Cancer Res.*, 23, 537-545.
- 7) 森昌彦, 森下正明, 吉村安郎, 吉田喜人, 伊藤洋平 (1967):
ショーフ乳頭腫の酵素組織化学的研究.
日本癌学会総会記事 26 P151 昭和42年
- 8) Monis, B. and Weinberg, T. (1961): Cytochemical study of esterase activity of human neoplasms and stromal macrophages. *Cancer*, 14, 369-377.
- 9) Cohen, R.B., Nachlas, M.M., and Seligman, A.M. (1951):
Histochemical demonstration of esterase in malignant tumors. *Cancer Res.* 4, 707-711.
- 10) Matsumura, T. (1966): Enzyme histochemistry of experimentally induced tumors in the mouse submaxillary and sublingual glands during carcinogenesis. *Gann* 57, 251-263.
- 11) Suzuki, T. (1966): Histochemical studies on enzymes in lung tumors. II. Enzymatic activities in mouse and rat lung tumors induced by 4-Nitro-quinoline 1-Oxide. *Gann* 57, 169-184.

- 12) Hunter, R.L. and Markert, C.L. (1957): Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125, 1294-1295.
- 13) Augustinsson, K-B. (1961): Multiple forms of esterase in vertebrate blood plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 94, 844-860.
- 14) Augustinsson, K-B. (1964): Arylesterase. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 744-747.
- 15) Holmes, R.S. and Masters, C.J. (1967): The developmental multiplicity and isoenzyme status of cavian esterases. *Biochim biophys Acta (amst)* 132, 379-399.
- 16) Holmes, R.S. and Masters, C.J. (1968): A comparative study of the multiplicity of mammalian esterases. *Biochim biophys acta (amst)* 151, 147-158.
- 17) Markert, C.L. and Hunter, R.L. (1959): The distribution of esterases in mouse tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 7, 42-49.
- 18) Paul, J. and Fattrell, P. (1961a): Tissue-specific and species specific esterases. *Biochem. J.* 78, 418-424.

- 19) Yosimura, Y., Morishita, M., Mori, M. and Kawakatsu, K.
 (1969): Zymograms and histochemistry of non specific esterase in the salivary glands. Histochemie, 18, 302-313.
- 20) Kreusser, E.H. (1966): Non specific esterase in normal and neoplastic tissues of the syrian hamster. Zymogram study. Cancer Res., 26, 2181-2185.
- 21) Oka, R., Okamoto, Y., Go, J., and Nagasuna, H. (1961): Histochemical distributions of alkaline and acid phosphatases, esterase, β -glucuronidase and protein-bound sulphydryl groups in experimental carcinogenesis of the mouse skin. Gann. 52, 305-312.
- 22) 坂本忠幸(1967)：実験腫瘍に対するX線照射の影響に関する研究。日本癌誌 12, 35-50 昭和42年
- 23) Nachlas, M.M. and Seligman, A.M.: Evidence for the specificity of esterase and lipase by the use of three chromogenic substrates. J. Biol. chem. 181, 343-355.
- 24) Sidney, P.C. and Kaplan, N.O.: Methods in enzymology III. 448-450. Academic press Inc. Publishers New York.

- 25) Hogeboom, G.H. (1955): Fractionation of cell components of animal tissues. Method in Enzymology I. 16-18. Academic press Inc. publishers New York.
- 26) 石田雨、溝口幸二、藤田訓也 (1966): 口唾液腺細胞内顆粒に関する研究 日葉理誌 62, 207-212, 昭和41年
- 27) 萩田善一 (1965): ホリアフリルアミドによる電気泳動法Ⅰ 代謝 2, 331-344 昭和40年
- 28) Burstone, M.S. (1967): Enzyme histochemistry and application in the study of neoplasms. J. Nat. Cancer Inst. 21, 523-532.
- 29) Pearse, A.G.E. (1961): Histochemistry, theoretical and applied. London, P. 485. J. & A Churchill Ltd.
- 30) Clithero, J.W., Mitchard, M. and Harper, N.J. (1963): The possible biological function of pseudocholinesterase. Nature, 199, 1000-1001.
- 31) Moul'e, Y. (1964): Endoplasmic reticulum and microsomes of rat liver in cellular membranes in development edited by M. Locke, New York academic press. 97-133, 1964
- 32) Ballantyne, B. and Bunch, G.A. (1967): Esterase histochemistry of sebaceous gland. Dermatologic, 134, 51-59.

- 33) Lorincz, A.L. and Stonghton, R.B. (1958): Specific metabolic process of skin. *Physiol. Rev.* 38, 481-502.
- 34) Ballantyne, B. (1968): Histochemical and biochemical aspects of cholinesterase activity of adipose tissue. *Arch. int. pharmacodyn.* 173, 343-350.
- 35) Bell, M. and Barrnett, R.J. (1965): The use of thiol-substituted carboxylic acids as histochemical substrates. *J. Histochem. Cytochem.* 13, 611-628.
- 36) 今宿普作 (1968) : 血清および臓器コレステラーゼ (第2編)
日本小児科学会雑誌 72, 1097-1104 昭和43年
- 37) Hopsu, V.K. and Glenner, G.G. (1964): Enzymes hydrolysing acetyl naphthylamides. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 36-37.
- 38) Koudstaal, J., Bossenbroe, K.B. and Hardonk, M.J. (1968): Ovarian tumors investigated by histochemical and enzyme histochemical methods. *Am. J. Obst. and Gynec.* 102, 1004-1017.
- 39) Mishima, Y. (1965): Macromolecular changes in pigmentary disorders. *Arch. Derm.* 91, 519-557.

- 40) Greenstein, J.P. (1953): Biochemistry of Cancer. Ed. 2, 327-413 New York Academic press.
- 41) Myers, D.K. (1960): The enzymes. p. 475, 2nd ed. vol. 4 Academic press inc. New York.
- 42) Cohens, S. (1962): Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid openings in the new-born animal. J. Biol. Chem. 237, 1555-1562
- 43) Attaoli, D.G., Schlessinger, M.J. and Schlesinger, S. (1967) Submaxillary gland of mouse: Properties of a purified protein affecting muscle tissue in vitro. Science 156, 1253-1255, 1967.
- 44) Klein, U.E., Löfler, H. und Leuckfeld, F. (1966): Electrophoretische trennung Von Milchsäure dehydrogenase isoenzyme, unspezifischen Esterasen und alkalischen phosphatasen aus menschlichen Blutzellen Klin. Wschr. 44, 637-640.
- 45) Yosimura, Y., Kawano, T., and Mori, M: Non specific esterase zymogram and histochemistry in keratinization of tumors. Histochemie (in press)

46) Underhay, E., Holt, S., Beaufay, H. and deDuve, C. (1956) :

Intracellular localization of esterase in rat liver.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 635-637.

47) Bernshon, J., Barron, K.D., Doolin, P.E., Hess, A.R.,

Hendrick, M.T. (1966) : Subcellular localization of

rat brain esterases. J. Histochem. Cytochem. 14,

455-472.

48) Kawashima, T. (1968) : A cytochemical method for indoxyl

acetate esterase. Ann. Histochem. Cytochem. 1, 147-153.

49) 森昌彦 (1967) : 上皮癌発生過程の酵素組織化学的

研究 抗酸菌病研究雑誌 19 58-64 昭和42年

Table I. 皮膚 正常組織と上皮癌における
Non. SEの細胞内分布

Fraction	Centrifugal Force(g) and duration(min)	Specific activity	normal skin	epidermoid carcinoma
Whole homogenate			2.64	3.68
1	700 g, (10)	2.19	1.46	
2	15000 g, (20)	3.18	3.88	
3	105000 g, (30)	4.96	6.49	
Supematant		2.41		3.28

Specific activity: μ moles of β -Naphthol liberation per mg protein, 1h, 37°C

Table II 頸下唾液腺 正常組織と上皮性腫瘍
における Non. SEの細胞内分布

Fraction	Centrifugal Force(g) and duration(min)	Specific activity	normal submaxillary gland	epidermoid tumor
Whole homogenate		1.58	2.15	
1	550 g, (10)	1.50	1.42	
2	16000 g, (20)	2.74	2.76	
3	105000 g, (30)	3.60	6.18	
Supematant		0.95		1.52

Specific activity: μ moles of β -Naphthol liberation/mg protein, 1h, 37°C

Fig. 1 正常皮膚, 乳頭腫, 上皮癌における Non. SE の
比活性
N: 正常皮膚; P: 乳頭腫; Ca: 上皮癌
リストグラム中の数字は症例数

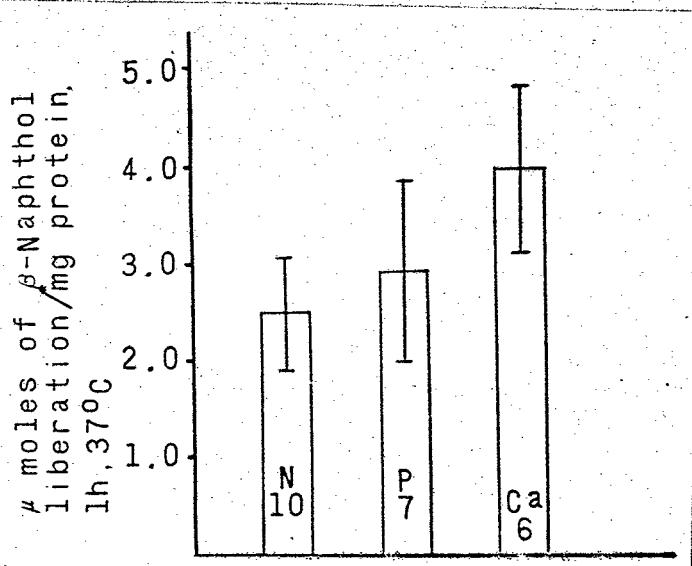


Fig. 2. 正常顎下唾液腺, 唾液腺上皮性腫瘍における
Non. SE の比活性
N: 正常顎下唾液腺, Ca: 口唾液腺上皮性腫瘍
リストグラム中の数字は症例数

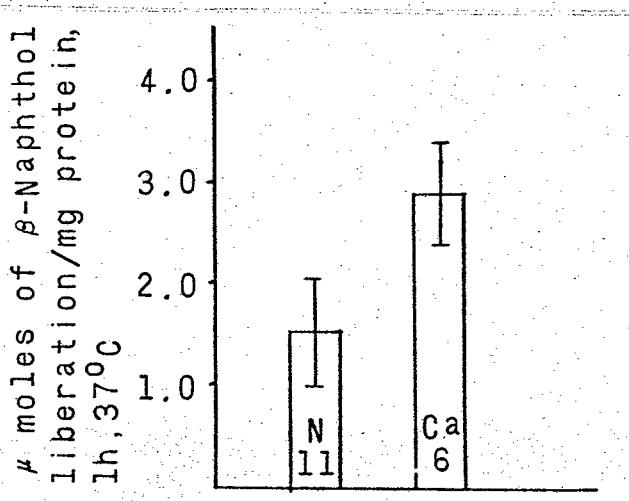


Fig.3 正常皮膚、乳頭腫、上皮癌における各A-, B-, C- esteraseの構成比率

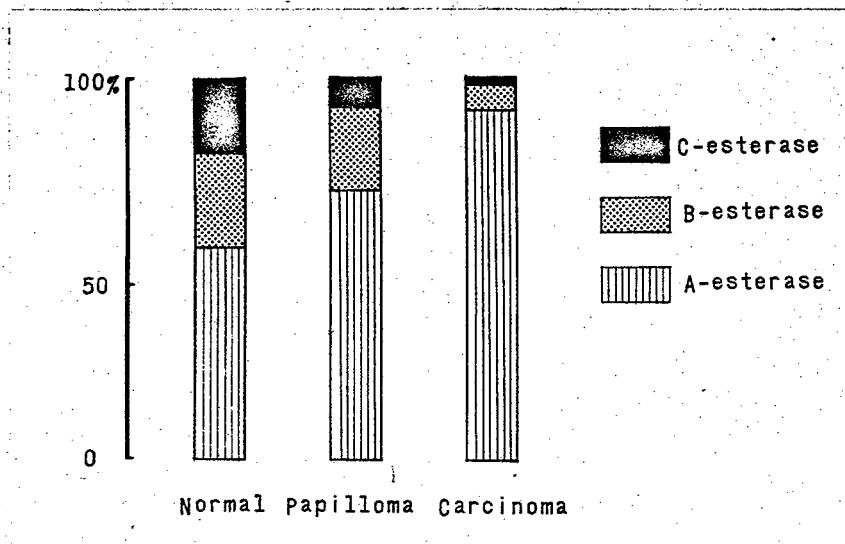


Fig.4 下顎口唾液腺の正常組織、非角化型上皮性腫瘍、
角化型上皮性腫瘍における各A-, B-, C- esteraseの構成比率

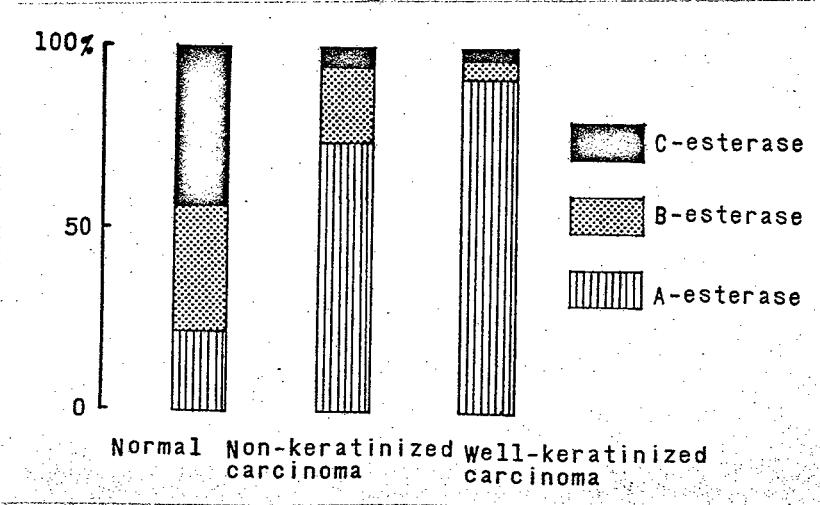


Fig. 5 正常皮膚, 乳頭腫, 上皮癌における各 A-, B-, C- esterase の構成比率

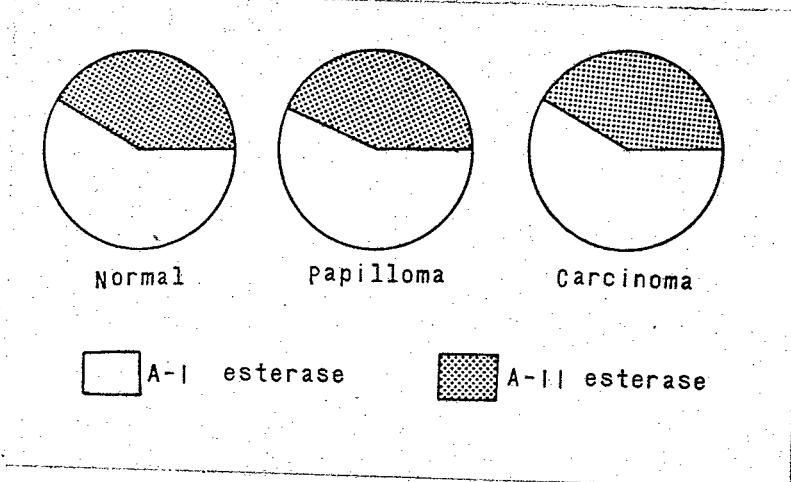
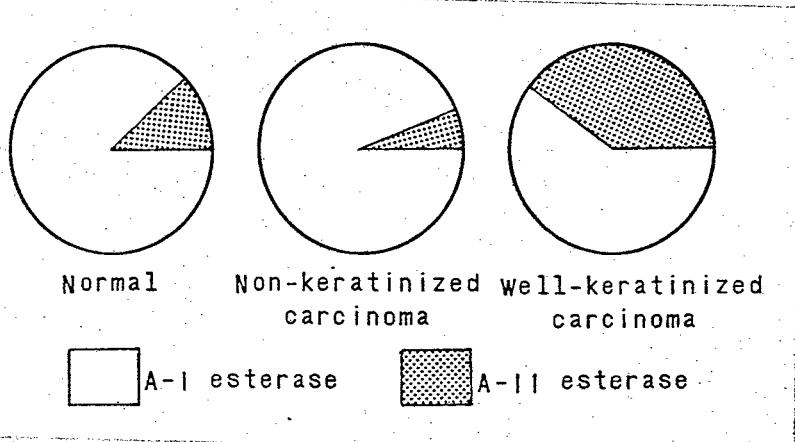


Fig. 6 下顎唾液腺, 正常組織, 非角化型上皮性腫瘍, 角化型上皮性腫瘍における各 A-, B-, C- esterase の構成比率



図表説明立

Fig. 7 対照実験。マウス正常皮膚の

Non. SE Zymogram pattern

1. 基質を含むもの

2. 基質を含まないもの。

(基質 : α -Naphthyl acetate)

Fig. 8 pH変動による Zymogram pattern

(基質 : α -Naphthyl acetate)

Fig. 9 皮膚発癌過程における

Zymogram pattern の変動

(基質 : α -Naphthyl acetate)

Fig. 10 Eserine の Non. SE Iに対する阻害態

度 (基質 : α -Naphthyl acetate)

Fig. 11

DFP の Non. SE に対する阻害態度
(基質: α -Naphthyl acetate)

Fig. 12

正常唾液腺の Zymogram と Densitometry
(基質: α -Naphthyl acetate)

Fig. 13

下顎唾液腺の正常組織と上皮性腫瘍の Non. SE zymogram pattern

N: 正常顎下唾液腺

1~7: 上皮性腫瘍

(基質: Naphthol AS-D acetate)

Fig. 14

下顎唾液腺上皮性腫瘍の
Non. SE zymogram pattern の諸型

(基質: β -Naphthyl acetate)

Fig. 15

皮膚発癌過程における Non. SE の酵素組織像

A: 正常皮膚, B: 乳頭腫, C: 上皮癌

(基質: β -Naphthyl acetate)

Fig. 16

皮膚乳頭腫および上皮癌における Non-SE の分布

A: 乳頭腫, B: 上皮癌 ($\times 40$)

(基質: Naphthol AS-D acetate)

Fig. 17

正常顎下唾液腺における Non-SE の分布

A: β -Naphthyl acetate

B: Naphthol AS-D acetate ($\times 40$)

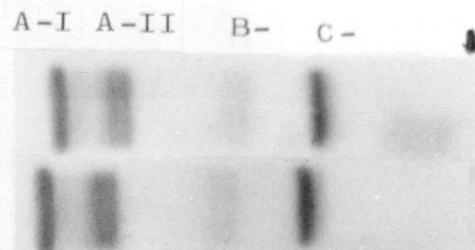
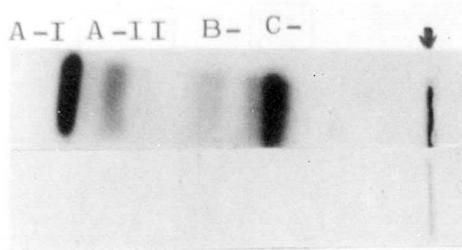


Fig. 7

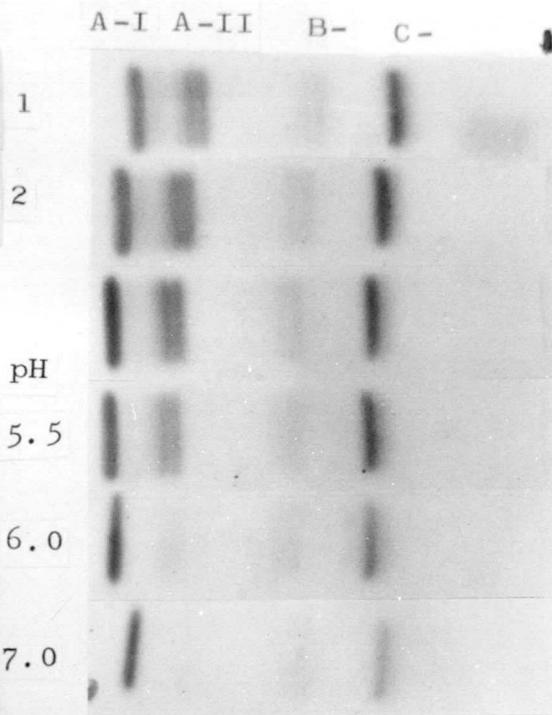
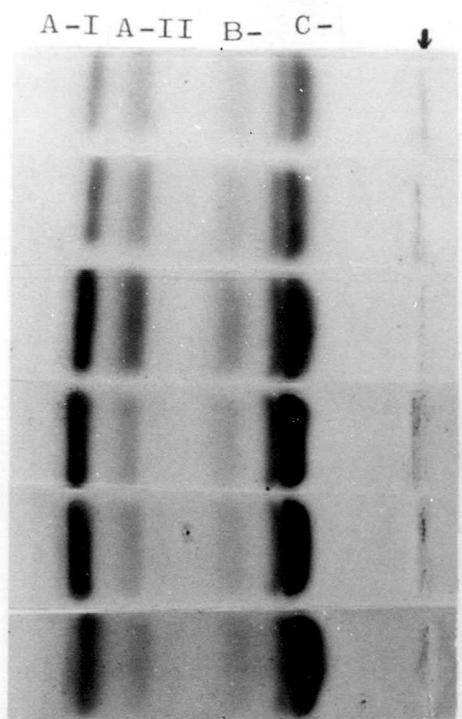


Fig. 10

Fig. 8

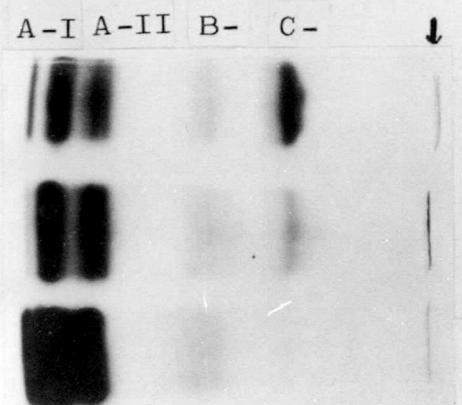


Fig. 9

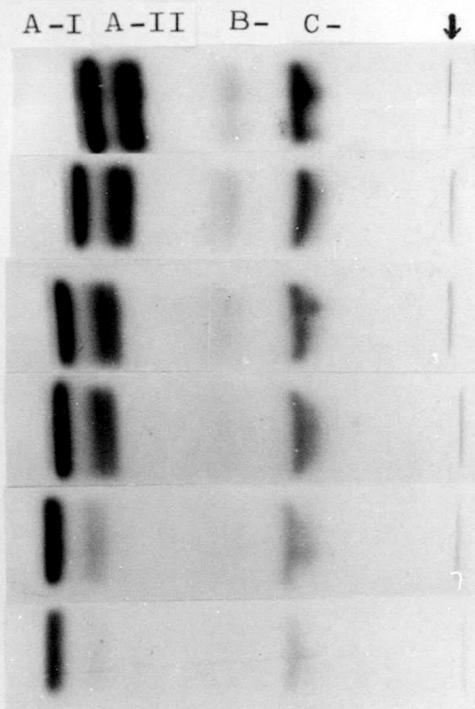


Fig. 11

DFP

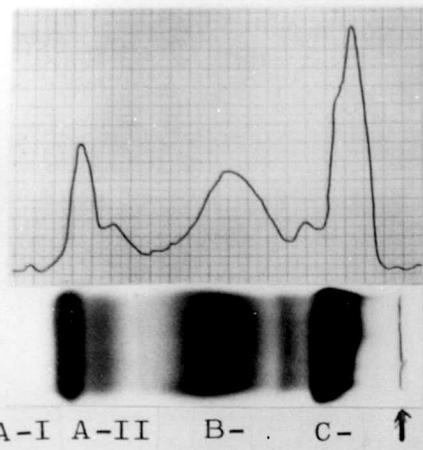


Fig. 12

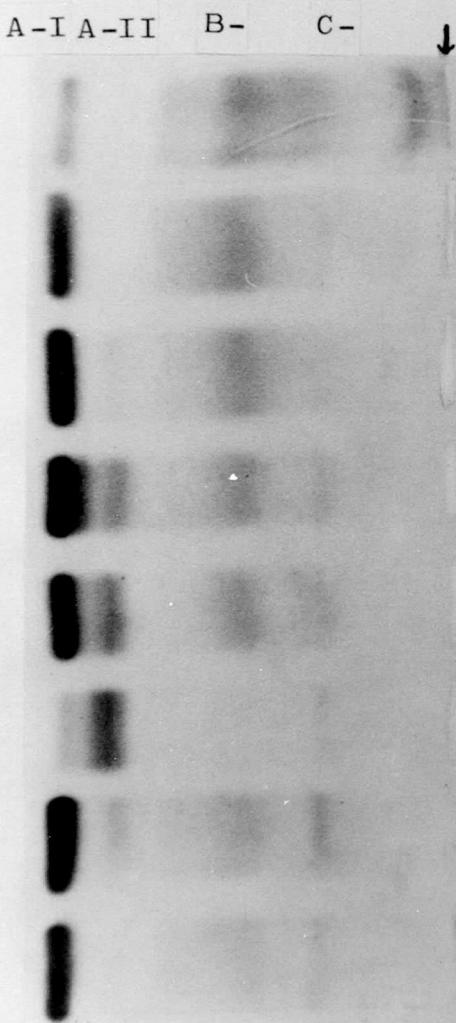


Fig. 13

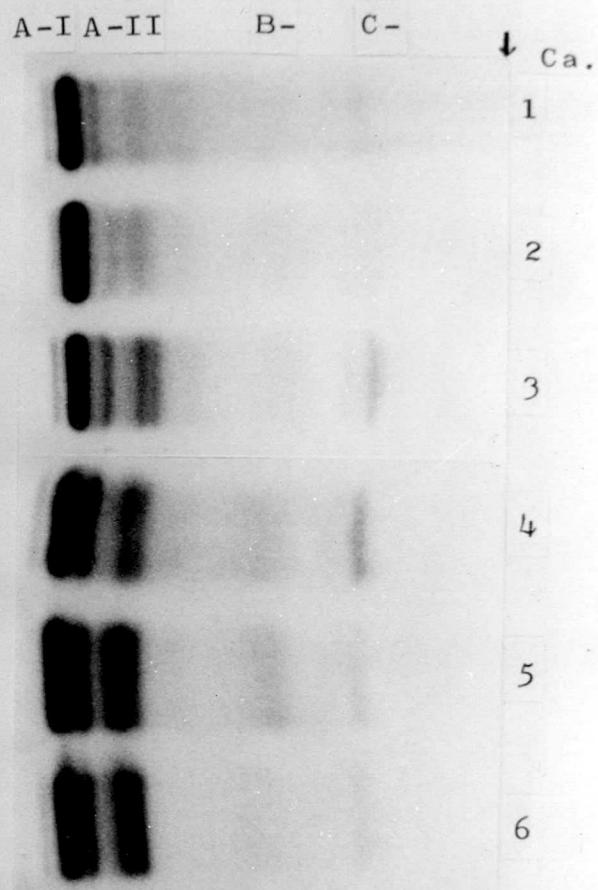


Fig. 14

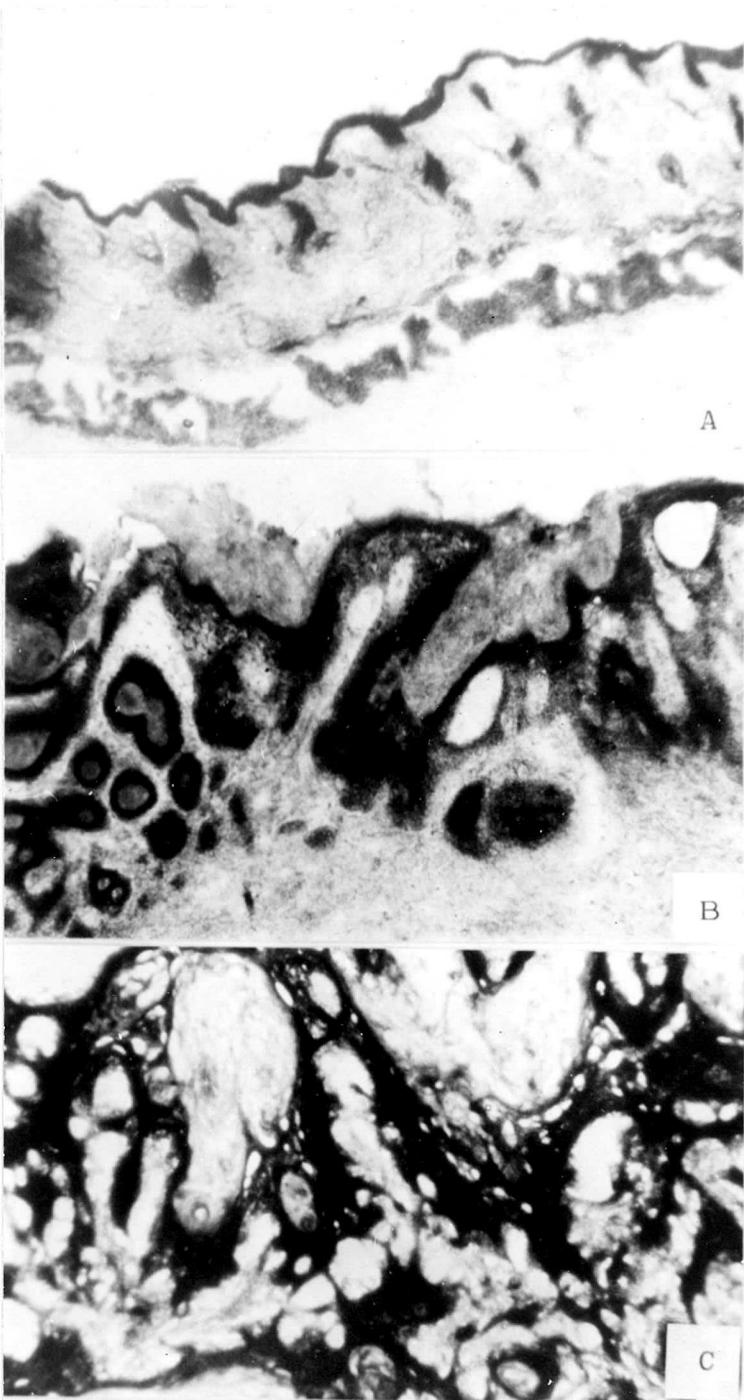


Fig. 15

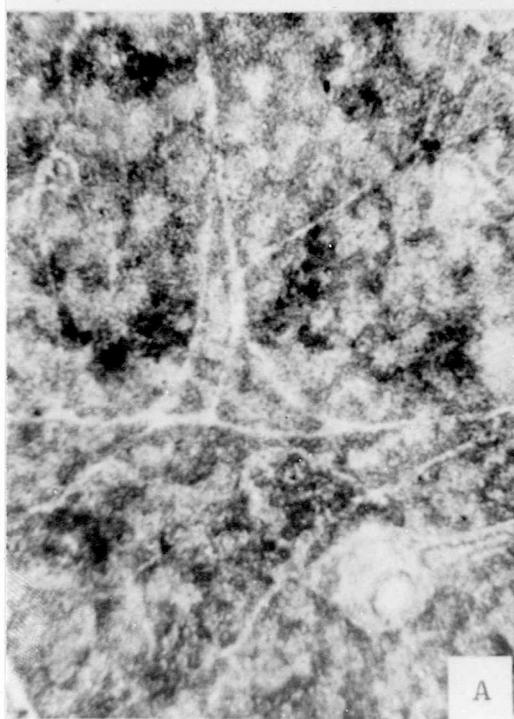


A

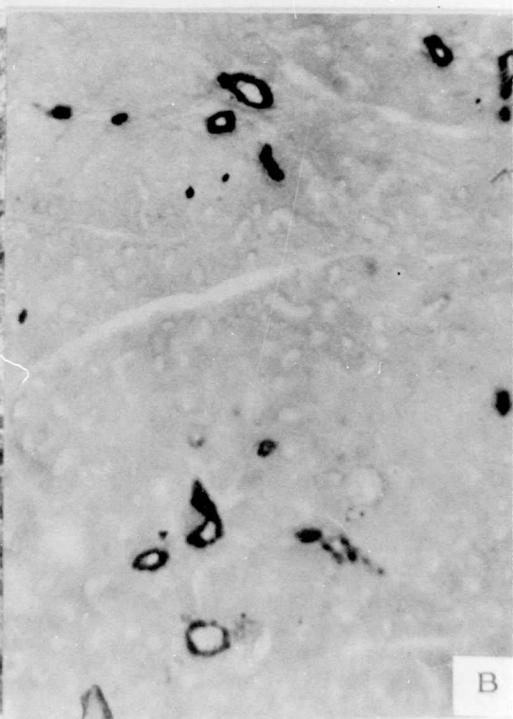


B

Fig. 16



A



B

Fig. 17

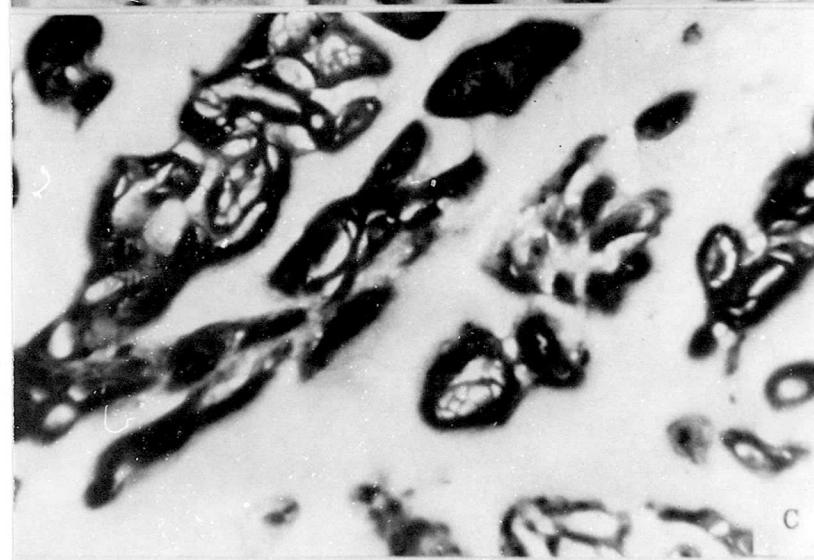
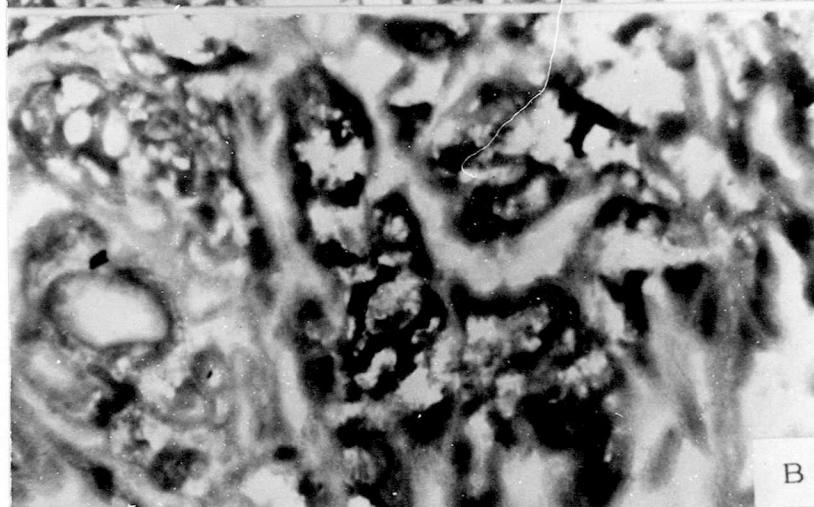
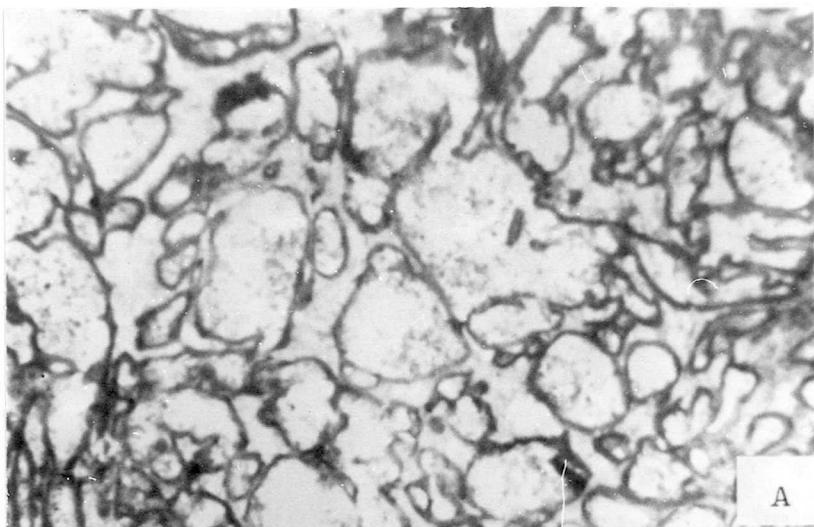


Fig. 18

HISTOCHEMICAL OBSERVATION OF ADENOCARCINOMA IN THE ORAL CAVITY

MASAHIKO MORI, D.D.S., D.M.S., YASURO YOSIMURA, D.D.S., YASUHIRO MORIMOTO,
D.D.S. and TOMOO KAWAMOTO, D.D.S.

Department of Oral Surgery, Osaka University Dental School, Osaka, Japan

INTRODUCTION

ADENOCARCINOMA is generally induced by minor salivary glands present in submucosae of oral epithelium. Foote and Frazell (1953) described that histochemical features of salivary gland tumours are classified as follows: trabecular or solid adenocarcinoma, anaplastic adenocarcinoma, mucous cell adenocarcinoma and adenocarcinoma with pseudo-adamantine pattern, and pathological features of the tumours of salivary origin have been established (Bhaskar, 1962; Lucas, 1964; Sugimura, 1966). The authors studied three cases of adenocarcinoma. Although histochemical studies of normal salivary glands (Burstone, 1956a; Chauncy & Quintarelli, 1959, 1961; Kawakatsu & Mori, 1962; Kawakatsu *et al.*, 1962, 1964) and neoplasms (Chauncy *et al.*, 1962; Cataldo *et al.*, 1964; Matsumura, 1966; Murata & Miyaji, 1966; Sugimura, 1966) have been attempted; enzyme histochemistry of adenocarcinoma in the salivary glands has not yet been studied in detail. The present study was carried out for the purpose of histochemical demonstrations of hydrolytic and oxidative enzymes in the adenocarcinoma.

CASE REPORTS

Case 1. A 42-year-old female was admitted to the Department of Oral Surgery, Osaka University Dental School, in July 1965, complaining of a painless growth at the left angle of mandible. She had first noticed the enlargement of that region in January 1964 and it had been progressively expanding towards the oral buccal mucosa. A medical history revealed that she had an operation of lip cancer in 1954. A biopsy was taken from the part of buccal side between $\frac{5}{6}$ and $\frac{6}{6}$. Pathological diagnosis was baso-squamous carcinoma. Clinically the tumour was of duck-egg size at the left angle of the mandible, and when palpated it was painless. Roentgenogram showed an ovoid shaped radiolucent area with a defined outline, measuring 5×4 cm. The mandible was resected between $\frac{3}{3}$ and the angle of the mandible, including the submandibular salivary gland, under Fluothane anaesthesia. Iliac bone was simultaneously transplanted. Resected material was examined for pathological and histochemical investigation. The final diagnosis was adenocarcinoma.

Case 2. A 44-year-old female was admitted to the Oral Surgery Department in September 1966, the chief complaint being difficulty in mouth opening and paresthesia of the tip of the tongue. She disclosed that previous surgical treatment had been carried out elsewhere. Cobalt therapy had been given for 20 days post-operatively. After the therapy she could only open her mouth approximately 1.2 cm. Scar tissue (1×4 cm.) was noted at the right cheek region. On admission to this hospital the opening of her

mouth was severely restricted, and she could only move 0.5 cm. laterally. A biopsy from the scar tissue of the cheek region showed a clear cell type of adenocarcinoma. X-ray examination disclosed an osteolytic area extending from the angle of the jaw into the ascending ramus with a definite outline. The X-ray film of the chest was negative. Hemimandibulectomy on the right side and partial maxillectomy including 876/ with lateral surface of the bone and zygomatic areas were done under orotracheal anaesthesia. Resected material was used for pathological and histochemical observations. Pathological diagnosis from resected specimens was adenocarcinoma.

Case 3. A 43-year-old man was admitted in November 1961 suffering from pain in the left molar area and paraesthesia in the mental region. 8 had been extracted elsewhere. He had a rapidly increasing swelling (3×4 cm.) around the left angle of the mandible. Submandibular lymph nodes were enlarged and palpable. The buccal mucosa of 7 and the retromolar region showed a thumb sized enlargement and a greyish white colour in 8 area. X-ray examination revealed a diffuse area of bone resorption at the left mandibular angle measuring 3×4 cm. in size. X-ray of the chest was negative. Left mandibular bone resection was done with the submandibular lymph nodes. The tumour was hen-egg in size and is located centrally in the mandibular bone. The pathological diagnosis of the resected mandible and regional lymph node was adenocarcinoma.

HISTOLOGICAL FINDINGS

Case 1. The tumour was encapsulated with fibrous connective tissue on its surface, but in the deeper portion the muscular tissue was infiltrated. Nests of tumour cells were proliferating in the fibrous and/or hyaline connective tissue and the tumour cells of basal cell type showed differentiation towards a glandular appearance. Glandular and/or acinous patterns were noted in some nests of tumour cells. Moderate infiltration with round cells and polymorphonuclear leucocytes were noted in the connective stroma. This tumour may be of salivary gland in origin from the standpoint of its appearance.

Case 2. The major part of tumour showed plexiform adenomatous epithelial structures with acinic like formation. Small nests and cords of tumour tissue were proliferated in abundant fibrous connective tissue. The tumour mass showed a variation of pleomorphic adenoma, varying types of mucoepidermoid carcinoma and clear cell adenocarcinoma. Some parts of the tumours resembled pleomorphic adenoma showing the presence of well differentiated duct structures with pleomorphism, and other parts revealed a polyzonal arrangement of compact tumour cells with dark staining and they were desquamated into luminal aspects as in squamous epithelia (Fig. 1, A and B). There was occasionally transformation from basal cell features with rather high columnar shape to spinocytic cell features with intercellular elements (Fig. 1, B). Mucoepidermoid portion of the tumour showed a resemblance to epidermoid cells with different layers of the mucosal epithelium. Some histological features indicated a clear cell plasma in acini-like structures in the tumour and a transition from solid adenocarcinoma cells to clear cells was frequently observed. They have some resemblance to hyperneophroma and to clear cell type of Grawitz tumour.

Case 3. Tumour cells were proliferating into myxomatous connective tissue, which was infiltrated with inflammatory cells. The tumour epithelial

cells were round or oval in shape with vesicular nuclei and irregular in shape and size. They were forming not only atypical glandular structures but also showing

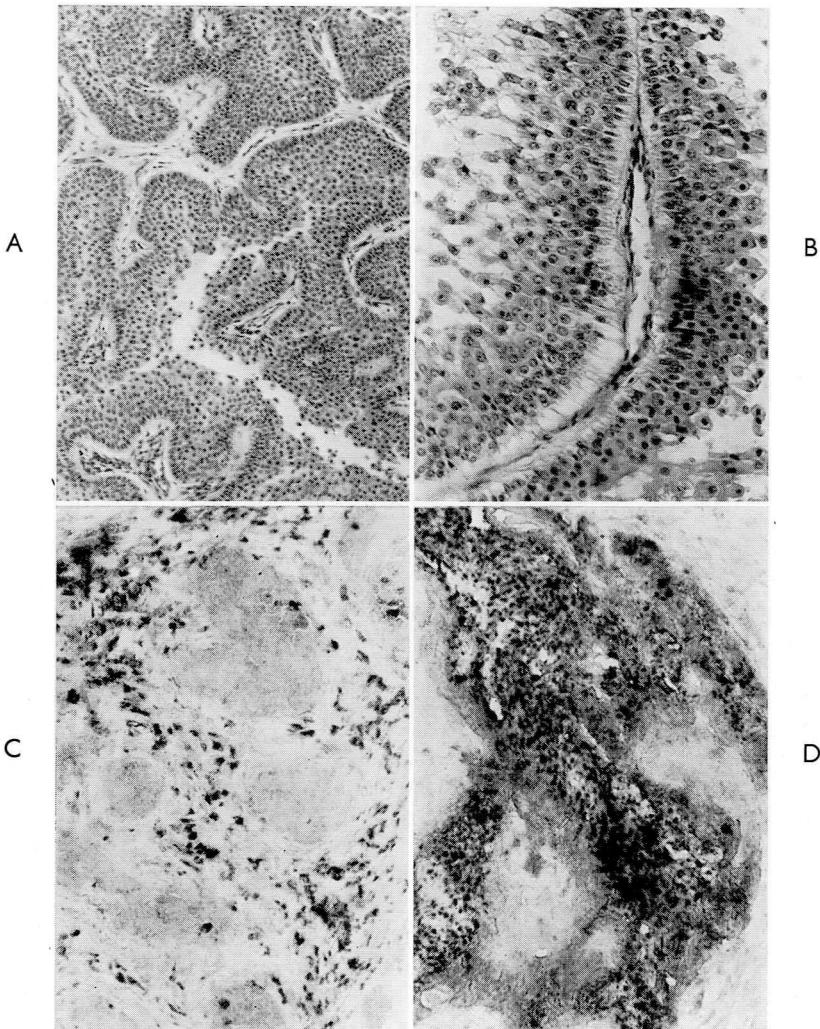


FIG. 1

A, Adenomatous proliferation with polyzonal layer, and the transition from basal cells to scattered cells is observed ($\times 75$). B, Large ductal structure with polymorphic cells. The basal cell shows rather columnar and transitional or scattered cells show oval and polymorphism ($\times 150$). C, Acid phosphatase. The enzymatic activity is slightly positive in neoplastic epithelia and prominent in stromal histiocytes ($\times 75$). D, Acid phosphatase. Tumour cells indicate a prominent staining with fine granulation. The pattern resembles the existence of lysosomes ($\times 75$).

squamous metaplasia. Mitotic figures were often observed. Metastasis to lymph nodes was evident and the histology of the tumour in lymph nodes was the same as in the primary tumour.

HISTOCHEMICAL METHODS

Fresh specimens were immediately frozen in Dry Ice at -70°C and cut at $18\ \mu$ in a -20°C cryostat with a sliding microtome. The sections were dried at the room temperature and incubated in the substrate solutions. Representative blocks from the three adenocarcinoma specimens were cut in serial sections for histochemical demonstrations of hydrolytic and oxidative enzymes. Alkaline and acid phosphatases, non-specific esterase, β -glucuronidase (Seligman *et al.*, 1954), aminopeptidase (Nachlas *et al.*, 1958), adenosine triphosphatase (Padykura & Hermann, 1955), for hydrolases and, succinate (Nachlas *et al.*, 1957), NAD-dependent (lactate, malate, glutamate, α -glycerophosphate) (Nachlas *et al.*, 1958b), NADP-dependent dehydrogenases (isocitrate and glucose-6-phosphate) (Nachlas *et al.*, 1958a), lipoic acid dehydrogenase (Balogh, 1964) and monoamine oxidase (Glenner *et al.*, 1957) for oxidative enzymes were histochemically detected. The detail of the preparation of substrate solution and staining methods required have been described elsewhere. The coloration of the enzymatic intensity was arbitrarily divided into five grades: the negative, trace, low, moderate, high and highest.

HISTOCHEMICAL FINDINGS

Alkaline phosphatase activity of neoplastic epithelia was generally negative, while in Case 1, it was slightly positive in the central parts of neoplastic epithelial foci. Stromal fibrous tissue showed a varying activity for alkaline phosphatase and capillary vessels revealed a constantly high activity. Hyaline stromal tissue indicated less or no activity.

Acid phosphatase activity was moderate or slight in tumour cells (Fig. 1, C and D). An intense activity of acid phosphatase was present in squamous metaplastic regions of adenocarcinoma in Case 3. Tumour cells in Case 2, as shown in Figure 1, A and B, exhibited an intense activity for acid phosphatase in cell plasma suggesting lysosomal activity. Although infiltrated lymph cells and polymorpholeucocytes in stromas were not so prominent for alkaline and acid phosphatase, histiocytes showed the most intense acid phosphatase activity (Fig. 1, C).

Adenosine triphosphatase activity was observed in neoplastic epithelia with a trace or low grade and the stroma was devoid of the enzymatic activity.

Non-specific esterase was moderately observed in neoplastic epithelia in Case 3 but not in Cases 1 and 2. The activity in stromas was variable.

Aminopeptidase activity in neoplastic glandular epithelia was weak or negative. The enzymatic activity was hardly observed in the stromal connective tissue irrespective of cell infiltration and fibrous proliferation.

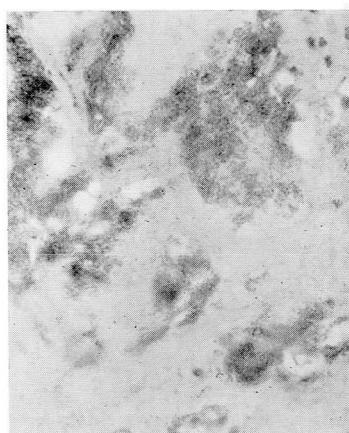


FIG. 2

Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase ($\times 75$). Neoplastic epithelia show a low to moderate succinate dehydrogenase, the highest lactate dehydrogenase and a low or moderate glucose-6-phosphate dehydrogenase activities.

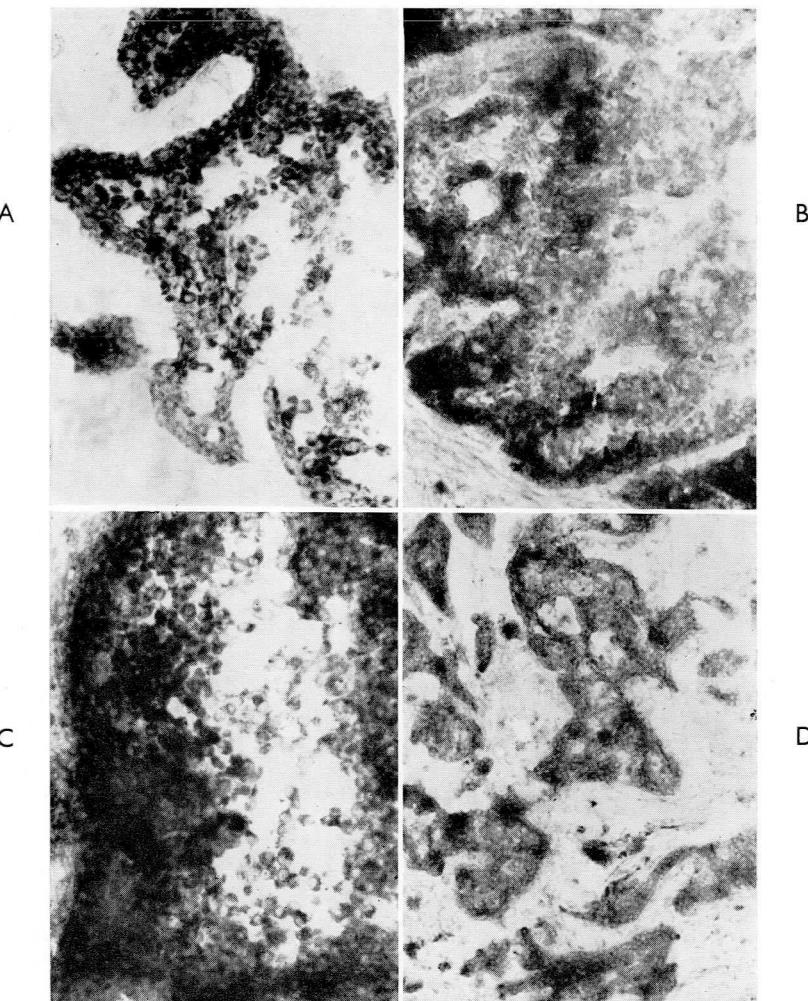


FIG. 3

A, Succinate dehydrogenase is highly confined in the neoplastic cell as indicated in Fig. 1, A. B, Lipoic acid dehydrogenase is strongly present in basal layer of tumour mass. C, Lactate dehydrogenase is abundantly positive in tumour epithelial nest. D, Glucose-6-phosphate dehydrogenase is limited in neoplastic cells and capillary vessels. In general, small epithelial nests indicate higher glucose-6-phosphate dehydrogenase as compared with large nests.

β -Glucuronidase activity was intense in neoplastic epithelia and it was low in squamous metaplastic epithelium. Tumour stromas indicated a varying activity of β -glucuronidase.

Succinate dehydrogenase activity was a slight to high levels in the epithelial element of adenocarcinoma (Fig. 2). Clear cells of tumour showed a lower activity than compact cells and tumour cells with dark staining in histology indicated a prominent succinate dehydrogenase activity in cell plasma (Fig. 3, A). Neoplastic epithelia showing squamous metaplasia exhibited a weak reaction. Stromal connective tissue had a trace activity for succinate dehydrogenase.

NAD-dependent dehydrogenases: lactate, malate and lipoic acid dehydrogenase activities were more intensely reactive than glutamate and α -glycerophosphate dehydrogenases, and they were localised in epithelial components of the tumour (Fig. 3, B, and C). Fibrous components in the stroma showed a trace to slight activity. NADP-dependent glucose-6-phosphate and isocitric dehydrogenases were generally confined to epithelial elements with varying levels (Figs. 2 and 3, D). Stromal capillary vessels occasionally indicated a low activity for the two enzymes (Fig. 3, D).

Monoamine oxidase indicated a low activity in neoplastic epithelia but not in stromal components.

DISCUSSION

The histochemistry of salivary gland adenocarcinoma has not yet been completely studied, though histochemical examination of pleomorphic adenoma of salivary glands has been performed (Chauncy *et al.*, 1962; Murata & Miyaji, 1966). In general, alkaline phosphatase activity was developed in stromal connective tissue components in reference to high inflammatory and proliferating process in epithelial tumours, and it appeared in rather low frequency in neoplastic epithelia in squamous carcinoma, adenocarcinoma and transitional carcinoma (Monis & Rutenburg, 1960; Murata & Miyaji, 1966). Acinal and ductal cells of normal salivary glands (Kawakatsu & Mori, 1962) and neoplastic cells of pleomorphic adenoma (Murata & Miyaji, 1966) were devoid of alkaline phosphatase activity. Alkaline phosphatase activity in experimental salivary gland tumours was confined to the proliferating duct-like structures and squamous metaplastic epithelia, but it was not detected in induced tumour cells (Matsumura, 1966; Sugimura, 1966). In the present study the central region of glandular or pseudo-acinic pattern in Case 1 exhibited a positive alkaline phosphatase activity. The occurrence of alkaline phosphatase seemed to be related to inflammatory cell infiltration with the enzymatic positive leucocytes. It is possible that the existence of alkaline phosphatase in salivary adenocarcinoma cells is unconnected with tumour cell growth.

It has been previously reported that acid phosphatase in tumour is present in neoplastic epithelium and in considerable quantity in histiocytes of connective tissue stroma (Reiner *et al.*, 1957). In the present report, adenocarcinoma of Case 2 exhibited a high activity, especially in the central area of the neoplastic tissues. However, in the other two cases there is a low activity. Acid phosphatase activity in epidermoid carcinoma chiefly distributed in the regions (Reiner *et al.*, 1957; Kawakatsu & Mori, 1963). The development of acid phosphatase in

adenocarcinoma cells of Case 2 seemed to have been related to the presence of lysozymes in cell plasma, and not related to keratinization.

Histochemical observation of esterase in neoplasms has shown that the activity in the tumour cells is frequently higher than in normal epithelium, sometimes the same as in normal epithelium. The activity and localisation did not correlate with the degree of differentiation of tumours. There are reports that β -glucuronidase activity was intensely positive in epithelial malignant tumours (Monis *et al.*, 1960). The present finding disclosed that the histochemical manifestation of esterase and β -glucuronidase in salivary gland resembled that of the above report.

Tissue aminopeptidase was generally present in the case of following responses; one is proteolytic areas of central necrotic mass in cancer foci (Burstone, 1956b; Burstone & Folk, 1956; Glenner *et al.*, 1959) and other in association with inflammatory and fibroblastic reactions of tumour stromas. Tumour epithelia originated from some glandular tissue, stomach and breast, occasionally contained a varying activity for aminopeptidase. In the present cases, the enzymatic activity exhibited in glandular and acinal-like tumour tissue are not so prominent in the stroma.

Histochemical observations of oxidative enzymes in neoplastic tissue have been made in many kinds of tumours (Monis *et al.*, 1959; Kawakatsu & Mori, 1963; Mori *et al.*, 1964). They reported that malignant neoplasia were generally low in activity for succinate dehydrogenase and a high inactivity for lactate dehydrogenase and considerably high in glucose-6-phosphate dehydrogenase. In general, depth of staining of oxidative enzymes in tumour tissue were found in the following order; lactate > malate > glutamate = α -glycerogenases. In the present study, oxidative enzymatic activities in salivary gland adenocarcinoma showed nearly the same levels as previously reported.

Investigations of the normal human salivary glands have shown that duct epithelia showed the highest succinic dehydrogenase activity and acini a trace or low activity (Kawakatsu & Mori, 1962; Kawakatsu *et al.*, 1962), while lactic dehydrogenase was considerably high in ducts and acini (Kawakatsu & Mori, 1962; Kawakatsu *et al.*, 1964). In a histochemical observation of enzymes during salivary gland carcinogenesis, squamous metaplastic epithelia showed a decreasing succinate dehydrogenase activity, while they showed an increasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, and the squamous carcinoma experimentally induced exhibited a similar enzymatic distribution as in human tumour. It has been suggested that pentose phosphate shunt plays an important role of nucleic acid biosynthesis. Histochemical reaction of glucose-6-phosphate dehydrogenase seems to be related to high metabolism of cell growth including malignant transformation (Mori *et al.*, 1963). The present cases, especially Case 2, indicate that rather high glucose-6-phosphate dehydrogenase in a small tumour mass is suggestive of significant growth as compared with large tumour mass with low enzymatic activity.

Clear cells of adenocarcinoma in Case 2 showed low oxidative enzymatic stainabilities as compared with compact cells. In general, clear cell renal carcinoma contained low enzymes in histochemical basis as compared with granular cell type. Morphologically similar features in clear cell salivary gland tumour and clear cell renal carcinoma showed neither the histological staining pattern nor enzyme histochemical properties of the oxidative enzymes studied.

Adenocarcinoma developed in the salivary glands exhibited a similar enzymatic pattern to neoplasms of the gastrointestinal tract.

SUMMARY

The present study dealt with the histochemical localisation of six hydrolytic enzymes (alkaline and acid phosphatases, adenocine triphosphatase, non-specific esterase, aminopeptidase, and β -glucuronidase) and nine oxidative enzymes (succinate, lactate, malate, glutamate, α -glycerophosphate, glucose-6-phosphate and isocitrate dehydrogenases, lipoic acid dehydrogenase and monoamine oxidase) in the three cases of adenocarcinoma.

Alkaline phosphatase was generally negative or slightly positive in tumour epithelia but usually positive in stromas. Acid phosphatase was moderate in tumour cells and esterase showed a moderate activity. β -Glucuronidase activity was high in tumour cells but much less in the squamous metaplastic cells. Aminopeptidase was absent in tumour cells.

Succinate dehydrogenase in tumour epithelia was generally low, while lactate and malate dehydrogenases were most intense. NAD-dependent dehydrogenase studied showed a similar distribution in adenocarcinoma except for enzymatic activities. NADP-dependent glucose-6-phosphate and isocitrate dehydrogenases were distributed in tumour epithelia. Monoamine oxidase showed a low activity in tumour cells.

REFERENCES

- BALOGH, K., Jr. (1964). *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 404-412.
BHASKAR, S. N. (1962). *Cancer*, **15**, 801-817.
BURSTONE, M. S. (1956a). *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 130-139.
BURSTONE, M. S. (1956b). *J. natn Cancer Inst.* **16**, 1149-1161.
BURSTONE, M. S. & FOLK, B. E. (1956). *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 217-226.
CHAUNCY, H. H. & QUINTARELLI, G. (1959). *J. dent. Res.* **38**, 961-968.
CHAUNCY, H. H. & QUINTARELLI, G. (1961). *Am. J. Anat.* **108**, 263-294.
CHAUNCY, H. H., SHKLAR, G. & BROOKS, R. A. (1962). *Oral Surg.* **15**, 950-964.
CATALDO, E., SHKLAR, G. & CHAUNCY, H. H. (1964). *Archs Path.* **77**, 305-316.
FOOTE, F. W. & FRAZELL, E. L. (1953). *Cancer*, **6**, 1065-1133.
GLENNER, G. G., BURSTONE, M. S. & MEYER, D. B. A. (1959). *J. natn Cancer Inst.* **23**, 857-873.
GLENNER, G. G., BURTNER, H. J. & BROWN, G. H., Jr. (1957). *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 591-600.
KAWAKATSU, K. & MORI, M. (1962). *Histochemie*, **2**, 393-401.
KAWAKATSU, K. & MORI, M. (1963). *Cancer Res.* **23**, 539-545.
KAWAKATSU, K., MORI, M., MIZUSHIMA, T. & KOIZUMI, K. (1962). *Z. Zellforsch. microsc., Anat.* **56**, 641-648.
KAWAKATSU, K., MORI, M., MIZUSHIMA, T. & MAKINO, H. (1964). *Archiv histol. jap.* **24**, 247-256.
LUCAS, R. B. (1964). *Pathology of Tumours of the Oral Cavity*. London: Churchill.
MATSUMURA, T. (1966). *Gann*, **57**, 251-263.
MORI, M., MIZUSHIMA, T., OKA, R., OKAMOTO, Y. & TAKITA, Y. (1964). *Oral Surg.* **17**, 352-363.
MORI, M., SUGIMURA, M., MATSUMURA, T. & KAWASIMA, H. (1963). *Gann*, **54**, 433-442.
MONIS, B., BANKS, B. M. & RUTENBURG, M. (1960). *Cancer*, **13**, 386-393.
MONIS, B., NACHLAS, M. M. & SELIGMAN, A. M. (1959). *Cancer*, **12**, 1238-1247.

- MONIS, B. & RUTENBURG, A. M. (1960). *Cancer*, **13**, 538-544.
MONIS, B. & WEINBERGER, T. (1961). *Cancer*, **14**, 369-377.
MURATA, I., KAWASHIMA, H. & MORI, M. (1966). *Gann*, **57**, 513-525.
MURATA, I. & MIYAJI, T. (1966). *Oral Surg.* **22**, 82-90.
NACHLAS, M. M., CRAWFORD, D. T. & SELIGMAN, A. M. (1957). *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 264-278.
NACHLAS, M. M., TSOU, K. C., DE SOUZA, E., CHEUG, C. S. & SELIGMAN, A. M. (1957). *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 420-436.
NACHLAS, M. M., WALKER, D. G. & SELIGMAN, A. M. (1958a). *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 29-38.
NACHLAS, M. M., WALKER, D. G. & SELIGMAN, A. M. (1958b). *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 467-474.
PADYKURA, H. A. & HERMANN, E. (1955). *J. Histochem. Cytochem.* **3**, 170-183.
REINER, L., RUTENBURG, A. M. & SELIGMAN, A. M. (1957). *Cancer*, **10**, 563-576.
SELIGMAN, A. M., TSOU, K. G., RUTENBURG, S. H. & COHEN, R. B. (1954). *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 202-229.
SUGIMURA, M. (1966). *Archs oral Biol.*
THOMA, K. H. & GOLDMAN, H. M. (1964). *Oral Pathology*. St. Louis: Mosby.

頸関節症の臨床的研究

第1報 頸関節症患者の統計的観察

高田 和彰, 福田 道男, 田村 浩一, 吉村 安郎
延藤 直弥, 広瀬伊佐夫, 林 育, 岡本 次郎

Clinical Study of the Temporomandibular Joint Disturbance

I. Statistical Observation of the Patients with Temporomandibular Disorders

Kazuaki TAKADA, Michio FUKUDA, Koichi TAMURA, Yasuro YOSHIMURA,
Naoya ENDO, Isao HIROSE, Takeshi HAYASHI and Jiro OKAMOTO

大阪大学歯学雑誌 第13巻 第2号 別冊 昭和43年12月1日発行

Reprinted from THE JOURNAL OF OSAKA UNIVERSITY
DENTAL SOCIETY, Vol. 13 No.2, December, 1968

頸関節症の臨床的研究

第1報 頸関節症患者の統計的観察

高田 和彰*, 福田 道男**, 田村 浩一*, 吉村 安郎*
延藤 直弥*, 広瀬伊佐夫*, 林 肇*, 岡本 次郎*

Clinical Study of the Temporomandibular Joint Disturbance

I. Statistical Observation of the Patients with Temporomandibular Disorders

Kazuaki TAKADA, Michio FUKUDA, Koichi TAMURA, Yasuro YOSHIMURA,
Naoya ENDO, Isao HIROSE, Takeshi HAYASHI and Jiro OKAMOTO

(昭和43年9月27日受付)

序 言

頸関節症は口腔外科外来において、かなりの頻度で遭遇する疾患の一つであり、これは頸関節運動疼痛、雜音、ならびに開口障害、頸運動の異常などを主訴として来院するもので、1949年 Foged¹⁾が、これらの症候群を一括して temporomandibular arthrosis と呼ぶことを提唱したのが始まりである。現在、その症状の主体が頸関節部に存在する症候群で、非感染性のものが一般に頸関節症と呼ばれている²⁻⁴⁾。

われわれはこの定義に基き診断しているが、臨床的にこれらを適確に診断して治療するに際しては、頸関節の解剖学的複雑さ、ならびに機能的複雑さと、さらに本疾患の性状および本疾患罹患患者の性格などの特異性より、非常にやっかいな疾患であり、従ってこれを適確に分類し処置することは、非常に困難なことである。

また成因に関しても、現在大別して Costen⁵⁾ のいう過蓋咬合によるもの、Schultz⁶⁾ のいう頸関節の過剰(異常)運動によるもの、Schwartz⁷⁾ のいう咀嚼筋の異常によるもの、の三つが考えられており、現在、診断法、治療についても幅広く研究されているが、まだ十分確立されていない。

われわれは本症を臨床的に検索する第一歩として本疾患罹患患者の性別、年令別、初発症状、動機、主訴、罹患側、初発より来院までの期間、臨床検査などについて統計的観察を行なったのでここに報告する。

対 象

昭和40年4月より昭和43年3月までに大阪大学歯学部口腔外科を訪れ、頸関節症との診断を下された外来患者 215 名を対象とした。

観察結果ならびに考察

I 性別観察

約3年間に来院した頸関節症患者を性別にみると次のごとくであった。

患者総数 215名

♂ 65名(30.2%), ♀ 150名(69.8%)

性別比は男性 1 に対し女性 2.3 であり、この比率は他のいくつかの報告と類似している。

すなわち、Foged¹⁾ は 1:4.5, 中村⁸⁾ は 1:2.16, Copeland⁹⁾ は 1:3.75, 岡³⁾ は 1:2.2, 中宮⁴⁾ は 1:2.37 の値をそれぞれ報告している。

このように女性の罹患率が高いのは、女性の頸関節窩が男性のそれに比べ一般に浅いという解剖学的な点と、諸種の stress に対する肉体的、精神的感受性が男性に比べ高いということに関係するのではなかろうか。

II 年令別観察

患者の年令層は13才から72才までにわたっているが、その大部分が10代後半より30代前半に集中し、全男性患者の約80% (52名), 全女性患者の約70% (114名) を占め、その内の約30%は男女ともに20~24才の範囲内に集中していた。また、50才以上の患者については徐々に増加していく傾向がみられる(図1)。

このように10代後半より30才ぐらいに最も発現頻度の高い点も他の報告と一致している^{1,3,4,8,9)}。なかでも20~24

* 大阪大学歯学部口腔外科学第二講座(主任:川勝賢作教授)

**大阪市立大学医学部歯科

本論文の要旨は昭和42年9月の第52回大阪大学歯学会例会、ならびに昭和43年4月の第22回日本口腔科学会において発表した。

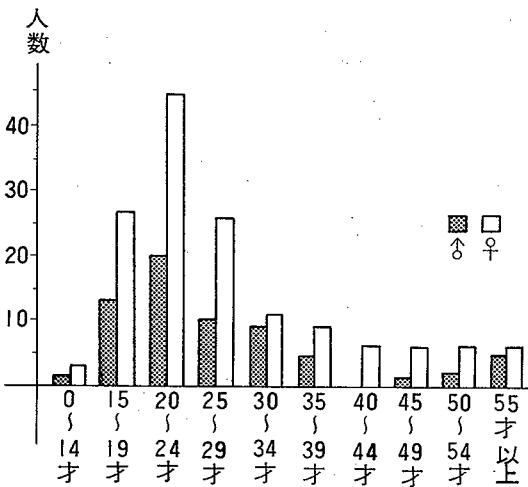


図1 頸関節症患者の年令的分布

才の年令層に集中している。この時期は頸発育の終末期にあたる期間でもあり、本症の発症と頸発育の間に何らかの関連性があるものと考えられる。

III 初発症状

疼痛80名 (37.1%)、および雑音52名 (24.1%) を初発する場合がその大部分を占め、次いで開口障害22名 (10.6%) の順となっている(図2)。

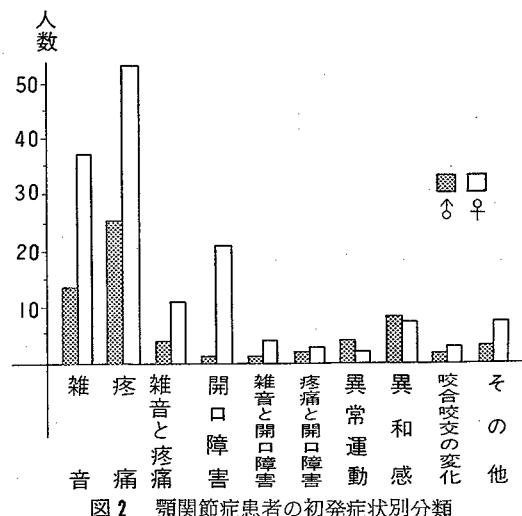


図2 頸関節症患者の初発症状別分類

異常運動、異和感、咬合咬交の変化を初発症状とする者は、それぞれ、6名 (2.7%), 15名 (7.0%), 5名 (2.3%) となっている。図2の中で「その他」の項目の10名は、咬合の不安定を訴えたものを含め、はっきりとした症状として認められなかったもので全体の 4.6 % であった。

このように初発症状において、すでに疼痛、雑音、開口障害のいずれかを単独に認めたものがかなりの数にみられたが、単独症状ではなしに、疼痛と雑音 (7.0%), 疼痛と開口障害 (2.3%), 雜音と開口障害 (2.3%) のように合併

症したものもあった。このことは頸関節の解剖学的ならびに機能の複雑さより当然のことと考えられる。

IV 動 機

図3-1は動機と考えられる内容を示したものであるが、これは症状を自覚する以前にあった出来事を問診により調べたものである。動機と考えられる事柄が明確にならなかつたもの、男性30名 (46%), 女性64名 (42%) で、突然起ってくるものが多いことを示している。咬合咬交の変化に由来すると思われるものは、主として歯科治療を受けた後に症状が現われたものであり、男性11%, 女性15%であった。悪習慣では「歯ぎしり」「頬杖」などを含み、片側のみ頸運動をさせる習癖のある者や、好んで音のできるような頸運動をしていた者もあり、総括して、男性14%, 女性10%であった。

全身疾患に関係すると思われる者は4名 (2%) で、内訳は他科においてリウマチと診断されたもの1名、リウマチの疑いのあるもの3名であった。

隣接疾患に関係があると思われるものは、中耳炎および耳下腺疾患に罹患していたもの1名で、全身疾患の場合と

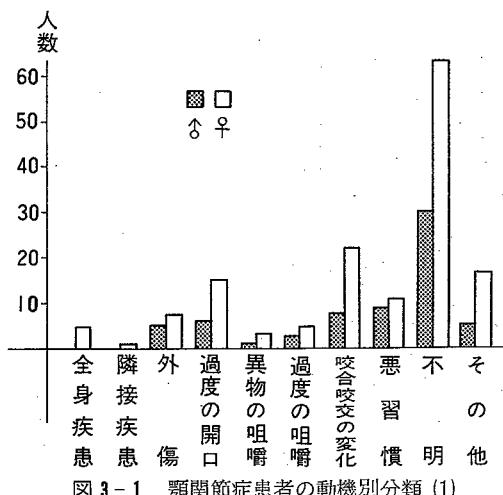


図3-1 頸関節症患者の動機別分類 (1)

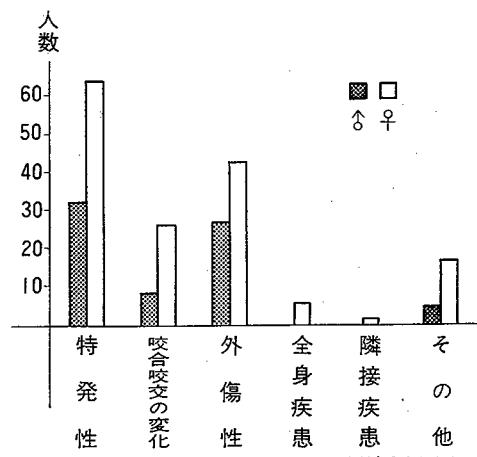


図3-2 頸関節症患者の動機別分類 (2)

同じく、いずれも低頻度である。

これらの動機と考えられるものあまり細分類することは、本症の取り扱いをかえって複雑なものにするようであるので、成り立ち方に関連づけ、原因の明らかでない特発性群、咬合咬交に関係した群、異常過剰運動などに関係したもの三つに大きく分類して観察すると図3-2のごとくである。

最近、本症の発症に関し、筋肉の異常（特に緊張）に重点的に結びつけようとする傾向にある^{2,10)}。なるほど、多くの因子が悪循環をくりかえして大多数の患者が筋肉の異常を訴えているようであるが、実際に治療するに際しては、この動機の項で述べたように、なお深く存在する筋肉の異常を引き起したと思われる原因に十分注意を払わねばならないと考える。

V 主訴

主訴については、初発症状とほぼ同様で、疼痛を訴えるものは男性46%、女性33%を占め、雜音を訴えるもの男女含めて14.8%であった。疼痛および雜音を同時に訴えるものは男性、女性ともに15.4%（男10名、女23名）、次いで、疼痛および開口障害または異常感を合併しているものは、男女合せて15.4%であり、これらに属するものは特に女性に多いようである。

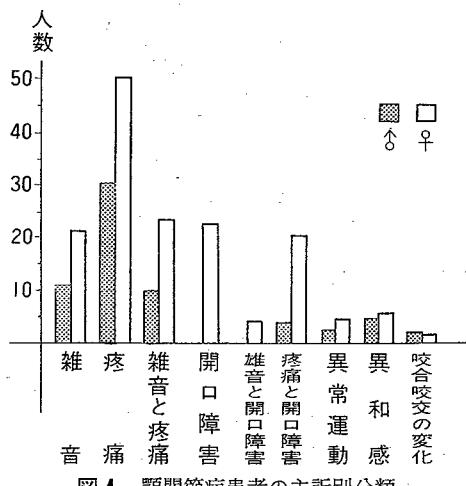


図4 頸関節症患者の主訴別分類

初発症状（図2）と主訴（図4）を比較すると、主訴において機能障害（開口、咀嚼障害）を訴えるものが増加しているほかは、両者の間に特に大きな差異は認められない。

VI 罹患側別観察

罹患側別に観察すると、男性と女性では左右側の罹患頻度が逆になっているが、左右側の有意の差をうんぬんするにはいたらない（図5）。

頸関節は両側協調して同時に運動するものであり、左右側に差異の認められないのが当然と思われる。もちろん、片側性に現われるのは患者の習慣性ならびに歯牙の状態、ひいては咬合状態との関係が考えられる。

罹患側

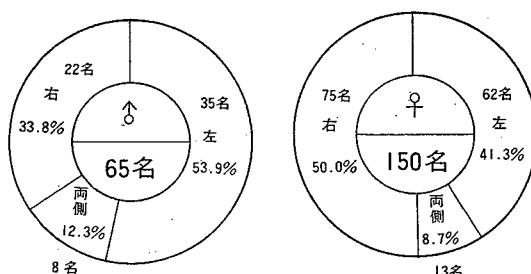


図5 頸関節症患者の罹患側別分類

VII 初発より来院までの期間

患者が症状を自覚してから来院するまでの期間別を観察すると、男性の場合は1～3ヶ月の間に来院するのが最も多く36%を占めている。女性の場合は男性に比較すると遅く、6ヶ月より1年までの間に来院する者が21.4%であった。患者の大部分は他の病院を転じながら来院したものである。しかしながら全体として、当初はあまり気にせず放置していた者が多いようである（図6）。

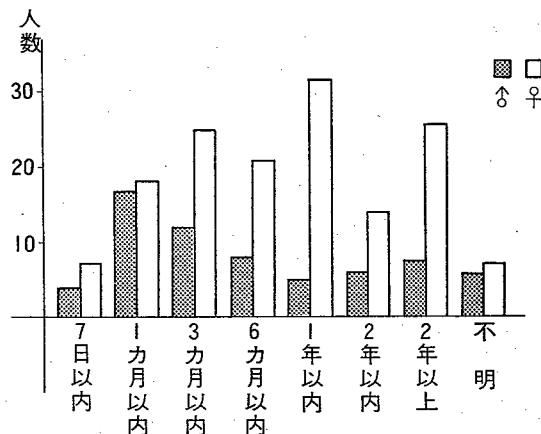


図6 頸関節症患者の初発より来院までの期間

来院までの期間の长短は、治療を行なって後の予後に關係する一つの重要な因子と考えられるのでこの点さらに観察する予定である。

VIII 臨床検査

臨床検査として、一般に重要視されているレントゲン像および血清検査結果について統計的観察を行なった。

1. レントゲン像

われわれは Schüller 法ならびに Grant-Lanting 法にて撮影を行ない観察した。

本疾患の場合、レントゲン的には関節窩ならびに関節頭部の骨実質異常、関節腔隙、さらに運動範囲が精査しうる^{8,11)}。この場合、完全な規格撮影が問題となるので今回は関節腔隙に関する所見ははぶき、骨実質異常および運動範

囲について観察し次のような結果を得た。

(A) 骨実質の異常は、吸収、脱灰、および関節頭の扁平化、辺縁の不規則なもの、骨の添加などの明らかに変化のあるもの14例、変化の疑われるもの8例であった。

X線所見（顎関節頭部ならびに関節窩）

(1) 骨に変化のあるもの 14名 (6.5%)

(2) 骨変化を疑うもの 8名 (3.7%)

(B) 運動範囲

各患者について最大開口時を Schüller 法にてレントゲン撮影し、同時に最大開口範囲、上下切歯尖端間距離にて測定し、一方、正常人において種々の程度に開口した時（上下切歯尖端間距離、1cm, 2cm, 3cm, 4cm, 5cm）の関節頭の位置を同様に Schüller 法で撮影しこれらを比較検討した。

患者においては当然のことながら、健側に比べ患側には、種々の程度の運動制限または運動異常が認められた。

次に正常人の開口範囲と関節頭の位置に関しては、おのれの次のようにあった。すなわち、上下切歯尖端間距離が 1cm～2.5cm の範囲では咬合状態にもよるが、大体関節窩より関節結節内方に存在した。いわゆる回転運動および滑走運動の範囲であった。切歯尖端間距離約 3cm でほぼ関節結節上の位置にあった。これが 3cm を越えるとほとんどの場合関節結節を越えていた。正常人においてはすべて切歯尖端間距離で平均 4cm 以上の開口状態であり、関節頭はすべて関節結節を越えていた。

以前は関節頭が関節結節をこえた状態を不完全脱臼、あるいは亜脱臼と呼ばれ「自分で整復しうる不完全な脱臼」とか「部分的な関節頭の位置異常」と定義されたり、過可動状態と考えられている^{2,10)}。

しかし、われわれの行なった正常人10名において、全例、普通最大開口時、関節頭が関節結節を越えており、また関節結節上に関節頭の存在するものは開口約 3cm の切歯尖端間距離程度の時であることより、レントゲン的に普通最大開口時に関節頭が関節結節を越えていることは生理的なものであると考えられる。この状態が慢性に存在すれば本症の発症の1因子となる場合もあるかもしれないが、この状態を亜脱臼と呼び疾患として扱うのは適当でないと思われる。

2. 血清所見

血清検査として ASLO, RA, CRP, Waaler-Rose の4法について検査を行ない次のような結果を得た。

(1) ASLO: 166 T. U. を越えるもの

33名 (10.3%)

(2) RA: ± および +

11名 (5.1%)

(3) CRP: +

11名 (5.1%)

(4) Waaler-Rose: 28 dils. を越えるもの

0名

これらの検査のいずれかに陽性反応を示すもののはほとんどは問診により、リウマチの既往歴、あるいは現症より十分リウマチと考えられる状態にある者であった。

このように臨床においてさきに述べた定義にもとづき顎関節症を診断した場合には、レントゲン的に明らかに異常の認められるものは、わずか数%であることに注目しなければならない。また血清検査 (ASLO, RA, CRP, Waaler-Rose) のいずれかに陽性反応を示したものは、ほぼ10%で、ほとんどが問診または現症より全身リウマチと考えられるものであった。

以上のことにより本症鑑別診断に際し、レントゲンならびに血清検査は有力な手段であるが、上述の結果を十分念頭において行なわれるべきである。

顎関節症というのは臨床症候名であるが、今後本症について研究を進めるにあたり本症の定義において同様の症状を示しても原因の明らかなものは除外して考えねばならないと思う。

結 語

(1) われわれは昭和40年4月より昭和43年3月まで大阪大学歯学部口腔外科外来を訪れた顎関節症患者 215名においての臨床症状ならびに臨床検査結果について考察した。

(2) 性別比は男性：女性、1:2.3であった。

(3) 年令的には10代後半より30代前半の間に約75%が存在し、特に20～24才までの範囲に約40%が集中していた。

(4) 初発症状では、疼痛、雜音、あるいは開口障害を比較的単独で認めるのに対し、主訴ではこれらの症状の合併する傾向が認められる。

(5) 問診よりえた動機と思われるものは、特発性のもの41.3%，咬合咬交の変化によると思われるもの13.0%，異常過剰運動、悪習慣など外傷性によると思われるもの20.5%であった。

(6) 左右側別の罹患度には特に差は認められなかった。

(7) 臨床諸検査でレントゲン的に明らかに骨の変化の認められたものは6.5%であった。ASLO, RA, CRP, Waaler-Rose の血清検査でいずれかに陽性反応を示したもののは10%であった。

終始、ご協力をいただきました歯学部中央放射線室の各位に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Foged, J. (1949): Temporomandibular arthrosis. *Lancet* 257, 1209-1211.
- 2) 河村洋二郎 (1965) : 顎関節症について、歯界展望, 26, 161-169, 昭和40.
- 3) 岡 達(1967) : 顎関節症の研究 (成因ならびに臨床像を中心), 口腔科学会雑誌 16, 116-123, 昭和42.
- 4) 中富憲次郎(1968) : 顎関節症について (その成立説の

- 紹介と臨床的観察), 日本歯科医師会雑誌 **20**, 933-938, 昭和43.
- 5) Costen, J. B. (1934): Syndrome of ear and sinus symptoms dependent upon disturbed function of temporomandibular joint. *Ann. Otol. Rhin. and Laryng.* **43**, 1-15.
 - 6) Schültz, L. W. (1937): A curative treatment for subluxation of the temporomandibular joint and any joint. *J. Amer. Med. Ass.* **109**, 1032-1035.
 - 7) Schwartz, L.L. (1964): Clinical anatomy and physiology of the temporomandibular joint. *Brit. J. Oral Surgery.* **2**, 20-27.
 - 8) 中村允也(1961) : 頸関節症の臨床的研究, 口腔病学会雑誌, **26**, 986-1011, 昭和36.
 - 9) Copland, J. (1960): Diagnosis mandibular joint dysfunction. *Oral Surg. Oral Med. and Oral Pathol.* **13**, 1106-1129.
 - 10) Schwartz, L.L. (1959): Disorders of the temporomandibular joint (河村洋二郎訳), 医歯薬出版, 1-410, 昭和37.
 - 11) 高久 邇(1961) : 正常ならびに病的頸関節のX線的研究, 口腔外科学会雑誌 **7**, 203-219, 昭和36.

Zymograms and Histochemistry of Non-specific Esterase in the Salivary Glands

Y. YOSHIMURA, M. MORISHITA, M. MORI and K. KAWAKATSU

Department of Oral Surgery, Osaka University Dental School, Kitaku, Osaka, Japan

Received March 22, 1969

Summary. Zymogramic analysis of esterase in the mouse, rat and guinea-pig salivary glands was undertaken and demonstrated species and organ specificities of esterase with electrophoretic method. Salivary glands esterase was classified into A, B and C types based on the electrophoretic mobility. Mouse submandibular gland had the most complicated pattern, while guinea-pig showed the simplest patterns which was devoid of B type of esterase. Rat salivary glands exhibited rather regular patterns. Similar zymogram patterns were obtained with many kinds of ester compounds, that is simple and substituted naphthol esters and indoxyI derivatives. The tests of inhibition and activation for esterase activity was obtained. Histochemical properties applied to inhibitor test in the esterase zymogram patterns showed no marked differences between ducts and acini.

Introduction

Several histochemical investigations of esterases in the major salivary glands was carried out on the localization and intensity of acini and ducts. In recent years, studies of the esterase zymogram with many kinds of substrates used have been explored, (MARKERT and HUNTER, 1956; BARRON, BERNSOHN and HESS, 1963; KOMMA, 1963; ERANKÖ, HÄRHÖNEN, KOKKO and RÄISÄNIEN, 1964; ALLEN, QLLEN and LICHT, 1965; KREUSSER, 1966; HOLMES and MASTERS, 1967a, b, 1968) however the esterase composition of the normal saliavy glands has not been studied yet.

The aim of the present experiment is to clarify the zymogramic patterns with an analysis of esterase activity of the salivary glands in the rat, mouse and guinea-pig by the combination techniques of electrophoresis, and histochemical staining. Comparisons of zymograms with the major salivary glands esterase using many substrates and the effect of inhibitors and activators on esterase activity also examined. Furthermore histochemical application of zymogram results were done and tried to demonstrate the subgroup esterases on the sections.

Materials and Methods

Materials

The animals employed were all the male of mouse, rat and guinea-pig. The specimens of the major salivary gland — submaxillary, sublingual and parotid glands — were obtained from three ddO mice (100—120 g), two wister strain rats (200—250 g) and three guinea-pigs (300—350 g) at one serial experiment. Following decapitation, the major salivary glands were resected and washed briefly 0.25 M sucrose to remove blood. After that homogenate was prepared in cetyltrimethylammonium bromide in 1:3 dilution (g weight/cc CTAB) and centrifugation at 9,000 \times g at 0—6°C for 30 min. The supernatant was subjected to electrophoresis.

Electrophoresis

Polyacrylamide thin layer electrophoresis was employed. The gels were made up according to modification of the method by RAYMOND and WANG (1960). Three kinds of buffer; phos-

phate buffer (pH 6.8, $I = 0.05$), borate buffer (pH 8.7, $I = 0.05$), and veronal buffer (pH 8.6, $I = 0.15$) were used. Aliquots of supernatant (0.004—0.006 ml) pipetted into the slot ($1 \times 1 \times 10$ mm) on the gel. The electrophoresis was carried out at 4°C for 60 min at 1.25 mA/cm.

Staining Procedures

The polyacrylamide gel plate was removed into the following incubating media at 37°C for 45—60 min after electrophoretic separation.

Substrate (2% acetone solution)	1 ml
Phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4)	30 ml
Fast Red 2R salt (or Garnet G.B.C.)	30 mg

The following substrates were used in the present study; α -naphthyl acetate, α -naphthyl propionate, β -naphthyl acetate, β -naphthyl laurate, β -naphthyl stearate, β -naphthyl myristate, naphthol AS acetate, naphthol AS-D acetate, naphthol AS-LC acetate, 6-bromo-2-naphthol acetate, indoxylo acetate, and 5-bromoindoxylo acetate.

The Tests for Inhibitors and Activators

The following inhibitors and activators were used; eserine sulfate (10^{-3} M— 10^{-9} M), D.F.P. (diisopropyl fluorophosphonate) (5×10^{-3} M— 5×10^{-9} M), EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) (10^{-3} M— 10^{-8} M). Mg^{2+} (10^{-3} M— 10^{-5} M), Cu^{2+} (10^{-3} M— 10^{-5} M), Mn^{2+} (10^{-3} M— 10^{-5} M), Ag^+ (10^{-3} M— 10^{-9} M), Cysteine (10^{-3} M— 10^{-5} M), sodium taurocholate (10^{-3} M— 10^{-5} M).

The procedure of the experiment on inhibition and activation for esterase was as follows; The gels were first left in the media containing a certain concentration of inhibitors or activators and buffer solutions for 20 min at room temperature. After then they were washed with distilled water for five minutes, and transferred into the complete substrate mixture for 40 min. Control gels were always preincubated at the same time in buffer solution which did not contain incubating media. The gels on the glass plate were enveloped with cellophane papers for preservation.

Histochemical Demonstration of Esterase

The parotid glands from the guinea-pig were immediately frozen in dry ice. They were cut at 12 — 18 μ thick with a sliding microtome in a -20°C cryostat and dried at room temperature. All sections were non-fixed. One group of sections were incubated in the substrate media and the other group of sections were preincubated in the inhibitory media which contained eserine (10^{-4} M, 10^{-6} M) and DFP (5×10^{-4} M, 5×10^{-6} M) for 15 min before surveying into the incubating media.

Results

1. Zymogram for Esterase in Major Salivary Glands of Rodents

Zymogram of the non specific esterase in the rodent salivary gland was divided into three kinds of groups; A-, B-, and C-esterases according to the greater mobilities and even in the each group these existed the subdivisions. These groups were coincided with arylesterase, aliesterase and cholinesterase from the anode to cathode respectively. This divisions for esterase zymograms followed by the AUGUSTINSSON's classification (1961), which classified the vertebrate plasma being based on the mobility and relative substrate specificities.

a) *Rat.* Ester compounds of esterase substrates were hydrolyzed into 8 active bands in the parotid gland, 6 ones both in the submaxillary gland and in the sublingual gland. A-esterases were composed of 4 active bands, of which the most first moving and the slowest are the main bands and these two bands showed approximate equal activities. B-esterase, in the salivary glands was recognized in 2 bands. C-esterase was only recognized in the parotid gland with weak grade.

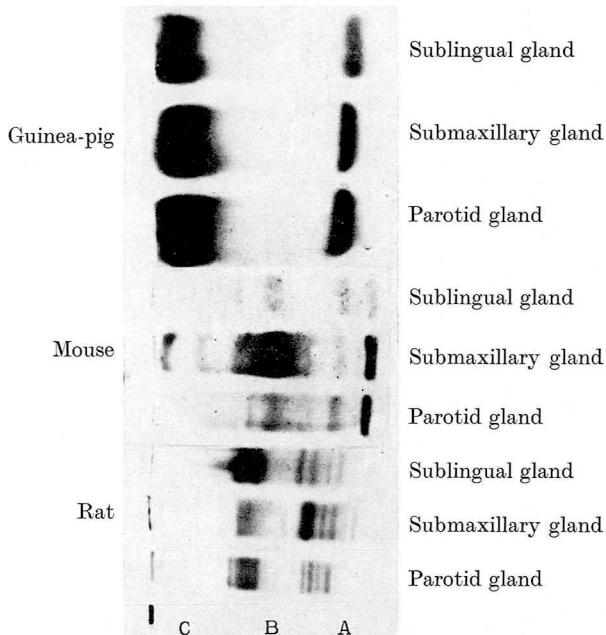


Fig. 1. Esterase zymograms of rodent salivary glands

Esterase zymogram showed much differences in each organs. Subdivisional bands were easily recognized in rat salivary gland comparing in another rodents (Fig. 1, the bottom). Zymogram pattern of rat salivary gland esterase was the most easily recognized being classified into A-, B-, and C-groups.

b) Mouse. Esterase zymogram of the parotid, submaxillary and sublingual salivary glands revealed 6, 7 and 5 bands respectively. Submaxillary gland generally contained multibands as compared with in the parotid and sublingual glands, besides it was the strongest activity among the three glands. Submaxillary gland of mouse showed the most complicated and most active band than that of other rodents. Tailing of the esterase bands and diffuse staining were observed in the sublingual gland due to mucin. Zymogram patterns for esterase in sublingual gland were faint as compared with those of parotid and submaxillary glands (Fig. 1, the middle).

c) Guinea-Pig. The major three salivary glands of guinea-pig showed the similar patterns one another, that is, the zymogram of esterase was characterized by the lack of B-esterase. C-esterase were wide active bands which might contain 2 main subdivisions, and A-group was a narrow active bands (Fig. 1, the upper).

2. Comparison of Esterase Zymogram with the Different Substrates

Zymogram patterns with α -naphthyl acetate, α -naphthyl propionate, naphthol AS acetate, naphthol AS-D acetate, 6-bromo-2-naphthol acetate, indoxyacetate, and 5-bromoindoxyacetate had not so much differences to one another (Figs. 2 and 3). But in detail some differences existed, namely within A-group esterase,

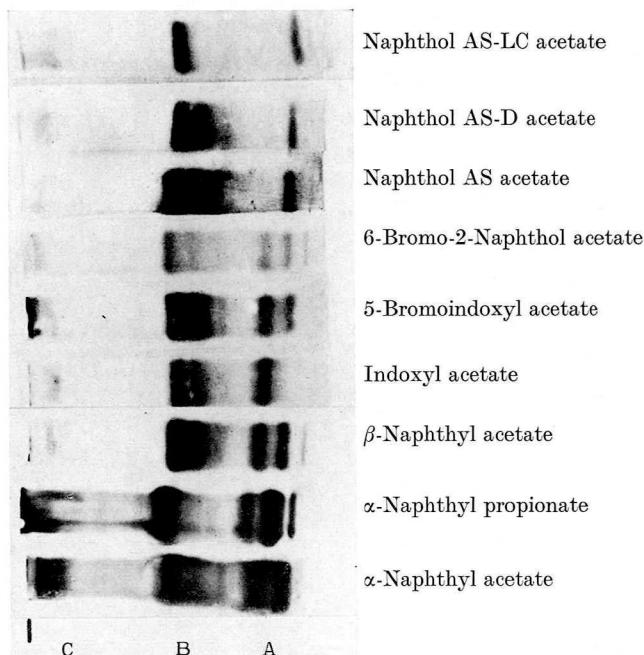


Fig. 2. Comparison of the esterase zymograms with the different substrates used in the rat parotid gland

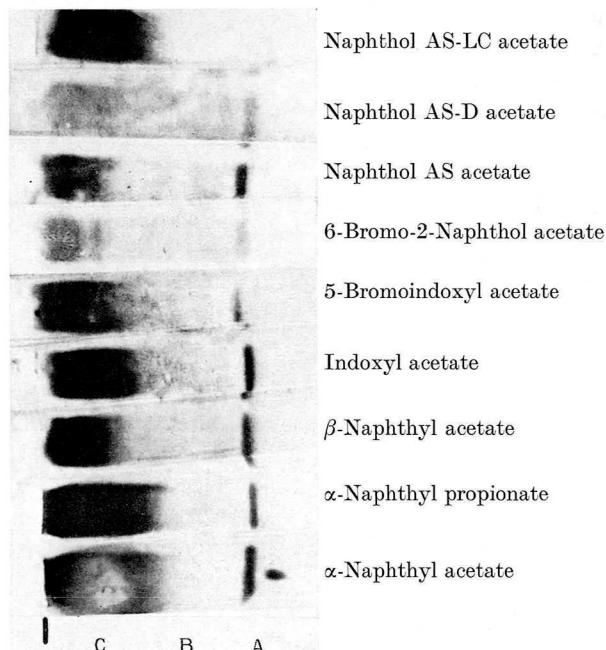


Fig. 3. Comparison of the esterase zymograms with the different substrates used in the guinea-pig parotid gland

active bands diminished the number when the substrate was the indoxyacetate, naphthol AS acetate, AS-D acetate, and AS-LC acetate. In B-group esterase, naphthol AS-LC acetate showed the only one bands. C-group esterase was scarcely recognized on the β -naphthyl acetate. Observing the substrate specificities, generally, the zymogram of the α -naphthyl acetate exhibited the total esterase pattern, that of the β -naphthyl-acetate was the anodic esterase pattern and that of the naphthol AS-D acetate was the cathodic esterase pattern. The brief attitude of the esterase toward the each substrates was summarized in the Table 1.

In the case of the rat, the long chain substrates, namely laurate, stearate and myristate of β -naphthyl esters were hardly observed to be hydrolyzed on the gels but the first substrate zymogram was scarcely recognized. The relative order of substrate hydrolysis by esterase in the rat salivary glands at the 20°C was as follows; B-esterase > A-esterase > C-esterase.

Table 1. Classification of A-, B-, C-esterase by the many substrates

Substrates	Types					
	A-esterase		B-esterase		C-esterase	
	Species	Rat	Guinea-pig	Rat	Guinea-pig	Rat
α -Naphthyl acetate	+	+		+		+
α -Naphthyl propionate	+	+		+		+
β -Naphthyl acetate	+	+		+		+
β -Naphthyl laurate	\pm	--		\pm		\pm
β -Naphthyl stearate	-	-		\pm		-
β -Naphthyl myristate	-	-		-		-
Indoxyacetate	+	+		+		+
5-Indoxyacetate	+	+		+		+
6-Bromo-2-Naphthol acetate	+	+		+		+
Naphthol AS-acetate	+	+		+		+
Naphthol AS-D acetate	+	+		+		+
Naphthol AS-LC acetate	+	+		+		+

Judged from appeared bands on the gel and relative intensity was as follows: no appearance (-), slightly appearance (\pm), easily recognized (+).

3. Inhibition Test

a) *Eserine*. Eserine was used from 10^{-3} M to 10^{-10} M concentration in the rat salivary glands. C-group esterase was inhibited almost completely at 10^{-5} M concentration, even A esterase was partially inhibited at above 10^{-4} M, but B-group esterase had somewhat resistance than A esterase (Fig. 4). In the specimens of the guinea-pig, at the 10^{-6} M, C-group esterase of the salivary glands was not so severely inhibited. Inhibitory attitude showed the gradual block of the faster component within C-esterases.

b) *D.F.P.* A-, B-, and C-group esterases in the rat samples severely inhibited at the concentration of 5×10^{-3} M, and A- and B-group esterases were more than half intensity blocked even at the 5×10^{-4} M. While, C-group esterase was severely blocked at the 5×10^{-6} M, and at last C esterase appeared weakly

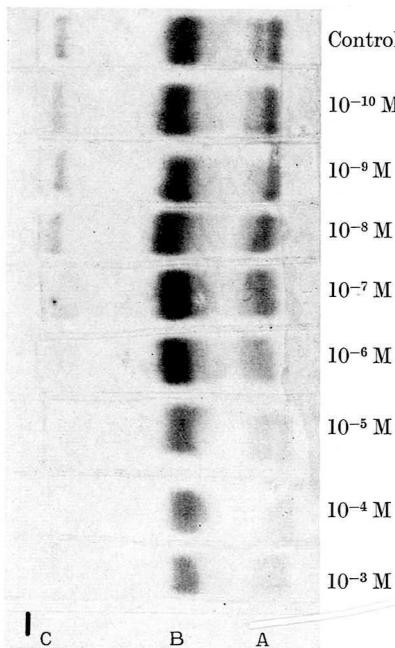


Fig. 4. Inhibition of esterase in rat parotid gland with eserine sulfate

at the 5×10^{-7} M. However A- and B-groups were almost no change in the same concentration. In esterase zymogram of the guinea-pig, C-group esterase was severely inhibited at the 5×10^{-6} M, though A-esterase was meditately inhibited in this concentration (Fig. 5, the upper).

c) *EDTA*. In esterase zymogram of the rat salivary glands, A-esterase was a little activated at the higher concentration (10^{-2} M, 10^{-3} M and 10^{-4} M). C-esterase was slightly inhibited at the highest concentration (10^{-2} M). No change was observed at the concentration of 10^{-3} M— 10^{-5} M in the guinea-pig.

d) *NaF*. The three groups of esterase in the rat salivary glands were slightly inhibited with the almost same grade even at 10^{-3} M concentration. A-esterase in the guinea-pig showed a slightly inhibition by 10^{-3} M of NaF, but C-esterase did not change.

e) *Sodium Taurocholate*. B-esterase in the rat was activated even at 10^{-7} M concentration, but A- and C-esterases did not change. A-esterase of the guinea-pig occasionally exhibited a slightly increase at the concentration of 10^{-3} M and 10^{-4} M.

f) *Cysteine Hydrochloride*. A-, B- and C-esterases of the rat samples were blocked, especially A- and B-esterases were moderately inhibited at 10^{-3} M, 10^{-4} M and 10^{-5} M. All types esterases in the guinea-pig were inhibited at 10^{-4} M but they could not be assured at 10^{-5} M (Fig. 5, the lower).

g) *AgNO₃*. In the rat zymogram of esterase, A- and B-esterases was completely inhibited at 10^{-2} M, and A- esterase showed a weak active bands even at 10^{-4} M. The different responses of esterases bands by certain inhibitors and activators at the concentration of 10^{-3} M— 10^{-5} M was shown as Table 2.

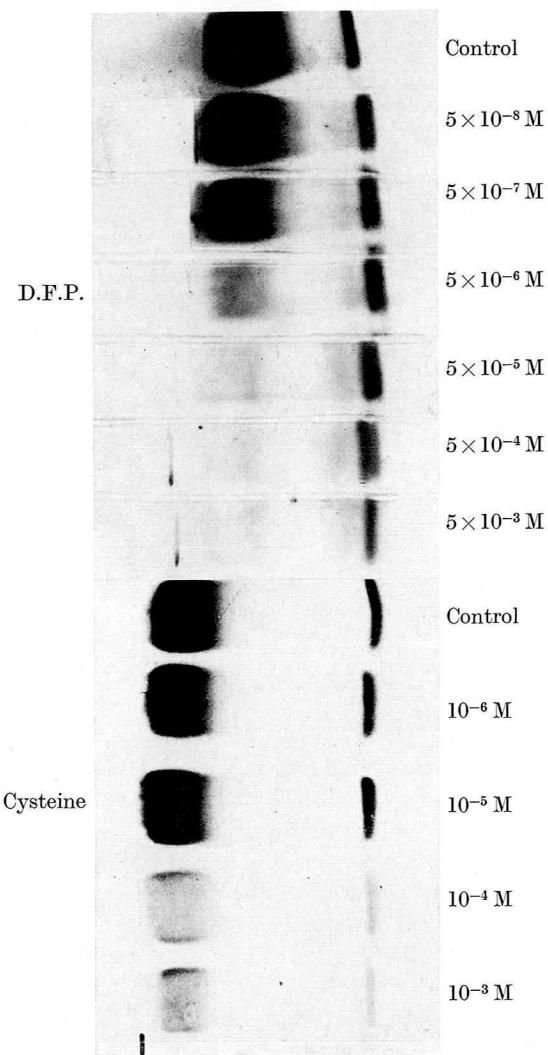


Fig. 5. Inhibition of esterase in guinea-pig parotid gland

4. Histochemical Application of Inhibition Test for Esterase

The control sections of guinea-pig showed a moderate and intense stainability for esterase in acini and ducts respectively. However in the sections which were pretreated with eserine as well as D.F.P., acini and ducts were slightly inhibited, and esterase stainability of acini was less than control sections. (Fig. 6).

Discussion

KAPLAN, MARKERT and their co-workers have been advocated and advanced the "isozyme" concept with lactate dehydrogenase that though they have same catalytic specificities, possess different physiological functions (MARKERT and

Table 2. Attitude to the several inhibitors and activators

Activators inhibitors	Species	Type of esterases										
		A-esterase			B-esterase			C-esterase				
		$5 \times 10^{-3}M$	$5 \times 10^{-4}M$	$5 \times 10^{-5}M$		$5 \times 10^{-3}M$	$5 \times 10^{-4}M$	$5 \times 10^{-5}M$		$5 \times 10^{-3}M$	$5 \times 10^{-4}M$	$5 \times 10^{-5}M$
D.F.P.	Rat	-3	-2	-1		-3	-3	-3		-3	-3	-3
	Guinea-pig	-2	-2	-1						-3	-3	-3
		$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$		$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$		$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$
Eserine	Rat	-3	-3	-3		-1	-1	-1		-4	-4	-4
	Guinea-pig	0	0	0						-2	-2	-1 to -2
NaF	Rat	-1	-1	-1		-1	-1	-1		-1	-1	-1
	Guinea-pig	-1	0	0						0	0	0
Cysteine	Rat	-3	-2	-2		-3	-2	-2		-3	-2	-2
	Guinea-pig	-1	-1	-1						-1	-1	-1
$MnCl_2$	Rat	0	0	0		+1	+1	0		0	0	0
	Guinea-pig	0	0	0						0	0	0
Sodium- Taurourcholate	Rat	0	0	0		+1	+1	+1		0	0	0
	Guinea-pig	0	0	0						0	0	0
EDTA	Rat	+1	+1	0		0	0	0		0	0	0
	Guinea-pig	0	0	0						0	0	0

Abbreviations used in this table are as follows: relative intensity of each band is indicated 0 to ± 4 , 0 no change, \pm trace, ± 1 slight, ± 2 moderate, ± 3 intense, ± 4 complete (+ activation, - inhibition) M = concentration of each inhibitors and activators.

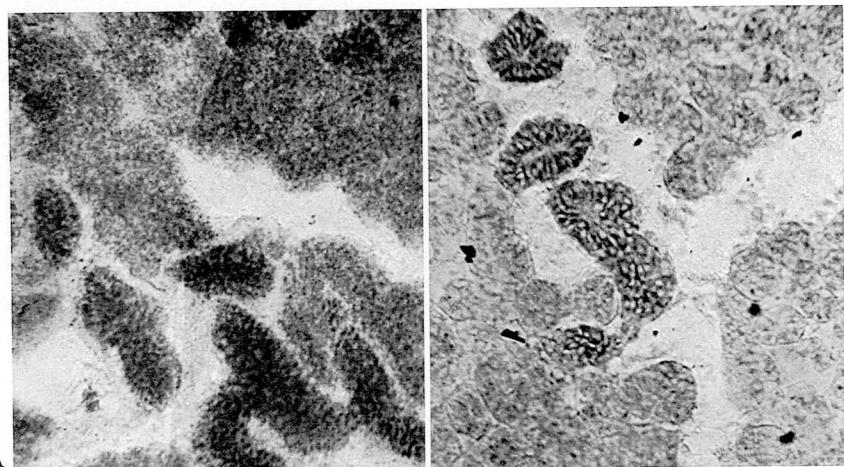


Fig. 6 A and B. Histochemical application of esterase inhibitor. A, Control gland. (The parotid gland of guinea-pig). Substrate: β -n. acetate, Dyecoupler: Fast Blue 2R. Incubation: 37°C, 30 m. B, Treated gland. Inhibitor: 10^{-4} M Eserine. Preincubation: 20°C. 15 m

MÖLLER, 1959; KAPLAN and CIOTTI, 1961; CAHN, KAPLAN, LEVINE and ZWILLING, 1962; MARKERT, 1968). Many enzymes, for example, esterases, ribonucleases, cytochrome C, trypsin, Chymotrypsin, dehydrogenases and phosphatases which could not be count up exist in multiple forms within the same species, organs, and cells. In fact esterase has the multiple active forms but physicochemical properties as well as biological significance are still quite ambiguous. From such respect it may be questionable that esterase is one of the "isozyme". As the characteristics of A-, B-, and C-esterases each connecting with physiological significance has remained unclear except for acetylcholine esterase, it is reasonable to classify A- (arylesterase) B- (aliesterase) and C- (cholinesterase which contains pseudocholine and acetylcholine esterases) esterases based on electrophoretic mobility and attitude to selective inhibitors (AUGUSTINSSON, 1959, 1961). Besides according to AUGUSTINSSON (1961), A-, B-, and C-esterases coincided with albumin, α -globulin, α -B globulin of protein respectively in the vertebrate plasma.

For the esterase zymogram of salivary gland, experiment of MARKERT and HUNTER (1959) showed that zymogram pattern of the parotid, submaxillary and sublingual glands presented their own forms and intensities. The present study exhibited that sharp differences existed in the mouse, rat and guinea-pig (species specific patterns). Relative substrate specificity was observed in the finding for serum esterase detection, that is, the band migrated of α -naphthyl acetate as a substrate showed the total esterase pattern, that of β -naphthyl acetate presented anodic esterase pattern, and that of naphthol AS-D acetate exhibited the cathodic esterase pattern. Serum esterase of the mouse showed rather distinctive substrate specificity (unpublished data).

Concerning experiments of inhibitory effects for A-, B- and C-esterase, PCMB (p-chloromercuric benzoate) and EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) have been accepted to be A-esterase (arylesterase) inhibitors but the inhibitory

response of EDTA has been different by some workers (AUGUSTINSSON, 1961; KOMMA, 1963). The present study showed that the rat A-esterase was activated in wide range concentration of EDTA (10^{-3} M— 10^{-5} M), but the guinea-pig A-esterase was inhibited at 10^{-3} M and 10^{-4} M, and has no response for lower concentration of 10^{-4} M. It is stated that esterase which was specifically inhibited by organophosphate compounds, such as, D.F.P. even at 10^{-8} M, was to be B-esterase. In the present experiment, D.F.P. inhibited the slowest moving band C-esterase in the guinea-pig with a severe grade in the more than 10^{-6} M concentrations, comparing to that of the rat. It is also reported that acetylcholine esterase was inhibited only 40% and the all type esterases of human brain were blocked at the ratio of 50—100% in 10^{-2} M and a certain esterases were inhibited even at the 5×10^{-7} M (BARRON, BERNSOHN and HESS, 1963) The present finding revealed no selective inhibition of B-esterase as have been reported. (AUGUSTINSSON, 1961; BARRON, BERNSOHN and HESS, 1963; ERANKÖ *et al.*, 1964; KOMMA, 1963).

It has been accepted that non-specific choline esterase and acetylcholine esterase were inhibited at the concentration of 10^{-5} to 10^{-6} M of eserine but B-esterase (aliesterase) inhibition was more higher concentration of 10^{-3} M— 10^{-6} M (PEARSE, 1960). Rat esterases were considered to be very sensitive for eserine. Even A-esterase was considerably inhibited more than 10^{-5} M, while C-esterase of the guinea-pig was not inhibited with severe grade at the concentration of 10^{-4} M, 10^{-5} M and 10^{-6} M as previously described (BARRON, BERNSOHN and HESS, 1963; CARVALHAIRA and PEARSE, 1967; KOMMA, 1963). Mn^{2+} , Zn^{2+} , and Ni^{2+} have been considered to be a certain esterase inhibitors, (BARRON, BERNSOHN and HESS, 1963; KOMMA, 1963) but the present experiment exhibited that $MnCl_2$ activated the B-group esterase at 10^{-3} M and 10^{-4} M concentration, but not at 10^{-5} M. Cysteine was the general strong inhibitor in both the rat and guinea-pig specimens as have been reported. (BARRON, BERNSOHN and HESS, 1963; KOMMA, 1963). The activation of B-esterase by sodium taurochrolate suggested that they might contain lipase. Generally the findings in the present inhibitory result are not always coincided with that of serum according to AUGUSTINSSON's articles (1961), because of the difference between the tissue homogenate and serum, supporting medium for the electrophoresis, and substrate, and so forth.

Histochemical observations of esterase activity in salivary glands have been contributed to the presence of ducts with prominent stainability and acini with lesser activity in the rodent salivary glands (BURSTON, 1956; TANI, 1960; KAWAKATSU *et al.*, 1959, 1962). In this experiment, the result from histochemical properties of non specific esterase reaction using β -naphthyl acetate as a substrate was similar as already studied. However applying esterase inhibitors such as eserine and D.F.P., histochemical staining in gland acini and ducts was almost equally affected. From this result, different localization and intensity of each group esterase were not shown in acini and ducts. It is an interesting finding that B-esterase of the guinea-pig was not presented on the zymogram but unnatural from the aspect that each esterase has have to their own physiological functions which are now unknown, so that B-esterase of the guinea-pig may be associated with or masked with another group esterases or proteins on the zymograms, namely the slowest moving esterase may contains B- and C-esterases.

Moreover the applying the zymogramic findings to the histochemistry, the divergence between two different kind methods should be well considered. This consideration were supported the following data. 1. The slowest moving esterase, which is called the C-esterase, was severely inhibited in a low concentration of D.F.P. (5×10^{-6} M). 2. Eserine sulfate weakly blocked C-esterase in a high concentration (10^{-4} M), and 3. The slowest moving band was a very broad active band. The phenomenon that the B-esterase disappeared in the plasma of man, monkey, dog and pig has been presented. However the B-esterase of the guinea-pig plasma were separated into 2 components, one of which migrated as an α -globulin, the second of which associated with β -globulin (AUGUSTINSSON, 1961). These reported results and this experiment indicate that each organ and tissue hold the rational functional enzymatic stituations. Regarding to the histochemical localization of cholinesterase in salivary glands, it has been previously described that the activity was positive in peripheral regions of acini suggesting nerve fibers (GARRETT, 1962, 1967; SNELL, 1959, 1960; SNELL and GARRETT, 1957). The present histochemical characters of salivary gland by means of esterase isoenzymal orientation did not accord with the histochemical distribution of cholinesterase as previously noted.

References

- AUGUSTINSSON, K. B.: Electrophoresis studies on blood plasma esterases. *Acta chem. scand.* **13**, 571—592 (1959).
- Multiple forms of esterase in vertebrate blood plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **94**, 844—860 (1961).
- BARRON, K. D., T. BERNSOHN, and A. R. HESS: Separation and properties of human brain esterases. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 139—156 (1963).
- BURSTONE, M. S.: Esterases of the salivary glands. *J. Histochem. Cytochem.* **4**, 130—139 (1956).
- CAHN, R. D., N. O. KAPLAN, L. LEVINE, and E. ZWILLING: Nature and development of lactic dehydrogenases. *Science* **136**, 962—969 (1962).
- CARVALHEIRA, A., and A. G. E. PEARSE: Comparative cytochemistry of C cell esterases in the mammalian hyroid-parathyroid complex. *Histochemie* **8**, 175—182 (1967).
- ERANKÖ, O., M. HÄRKÖNEN, A. KOKKO, and L. RÄISÄNEN: Histochemical and starch gel electrophoretic characterization of desmo- and lyoesterases in the sympathetic and spinal ganglia of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 570—581 (1964).
- GARRETT, J. R.: Some observations on human submandibular salivary glands. *Proc. roy. Soc. Med.* **55**, 488—491 (1962).
- The innervation of normal submandibular and parotid glands. Demonstration by cholinesterase histochemistry. Catecholamine fluorescence and electron microscopy. *Arch. oral Biol.* **12**, 1417—1436 (1967).
- HOLMES, R. S., and C. J. MASTERS: The developmental multiplicity and isoenzyme status of avian esterases. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **132**, 379—399 (1967).
- The developmental multiplicity and isoenzyme status of rat esterase. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **146**, 138—150 (1967).
- A comparative study of the multiplicity of mammalian esterases. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)* **151**, 147—158 (1968).
- KAPLAN, N. O., and M. M. CROTII: Evolution and differentiation of dehydrogenases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **94**, 701—722 (1961).
- KAWAKATSU, K., and M. MORI: Histochemical study of enzyme patterns in the human submaxillary gland. *Histochemie* **2**, 393—401 (1962).

- KAWAKATSU, K., K. FUJITA, M. FUKUDA, and T. KAWAGOE: Histochemical studies of normal salivary glands. II. Distribution and localization of esterase in the salivary glands of experimental animals. *J. Osaka Univ. dent. Soc.* **4**, 439—454 (1959).
- KOMMA, D. J.: Characteristics of the esterases of human cells grown in vitro. *J. Histochem. Cytochem.* **11**, 621—623 (1963).
- KREUSSER, E. H.: Non specific esterases in normal and neoplastic tissues of the syrian hamster, A zymogram study. *Cancer Res.* **26**, 2181—2185 (1966).
- MARKERT, C. L.: The molecular basis for isoenzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **151**, 14—40 (1968).
- , and R. L. HUNTER: The distribution of esterases in mouse tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 42—49 (1959).
- , and F. MØLLER: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45**, 754—763 (1956).
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*, chap. XVI. London: Churchill 1960.
- RAYMOND, S., and Y. I. WANG: Preparation and properties of acrylamide gel for use in electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **1**, 391—396 (1960).
- SNELL, R. S.: The histochemical appearances of cholinesterase in the parotid salivary gland of the rat. *Z. Zellforsch.* **49**, 330—338 (1959).
- The innervation of the salivary gland. A study of cholinesterase in nerves. *Histochemistry of cholinesterase Symposium*, Basel. *Bibl. Anat.* **2**, 97—110. Basel/New York: Karger 1960, 1961.
- , and J. R. GARRETT: The distribution of cholinesterase in the submaxillary and sublingual salivary glands of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* **5**, 236—245 (1957).
- TANI, T.: Histochemical observation of hydrolytic enzymes in major salivary glands. *J. Osaka Univ. dent. Sch.* **5**, 213—230 (1960).

Dr. Y. YOSHIMURA
Department of Oral Surgery
Osaka University Dental School
32-Joancho, Kitaku, Osaka, Japan



歯科領域におけるポンタールの使用成績

杉村正仁* 坂本忠幸* 田村浩一*
吉村安郎* 森本泰弘* 川本知雄**

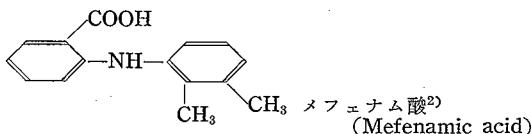
緒 言

従来、疼痛に対する種々の鎮痛剤が研究され、使用されてきたが、非麻薬性の鎮痛剤としては、その大部分がアセチルサリチル酸やピラゾロン系統のものであった。しかしこれらの薬物には副作用としてのピリン疹などの薬物過敏症を誘発する1つの大きな欠点がある。そこで最近では種々の非ピリン系薬剤が盛んに開発されているが、その臨床効果に今一步の感があり、十分な効果を発揮するものは少ない。

今回、われわれはパーク・デービス社 (Parke-Davis) の研究によって開発された抗炎症性の新しい鎮痛剤、ポンタール (Pontal) の試供をうけたので、歯科領域患者に使用し、その効果について検討を試みたところ、好成績を得たのでここに報告する。

1. 被験薬剤

本剤、ポンタール (パーク・デービス-三共社) は、従来の鎮痛剤のいずれの系にも属さないアントラニール酸 (Anthranilic acid) の誘導体であり、分子式は $C_{15}H_{15}NO_2$ で次のような構造を有している¹⁾。



本剤は融点約 $229^{\circ}\sim 231^{\circ}\text{C}$ の白色淡黄色の粉末または塊で、ほとんど臭気なく、ジメチルホルムアミドに溶けやすく、エタノール、水酸化ナトリウム試液にやや溶け、水にはほとんど溶けない。通常の状態では安定である¹⁾。

基礎実験によれば、本剤は中枢における鎮痛作用と、末梢における抗炎症作用の両面を有するといわれ¹⁾、ア

レルギー反応も少なく、またマウスに対する実験においても毒性はきわめて低い³⁾と報告されている。嗜癖性もない⁴⁾。なお、試用したポンタール 1 カプセル中には 250 mg の本剤が含まれている。

2. 投与対象および投与方法

国家公務員共済組合立大手前病院歯科に来院した外来および入院患者のうち、炎症性の疼痛を訴える、あるいは術後疼痛を予想される総計 140 名の患者を投与対象とした。投与対象とした患者の年令および性別は図 1 に示すとくである。小児および老人は投与対象より除外し、また女子より成人男子をより多く被験者として選んだ。

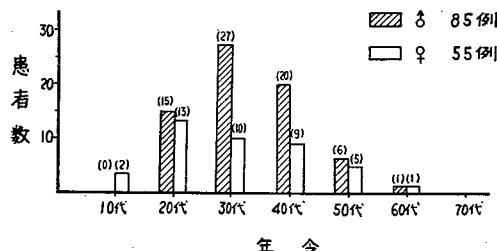


図 1 治験症例の年令別分布

被験症例は表 1 に示すとく、歯髄の炎症 4 例、歯膜の炎症 18 例、歯槽膿漏症 8 例、口内炎 1 例、智歯周囲炎 8 例、口腔内膿瘍 8 例、下顎骨炎 1 例、抜歯 44 例、抜歯（複雑なもの）9 例、膿瘍切開 26 例、歯槽骨形成術 2 例、歯肉切除術 1 例、囊胞摘出術 3 例、その他の入院手術（上顎癌根治手術、エナメル上皮腫根治手術および腸骨移植術、頸関節運動術、下顎骨骨折整復固定術、上顎洞炎根治手術）7 例であった。

投与方法および投与量は、メフェナム酸 250 mg 含有のカプセルを 1 回 1 カプセル 1 日 3 回内服させ、1~2 日間、症例によっては 3~5 日間連用させた。術後性疼痛に対しては、疼痛発現時に、ただちに服用させ、一部症例においては初回投与量を 2 カプセルとした。高度の

* 大阪大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任教授: 川勝賢作)

** 国家公務員共済組合立大手前病院歯科医長

表1 症例数およびその分類

歯髓の炎症	4例	抜歯	44例
歯膜の炎症	18	抜歯(複雑なもの)	9
歯槽膿漏症	8	膿瘍切開	26
口内炎	1	歯槽骨形成術	2
智歯周囲炎	8	歯肉切除術	1
口腔内膿瘍	8	囊胞摘出術	3
下顎骨炎	1	その他の手術 (入院患者)	7
	計	140例	

化膿性疾患を伴うもの、また術後感染予防の目的で一部症例においては抗生物質またはサルファ剤の投与を併用した。

3. 効果の判定基準

本剤の示す鎮痛および消炎効果のうち、鎮痛効果は被験者の答申により、また消炎効果は炎症の一般症状のほか、口腔内で極めて具体的な炎症症状として現われる歯牙の打診痛や牙関緊急の有無などを指標とした験者の他覚的な判定を行ない、その基準は

鎮痛効果

- ++ まったく疼痛の消失したもの
- + 軽度の疼痛を感じたもの
- まったく疼痛の軽減しなかったもの

消炎効果

- + 炎症症状のいくつかが改善または消失したもの
- ± やや改善が認められたもの
- 改善がないかまたは炎症がさらに進行したものとした。

4. 投与成績と副作用

鎮痛および消炎効果

全症例を大きく下記の3群にわけてその鎮痛および消炎効果を検討した。すなわち

第1群：歯髓および歯周組織の炎症

第2群：第1群を除く口腔内の急性炎症性疾患

第3群：外科的処置後の症例

で、その効果の成績は表2～4に示すとおりである。鎮痛有効率は $\frac{++}{++} + \frac{+}{+} \times 100 (\%)$ 、消炎有効率は $\frac{+}{++} + \frac{+}{+} \times 100 (\%)$ とした。

第1群（表2）においては、歯髓の炎症はAs貼布後の主に鎮痛目的に投与、また歯槽膿漏は急性発作を示した症例にのみ使用した。この群においては根充後の強い

表2 鎮痛および消炎効果の成績（I）

	症例数	鎮痛効果			消炎効果				
		++	+	-	不明	+	±	-	不明
歯髓の炎症	4	3		1		1		3	
歯膜の炎症	18	8	3	3	4	6	5	1	4
歯槽膿漏症	8	3	2	1	2	1	5	1	
計	30	14	5	4	7	7	11	1	8

鎮痛有効率 82.6% 消炎有効率 35.0%

表3 鎮痛および消炎効果の成績（II）

	症例数	鎮痛効果			消炎効果				
		++	+	-	不明	+	±	-	不明
口内炎	1	1						1	
智歯周囲炎	8	7	1			4	3		
口腔内膿瘍	8	3	4	1		1	3	2	2
下顎骨炎	1	1					1		
計	18	12	5	0	1	6	7	2	2

鎮痛有効率 100% 消炎有効率 40%

打診痛に著明な効果を認めたことが注目される。2～3日の連用で打診痛の消失をみている。この群の鎮痛有効率は82.6%、消炎有効率は35.0%であった。

第2群（表3）においては、いずれの疾患に対しても洗浄以外、何ら外科的処置を施していない。ゆえに薬剤の効果が修飾されることが少ないと考えられる。鎮痛有効率100%、消炎有効率40%という結果を得た。疾患別にみると、智歯周囲炎に特に著明なる鎮痛および消炎効果を認めた。

第3群（表4）は種々の外科的処置を施した後の鎮痛および消炎、あるいは炎症前駆症状抑制の目的で投与したものである。外科的侵しゅうの大小によりその薬剤効果が違ってくること、また逆に外科的処置がある意味では消炎療法であることなどからとくに消炎効果の判定が困難である場合が多く、そのため不明とした症例が多い。この群の鎮痛有効率は93.0%、消炎有効率は53.3%であった。鎮痛作用では、抜歯後投与のものに著明な効果があったほか、外科的侵しゅうの大なる手術後においても鎮痛効果は著明であった。下顎骨骨折、腸骨移植術後の腰痛などの持続的疼痛には1回の服用が長時間の著効を見た。外科的侵しゅう大なる術後の消炎効果については、炎症症状の出現が一般に軽度であった。

表4 鎮痛および消炎効果の成績(III)

	症例数	鎮痛効果			消炎効果				
		++	+	-	不明	+	±	-	不明
抜 茍	44	34	7	2	1	12	10	2	20
抜 茭(複雑な もの)	9	7	1	1	0	3	3	1	2
膿瘍切開	26	17	3	2	4	13	6	2	5
歯槽骨形成術	2	1	1	0	0	0	1	0	1
歯肉切除術	1	0	1	0	0	0	1	0	0
囊胞摘出術	3	2	1	0	0	1	1	1	0
その他の手術	7	5	1	1	0	3	2	1	1
計	92	66	15	6	5	32	23	7	29

鎮痛有効率 93.0% 消炎有効率 53.3%

鎮痛効果の発現時間および持続時間

140例すべてに調査を行なったが、明らかに発現および持続時間の判明し得たもの(44例)をグラフに現わしたのが図2である。発現時間は30分～1時間が圧倒的に多く23例(52%)、持続時間は4～5時間が20例(46%)、3～4時間が11例(25%)、5時間以上が9例(20%)であった。

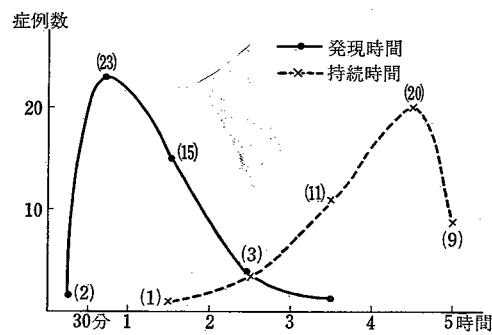


図2 発現時間および持続時間

鎮痛無効例の分析

鎮痛無効例は第1群4例、第2群0例、第3群6例、計10例で無効率は7.8%である。鎮痛効果のみと認められなかった症例で疼痛の持続している場合は、翌日ピラビタール300～500mgの投与を行ないその効果を調べたところ、他剤で有効なものは1例、他剤でも無効のもの5例という結果を得た(表5)。

副作用およびアレルギー体質患者に対する反応

ポンタール投与後現われた副作用とおぼしき症状を列挙したのが表6である。ただしポンタールによる副作用であるかどうかは明らかでない。軟便、下痢を訴えた6

表5 鎇痛無効例の分析

無効率	$\frac{10}{128}$ (7.8%)
有効率	$\frac{118}{128}$ (92.2%)
他剤で有効のもの	1
他剤で無効のもの	5
不明	4

表6 ポンタールの副作用についての検討

副作用発現	13例(9.2%)
軟便	4
下痢	2 } 6
恶心嘔吐	3
食欲不振	1
胃痛腹痛	1
胃膨満感	1
発疹	1
副作用なし	124例(90.5%)
不明	3例(0.3%)

表7 アレルギー体質患者に対する投与

症例数	鎮痛効果		副作用ありなし
	++	+	
ピリン禁忌	3	2	1
その他	2	1	0
	9	5	3
		0	6
		1	3
		0	9

例中、4例は抗生物質を併用していた。投与後、四肢、特に下肢に紅斑を生じた症例が1例のみ認められた。

つぎに薬物過敏症患者に対する反応であるが、今回治験対象とした140例の患者のうち、ピリン禁忌患者6名、他のいわゆるアレルギー患者(プロカインアレルギーその他)が3名、計9名であったが、これらすべての患者に何ら副作用をみとめず、かつ鎮痛効果を十分に得ることができた(表7)。

5. 考 察

鎮痛剤の効果判定には客觀性が少ないとよくいわれる。まず患者の疼痛の程度を正確に知ることは容易でない。患者の体質や精神状態も十分考慮しなければならない。さらに効力判定には被験者の答申に待たざるを得ない以上、当然いろいろな因子が混入する。したがって少しで

も検者、被検者双方に含んでいる主観的な誤りをさけるために、論理的な方法をとることが重要であり、実施にあたってはさらに細かい注意が必要である。

今回のわれわれの治験では、すでに商品化された薬剤を、日常臨床におけるいわゆる routine の投薬として行なったものであるので、double blind method や placebo 使用を行なっていない。しかし投与対象としては疼痛の強さをはっきりと判定できるもの、すなわち小児、老人は用いず、また心理的生理的な理由から女子はなるべく避け、成人男子を使うよう⁹⁾ 注意した。また、検者側に関しては必ず一定したメンバーで行ない、とくに手術後投与の症例（第3群）は必ず術者がその判定を行なった。

歯科領域患者の大半は外来患者である。外来患者なるがゆえに麻薬系の鎮痛剤の使用は差し控えねばならない。しかし簡単な治療でさえも、ときには激しい疼痛をきたすものが少なくない。また歯科領域においては、局所の炎症が疼痛発現の大きな因子になっていることが多いのが特徴である。ゆえに鎮痛剤としては、非麻薬性のもので、しかも鎮痛作用が強力、効果発現が速く持続性の長いことが望まれるのはいうまでもないが、それにもまして重要なことは多くの鎮痛剤のように単に中枢神経系に働いて痛みの閾値を上昇させるだけでなく、疼痛発現の大きな因子である局所の抗炎症作用を同時に有することが必要であろう。もちろん鎮痛剤の代表とされているアスピリンも現在、薬理学的にはその鎮痛作用機作を中心より末梢性に求められる傾向はあるが、消炎効果はそれほど強くない⁶⁾。

今回われわれが試用したポンタール（パーク・デービス-三共社）（メフェナム酸）は鎮痛効果において128例中118例に有効であり、その鎮痛有効率は92.2%であった。さらに無効例（10例）において痛みのレベルが最初に投与した薬剤に影響されぬまでもどった頃、他剤（ピラビタール 300～500 mg）を投与してその効果を比較したところ他剤で有効であったものは1例に過ぎなかった。また外科的侵襲による大なる術後の疼痛にも満足すべき効果を得ている。ただ今回のわれわれの投与方法および結果からは、鎮痛効果の強さにおいて他剤との優劣を決定することはできぬが、Holte⁷⁾ や長尾⁸⁾らの報告によれば、ポンタール 250 mg がコデイン 25 mg に比しその鎮痛効果が、またピラビタール 500 mg に比しその有効率がそれぞれ高いことを述べており、他科領域の報告においても優れた鎮痛効果を示している^{9,10)}。

発現および持続時間は、われわれの成績において30分～1時間にその効果発現をみたものが52%で、持続

時間は4～5時間と答えた被験者が46%を占めていた。メフェナム酸は吸収度が比較的緩徐であるため、径口投与後2～3時間で血中濃度が最高に達し、持続時間は6～8時間におよぶといわれている¹¹⁾。アスピリンなどの持続時間が2～3時間である¹²⁾ことから、持続性疼痛には本剤投与が他剤に比し非常に便利である。われわれの成績でも、下顎骨骨折および腸骨移植術後の持続性腰痛に1回の投与が長時間の有効をみた。

消炎効果の判定も、臨床的には客観的な良い方法がない。しかし一般の炎症症状のほかに、口腔内では歯牙の打診痛や牙関緊急の程度などがその具体的な指標となる。われわれの成績では、外科的処置を加えていない急性炎症、すなわち薬剤効果が炎症性病巣に直面に現われると思われる第2群（表3）において、消炎効果の無効、あるいは増悪例がきわめて少なかった。また第3群の外科的侵襲による大なる術後の炎症症状は一般に軽度であり、炎症前駆症状を抑制する作用が本剤にあると考えても良いと思われる結果を得た。基礎実験においてはメフェナム酸はフェニールブタゾンの0.5倍、アスピリンの5倍、アミノピリンの3.8倍の抗炎症作用を有することが認められている¹³⁾。

薬物に対する過敏症の有無は、とくに考慮が必要である。とくに、アセチルサルチル酸やピラツォロン系統の鎮痛剤には、過敏症としてのピリン疹や胃腸障害の副作用の点でその使用を制限せざるを得ないことが多い。ポンタール投与後の副作用は表6のごとくであったが、その発現率は9.2%で、発疹例の一例を除く他はきわめて軽度のものであった。軟便下痢の6例についてはそのうち4例に抗生素を併用している事実から、必ずしも本剤による副作用であるとはいえない。他の多くの報告例でも副作用はきわめて少ない¹⁴⁾。またアレルギー体质患者9名（うちピリン禁忌患者6名）に対し、本剤には何の反応も示さず、かつ十分な鎮痛効果を得ることができた。このことから、ピリン禁忌などの薬物アレルギー体质の患者に対しポンタールはきわめて安全に使用することができると言える。

結語

以上の分析結果を総合して考えると、ポンタールの鎮痛作用はきわめて良好で多くの症例にその効果が期待されるといえる。しかもその効果がかなり持続的であり、局所の消炎作用も期待でき、副作用も著明でないので、口腔領域の炎症、疼痛を伴う症例に対してきわめて望ましいものであり、とくにピリン禁忌などの薬物過敏症患

者への使用にも適していると考えられる。ただし、ごくまれに本剤に対してアレルギー性反応を認める症例があるので、使用にあたって慎重な考慮と管理が必要であると思われる。今後投与法、製剤の進歩改良によってさらに使用範囲は拡大されるものであろうと考える。

文 献

- 1) Winder C.V. et al.: Anti-inflammatory, anti-pyretic, and antinociceptive properties of N-(2,3-Xylyl) anthranilic acid (CI-473), *J. Pharmacol & Exper. Therap.*, **138**: 405, 1962.
- 2) WHO Chronicle 1963, United States Adopted Names (USAN); 1963年7月第1版。
- 3) McAlpine, R.J. et al.: Research Laboratories, Parke, Davis & Company, 1960.
- 4) Deneau, G.A. et al.: Report to the Department of Clinical Investigation, Research Division, Parke, Davis & Company.
- 5) 恩地 裕, 美馬 昂: 疼痛閾値及び痛みの強さ. 総合臨床, **15**: 577, 1966.
- 6) 山本 巍, 猪木令三, 高橋 宏: 新しい鎮痛薬.
- 7) Holte N.O. (Minneapolis): Report to the Department of Clinical Investigation, Research Division, Parke, Davis & Company.
- 8) Nagao, Y. et al. (Tokyo): Clinical Test on a New Analgesic "PONSTAN" Administered After Teeth Extraction and Minor Operations. *Journal of Tokyo Dental College Society*, **65**: 401~404, 1965.
- 9) Umehara, S. (Tokyo): Report to the Department of Clinical Investigation, Research Division, Parke, Davis & Company.
- 10) Friedman, A.P. (New York): Report to the Department of Clinical Investigation, Research Division, Parke, Davis & Company.
- 11) Unpublished Laboratory Data. Research Division, Parke, Davis & Company.
- 12) 臨床薬理学大系, 第4巻, p. 57.
- 13) Lane, A.Z. (Ann Arbor): Report to the Department of Clinical Investigation, Research Division. Parke, Davis & Company.

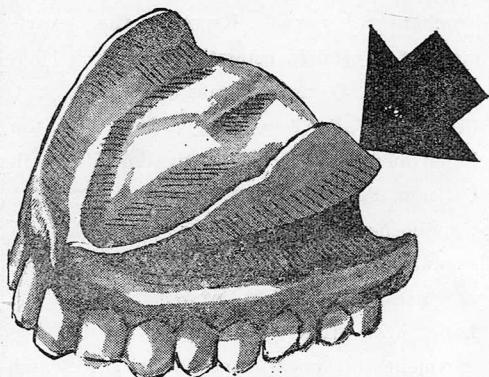
新製品 《特許出願中》

ニュー・スナッガー

NEW-SNUGGER

SILICONE-RUBBER 主体

理想的義歯床裏装材



- 口腔内で変化変質しない・弾力性永続
- 成型は簡単で正確・レジン床ならびに金属床にも密着

製造元・日本デンタル株式会社

東京都台東区元浅草2-7-5 ☎(東京)831-7935

東日本発売元・株式会社新井歯科商会

東京都品川区東五反田1-25-4 ☎(東京)443-4431

西日本発売元・株式会社モモセ歯科商会

大阪市天王寺区南河堀町71 ☎(大阪)771-5275

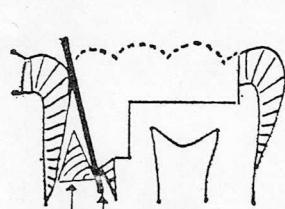
アマルガムウェッジと ウェッジホルダー

アマ充用マトリックスを効果的に！

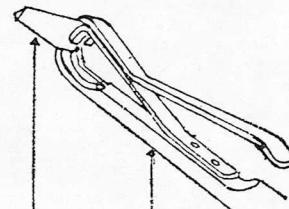


クサビ併用の目的

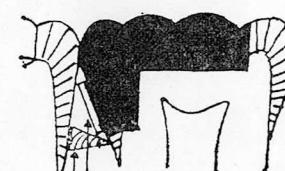
- 隔壁を歯頭部に堅固に圧接固定して填塞圧に堪えさせる
- 隔壁の厚さだけ歯間を離開し隔壁の厚さに依って接触点にすき間が生ずるのを防ぐ
- 二級アマルガム充填の研磨時にスチールストリップスやナイロンストリップスを使い安心して隣接面の研磨をする事が出来る



填 塞 時



ウエッジ ホルダー



研 磨 時

東京都台東区上野5-12-8

K.K 日本歯科工業社

TEL (832) 6141(代)

論文參考

口腔外科領域における Viccillin の使用成績について

高田和彰* 伊藤 実*
 吉村安郎* 延藤直弥*
 石川武憲**

緒 言

1928年 A. Fleming により penicillin (Penicillium notatum) が秀れた抗菌性を有することが発見されて以来、種々抗生物質が研究され抗生物質療法が急速に発達した。しかし一方、耐性菌や菌交代症の出現ならびに副作用など問題が出現し、これらの方面の研究が必要になりました。相乗効果、抗菌力の増強、耐性的防止、抗菌スペクトルの拡大など種々の方面より研究、改良が加えられている現状である。一時、耐性、重篤なショックなどの副作用および他の抗生物質の発達に伴い、あまり使用されなかった penicillin に関しても、1957年 J.C. Sheehan により合成 penicillin が合成されて以来、種々の新誘導体が研究され、内服使用可能で高血中濃度が得られ、ショックも少ないとより臨床に広く用いられるようになってきた。

しかし從来、天然または合成の penicillin でグラム(-)桿菌に強い活性をもち、臨床的に好結果を示すものはなかったが、近年 Doyle 一派が半合成した新しい D(-)-α-Aminobenzyl penicillin [6-(D(-)-α-amino-phenylacetamide] penicillanic acid (Viccillin) は広領域の抗菌スペクトルを有する抗生物質といわれ、グラム陽性菌のみならず、グラム陰性菌にも有効な誘導体であるといわれ注目されている。われわれは本学口腔外科外来患者のうち、感染症および術後感染防止に Viccillin を使用し、以下の成績を得たので報告する。

1. 使用症例ならびに方法

大阪大学歯学部口腔外科外来患者のうち、口腔感染症ならびに手術後感染防止に使用した。その症例は 13~65 才までの 26 名で、男子 17 名、女子 9 名であり、

内訳は表1のごとくである。投与法はまず P-test 行ない、特異反応陰性を確認の上 1 日 1,000~1,500 mg を 4~6 回に分服せしめた。

表 1

膿瘍形成	9例	唾石症	1例
智齒周囲炎	5例	蜂窩織炎	1例
放線菌症	2例	歯肉腫	1例
上頸洞炎	1例	術後囊胞	1例
歯槽骨炎	2例		
リンパ節炎	3例	計	26例

2. 効果判定

一般に薬剤の効果判定は、おのおのの疾患の性状およびそれらの投与前後の経過ならびに処置、患者の全身状態、併用薬剤などを総合判断しなければならないものであり、きわめて複雑かつ困難なものである。今回は一応下記の基準に従い行なった。疼痛、腫脹、発赤、牙関緊急、リンパ節の腫脹および解熱などの点をチェックし、投与後 3 日以内に各症状の改善されたものを著効(++)、6 日以内に症状の改善されたものを有効(+)、症状改善に 1 週間以上を要したもの、および他の薬剤の投与などを必要としたものを無効(−)とした。ただし放線菌症の場合は表2のごとく治療開始後、それまでの経過および症状と比較し、症状の改善されたものを有効としている。

3. 使用成績

使用成績は表2のごとくで、著効 5 例 (19.2%)、有効 16 例 (61.5%)、無効 4 例 (15.4%) であった。なお表2には使用量、処置および併用薬剤も付記した。次に 2, 3 の症例について詳細に記載する。

<症例 2> 芳○詔○、23 才、♂

初診：昭和42年6月9日

* 大阪大学歯学部第二口腔外科学教室

(主任教授：川勝賢作)

** 大阪大学歯学部第一口腔外科学教室

(主任教授：永井 崑)

表 2

年令	性別	部 位	臨床診断	処 置	総量	併用薬剤	判定	備 考
1	61	♀ 左側頸部	口腔底蜂窩織炎	切 開	11(g)	カイモラール 6錠分3 6日	+	
2	23	♂ 左側頰部	放線菌症	切 開	10.5	タンデリール 6錠分3 3日	+	
3	35	♀ 65部	下頸周囲膿瘍	切 開	4	ブチロン1g 屯用	+	
4	61	♂ 8	智歯周囲炎	抜 歯	4	タンデリール 6錠分3 2日	+	
5	57	♂ 右側上顎臼歯部	術後囊胞	摘 出	4		+	
6	37	♂ 右側頸下部	骨膜下膿瘍	切 開	2		+	
7	24	♂ 8部	放線菌症	切 開	36.5	ビタミン タンデリール 6錠分3 4日	+	1.5g/日で19日間 は後1.0g/日で8日間
8	22	♀ 67部	骨膜下膿瘍	切 開	2	新グレラン錠2錠 キモチーム 6錠分3 2日	+	
9	63	♂ 5部	骨膜下膿瘍	切開, 抜歯	2	ポンタール 1g 分3 2日	+	
10	23	♀ 7部	歯槽骨炎	搔 滾	5	BM 含 3剤	+	
11	13	♂ 右側頸下部	リンパ節炎	切 開	3		+	
12	23	♂ 左側頸部	頸部膿瘍	切 開	7		-	膿から放線菌は検出されず
13	45	♀ 11部	歯肉腫	摘 出	2	アドナ 30mg	+	
14	24	♂ 8部	智歯周囲炎	抜 歯	3	タンデリール 6錠分3 3日	+	
15	25	♀ 左側頸下部	リンパ節炎	切 開	2	ポンタール 2錠分2 2日	不明	眩暈を認む
16	27	♂ 8部	智歯周囲炎	抜 歙	2	新グレラン錠2錠 2回	+	
17	59	♂ 左側頸下部	リンパ節炎		15	カイモラール 6錠分3 12日	-	
18	25	♂ 8部	智歯周囲炎	抜 歯	2	ブチロン1g 屯用		
19	41	♂ 左側上顎臼歯部	頸部膿瘍	切 開	15	カイモラール 6錠分3 2日	-	軟 便
20	34	♂ 8部	智歯周囲炎	抜 歯	2	カイモラール 6錠分3 2日	+	
21	34	♂ 上顎洞	歯性上顎洞炎		9.5	レフトーゼ 6錠分3 8日	+	急性発作予防のため
22	27	♂ 8部	拔歯後感染	切 開	29	全ての抗生素質 抗腫脹剤	+	長期経過を経て治癒
23	29	♀ 5部	骨膜下膿瘍	切 開	4	タンデリール 6錠分3 3日	+	
24	65	♀ 右頸部	唾石症	排泄管への 局所洗浄	6	タンデリール 6錠分3 3日	-	唾石の自然流出
25	24	♀ 口 蓋	口蓋扁桃 周囲膿瘍	切 開	6	BM 含 3剤	+	
26	21	♂ 6	頸部膿瘍	切 開	10.5	BM 含 3剤 カイモラール 6錠分3 3日 新グレラン錠3錠	+	

主訴：左側頬部硬結性腫脹

現病歴：約3カ月前に¹⁶部の歯肉に有痛性腫脹を認めたが、そのまま放置した。症状は以後やや軽減した。2カ月前に再度腫脹し、某歯科医に受診、切開処置を受けるも疼痛は消退したが腫脹は消退せず、その後¹⁶の保存治療を受けた。切開後6日目よりさらに腫脹は増大し硬結を生じるためにアクロマイシン1,000mg/日内服した。その間腫脹および硬結はやや消退するも、内服中止後再び硬結性腫脹をきたした。

現症：左側上顎部（眼窩下部）に約4×4cmの板状硬結性腫脹を認め、圧痛あるも発赤はなく所属リンパ節⁺⁺は示指頭大に腫脹し軽度の圧痛を認めた。打診痛は⁺⁺567で、開口度は約1横指であった。

診断：左側頬部放線菌症

経過：Viccillinを1,500mg/日投与および赤外線照射により経過を観察した。すなわち本年6月20日より250mgを4時間ごとに投与、4日後切開により排膿せしめる。その膿中に菌塊様のものを認めたが、細菌検査（検鏡、培養）の結果、細菌を認めなかった。本年6月27日腫脹の中心部が発赤し軽度の波動を認めた。しかし手首および肘関節部に2mm径の発赤斑が多数現われたのでViccillinの副作用と考え、一時投与を中止した。4日後に再投与を始め、7月10日には硬結および腫脹は消退した。

〈症例19〉 ○教○、41才、♂

初診：昭和42年3月21日

主訴：76部の腫脹および開口障害

現病歴：来院4日前に某歯科医にて⁷¹部の支台形成のため麻酔を行ない、2~3時間後より開口障害を生じた。2日間抗生素質を投与するも開口障害は回復せず来院した。

現症：76部の歯肉に発赤、自発痛、刺激痛ならびに圧痛を認め、同時に牙關緊急（開口度は0.3cm）も認められた。しかし76には異常は認められなかった。76に相当する外頬部には著しい硬結を触れ、所属リンパ節は大豆大に腫脹し、可動性で圧痛がある。⁷¹部齶頬移行部より穿刺にて濃厚な黄色膿を約1.5ml吸引した。87部の齶頬移行部に約1cmの切開処置を行なった。

診断名：76頬部膿瘍

経過：Viccillin1,000mg/日とChymoral6錠を3回に分服させ、4日後開口度0.9cmに回復するも腫脹はほとんど変化がなかったが、7日目には1.3cmの開口状態で腫脹もかなり消退し、所属リンパ節は小豆大の大きさで圧痛はほとんど消失した。11日目には自覚的

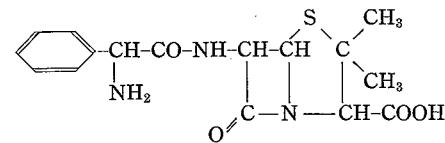
ならびに他覚的症状とも、まったく消失した。以後転医させた。

4. 副作用

本剤は他の合成ペニシリン剤と同じくアレルギー性反応を有する危険性があるとされているが、26例中24例においては何ら副作用と考えるべき症状はみられず、ただ2例において下記の副作用様症状を認めた。すなわち1症例は投与開始後7日目に手足に2mm直径の紅斑を多数生じたものであり、内服中止により消失した。他の1例は、内服約40分後に眩暈が起り、内服中の2日間継続した。そのため本剤2日間(2,000mg)で中止し、他剤に切替えたところ眩暈は認められなくなった。

5. 考察

ViccillinはDoyleらにより合成された合成ペニシリソード、その構造式は以下のとくである。



水に対しては不溶解性で、酸に安定である。本剤は広範なグラム陽性菌および陰性菌に強い抵抗力を有しております。Broad spectrum penicillinといわれている。また酸に対して安定なため経口投与が可能であり、また吸収が良好で1~2時間で最高血中濃度を示し、他のペニシリソードと同量の経口投与より高いとされている。1961年RolinsonらはStaphylococcus, Streptococcus, Diplococcus pneumoniae, Hemophilus influenzae, Escherichia coli, Aerobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Shigella, Salmonella, Proteusに対して著しい抗菌力を示すことを認めている。

一方 penicillin Gに高度耐性を示す菌株に対しても感受性を示すものがあるが、他の合成 penicillinに比較すれば、penicillin G耐性菌に対する効果は劣るようである。しかしShigella, E. coliらは、他の抗生素質(SM, CP, TCなど)の重耐性株にも本剤は抗菌作用を示すと報告している。吸収および排泄に関してはE.T. Knudsenらによると、その血中濃度は投与後30分で1,000mg1回投与、750mgおよび250mgのどの投与量でも1mcg/mlとなり、2時間後に最高の7mcg/mlで6時間後には0.5mcg/mlとなる。最少250mg投与では最高濃度は1時間後で2mcg/mlである。また

副作用はほとんどなく、ラット 500 mg/kg で 1~2 週間経口投与でも何らの異常を認めていない。

われわれは以上のことより 1,000~1,500 mg を 4~6 回に分服せしめたが、26 例中 2 例に、本剤投与によると思われる蕁麻疹の発現および眩暈の副作用を認めているが、胃腸障害などの消化管系の副作用は認められなかった。なお本剤の使用にあたっては P-test を行なったが、全 26 例はいずれも陰性であったことを付記する。

以上のことより、口腔感染症の治療ならびに常に細菌の感染にさらされている口腔領域における手術後の感染予防に抗生素質を用うる場合、広範囲スペクトルのものがもっとも望ましい。この点、従来の penicillin に比べ副作用がきわめて少なく、かつグラム陽性菌をはじめグラム陰性菌にも抗菌性を示す Broad spectrum penicillin の本剤は、臨床的に注目すべきものである。しかし本剤使用にあたり、本剤が penicillin G 耐性菌にはあまり抗菌性を示さないこと、および副作用がきわめて少ないとはいえる、やはり蕁麻疹などの副作用が penicillin 過敏の患者に発生した報告もあり、また P-test 陰性のものにおいても発生するため、使用にあたっては P-test はもちろんのこと、薬物アレルギーなど問診に十分注意

すべきである。

結語

本学口腔外科外来のうち各種感染症および術後感染予防のため、26 例に aminobenzyl penicillin (Viccillin) を使用し、21 例にかなりの効果を認めた。5 例のものには、みるべき効果は認められなかった。副作用としては 26 例中 2 例に蕁麻疹および眩暈がみられたが投与中止により消失した。本剤は広範囲の抗菌スペクトルを有し、経口投与でよく吸収され、毒性がきわめて低いもので、口腔領域の感染症、ならびに術後感染予防に使用して十分価値あるものといえる。

文献

- 1) Rolinson, G.N. & S. Stevens: Microbiological studies on a new broad-spectrum penicillin "Penbritin." *Brit. Med. J.*, 5246: 191~196, July 22, 1961.
- 2) Knudsen, E.T., T.G. Rolinson & S. Stevens: Absorption and excretion of "Penbritin." *Brit. Med. J.*, 5246: 198~200, July 22, 1961.
- 3) 合成ペニシリン "ビックシリル Viccillin" 臨床文献集.

*

*

*