

鷄胎呼吸氣道の 組織化學的 研究

河 在 清
(釜山大·文理大)

Histochemistry of the Developing Chick Respiratory Tract

Jae Chung Hah
(Dept. of Biology, Pusan National University)

(1972. 11. 27 수리)

SUMMARY

A histochemical study of the respiratory tract in developing chick was done to demonstrate PAS-positive materials, ribonucleic acid, phospholipid, and alkaline phosphatase activity. Following results are obtained:

1. The alkaline phosphatase activity was found to be high before the appearance of cartilage in mesenchyme surrounding the tracheal epithelium. The enzyme activity declined after the cartilage formation, followed by the restricted activity in epithelium in the postembryonic stage.

2. A moderate positive reaction of ribonucleic acid was found in the cytoplasm of the epithelium and undifferentiated mesenchyme. As the cartilage grew differentiated the reaction of ribonucleic acid was found to disappear in the mesenchyme surrounding the epithelium, but the cytoplasm of the glands showed a moderate positive reaction.

3. Goblet cells of the mucosa and glandular cells showed highly positive reaction, but the basement membrane exhibited slightly positive PAS-reaction.

4. Epithelial cells of the mucosa showed a weak to moderate reaction. However, the epithelia of bronchioles and alveoli in the differentiating period and glandular cells showed a strong positive reaction in Baker's hematein test.

緒 論

Gomori (1939)에 의하여 alkaline phosphatase의 組織化學的 研究가 보고된 이래 각종 動物에 관한 組織化學的 研究가 다수 이루어 졌으나 鷄胎發生에 즈음

하여 일어나는 組織化學的 變化에 대한 研究는 그다지 많지 않다.

Tymms (1963)는 일반鳥類의 氣管의 구조와 발달에 관한 研究에서 氣管上皮 주위의 間充織에 alkaline phosphatase 活性을 보고한 바 있으며 Spicer and

Meyer(1960)는 흰쥐, 모르핀드, 토끼 등의 呼吸氣道粘膜 杯狀細胞와 喉頭 및 氣管腺 分泌物의 粘液多糖類에 대하여 比較研究한 바 있다.

Rolando 等 (1963)은 사람, 원숭이, 양, 돼지, 개, 흰쥐, 모르핀드 등의 氣管粘膜 杯狀細胞와 氣管 및 氣管支腺에 대한 PAS 反應을 組織化學적으로 비교 관찰하여 杯狀細胞는 사람과 여러 動物에서 PAS 陽性物質을 함유하며 氣管 및 氣管支腺은 漿液細胞에서는 陰性反應을 보이거나 粘液細胞는 PAS 陽性物質을 함유한다고 하였다. Hinsch(1965, 1966)는 鷄發生期 氣管 및 食道는 形態의變化에 따라 核酸分布와 alkaline phosphatase 活性部位가 변한다고 하였으며 alkaline phosphatase 는 粘液의 合成이나 分泌作用에 관여하지 않으나 acid phosphatase 는 分泌作用에 관여한다고 하였다. 조등(1970)은 닭의 呼吸氣道에서, 신(1970)은 생쥐 및 수종의 哺乳動物에 있어서 呼吸氣道粘膜의 alkaline phosphatase, 核酸, 酸性粘液多糖類 및 中性粘液多糖類의 分布를 組織化學적으로 관찰한 바 있다.

著者は 鷄胎 各種 臟器의 組織化學的 研究의 一環으로 鷄胎喉頭, 氣管, 氣管支, 細氣管支 및 肺胞의 發生과 分化중에 일어나는 alkaline phosphatase 活性의 分布와 RNA, PAS 陽性物質 및 燐脂質의 消長을 鷄胎4日胚에서 發生期 전반에 걸쳐 관찰한 結果를 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

本研究에 사용한 動物은 무게 55~60g 되는 白色레그혼의 種卵을 孵化시켜 얻은 鷄胎이며 第4日胚에서 20日胚까지의 殼內雛를 24時間 간격으로 犧牲시켜 發生初期에는 鷄胎全體를, 10日胚 이후에는 喉頭, 氣管, 氣管支 및 肺의 일정부위를 절취하여 사용하였다. alkaline phosphatase 를 위하여는 85% 冷에틸알코올에 固定한 후 paraffin(m.p. 46°—48°C)에 包埋하여 8 μ 切片을 만들었으며 酵素檢出을 위한 基質로는 Na β -glycerophosphate 를 사용하여 pH 9.4, 37°C에서 3~4時間 浸漬한 후 Gomori 改良法(1952)에 의하여 酵素活性를 결정하였다. RNA 의 檢索은 Carnoy 液에 固定후 Brachet 法에 의하여 Unna 液으로 染色하였으며 核酸 除去를 위하여 Erickson, Sax et Ogur 法을 병용하였다. PAS 陽性物質은 순수한 에틸알코올에 固定후 MacManus 法으로 증명하였다. 燐脂質의 檢索은 gelatin 에 包埋한 후 凍結切片을 제작하여 Baker 法과 그 對照試驗으로 pyridine 抽出試驗을 병

용하였다.

結 果

1. 喉 頭

4日胚에서 喉頭는 食道와 구분되어 食道腹側に 관찰되었으며 單層의 喉頭上皮는 間充織으로 둘러싸여 있었다. 10日胚에서 처음으로 喉頭軟骨이 관찰되었고 14日胚에서 偽重層纖毛上皮가 나타나기 시작하여 喉頭는 크기가 증가되면서 18日胚에서는 喉頭腺이 관찰되었다 alkaline phosphatase 活性은 5日胚의 喉頭上皮 주위에 농축하기 시작한 間充織에 나타나서 점차 강해졌으며 軟骨形成전에 上皮를 둘러싸고 있는 間充織에 고도의 活性을 보였다가 軟骨形成후 反應은 감소되고 鷄胎後期에는 上皮에만 alkaline phosphatase 가 관찰되었다. RNA 는 5日胚 이후의 粘膜炎에 약 또는 중등도의 陽性反應을 보였으며 7日胚 이후의 間充織에도 陽性反應이 나타나 軟骨形成期에는 비교적 강한 陽性反應을 보였다가 그후 反應은 저하되었다. 喉頭腺形成에 따라 腺細胞에도 비교적 강한 陽性反應이 관찰되었다. PAS 陽性物質은 發生초부터 基底膜에 미약한 陽性反應을 보였으나 上皮에는 PAS 陽性反應을 거의 관찰할 수 없었으며 다만 喉頭腺이 分化된 뒤의 腺細胞와 杯狀細胞에 反應이 비교적 강한 PAS 陽性物質이 관찰되었다.

燐脂質은 發生초의 上皮에는 미약한 陽性反應이 관찰되었으나 鷄胎 후기의 腺細胞와 粘膜炎에는 비교적 강한 褐色反應을 보였다.

2. 氣管 및 氣管支

氣管 및 氣管支는 4日胚의 食道腹側に 관찰되었으며 5日胚의 氣管 및 氣管支上皮 주위의 間充織은 농축되었고 11日胚에서 최초의 軟骨輪이 관찰되었다. 15日胚에 偽重層纖毛圓柱上皮가 출현하기 시작하였으며 19日胚에 氣管 및 氣管支腺이 分化되었다.

alkaline phosphatase 活性은 5日胚의 氣管 및 氣管支上皮 주위에 밀집된 間充織에 출현하여 점차 強陽性을 보였다가 軟骨形成 이후에는 活性은 저하되어 發生 후기에는 上皮 基底層과 腺細胞에 국한하여 관찰되었다. RNA 는 6日胚 이후의 上皮에 약 또는 중등도의 陽性反應을 보였으며 7日胚의 間充織에도 陽性反應이 관찰되고 軟骨形成期에는 비교적 강한 陽性反應을 보였다가 그후 褐色反應은 점차 저하되었다. 氣管 및 氣管支腺의 형성과 함께 腺細胞에도 비교적 강한 陽性反

Table 4. Distribution of phospholipid in the developing chick respiratory tract

| Regions | Tissues | Date | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | |
|-----------------------|------------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| Larynx | Epithelium | | -- | -- | -- | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | ++ | |
| | Gland | | | | | | | | | | | | | | | | + | ++ | ++ | |
| | Mesenchyme | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | |
| Trachea & bronchi | Epithelium | | -- | -- | -- | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | |
| | Gland | | | | | | | | | | | | | | | | | ++ | ++ | |
| | Mesenchyme | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | |
| Bronchioles & alveoli | Epithelium | | -- | -- | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | + |
| | Mesenchyme | | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | |

腺形成과 함께 腺細胞와 粘膜炎에는 강한 陽性呈色反應을 보였다.

3. 細氣管支 및 肺胞

4日胚의 肺域에는 氣管支와 細氣管支단이 間充織內에 관찰되었으며 그후 細氣管支는 점차 分岐되어 發生 후기에 이르러 비로소 肺胞가 관찰되었다.

alkaline phosphatase 活性은 細氣管支上皮를 둘러싼 間充織에 비교적 약한 反應이 관찰되었으나 肺胞의 分化와 함께 活性은 소실되었다. RNA는 7日胚의 細氣管支上皮에 미약한 陽性反應이 출현하여 그 후 비교적 강한 呈色反應을 보였다가 肺胞分化에 따라 反應은 저하되어 弱陽性을 나타냈다. PAS 陽性物質은 基底膜의 미약한 陽性反應을 제외하고는 시종 陰性反應을 보였다. 淸脂質은 6日胚의 細氣管支上皮에 미약한 陽性反應이 관찰되었으며 그후 점차 강해져 發生中期에는 고도의 陽性反應을 나타내었다가 肺胞의 충분한 分化와 함께 呈色反應은 저하되었다.

考 察

Gomori(1939)에 의해 alkaline phosphatase의 組織化學的 檢索法이 보고되자 Roche(1950)는 phosphatase를 그 작용 pH에 따라서 鹽基性, 中性, 酸性 등으로 분류하였으나 動物組織에 있어서는 아직 中性 phosphatase는 발견된 바 없다. 鷄胎喉頭 氣管 및 氣管支에 있어서의 alkaline phosphatase의 소장을 보던 發生초에 이들 氣道上皮 바로 밑의 間充織內에 고도의 酵素活性을 나타내었다가 軟骨形成과 上皮組織의 分化와 함께 反應은 감소되어 鷄胎後期에 있어서 alkaline phosphatase는 纖毛上皮와 腺 周圍 組織에만 국한 되었으며 細氣管支 및 肺胞 등의 呼吸部에 있어서는

發生초기에 細氣管支上皮 주위의 間充織內에 중등도의 活性이 출현하였다가 肺胞分化와 함께 alkaline phosphatase는 소실되었다. Hirsch(1965)는 鷄胎의 食道 및 氣管의 組織化學的 研究에서 alkaline phosphatase의 局在位置의 이동과 소장을 관찰하였으며 Moog(1950, 1951)도 發生중의 alkaline phosphatase의 局在位置의 변화를 鷄胎와 생쥐의 腸管에서 관찰한 바 있다. 이들은 組織內酵素의 局在部位의 변화와 酵素活性의 소장은 細胞增殖과 組織分化 또는 石灰化作用 등의 生化學的 變化的 關係가 있다고 하였는데 이와같은 사실은 Serokin等(1959)에 의하여 發生中의 흰쥐와 모르드트의 肺에서, Prakash(1961)에 의하여 송어(steel head trout)의 消化管에서, 河(1968)는 鷄胎消化管에서 각각 관찰한 바 있다. 이상의 보고된 사실과 저자의 관찰결과로 보아 發生 초기에 呼吸氣道上皮 바로 밑의 間充織에 酵素活性이 출현하였다가 組織分化와 함께 活性像이 소실됨은 alkaline phosphatase와 組織分化와의 關係를 시사하며 氣道上皮의 分化후 酵素活性이 上皮의 基底層에 국한함은 alkaline phosphatase와 細胞增殖과의 상호關係를 표시하는 것이라고 생각 된다.

RNA 陽性物質은 呼吸氣道에 있어서의 alkaline phosphatase의 출현기와 거의 일치하여 출현하였으며 氣道上皮의 分化와 함께 間充織의 pyronin 好性은 소실되는데 반하여 上皮의 反應은 점차 강해졌다. 한편 發生 중기의 細氣管支上皮的 pyronin 好性은 중등도의 反應을 보였다가 肺胞의 分化와 함께 점점 되었으며 喉頭腔, 氣管 및 氣管支腺의 형성으로 RNA 陽性物質은 腺細胞에 비교적 강하게 나타났다.

Bracket(1950)는 다수 動物의 여러組織에 있어서의 pentose 核酸의 定量과 組織細胞의 pyronin에 의한

染色性を 평형적으로 研究하여 RNA 含量과 pyronin 好性과는 평형관계에 있음을 밝혔으며 Lison(1961)은 RNA 檢出을 위한 染色과정 중에 있어서 ribonuclease 對照試驗을 병용하면 pyronin 染色은 가장 만족스러운 것이라고 하였다. Allenspach and Hamilton (1962)은 發生 초기에 있어서 食道上皮下의 間充織에 alkaline phosphatase 活性을 관찰할 수 있는 것과 동일한 부위에 강한 pyronin 好性을 관찰하였으며 上皮에는 중등도의 鹽基好性을 관찰하였다.

Hinsch(1966)는 azure B의 染色으로 鷄胎 發生후기 및 成鷄의 食道에서 上皮의 基底層에 강한 鹽基好性을 관찰하고 細胞分裂이 旺盛한 基底層에 있어서 RNA와 alkaline phosphatase의 局在의 평형을 관찰할 수 있음은 上皮基底層에 있어서 蛋白質合成의 가능성을 시사하는 것이라고 하였다.

이상 논의한 결과와 저자의 실험결과에서 추측컨대 呼吸氣道에 있어서 RNA의 출현기, 局在性 및 소장이 alkaline phosphatase의 것과 일치한다는 것은 이들이 蛋白質合成과 細胞增殖에 관계가 있을 것으로 사료된다.

PAS 陽性物質은 15日胚 이후의 呼吸氣道粘膜炎의 杯狀細胞에 중등도 이상의 陽性反應을 관찰할 수 있었으며 喉頭腺 氣管 및 氣管支腺의 分化된 19日胚 이후의 腺腔內와 上皮表面의 遊離緣에도 비교적 강한 PAS 陽性反應物質이 관찰되었다.

Meyer(1945)에 의하면 粘液分泌細胞의 分泌物는 酸性粘液多糖類이거나 酸基를 갖지 않는 中性粘液多糖類이며 저자는 toluidine blue에 異染色인데 대하여 후자는 陰性이며 mucicarmine 染色에 전자는 強染되나 후자는 染色되지 않는다고 하였다. Sorokin(1965)은 주머니쥐의 氣管支腺의 粘液細胞는 粘液蛋白質이나 粘液多糖類를 함유하고 있으므로 PAS 陽性反應을 낸다고 하였으며 Krause(1970)는 가지두더쥐(echidna)의 腸粘膜炎 杯狀細胞는 PAS에 強한 陽性反應임을 관찰하였다. Rolando 等 (1963)은 사람의 氣管支腺 粘液細胞는 PAS 陽性反應을 보이나 粘液性 顆粒이 없는 漿液細胞는 反應이 없다고 하였으며 哺乳動物의 氣管 및 氣管支腺은 형태적으로 粘液細胞와 漿液細胞를 구별할 수 없으나 腺細胞는 PAS 陽性物質을 함유한다고 하였다. 신(1970)은 흰쥐, 모르핀드, 토끼, 고양 및 개에서, 조 등(1970)은 닭의 呼吸氣道에서 杯狀細胞와 腺細胞는 alcian blue 및 PAS 反應에 중등도 이상의 강한 陽性反應을 나타내는 것을 관찰하였다.

燐脂質은 發生초에는 氣道上皮에 약한 陽性反應을 보였으나 鷄胎 후기에는 腺分化와 함께 중등도의 呈色反應을 관찰할 수 있었으며 細氣管支上皮에는 鷄胎 중기에 黑紫色의 高度反應을 보였다가 肺胞의 分化에 따라 呈色反應은 점차 감소되었다. Baker(1947)는 組織을 포르몰-갈슘 混合液에 고정하여 칼슘이온으로 燐脂質의 이동을 막고 하였으며 酸性 hematein에 의한 특이성이 높은 燐脂質의 檢出法을 발달시켰다. 그는 酸性 hematein에 대하여 陽性으로 反應하는 鹵素의 蛋白質을 燐脂質에서 구별하기 위하여 pyridine 抽出의 對照試驗을 행하였다. Melcer(1943)는 皮脂腺에 alkaline phosphatase 活性이 높으며 皮脂腺에서 皮脂가 될 脂質이 형성될 경우 皮脂腺細胞內의 炭水化合物이 脂質로 전환된다고 하였다. de Duve(1955)는 燐脂質蛋白質으로 構成되어 있는 lysosome 內에 alkaline phosphatase가 존재하는 것은 alkaline phosphatase가 燐脂質代謝에 관여하기 때문이라고 추론하였다.

이상의 성격을 종합하면 alkaline phosphatase는 呼吸氣道の 基底層에 있어서 RNA와 局在의 平行을 이루었으며 腺形成에 즈음하여 alkaline phosphatase의 분포는 RNA 뿐 아니라 燐脂質의 것과도 일치하였다. 腺分化후에는 燐脂質의 분포는 陽性物質과 거의 일치함을 관찰할 수 있었다.

摘 要

저자는 白色레그혼의 種卵을 孵化시켜 얻은 鷄胎呼吸氣道の alkaline phosphatase, RNA, PAS 陽性物質 및 燐脂質의 분포와 소장을 組織化學적으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. alkaline phosphatase는 軟骨形成에 앞서 氣道上皮 주위의 間充織에 고도의 活性을 나타냈으며 軟骨形成後에는 反應은 감소되었고 胎生後期에는 phosphatase 活性은 上皮에만 관찰되었다.

2. RNA는 胎生초에 氣道上的 細胞質內에 陽性反應을 보였으며 軟骨形成에 앞서 上皮주위에 밀집하기 시작한 間充織에도 점차 陽性을 나타냈으나 軟骨形成후에는 이 反應은 감소하였고 鷄胎末期에 腺形成에 따라 腺上皮의 細胞質內에도 陽性 呈色反應을 보였다.

3. PAS 陽性物質은 基底膜, 杯狀細胞 및 腺形成後의 腺內腔을 제외하고는 陰性反應을 나타냈으며 燐脂質은 發生期の 肺域내의 細氣管支上皮와 腺胞를 제외하고는 비교적 약한 呈色反應이나 陰性을 보였다.

參 考 文 獻

- Allenspach, A.L. and H.L. Hamilton, 1962. Histochemistry of the esophagus in the developing chick. *J. Morph.* **111** : 321.
- Baker, J.R., 1947. *Quart. J. Microsc. Sci.* **88** : 468.
- Brachet, J., 1950. Chemical Embryology. In: Microscopic histochemistry (Okamoto, K., M. Ueda, R. Maeda and A. Mizutani ed. Igaku Shoin, Tokyo, 3rd. Edit. 171~174.
- De Duve, C., B.C. Pressman, R.J. Cianetto, R. Wattiaux, and F. Appleman, 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* **60** : 604.
- Gomori, G., 1939. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **42** : 23.
- Gomori, G., 1952. Microscopic Histochemistry-Principle and Practice. The University of Chicago Press, Chicago.
- 河在清, 1968. 鷄胎消化管的組織化學的研究. 釜山大文理大學報. **11** : 283~302.
- Hinsch, G.W. and S.K. Buxbaum, 1965. Histochemistry of the developing chick esophagus and trachea. I. Alkaline phosphatase. *J. Morph.* **118** : 109-116.
- Hinsch, G.W., 1966. Histochemistry of the chick esophagus and trachea. II. Enzymes, nucleic acids, proteins, carbohydrates and fats. *J. Morph.* **119** : 327-340.
- 조운복, 박준기, 노국룡, 박해춘, 1970. 닭 호흡기도점막의 조직화학적 연구. 釜山醫大雜誌. **10** : 79-87.
- Krause, W. J., 1970. Brunner's glands of the echidna. *Anat. Rec.* **167** : 473-480.
- Lison, L. (今泉正譯), 1961. 組織化學及び細胞化學, 理論と方法. 白水社發行
- Melczer, N. and S. Deme, 1943. Beiträge zur Tätigkeit der menschlichen Talgdrüsen. II. Rolle und Formveränderungen des Golgi-Apparates der Talgproduktion. *Arch. Dermat. u. Syphils.* **183** : 388.
- Moog, F., 1950. The functional differentiation of the small intestine. I. The accumulation of alkaline phosphomonoesterase in the duodenum of the chick. *J. Exp. Zool.* **115** : 109-130.
- Moog, F., 1951. The functional differentiation of the small intestine. II. The differentiation of alkaline phosphomonoesterase in the duodenum of the mouse. *J. Exp. Zool.* **118** : 187-207.
- Prakash, A., 1961. Distribution and differentiation of alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of steel head trout. *J. Exp. Zool.* **146** : 237-251.
- Rolando V. Goco, Milton D. Kress and Otto C. Brantigan, 1963. Comparison of mucous glands in the tracheobronchial tree of man and animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **106** : 555-571.
- Serokin, S., H.A. Podykula and E. Herman. 1959. Comparative histochemical patterns in developing mammalian lungs *Dev. Biol.* **1** : 125-151.
- 신영기, 1970. 호흡기도점막의 비조직화학적 연구, 결핵 및 호흡기질환. **7** : 33-45.
- Sorokin, S.P., 1965. On the cytology and cytochemistry of the opossum's bronchial glands. *Amer. J. Anat.* **117** : 311-338.
- Spicer, S.S. and D.B. Meyer, 1960. Histochemical differentiation of acid mucopolysaccharides by means of combined aldehyde fuchsin-alcian-blue staining. *Amer. J. Clin. Path.* **33** : 453-460.
- Tymms, A.O.V., 1963. The syrinx of the common fowl, its structure and development. *Proc. Roy. Soc. Victoria.* **25** : 286-306.

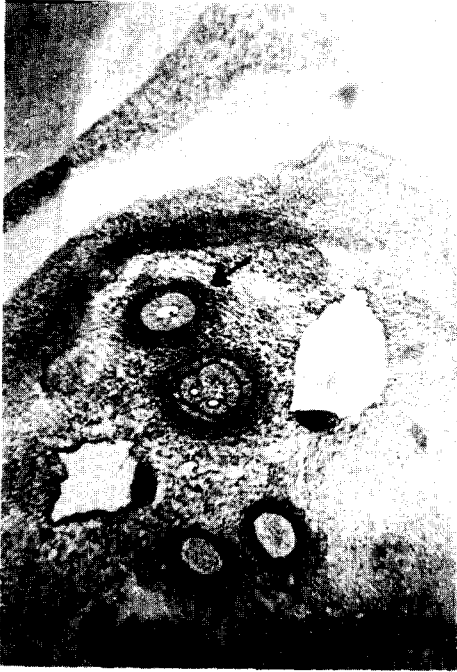


Fig. 1. Trachea of 6-day chick embryo (arrow). Alkaline phosphatase. X120.



Fig. 2. Larynx of 18-day chick embryo. Alkaline phosphatase. X120.

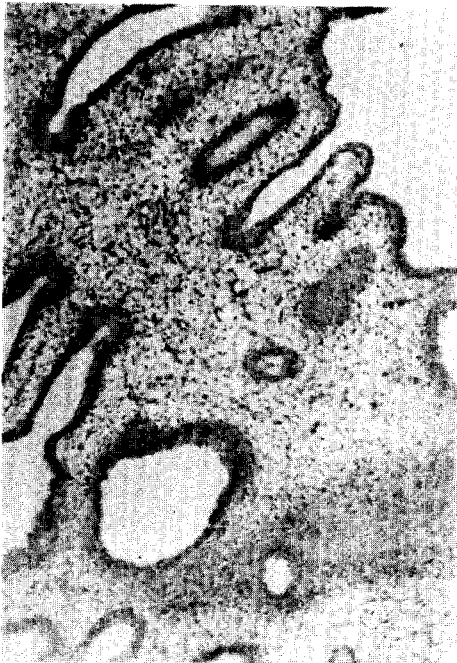


Fig. 3. Lung of 11-day chick embryo. RNA. X120.

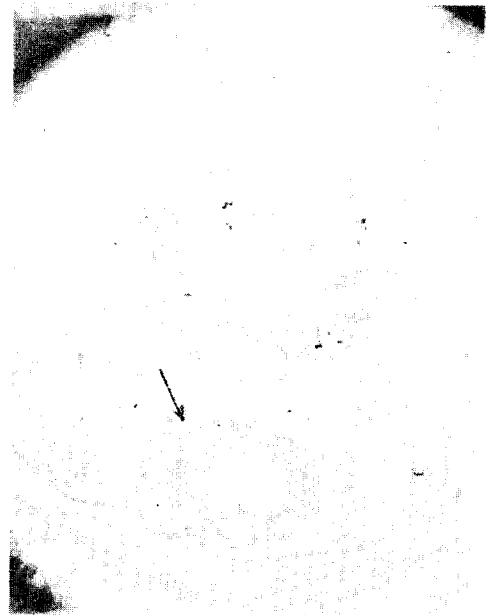


Fig. 4. Trachea of 11-day chick embryo (arrow). RNA. X120.



Fig. 5. Larynx of 20-day chick embryo. PAS stain. X120.



Fig. 6. Lung of 9-day chick embryo. Phospholipid. X120.

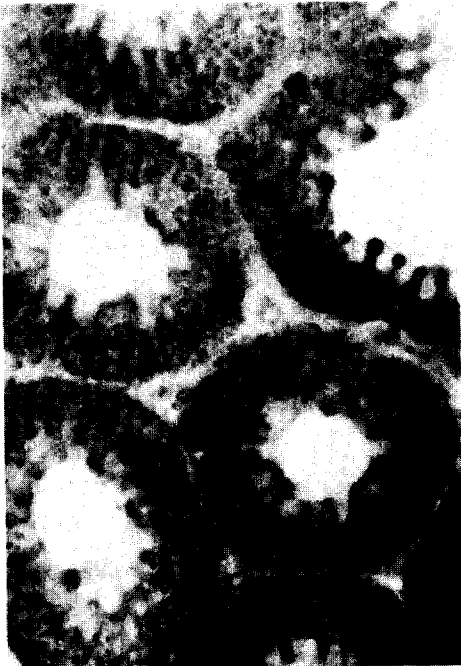


Fig. 7. Lung of 16-day chick embryo. Phospholipid. X120.



Fig. 8. Trachea of 20-day chick embryo. Phospholipid. X120.