

マウス消化管上皮細胞における 硫酸化粘液合成に関する組織化学的研究

河 原 勇

信州大学医学部第1解剖学教室

(主任: 永田 哲士教授)

Histochemical Studies on Sulfomucin Synthesis in the Digestive Tract of Mice

Isamu KAWAHARA

Department of Anatomy and Cell Biology, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Tetsuji NAGATA)

The synthesis and localization of sulfated glycoconjugates in the epithelial cells of the digestive tract of mouse were investigated with conventional histochemical staining methods such as AB-PAS, HID-AB, HID, AB (2.5) and AB (1.0) as well as radioautography 45 minutes, 1, 3 and 5 hours after radiosulfate $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ injection.

HID-AB, HID and AB (1.0) sequences exhibited negative or faint positive reactivity in the covering cells, gastric pit cells and isthmus cells of the stomach corpus, while radioautography demonstrated small numbers of silver grains on the same cells. HID-AB, HID and AB (1.0) sequences exhibited weak positive reactivity in the pit cell in the antrum, while strong staining occurred in the pyloric gland cells. Radioautography demonstrated weak incorporation of $^{35}\text{SO}_4$ into the covering cells, moderate incorporation into secretory granules of pit cells, and strong incorporation into pyloric gland cells. In the proximal colon, mucous cells in the upper half of the crypts demonstrated brown and blue colored reactivities with HID-AB sequence, a strong brown color with HID sequence and moderate alcinophilia with AB (1.0) sequence. In the mucous cells in the lower half of the crypts, alcinophilia with HID-AB sequence, faint reactivity with HID sequence, and a weak blue color with AB (1.0) sequence were observed. By radioautography, mucous cells in the upper half and lower half of the crypts exhibited many silver grains in the mucous droplets. No difference in the number of silver grains in the mucus between the upper half and the lower half of the crypts was observed. In the distal colon, HID-AB sequence exhibited a brown color in the goblet cells in both halves of the crypts and a blue color in the vacuolated cells. HID sequence also produced a weak brown color on the surface of the vacuolated cells, while with AB (1.0) staining, goblet cells in both halves of the crypts demonstrated alcinophilia. By radioautography, many silver grains were observed on the mucus of goblet cells in both halves of the crypts, while few silver grains were observed on the mucus of the vacuolated cells. *Shinshu Med J* 44: 17-36, 1996

(Received for publication September 6, 1995)

Key words: digestive tract, sulfomucin, radioautography

消化管, 硫酸化粘液, ラジオオートグラフィー

I 緒 言

別刷請求先: 河原 勇

〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部第1解剖

消化管における分化した上皮細胞は粘液を分泌して

おり、この分泌物は物理化学的には highly hydrated slippery gel の状態にある¹⁾。このゲルの主要な構成要素がムチンとして知られ特殊な防御機能を有している¹⁾。この分泌粘液は組織細胞化学的研究において、染色性の違いによって中性粘液と酸性粘液に分類されている²⁾。酸性粘液はさらにシアロムチン (以下 sialomucin), サルホムチン (以下 sulfomucin) と sialo-sulfomucin に細分される³⁾。Sialomucin は Alcian-blue によって sialic acid に含まれるカルボキシル基による陰イオンと結合し染色される古典的な cationic dye procedure と近年考案された sialic acid の環外構造の O-acyl substituents を染色し得る selective periodic acid Schiff based procedure⁴⁾⁻⁵⁾がある。電子顕微鏡的細胞化学的研究のためには、高電子密度を有する cationic materials を用いて複合糖質 (以下 glycoconjugates) の局在を証明する方法が開発されている⁶⁾⁷⁾。一方、sulfomucin に関してはアルシアンブルー pH2.5 (以下 ABpH2.5), アルシアンブルー pH1.0 (以下 ABpH1.0) とジアミン (以下 diamine) による染色方法が一般的に用いられており、いずれも cationic dye procedure のみである²⁾。しかしながらこれらの方法は光顕組織化学の研究において有効な手段として長く用いられている²⁾⁸⁾。アルシアンブルーによる染色は粘液の酸性度によって酸性粘液を検出する方法であり、染色液の pH を 2.5 と 1.0 に調整し用いられる⁹⁾。pH2.5 によって染色される酸性粘液は sialomucin が主で一部の sulfomucin も染色できるとされ²⁾⁹⁾、pH1.0 では sulfomucin のみが染色される²⁾。さらに高鉄ジアミン (以下 HID) 法では sulfomucin が特異的である⁵⁾⁹⁾。この特異性に着目し、HID 染色と AB pH2.5 染色を組み合わせることにより sulfomucin と sialomucin を染め分けることが可能になり、HID 染色によって sulfomucin を検出し ABpH2.5 により sialomucin のみを検出することが可能となる²⁾。これらの染色方法と違ってラジオオートグラフィー (以下 RAG) は投与される radioisotope の代謝が生化学的に十分に理解される時は非常に信頼性が高くまた有効な研究方法である¹⁰⁾。粘液分泌細胞においては³⁵SO₄による RAG を行うことによって合成される sulfomucin へ RI 物質が取り込まれることが知られている¹¹⁾。今回用いられるマウス消化管の上皮における sulfomucin の報告は、HID-AB 染色と AB-PAS 染色によって胃体部においては deep foveolar cell に、少量存在する説⁹⁾と中性粘液のみで sul-

fomucin は存在しないとする説¹²⁾がある。また幽門部では幽門腺にのみ sulfomucin が存在するとし諸家の報告は一致する⁹⁾¹²⁾。大腸においても若干の差はあるが杯細胞において sulfomucin と sialomucin が存在し特に陰窩の上半部と下半部においての粘液細胞の染色性の差が知られている¹²⁾。一方、RAG では、胃体部において low parts of all foveolae に³⁵SO₄の取り込みを認めたとする説¹³⁾と RI の標識はなかったとする説⁹⁾があるが、胃幽門部では幽門腺にのみ取り込みが確認されている⁹⁾¹³⁾。大腸においては、杯細胞に標識があり、特に遠位大腸の deep mucous cell (vacuolated cell) に little or no labeling との報告⁹⁾もあるがその後は RAG にて検討はされていない。著者は上記のごとく両説があるマウス胃および大腸での sulfomucin 産生に関して³⁵SO₄による RAG を行い、併せて組織化学染色結果と比較検討したので報告する。

II 材料と方法

A 材料

生後約 1 カ月の ddY 系雄性マウス 8 頭 (体重 20~25 g) を用いた。マウスは教室内で自家繁殖し、固型飼料 Clea CE-2 にて自由給食給水を行って飼育した。マウスの腹腔内へ生理的食塩水により 0.1 ml に希釈された Na₂³⁵SO₄ (specific activity 3,700 MBq/mM, Radiochemical Centre, Amersham, England) を体重あたり 7.4 MBq 注射した。投与 45 分、1 時間、3 時間および 5 時間後各 2 頭ずつ断頭屠殺した。屠殺後ただちに開腹し、胃体部、胃幽門部、近位大腸 (回盲部より約 4 cm distal) および遠位大腸 (肛門より約 5 cm proximal) を切り出した。胃体部と胃幽門部は胃の長軸に平行に縦断し近位大腸と遠位大腸は輪状に横断した。

B 方法

1 光学顕微鏡的組織化学染色

前述のごとく切り出した組織片は 0.1 M 磷酸緩衝液によって pH7.4 に調節された 10% ホルマリン (4°C) にて 24 時間固定した。その後通常の方法に従い、緩衝液による洗浄、上昇アルコール系列による脱水後パラフィンに包埋を行った。回転式ミクロトーム (サクラミクロトーム IVS-40D, サクラ精機, 東京) で厚さ 5 μm に薄切し、前述した 4 種類の組織を一枚ずつスライドグラス上に載せ、脱パラフィンの後以下の染色を行った。今回用いられた光学顕微鏡的染色方法は haematoxylin eosin (HE) 法, AB pH2.5-PAS 法

(Mowry と Winkler¹⁴⁾), HID - AB pH2.5法 (Spicer⁹⁾), HID 法 (Spicer⁹⁾), AB pH2.5法 (Pearse¹⁰⁾), AB pH2.5-haematoxylin eosin 法 (AB-HE), AB pH1.0法 (Lev と Spicer¹⁰⁾) であった。

特に Alcian blue による染色に際しては目的の pH に調節されていることを確認するため、染色前に染色液の pH を pH メーター (H-7SD, 堀場, 東京) により測定して確認した⁷⁾。また, ABpH2.5-HE 染色は組織の全体像を確認するため, haematoxylin (Carrazzi) 染色30秒間, eosin 染色30秒間を加えた。

2 光学顕微鏡的 RAG

上記の 5 μ m パラフィン切片のほかに以下に述べる 1 μ m の厚さの樹脂包埋切片において行った。樹脂包埋切片による RAG は銀粒子の局在の評価に際してパラフィン切片よりはるかに高い分解能を示すので、より詳細な銀粒子の局在を検討するために樹脂包埋切片による RAG も行った。すなわちマウスを断頭後、胃体部、胃幽門部、近位大腸および遠位大腸を細切し、0.1M 磷酸緩衝 2.5% グルタルアルデハイド (4°C, 4 時間) の前固定後、同緩衝 1% 4 酸化オスミウム (4°C, 1 時間) の後固定を行った。同緩衝液による洗浄後、上昇アルコール系列による脱水、エボン 812 熱重合による包埋を行った。各細切された組織は Porter-Blum 型 MT-2B ultramicrotome (Dupont-Sorvall, Newtown, U.S.A.) を用いてガラスナイフで 1 μ m の厚さに薄切した。これら 2 種類の標本はスライドガラスに載せ、パラフィン切片は脱パラ後、Konica NR-M2 乳剤による dipping 法 (Nagata¹⁷⁾) にて乳剤湿性適用を行い、4°C の暗室内で露出した。露出期間は 5 μ m のパラフィン切片では 2 週間、1 μ m のエボン切片では 3 週間行った。SDX-1 現像液による現像と定着後、5 μ m のパラフィン切片は HE にて染色し、1 μ m のエボン切片は 0.1M 磷酸緩衝 1% メチレンブルーにて染色した。観察は可視光透過型光学顕微鏡 (Olympus Vanox AHB-LB 型) にて行い写真撮影した。

III 結 果

A ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE)

胃体部: HE 染色によって、内腔側より被蓋上皮細胞、胃小窩が観察され、胃底腺では峽部、頸部、腺底が識別される (Fig. 1)。

胃幽門部: 胃体部と同様に被蓋上皮細胞によって内

腔が被われ、幽門腺は深い小窩につづき腺底部を有している (Fig. 2)。

近位大腸: 内腔表面には吸収上皮細胞とこの細胞間の所々に粘液細胞が介在している。陰窩の上半部には吸収円柱上皮が存在し、陰窩内には大型の粘液細胞とやや小型の粘液細胞が識別しうる。一般的に陰窩の上半部の粘液細胞は大型の粘液形成があり、空胞状で典型的な杯状の形態を示す。一方陰窩下半部では粘液細胞は一樣な大きさでなく小型のものも存在しているが、しばしば大型の粘液細胞は杯状を示す。陰窩下半分の粘液顆粒も上半部のそれと同じく空胞状に観察される (Fig. 3)。

遠位大腸: 内腔表面は近位大腸と同様に一層の吸収上皮細胞と杯細胞が存在する。吸収上皮細胞は陰窩内では近位大腸よりやや上方にまでしか局在しない。陰窩内の杯細胞は近位大腸と同様に上半部の粘液顆粒は空胞状であり下半部のそれより大型である。近位大腸との違いは陰窩の深さに関係なく下半部も杯細胞の形態が認められる。陰窩下方 2/3 の深い部分では、杯細胞以外では小型の粘液細胞が圧倒的に多く存在する。この細胞の粘液も HE 染色では染まらず空胞状に観察される (Fig. 4)。

B 光学顕微鏡的組織化学染色

1 Alcian blue-periodic acid Schiff 染色 (AB-PAS)

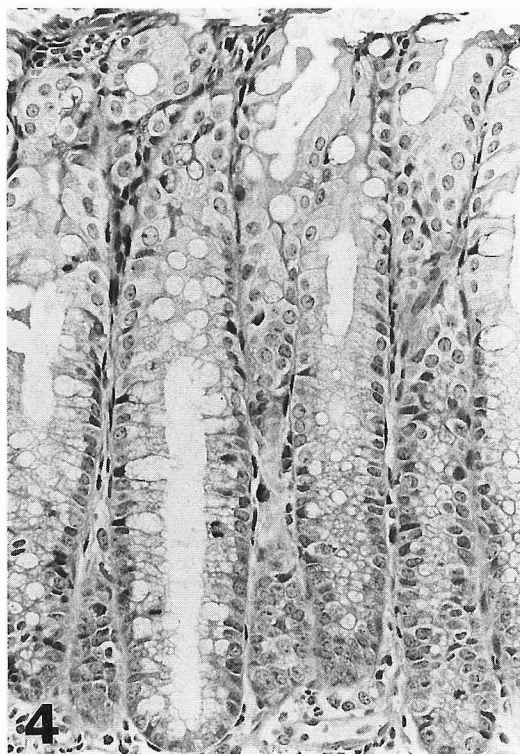
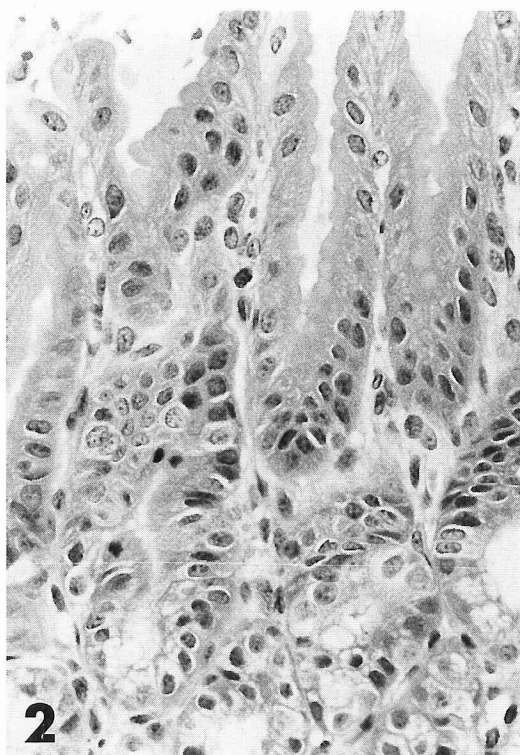
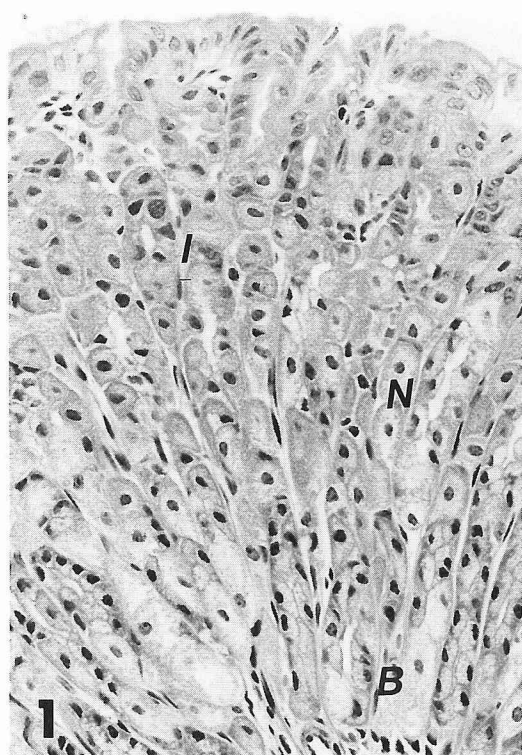
胃体部: 被蓋上皮細胞、胃小窩細胞および峽部の粘液細胞の自由表面側と核上部が強い赤色反応を示している。副細胞 (mucous neck cell) も赤く染められている (Fig. 5)。

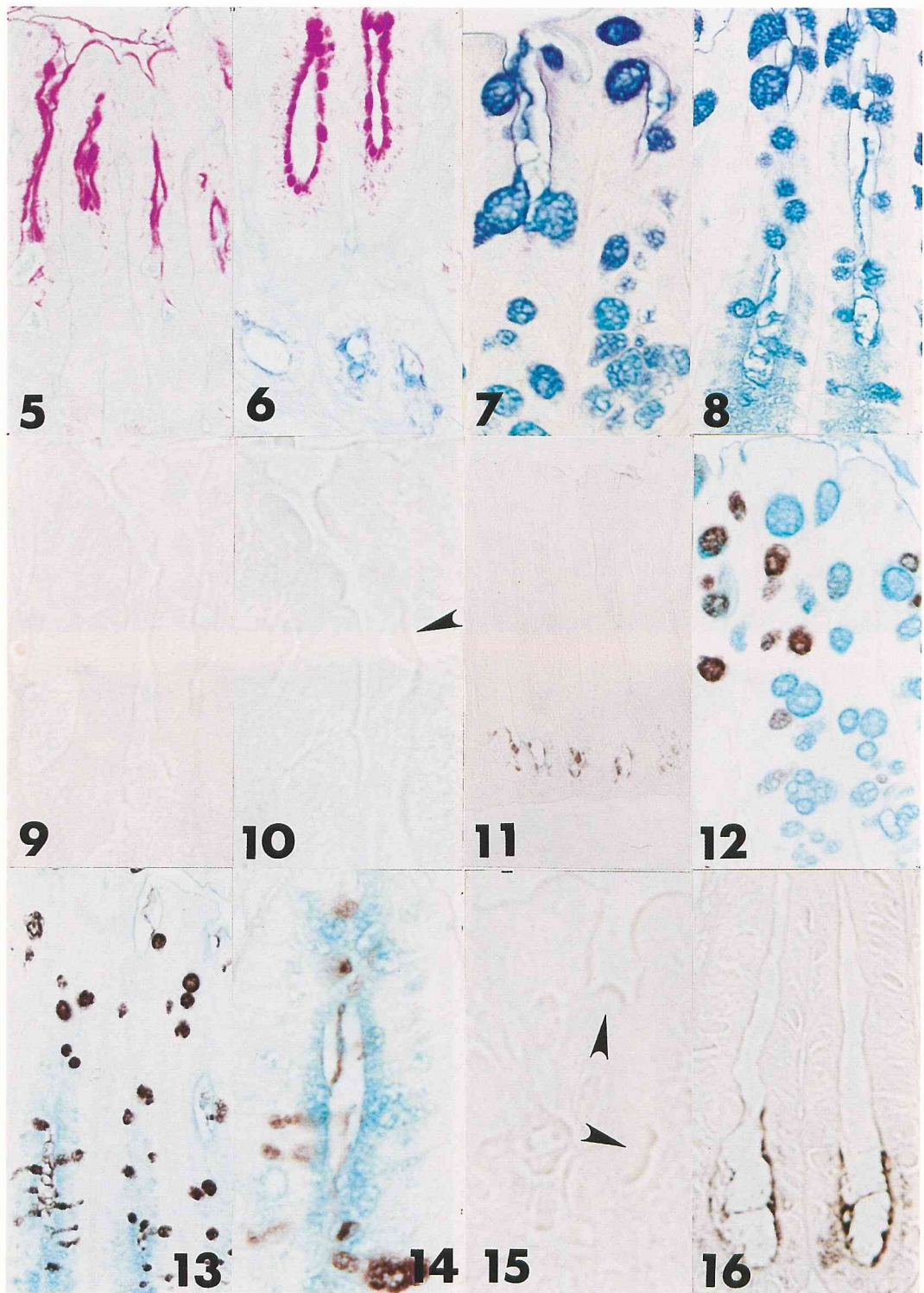
幽門部: 胃体部と同様に被蓋上皮細胞と胃小窩上皮細胞の自由表面側と核上部が強い赤色を示す。幽門腺底部では alcinophilia が主であるが、時々赤色や紫色が観察される (Fig. 6)。

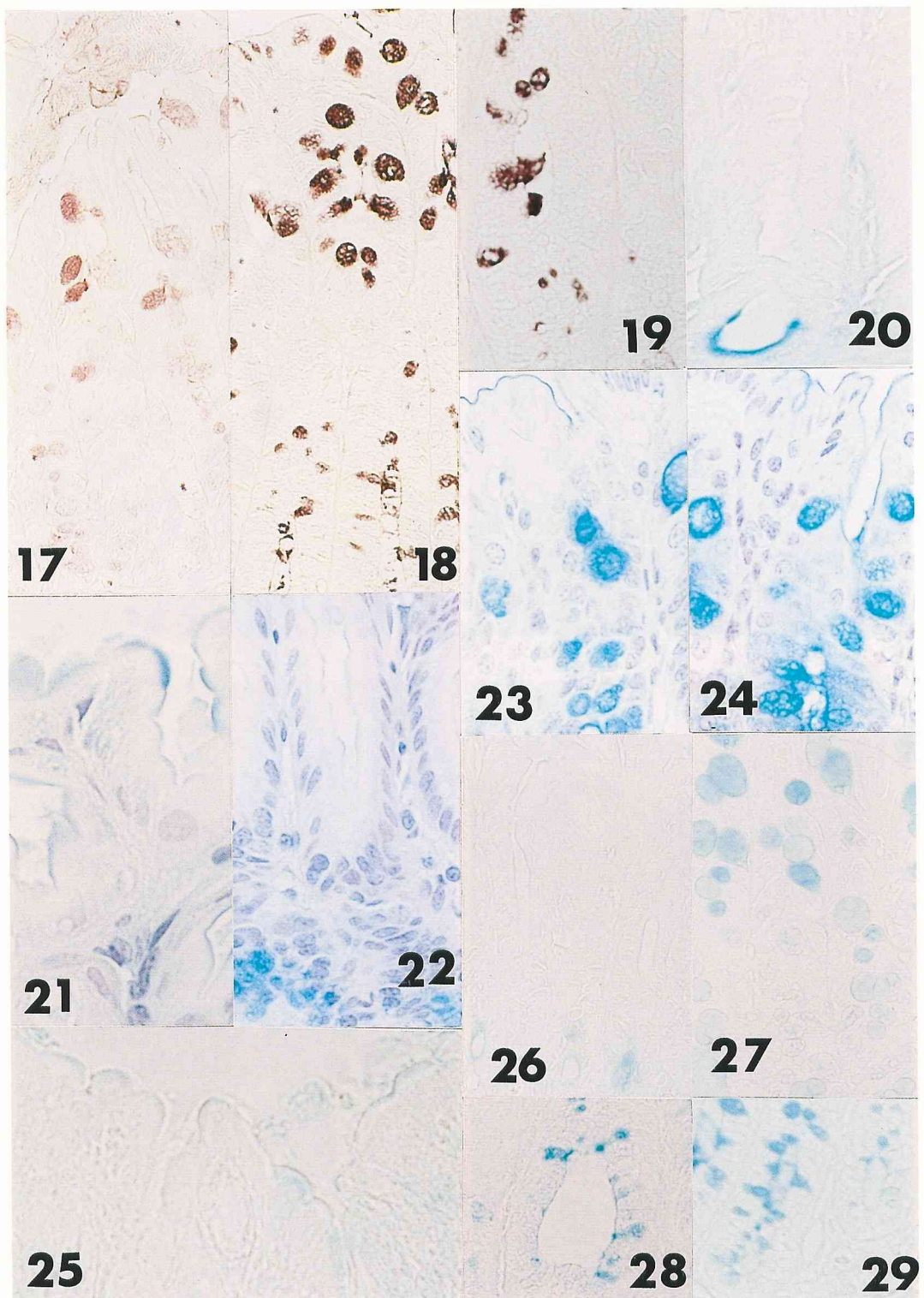
近位大腸: 内腔面の吸収上皮細胞と陰窩内の吸収上皮細胞の自由表面には青色と弱い紫色が示されている。陰窩上半部にある粘液細胞は青紫色に染められ、下半部にある粘液細胞 (mucous cell) は青色を示す (Fig. 7)。

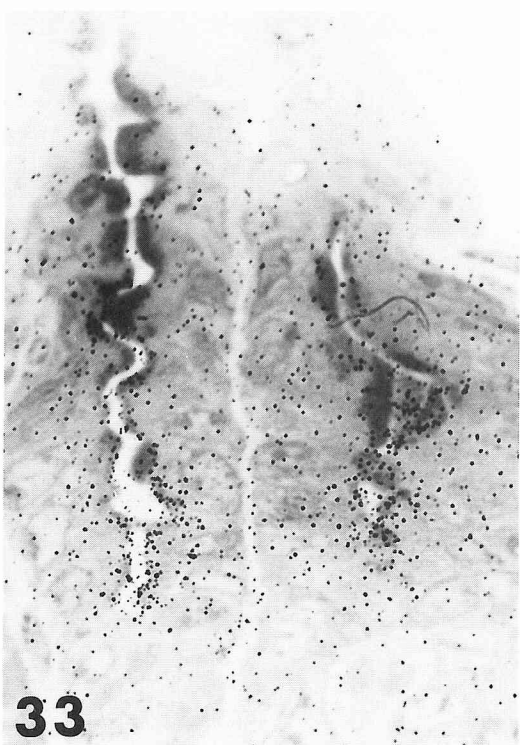
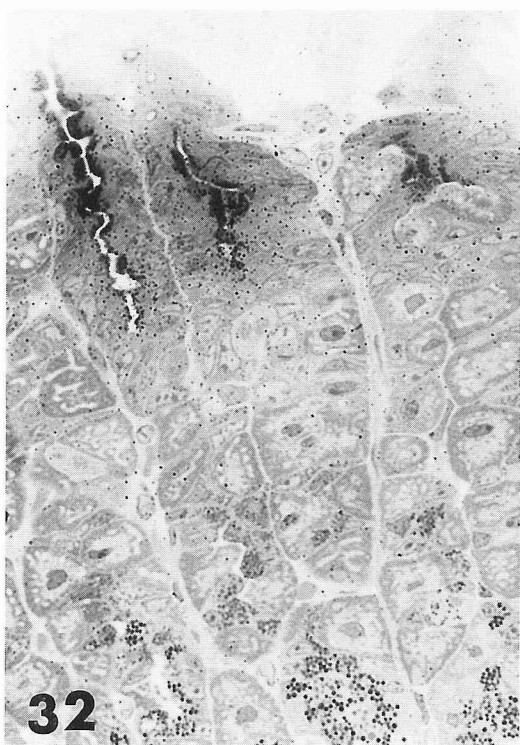
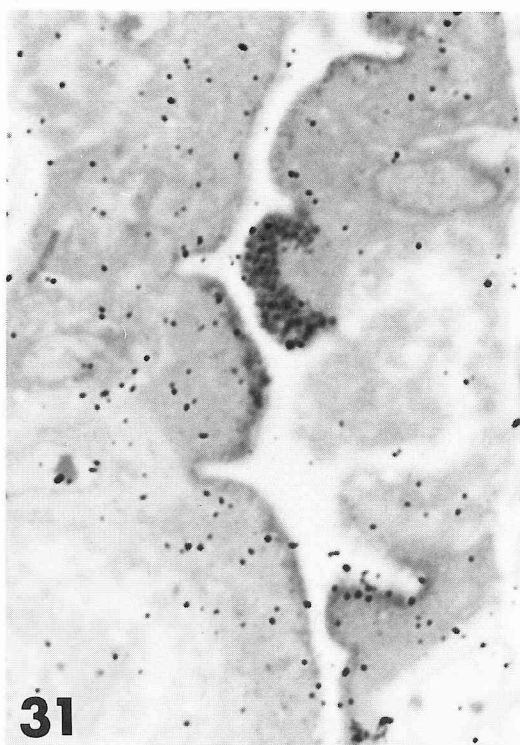
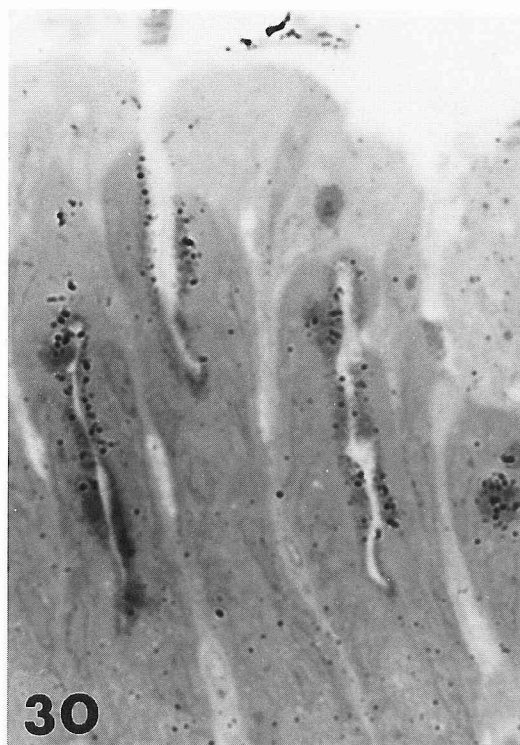
遠位大腸: 内腔面と陰窩内の吸収上皮細胞の自由表面は青色に染められる。また、杯細胞も近位大腸と同様上半部の杯細胞はわずかに紫色を帯びており、下半部のそれは青色のみである。空胞細胞 (以下 vacuolated cell) は微小な顆粒の集合による分泌顆粒を有しており、細胞表面と分泌顆粒は青色を示す

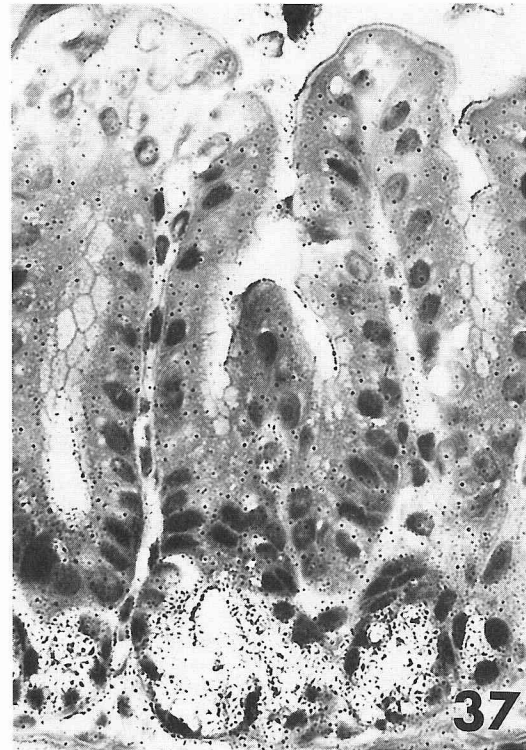
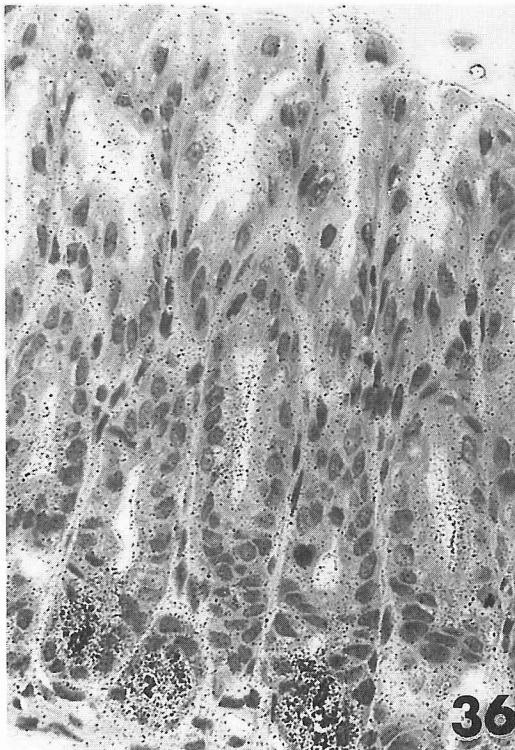
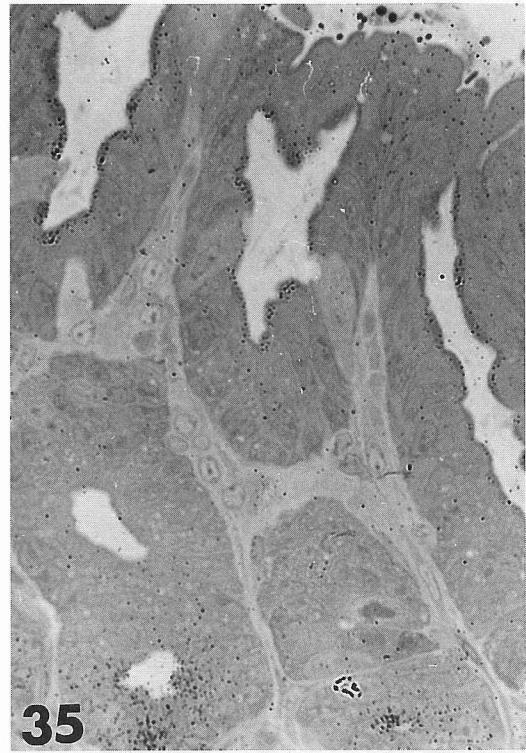
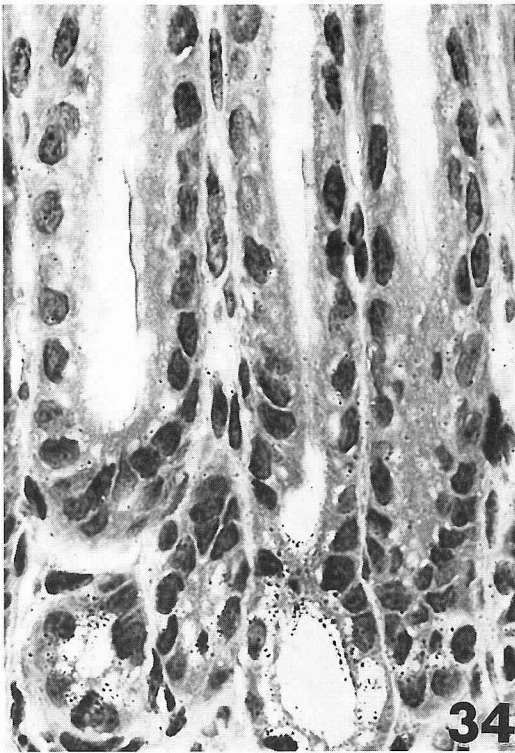
- Fig. 1 胃体部, 被蓋上皮細胞, 胃小窩, 峽部(I), 頸部(N), 底部(B)が識別される。HE 染色×270
- Fig. 2 胃幽門部, 被蓋上皮, 深い陰窩と底部の幽門腺細胞が認められる。HE 染色×420
- Fig. 3 近位大腸, 内腔面には吸収上皮細胞とこれに介在する粘液細胞があり, 陰窩上半部に吸収上皮細胞と大型の粘液細胞を認める。陰窩下半部にはやや小型の粘液細胞が観察される。HE 染色×370
- Fig. 4 近位大腸と同じく内腔面に吸収上皮細胞と杯細胞があり, 陰窩の1/3の深さまでは吸収上皮細胞が存在する。杯細胞は陰窩上半部では下半部での杯細胞よりやや大型である。陰窩の下方2/3では杯細胞以外は vacuolated cell によって占められる。HE 染色×270
- Fig. 5 胃体部, 被蓋上皮細胞, 胃小窩細胞と峽部の粘液細胞が強い赤色を示す。AB-PAS 染色×180
- Fig. 6 幽門腺細胞は alcinophilia を多く認めるが時に紫色が観察される。AB-PAS 染色×220
- Fig. 7 近位大腸陰窩上半部にある粘液細胞の粘液は青色にわずかな紫色が加わるが, 下半部のそれは青色である。AB-PAS 染色×460
- Fig. 8 遠位大腸, 近位大腸と同じく杯細胞の粘液は陰窩の上・下半部が異なる。また, vacuolated cell の粘液は青色である。AB-PAS 染色×420
- Fig. 9 胃体部, 被蓋上皮, 胃小窩上皮と峽部の上皮細胞の自由表面側が陰性もしくは痕跡程度の茶色を示す。HID-AB 染色×760
- Fig. 10 Fig. 9の拡大, 痕跡程度の陽性反応はしばしば三日月状を呈す(矢印)。HID-AB 染色×1,070
- Fig. 11 胃幽門部, 陰窩底部の幽門腺細胞は茶色と青色反応を混じている。HID-AB 染色×150
- Fig. 12 近位大腸, 陰窩上半部では, 粘液細胞の粘液は茶色単独, 青色を混じたものと青色のみの3種の反応がある。HID-AB 染色×290
- Fig. 13 遠位大腸, 杯細胞は陰窩の上・下半部に関係なくもっぱら茶色が圧倒的に多い。Vacuolated cell は青色である。HID-AB 染色×200
- Fig. 14 遠位大腸の陰窩下部の拡大, vacuolated cell の粘液は微小顆粒集合として見える。HID-AB 染色×930
- Fig. 15 胃体部, 被蓋上皮, 胃小窩上皮および峽部の上皮細胞に非常に弱い陽性反応を認める(矢印)。HID 染色×540
- Fig. 16 胃幽門部, 陰窩底部の幽門腺細胞に強い陽性反応を認める。HID 染色×490
- Fig. 17 近位大腸, 陰窩上半部の粘液細胞の粘液は全体が陽性のものと一部が斑状に陽性を示すものもある。下半部の粘液は痕跡程度の陽性または陰性である。HID 染色×220
- Fig. 18 遠位大腸, 陰窩の深さに関係なく杯細胞は陽性であり, vacuolated cell の粘液は染色されない。HID 染色×240
- Fig. 19 Fig. 18の拡大, vacuolated cell の分泌顆粒は染色されないが surface coat は軽度の陽性反応を示す。HID 染色×390
- Fig. 20 胃幽門部, 被蓋上皮と陰窩の上皮細胞の自由表面側が青色を呈す。陰窩底部の幽門腺細胞は強く青色に染められる。ABpH2.5染色×210
- Fig. 21 胃体部, 被蓋上皮と胃小窩上皮細胞の自由表面側が明瞭な青色反応を示す。しばしばこの反応は三日月状となる。ABpH2.5-HE 染色×1,450
- Fig. 22 胃幽門部, 被蓋上皮と陰窩上皮細胞の自由表面側に青色を認める。陰窩底部に青色が示される。Fig. 20と比較されたい。ABpH2.5-HE 染色×470
- Fig. 23 近位大腸, 陰窩の上・下半部ともに粘液細胞の粘液は青色を呈する。ABpH2.5-HE 染色×380
- Fig. 24 遠位大腸, 杯細胞の粘液は陰窩上半部の方が強い青色を呈する。Vacuolated cell の粘液はやや弱い反応である。ABpH2.5-HE 染色×380
- Fig. 25 胃体部, 被蓋上皮および胃小窩上皮細胞の自由表面側に非常に弱い反応を認める。ABpH1.0染色×1,460
- Fig. 26 胃幽門部, 陰窩底部の幽門腺細胞に青色反応を認める。ABpH1.0染色×190
- Fig. 27 近位大腸, 陰窩上半部と下半部での粘液細胞の粘液における青色反応の強さには明瞭な差がある。ABpH1.0染色×280
- Fig. 28 遠位大腸, vacuolated cell の分泌顆粒に痕跡程度の alcinophilia が観察される。ABpH1.0染色×210
- Fig. 29 遠位大腸, vacuolated cell の分泌顆粒は痕跡程度の陽性反応から陰性所見までが認められる。ABpH1.0染色×320
- Fig. 30-Fig. 37 胃体部および幽門部の radioautographs
- Fig. 30 胃体部, 投与1時間後, foveolar cell と isthmus cell の分泌顆粒上に銀粒子を認める。被蓋上皮細胞の銀粒子はわずかである。メチレンブルー染色, エボン切片×1,500
- Fig. 31 胃体部, 投与3時間後, 峽部の粘液分泌細胞の核上部から分泌顆粒にかけて銀粒子を認める。メチレンブルー染色, エボン切片×2,050
- Fig. 32 胃体部, 投与5時間後, foveolar cell より isthmus cell にかけて多数の銀粒子が集積している。被蓋上皮細胞にも銀粒子が観察される。メチレンブルー染色, エボン切片×470
- Fig. 33 Fig. 32の拡大, foveolar cell より isthmus cell の核上部・分泌顆粒に銀粒子が示されている。メチレンブルー染色, エボン切片×1,220

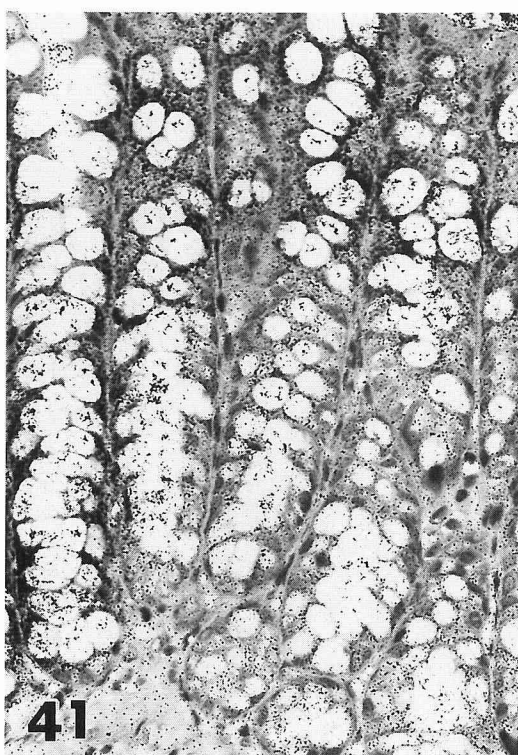
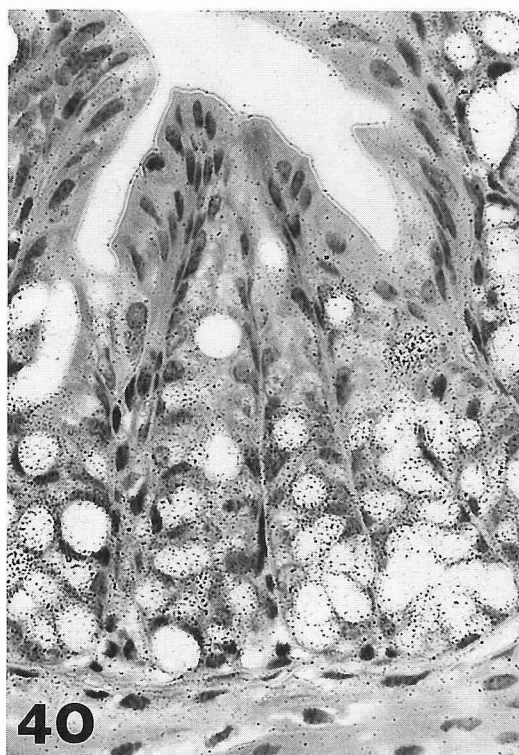
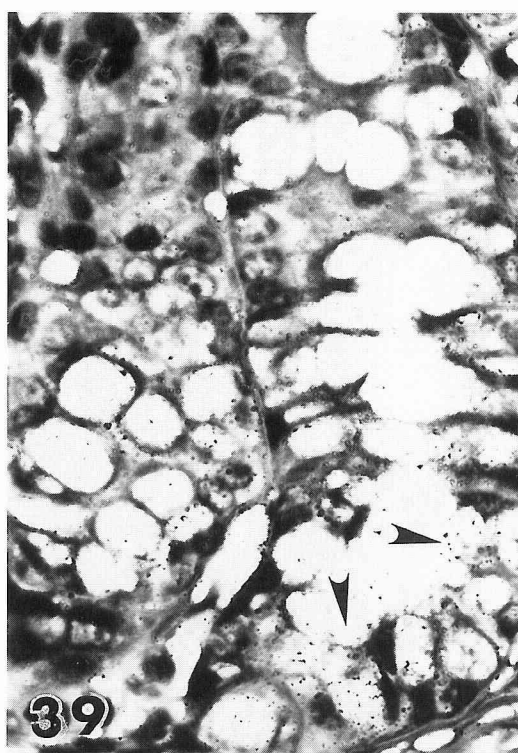
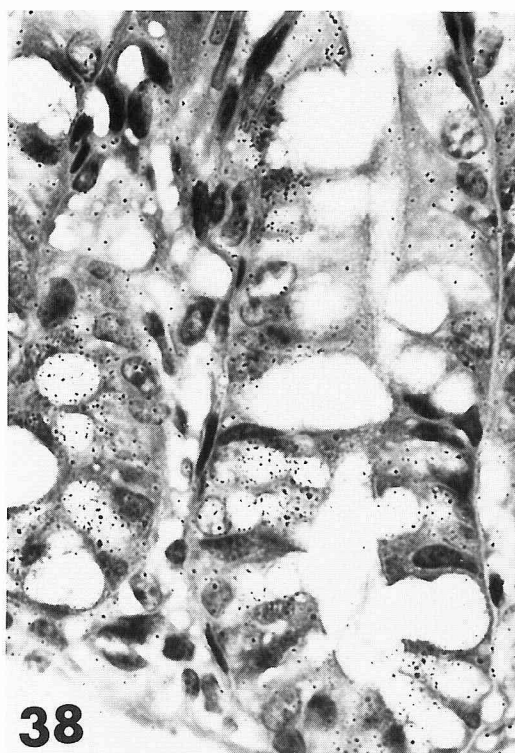


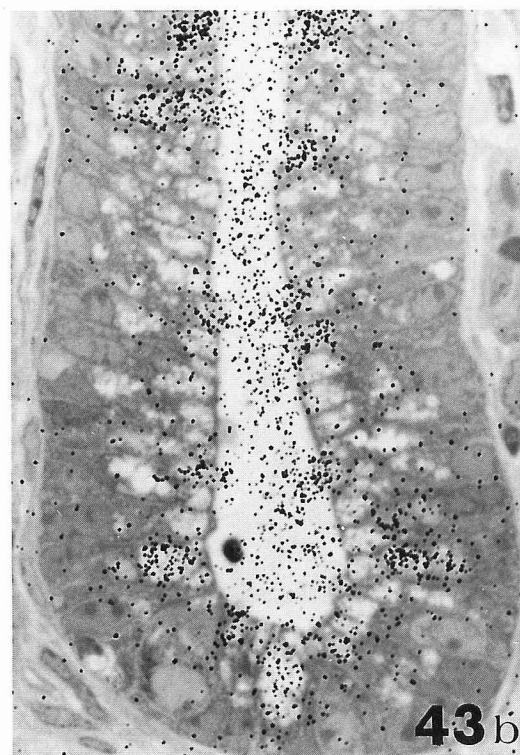
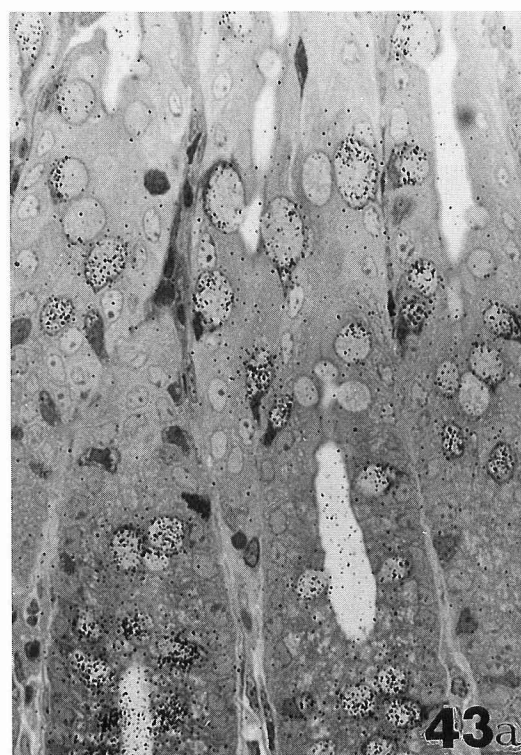
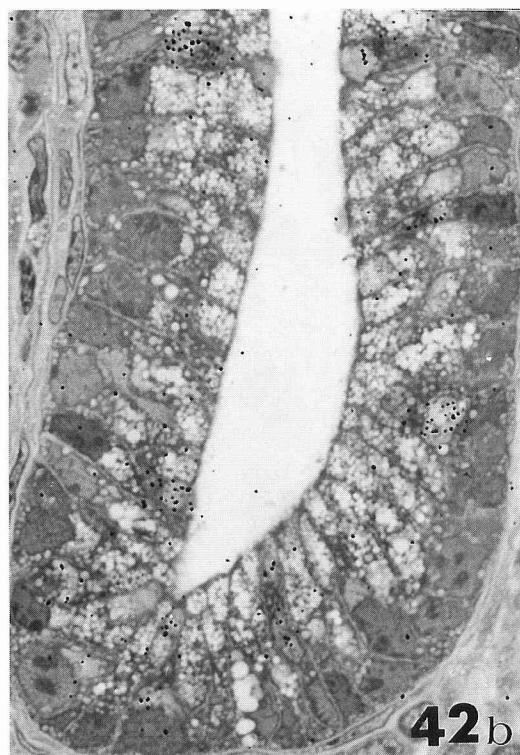


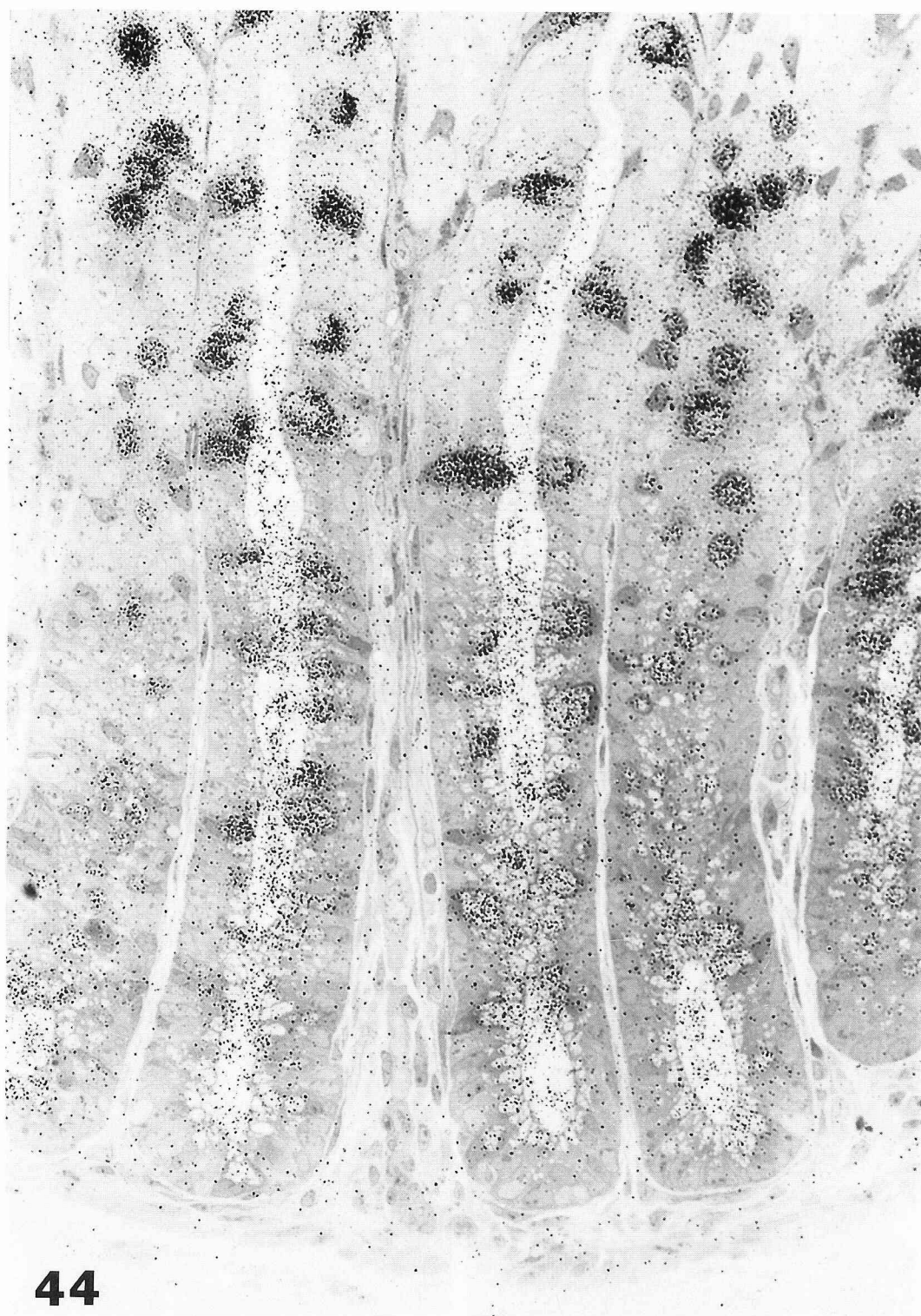












44

(Fig. 8)。

2 高鉄ジアミン-Alcian blue pH2.5染色 (HID-AB)

胃体部: AB-PAS 染色による明瞭な陽性反応と違って, この染色の結果は一般的に非常に弱い。被蓋上皮細胞, 胃小窩細胞と峽部の細胞の自由表面側で陰性から痕跡程度の茶色が観察される。強拡大による観察では, この陽性反応は細胞表面にて一様でなく中央部が厚くなり三日月状となる。この所見は被蓋上皮と胃小窩の細胞にしばしば起こる (Fig. 9, 10)。

胃幽門部: 被蓋上皮と胃小窩上皮細胞の自由表面には胃体部の所見と同様な結果が観察される。幽門腺細胞では茶色の陽性反応がおもに認められるが, 幽門腺底部の細胞ではしばしば青色も観察される (Fig. 11)。

近位大腸: 内腔面と陰窩の吸収上皮細胞の細胞表面は青色反応が認められる。陰窩の上半部に存在する粘液細胞の粘液は青色のみか, 茶色に青色がかかるか, または茶色のみの3種類の陽性反応が認められる。しか

し一般的には青色が多い。下半部の粘液細胞では粘液は大多数が青色に染められるがまれには茶色を加えられる (Fig. 12)。

遠位大腸: 内腔面と陰窩の吸収細胞表面の反応は近位大腸のそれと同じである。陰窩上半部の杯細胞の粘液は圧倒的に茶色であるが下半部では非常にまれに青色が加えられることがある。Vacuolated cell の mucus と surface coat はもっぱら青色のみが観察される (Fig. 13, 14)。

3 高鉄ジアミン染色 (HID)

胃体部: 被蓋上皮, 胃小窩と峽部の粘液細胞の所見は HID-AB 染色の結果と同じである (Fig. 15)。

胃幽門部: 被蓋上皮と胃小窩の上皮と幽門腺細胞の所見は HID-AB 染色の所見よりも若干強くなる傾向を認める (Fig. 16)。

近位大腸: 内腔面と陰窩の吸収上皮の細胞表面には茶色の陽性反応が示される。陰窩上半部にある粘液細胞は 粘液全体が陽性所見を示す場合と粘液内に斑状

Fig. 34 胃幽門部, 投与45分後, 陰窩底部の幽門腺細胞にはすでに中等量の銀粒子が認められ, 胃小窩上皮細胞にはほとんど観察されない。HE 染色, パラフィン切片×950

Fig. 35 胃幽門部, 投与1時間後, 陰窩底部の腺細胞には銀粒子の増加があり, 陰窩上皮細胞の分泌顆粒上に銀粒子が観察される。メチレンブルー染色, エボン切片×510

Fig. 36 胃幽門部, 投与3時間後, 銀粒子は陰窩上皮細胞および底部の腺細胞で著明な増加を示す。HE 染色, パラフィン切片×430

Fig. 37 胃幽門部, 投与5時間後, 投与3時間後の所見と明らかな差は認められない。HE 染色, パラフィン切片×880

Fig. 38-Fig. 41 近位大腸の radioautographs

Fig. 38 注射45分後, 陰窩内の吸収上皮細胞に銀粒子が出現しており, 陰窩下半部の粘液内にも銀粒子が示されている。HE 染色, パラフィン切片×820

Fig. 39 注射1時間後, 陰窩底部の粘液はほとんどが均等にラベルされて, 腺腔内にも銀粒子が多数散在している(矢印)。しかしながら陰窩上半部では粘液内に銀粒子は観察されない。HE 染色, パラフィン切片×710

Fig. 40 投与3時間後, 内腔面および陰窩の吸収上皮細胞に銀粒子が認められる。陰窩上半部の粘液もラベルされており, 大型の粘液では辺縁に集積する。HE 染色, パラフィン切片×510

Fig. 41 投与5時間後, すべての粘液がラベルされ, 陰窩の上・下半部での粘液における銀粒子に差は認められない。HE 染色, パラフィン切片×350

Fig. 42-Fig. 44 遠位大腸の radioautographs

Fig. 42a 投与後45分, 陰窩中部にある杯細胞の粘液は Golgi 領域より粘液底部で銀粒子を認める。陰窩底部では小型の杯細胞がラベルされる。メチレンブルー染色, エボン切片×460

Fig. 42b Fig. 42a の拡大, 陰窩底部の杯細胞ではすでに粘液内に銀粒子を認める。メチレンブルー染色, エボン切片×1,000

Fig. 43a 投与後3時間後, 陰窩上半部の杯細胞の粘液に銀粒子は増加するがおもに辺縁に集積している。メチレンブルー染色, エボン切片×680

Fig. 43b Fig. 43a の陰窩下半部, 杯細胞の粘液内には銀粒子が均等に多数配列している。Vacuolated cell の mucus 内にも銀粒子が観察されるようになる。メチレンブルー染色, エボン切片×1,040

Fig. 44 投与5時間後, 陰窩上半部の大型の粘液には著しい銀粒子の増加が観察される。Vacuolated cell の粘液にも銀粒子が明瞭に観察される。メチレンブルー染色, エボン切片×640

の陽性反応を示す場合が認められる。これに反して下半部の粘液細胞の粘液はほとんどが陰性所見を示すがまれにわずかな斑状の陽性所見が観察される時もある (Fig. 17)。

遠位大腸：内腔面と陰窩内の吸収上皮細胞の所見は近位大腸のそれと同じ所見が認められる。杯細胞の陽性反応は陰窩の深さに関係なく一様に茶色が示される。近位大腸の粘液細胞の粘液での陽性反応の様に部分的な斑状の所見を認めることはない。Vacuolated cell の粘液は染色されないが、surface coat は陽性反応を示す (Fig. 18, 19)。

4 Alcian blue pH2.5-ヘマトキシリン・エオジン染色 (AB pH2.5-HE)

AB pH2.5染色と AB pH2.5-HE 染色による alcinophilia の局在の差は認められない (Fig. 20)。しかし短時間のヘマトキシリン・エオジン染色を加えることによって、青色反応は明瞭になる。AB pH2.5染色の後にヘマトキシリン・エオジンを加えることは、当然 Alcian blue と mucin との electrovalent の結合になんらかの影響を与えると推測されるが、今回は短時間の HE 染色のためか局在に差は認めない。したがって AB pH2.5-HE 染色の所見を用いる。

胃体部：被蓋上皮を胃小窩細胞の自由表面側に alcinophilia を認める。しかもこの反応はしばしば三日月状の形を呈しているが上記の細胞すべてに起るわけではない (Fig. 21)。

胃幽門部：被蓋上皮と胃小窩の上皮細胞の自由表面側に青色が観察される。幽門腺の腺底部の幽門腺細胞にも陽性所見が示されている (Fig. 22)。

近位大腸：内腔面と陰窩の吸収上皮細胞の surface coat に明瞭な青色を強める。粘液細胞の粘液はすべて青色を呈するが、辺縁がより強い反応を示す。また、crypt の深さによる差が示され、上半部の方が強い傾向を示す (Fig. 23)。

遠位大腸：内腔面と陰窩内の吸収上皮細胞の所見は近位大腸の所見と同じである。杯細胞の粘液はすべて青色反応を呈するが、陰窩上半部の粘液の方がやや強い反応を示す。Vacuolated cell も青色反応を示すが、一般的に杯細胞より弱い反応である (Fig. 24)。

5 アルシアンブルー pH1.0染色 (AB pH1.0)

胃体部：被蓋上皮、胃小窩細胞と峽部の細胞の自由表面側に非常に弱い陽性所見を認める (Fig. 25)。

胃幽門部：被蓋上皮と胃小窩の上皮細胞の表面に弱い反応を観察しうる。幽門腺の腺底部の幽門腺細胞も

alcinophilia を示す (Fig. 26)。

近位大腸：内腔面と陰窩内の吸収上皮細胞の surface coat が弱い青色を示す。粘液細胞は陰窩上半部に存在するものは強い陽性反応を示し、下半部の弱い反応と差が明瞭である (Fig. 27)。

遠位大腸：内腔面と陰窩内の吸収上皮における surface coat 反応は痕跡程度の反応である。また、杯細胞は上半部・下半部ともに青色に染められるが、上半部のそれの方が強い。Vacuolated cell の粘液は微小な顆粒の集合として観察され、痕跡程度の陽性反応を示す。しかしながら、同一個体でも陰性反応を示す部も多く観察される (Fig. 28, 29)。

C 光学顕微鏡的 RAG

胃体部：radiosulfate が注射された1時間後には、すでに少数の銀粒子が被蓋上皮、胃小窩上皮と峽部の粘液細胞の分泌顆粒と思われる部に局在している (Fig. 30)。注射後3時間経過した標本では胃小窩上皮と峽部の上皮細胞での核上部より分泌顆粒上にかけて銀粒子が観察される (Fig. 31)。特に表層の分泌顆粒の集積部位には多数の銀粒子が局在することもある (Fig. 31)。5時間後の radioautograph の所見では、銀粒子の局在の部位は投与後3時間のそれとほとんど変化がないが銀粒子の数は増加する (Fig. 32, 33)。

胃幽門部：radiosulfate の投与45分後の標本では幽門腺の腺底部の腺細胞の核上部より分泌顆粒に $^{35}\text{SO}_4$ の銀粒子が観察されるが、被蓋上皮と胃小窩上皮細胞ではわずかの銀粒子が認められるだけである (Fig. 34)。

1時間の経過後では胃小窩上皮細胞の分泌顆粒上にも銀粒子が示される (Fig. 35)。注射3時間後には幽門腺の腺底部の腺細胞には多数の銀粒子が核上部より分泌顆粒に出現する。幽門腺上皮細胞上の銀粒子も著明に増加し、核上部より自由表面側および幽門腺内腔に観察される (Fig. 36)。5時間経過後の標本では3時間経過後の標本と比較しても銀粒子の増加以外は明らかな差は認められない (Fig. 37)。

近位大腸：標識された Na_2SO_4 注射45分後での radioautograph では内腔面と陰窩の吸収上皮細胞の核上部より表面側に銀粒子が散在している。陰窩の上半部に存在する粘液細胞では銀粒子は Golgi 領域より粘液の基部に偏在しているが、下半部にある小型の粘液内ではすでに中程度の銀粒子が偏在することなく粘液内に散在している (Fig. 38)。しかし、大型の粘液小滴ではこの所見は観察されない。投与後1時間の

radioautograph では陰窩下半部特に底部の粘液細胞の粘液はほとんどが銀粒子を示すにも拘らず、上半部の粘液はラベルされていない (Fig. 39)。投与後3時間後の標本では内腔面と陰窩の吸収上皮細胞の surface coat に銀粒子が多量ではないが観察される。また、陰窩下半部ではほとんどの粘液が多数の銀粒子によってラベルされるが時には粘液小滴辺縁にのみ銀粒子を有する粘液細胞も認められる (Fig. 40)。5時間後になると、陰窩上半部の粘液のすべてが銀粒子を示し、陰窩の上下半部での取り込みの量および配列に差を認めない (Fig. 41)。

遠位大腸：メチレンブルーによる染色によって杯細胞は特に陰窩の上半部で metachromasia を示し紫色の粘液を示す。さらに核のクロマチンも他の細胞の核より濃染されて識別される (Fig. 42a)。Radioisotope 注射後45分では小数の銀粒子が内腔面と陰窩の吸収上皮細胞に観察される。陰窩の上半部にある杯細胞では銀粒子が Golgi 領域に出現するが、下半部の杯細胞ではしばしば Golgi 領域より粘液内に観察される (Fig. 42a, b)。

1時間経過後の所見は内腔面と陰窩内の吸収上皮細胞に銀粒子が増加することを除いて明瞭な変化を認めない。投与後3時間では上記の両吸収上皮細胞の銀粒子はさらに増加する。また、陰窩上半部の大型の杯細胞の粘液内の銀粒子も増加し、粘液の辺縁にも認められる。しかしながら粘液内に均等に分布することは少ない。これに反して、下半部の杯細胞の粘液はぎっしりと詰った銀粒子によっておおい隠される。さらに vacuolated cell の粘液にも銀粒子が観察される (Fig. 43a, b)。5時間経過後の radioautograph でも両吸収上皮細胞に銀粒子の増加が認められ、陰窩上半部の杯細胞の粘液ではより多くの銀粒子が集積するため粘液がおおい隠されるが、すべての粘液がこの所見を示すわけではない。Vacuolated cell ではほとんどすべての粘液に銀粒子を観察し得る (Fig. 44)。

IV 考 察

一般的に組織化学的に用いられる各種の染色方法では組織細胞中の特定の物質を染色するのに対して、radioautography は、投与された RI の取り込みを観察する特異な方法であり、物質の合成を知るためには有効な方法である¹⁰⁾。そして RI 標識化学物が特異的にある物質に取り込まれることによって合成された物質の組織内局在を知ることが可能となり、また同時に

時間の経過による標識された物質の移動をも知ることが可能となる。しかしながら、この方法が用いられる時は、標識される物質の生化学代謝についての知識が不可欠である。今回用いられた inorganic $^{35}\text{SO}_4$ はヒト滑膜線維芽細胞¹⁸⁾やブタの大動脈¹⁹⁾では glycosaminoglycan の前駆物質となるが、消化管のムチン産生細胞では分泌物に取り込まれることが明らかにされており^{20,21)}、しかも取り込みは Golgi 装置の trans-cisterna と network でムチンの構成要素である glycoconjugates の oligosaccharide への O-sulfation によることも知られている^{7,22)}。RAG を行うにあたって注意点の1つとして標本作製中に人工的なカブリが生じる可能性が考えられるが、著者はできるかぎりこれを排除するため、投与 RI 量を大量とした^{23,24)}。このことによって露出期間を短くし、人工産物を減らすことを目的としたものである。

次に組織化学的染色結果と RAG の結果を各臓器ごとと比較すると、胃体部においては被蓋上皮、胃小窩上皮と峽部粘液細胞に染色と RAG に結果の解離が認められる (Table 1)。染色結果からは、明確な sulfomucin の産生は考えたいが RAG では3種の細胞間に程度の差はあるが確実な $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みを認める。この染色と RAG の結果の解離に対する解釈としては、① これらの細胞はおもに中性ムチンを産生するが sulfomucin も少量ながら産生している可能性が考えられる。一般的に cationic dye による染色の強さは染色液の pH とムチンの荷電陰イオン強度によって決定される²⁵⁾。Reid ら²⁵⁾によれば sulfate ester の pKa は1.0であり、AB pH1.0染色が行われる pH 域では sulfate ester の50%が陰性に荷電するとし、HID 染色が行われる pH1.5~1.7⁵⁾では76~83.4%の sulfate ester が陰性に荷電するとしている。このことは理論的にはすべての sulfate ester が染色によって検出され得ないことを示している。一方、RAG においては投与された RI が目的の物質へ標識されるために十分な時間が与えられた場合はすべての分泌 sulfomucin のみならず細胞構成硫酸化糖蛋白⁶⁾への取り込みも起りうると考えられる。したがって、少量のみの sulfomucin が存在する場合上記の染色結果と RAG の結果の解離は明確になるかも知れない。② 次に考えられる解釈としては、投与された $^{35}\text{SO}_4$ がムチンの主要な構成要素である糖蛋白質の oligosaccharide chain へ O-sulfate ester として取り込まれていない可能性である。最近の報告では $^{35}\text{SO}_4$ が糖蛋白質の core

Table 1 胃体部における組織化学染色とラジオオートグラフィーの結果

	AB-PAS	HID-AB	HID	AB-HE	AB(1.0)	RAG
被 蓋 上 皮	2R	O-F	O-F	2B	B-F	+
胃 小 窩 上 皮	3R	O-F	O-F	2B	B-F	2+
峽部粘液上皮	3R	O-F	O-F	B	F	2+
頸部粘液上皮	R	O	O	O	O	O

B：青色，R：赤色，P：紫色，N：黒色または茶色，F：痕跡陽性，O：陰性
+，-：ラジオオートグラフィーの結果

Table 2 胃幽門部における組織化学染色とラジオオートグラフィーの結果

	AB-PAS	HID-AB	HID	AB-HE	AB(1.0)	RAG
被 蓋 上 皮	2R	O-F	N	2B	B-F	+
陰 窩 上 皮	3R	O-F	N	2B	B-F	2+
幽 門 腺 上 皮	3BR	3N-B	4N	3B	2B	4+

表記文字の意味は Table 1 と同じ

Table 3 近位大腸の組織化学染色とラジオオートグラフィーの結果

	AB-PAS	HID-AB	HID	AB-HE	AB(1.0)	RAG
吸 収 上 皮	2BP	2B	2N	2B	B	+
粘液細胞(上部)	4BP	2N3B	2N-N	4B	2B	3+
粘液細胞(下部)	2B	2B	F	3B	B	3+

表記文字の意味は Table 1 と同じ

Table 4 遠位大腸の組織化学染色とラジオオートグラフィーの結果

	AB-PAS	HID-AB	HID	AB-HE	AB(1.0)	RAG
吸 収 上 皮	B-PF	2B	N	2B	B-F	+
杯細胞(上部)	3BP	3NB	4N	4B	3B	4+
杯細胞(下部)	3B	2N	3N	3B	2B	3+
空 胞 細 胞	2B	2B	N*	2B	F-O	+

表記文字の意味は Table 1 と同じ

* 分泌顆粒でなく surface coat の所見

protein の tyrosine に O-sulfate として標識されることが知られている²⁶⁾²⁷⁾。しかも tyrosine への sulfation もまた、Golgi 装置の trans-cisternae と network で起る。現在迄上記の 3 種の細胞においてこの現象は報告されていないが、tyrosine への sulfation は tyrosylprotein sulfotransferase がこの反応を触媒す

るので、この酵素の局在証明がこの解釈のためには不可欠である。③ さらなる解釈としては、ムチンに存在する塩基性蛋白質が cationic dye と結合する陰性荷電イオン (sulfonic anion) を mask するという説²⁸⁾が古くよりある。以上の 3 種の解釈が所見の解離に対する理由として考えられるが、染色結果は HID-AB

染色, HID 染色および ABpH1.0 染色にて痕跡程度の陽性所見が存在することより最初の解釈が他の解釈より妥当性を有していると考ええる。

AB pH2.5-HE では青色反応は細胞表面に三日月状を呈している。Surface coat の反応であれば反応は細胞表面に平行に出現するので、この反応は surface coat の反応ではなく分泌顆粒によるものであることが推測される。さらに AB pH2.5-HE 染色では被蓋上皮と胃小窩上皮の一部に青色反応が認められるにもかかわらず AB-PAS 染色によって反応が紫色を示さないことに疑問が生じるが、Roe 等²⁹⁾によれば AB-PAS の dual staining を行うと中性ムチンと酸性ムチンが共存する時 Alcian blue と Schiff 試薬の間に干渉が起こり、青色の過小評価が起こりうるとされているが、今回の AB-PAS 染色においても同様の現象が起こり紫色を呈さなかったと考えられる。

次に胃幽門部において、被蓋上皮と胃小窩上皮細胞の RAG の結果は組織化学染色の内の HID 染色と ABpH1.0 染色の所見と一致する (Table 2)。しかも RI 投与後 1 時間経過後のラジオオートグラフでは明らかに胃小窩上皮細胞の粘液顆粒上に銀粒子を認める。この所見は現在まで RAG による sulfomucin の産生として報告されていない⁹⁾¹³⁾。幽門腺は以前の報告と同様に組織化学染色と RAG の結果は一致する。

次に近位大腸では HID-AB 染色により、被蓋上皮細胞と陰窩吸収上皮細胞の surface coat に青色反応が出現するが HID 染色のみでは diamine complex による反応が出現する。この奇妙な結果の解釈としては、HID-AB 染色は HID 染色後にさらに AB pH2.5 染色が行われるので、これらの細胞の surface coat における sulfomucin はまず diamine mixture と結合するが、次に pH2.5 に control された Alcian blue の染色液内では diamine complex のすべてもしくは大部分が遊離し、かわって Alcian blue と結合することによって推測される。よく知られた事実として diamine mixture と Alcian blue の両染料に結合しうる radical を有する糖蛋白が HID-AB 染色を受ける時は、black color が blue color をあいまいにする事実が報告されており²⁾染色性の信頼性も疑われている³⁰⁾。しかしながら HID-AB 染色と HID 単独染色の結果を比較し HID-AB 染色の二重染色を行った時、最初の HID 染色による陽性反応があいまいもしくは陰性になる結果は報告されていない。次に近位大腸粘膜の粘液細胞の組織化学染色の結果を見ると陰窩上半部にある細胞と

下半部にある細胞とでは明らかに異なった反応を示す (Table 3)。これらの染色結果は下半部にある粘液細胞には硫酸化粘液が存在しないかまたは少量のみの存在を示しているが、一方、radioautograph ではすべての粘液細胞に銀粒子は存在し、陰窩上半部と下半部の粘液細胞において明確な銀粒子の数の差を示さない。組織化学的染色の結果では AB pH1.0 染色の結果のみが RAG の結果を支持しているが量的には差がある。この様に HID-AB, HID 染色の結果と RAG の結果は異なっているが、Jones と Reid は HID-ABpH2.5 と HID-ABpH1.0 染色を行い、HID-ABpH2.5 染色では反応陰性で HID-ABpH1.0 染色のみで検出する sulfomucin が存在したと報告しているので³¹⁾³²⁾、マウスの近位大腸の陰窩下半部に存在する粘液細胞も ABpH1.0 染色でのみ検出する sulfomucin を有する細胞であるのかも知れない。次に近位大腸の粘液細胞における radioautograph による銀粒子の配列 pattern を検討すると、陰窩上半部にある粘液細胞の銀粒子は Golgi area より粘液底部の周囲に集積し、典型的な杯細胞と同じ pattern を示す (Neutra と Leblond³³⁾)。しかしながら下半部にある粘液細胞では必ずしも典型的な配列を示さない。特に陰窩底部に存在する小型の粘液細胞では、RI 投与短時間経過後、粘液内に銀粒子が均等に配列している。この様に陰窩の上・下半部の粘液細胞における銀粒子の配列の差は両細胞が異なった種類の細胞である可能性を推測させる。ラットの近位大腸の陰窩の下半部以下に存在する粘液細胞は AB-PAS 染色の結果と電子顕微鏡の所見が陰窩上部の杯細胞と異なることやこの細胞が未分化な粘液細胞でないことより杯細胞より区別しうるとして Altmann³⁴⁾により deep cryptal secretory cells (DCS cell) と命名されている。マウスの近位大腸の陰窩下半部にある粘液細胞も AB-PAS, ABpH1.0, HID-AB, HID 染色によって上部の粘液細胞より区別することができ (Table 3)、さらに上記のごとく粘液内での銀粒子の配列 pattern が異なる。したがってラットの近位大腸と同様に異なった細胞であるかも知れない。

遠位大腸では陰窩上半部と下半部における杯細胞の組織化学染色の結果は AB-PAS 染色の結果を除いて、本質的な差は認めない。したがって今回用いられた染色結果は RAG の結果と一致している (Table 4)。一方陰窩の 2/3 以下に存在する vacuolated cells では HID-AB 染色と ABpH2.5 染色によって sialomucin

を含むことが観察されるが、HID 染色結果は surface coat に少量の sulfated glycoconjugates の存在を示し、ABpH1.0 染色結果は痕跡程度の陽性反応のみのため、分泌顆粒に明らかな sulfomucin の存在は考えがたい。しかしながら RAG の結果 (RI 注射後 3 時間, 5 時間) は確実に vacuolated cells の粘液小滴内に数は少ないが銀粒子が観察され、 $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みを認める。この radioautograph と染色結果との相反する所見に対しての推測しうる説明としては、まず初めに vacuolated cells は 2 種類の glycoconjugates を分泌する可能性が考えられる。すなわち分泌顆粒の glycoconjugates は ABpH1.0 染色されうる sulfomucin を少量含み surface coat には HID 染色にて染色されうる sulfated glycoconjugates を含むことによるかも知れないという推測である。1 つの細胞が 2 種類以上の化学物質を分泌することはまれな現象ではない。よく知られている細胞としては、ヒトの唾液腺の分泌顆粒は電子顕微鏡による観察によって bipartite として知られ、1 つの顆粒内に異なった物質を含むとされている³⁵⁾。さらにラット下垂体のプロラクチン細胞 (prolactin cell) は 3 種類の分泌顆粒を分泌することが示されている³⁶⁾。しかしながら現在迄消化管上皮の分泌細胞では分泌顆粒と surface coat の glycoconjugates の化学的組成が異なる細胞の存在は明確に報告されていないので、この推測を証明するためには更なる研究が必要である。

その他の解釈としては、胃体部の所見の解離に対して考えられる解釈も考慮に入れなければならない。すなわち、投与された $^{35}\text{SO}_4$ が tyrosine に取り込まれるかも知れないことと、ムチンの塩基性蛋白質による染色の block である。いずれにしても現在のところこれらの推測は上記の結果の矛盾を説明するに十分でない。Thomopoulos ら³⁷⁾によるとマウスの S 状結腸の vacuolated cell は HID-AB 染色と AB-PAS 染色の結果によって alciphilia を示すが HID affinity は認めないと報告している。この報告では HID 単独染色および ABpH1.0 染色の結果は記載されていないので

不明であるが、もし HID 単独および ABpH1.0 染色が行われたら違った結果を得るかも知れない。ラットの vacuolated cell では Murata ら⁷⁾によると電子顕微鏡的細胞化学的染色結果より sialomucin のみであるとしているが Park ら³⁸⁾によれば同じラットの vacuolated cell は "Mucous cells contained only relatively small quantities of sulfate" と報告している。さらに、Reid ら³⁹⁾によるとウサギの vacuolated cell は多量の O-sulfate ester と sialic acid を分泌するとしている。同じ vacuolated cell でも動物の種による差が著しいことが指摘されている。

V 結 語

光顕的組織化学染色と $^{35}\text{SO}_4$ によるラジオオートグラフィを用いてマウスの胃体部、幽門部、近位大腸と遠位大腸の上皮細胞における硫酸化粘液産生を検索し以下の結果を得た。

- 1 胃体部においては被蓋上皮、胃小窩上皮、峽部粘液細胞に組織化学染色と一致しない $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みを認めた。
- 2 胃幽門部においては、被蓋上皮と胃小窩上皮細胞において組織化学染色と一致する $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みを認めた。
- 3 近位大腸においては、陰窩下半部の粘液細胞に上半部の粘液細胞と量的変化のない $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みを認めたが、組織化学染色の結果は弱いので、RAG の銀粒子の量と染色の強度の点で解離を認めた。
- 4 遠位大腸においては、空胞細胞に組織化学染色と一致しない $^{35}\text{SO}_4$ の取り込みを認めた。

本論文の要旨は1981年11月15日～17日第22回日本組織細胞化学会総会 (東京) において発表した。

最後に稿を終えるにあたり終始懇切な御指導と御校閲を賜りました信州大学医学部第1解剖学教室の永田哲士教授に厚く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Strous GJ, Dekker J: Mucin type glycoprotein. Crit Rev Biochem Mol Biol 27: 57-92, 1992
- 2) Spicer SS, Schulte BA: Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. J Histochem Cytochem 40: 1-38, 1992
- 3) Park CM, Reid PE, Owen DAWL, Volz D: Histochemical procedures for the simultaneous visualization of neutral sugars and either sialic acid and its O-acyl variants or O-sulfate ester. II. Methods based upon

the periodic acid-phenylhydrazine method. *Histochem J* 19: 257-263, 1987

- 4) Reid PE, Volz D, Park CM, Owen DA, Dunn WL: Methods for identification of side chain O-acyl substituted sialic acids and for the simultaneous visualization of sialic acids, its O-acyl variants and O-sulfate ester. *Histochem J* 19: 396-398, 1987
- 5) 勝山 努, 小野謙三: シアル酸の組織化学. *信州医誌* 29: 643-655, 1981
- 6) Skutelsky E, Roth J: Cationic colloidal gold—a new probe for the detection of anionic cell surface site by electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 34: 693-696, 1986
- 7) Murata F, Tsuyama S, Ishida K, Kashio N, Kawano M, Zeug ZL: Sulfated glycoconjugates demonstrated in combination with high iron diamine thiocarbonylhydrazide-silver proteinate and silver acetate physical development. *J Electron Microsc (Tokyo)* 41: 14-20, 1992
- 8) 山田和順: 組織化学, 初学者のための基礎と実際. pp 224-225, 南江堂, 東京, 1987
- 9) Spicer SS: Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J Histochem Cytochem* 13: 211-234, 1965
- 10) Nagata T: Radioautography in medicine. pp13-22, Shinshu University Press, Matsumoto, 1994
- 11) Van Beurden-Lamers WMO, Spee-Brand R, Dekker J, Strous GJ: Sulfation causes heterogeneity of gastric mucins. *Biochem Biophys Acta* 990: 232-239, 1989
- 12) Sheahan DG, Jervis HR: Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. *Am J Anat* 146: 103-132, 1976
- 13) Jennings MA, Florey HW: Autoradiographic observations on the mucous cells of the stomach and intestine. *Q J Exp Physiol* 41: 131-152, 1956
- 14) Mowry RW, Winkler CH: The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of *Cryptococcus neoformans*, *Pneumococci* and *Staphylococci*. *Am J Pathol* 32: 628-629, 1965
- 15) Pearse AGE: Carbohydrates and mucosubstances. In: *Histochemistry, theoretical and applied*. 3rd ed, vol 1, pp 294-380, J. & A. Churchill, London, 1968
- 16) Lev R, Spicer SS: Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem* 12: 309, 1964
- 17) Nagata T: Radiolabeling of soluble and insoluble compounds as demonstrated by light and electron microscopy. In: *Recent advances, in cellular and molecular biology. Molecular biology of pyrimidines, DNA, peroxisomes, organelles and cell movements*. Wegmann RJ, Wegmann MA (eds), vol 6, pp 9-21, Peeters Press, Leuven, 1992
- 18) Stephens CA, Anastassiades TP, Kosir J: Stimulation of proteoglycan synthesis by fibroblastic cells in culture due to addition of matrigenin from bovine bone. *Biomed Biochim Acta* 46: 361-367, 1987
- 19) Hale G, Streeter B, Hann AC, Gasesa P, Wusteman FS: Chondroitin sulfate at the endothelial lumen of pig aorta: assay by radiolabeling and by X-ray microanalysis. *Biosci Rep* 7: 187-191, 1987
- 20) Dekker J, Wilma MO, Van Beurden-Lamers, Strous GJ: Biosynthesis of gastric mucus glycoprotein of the rat. *J Biol Chem* 264: 10431-10437, 1989
- 21) Goso Y, Hotta K: Types of oligosaccharide sulfation, depending on mucus glycoprotein source, corpus or antral, in rat stomach. *Biochem J* 264: 805-812, 1989
- 22) Albedi FM, Cassano AM, Ciaralli F, Taruscio D, Donelli G: Ultrastructural identification of sulfated glycoconjugates in the Golgi apparatus in human colonic absorptive cells. *Histochemistry* 92: 73-79, 1989
- 23) Young RW: The role of the Golgi complex in sulfate metabolism. *J Cell Biol* 57: 175-189, 1973
- 24) Suganuma T, Suzuki S, Tsuyama S, Murata F: Mucosubstances of the rat gastric mucosa studied by means of several histochemical methods. *Acta Histochem Cytochem* 14: 534-548, 1981

- 25) Reid PE, Owen DA, Fletcher K, Rowan RE, Reimer CL, Rouse GJ, Park CM.: The histochemical specificity of high iron diamine-alcian blue. *Histochem J* 21 : 50-57, 1989
- 26) Huttner WB: Protein tyrosine sulfation. *TIBS* 12 : 361-363, 1987
- 27) Danielsen EM: Tyrosine sulfation is not required for microvillar expression of intestinal aminopeptidase N. *Biochem J* 254 : 219-222, 1988
- 28) Spicer SS, Duvenyi J: Histochemical characteristics of mucopolysaccharides in salivary and exorbital lacrimal gland. *Anat Rec* 149 : 333-358, 1964
- 29) Roe R, Corfield AP, Williamson CN: Sialic acid in colonic mucin: an evaluation of modified PAS reactions in single and combination histochemical procedures. *Histochem J* 21 : 216-222, 1989
- 30) Sugihara K, Jass JR: Colorectal cell in sialomucin heterogeneity: its relation to malignant disease. *J Clin Pathol* 39 : 1088-1095, 1986
- 31) Jones R, Reid L: The effect of pH on alcian blue staining of epithelial acid glycoproteins. II. Human bronchial submucosal gland. *Histochem J* 5 : 19-27, 1972
- 32) Reid PE, Park CM: Carbohydrate histochemistry of epithelial glycoproteins. *Prog Histochem Cytochem* 21 : 1-169, 1990
- 33) Neutra M, Leblond CP: Synthesis of carbohydrates of mucus in Golgi complex as shown by electron microscopic radioautography of goblet cells of rat injected with glucose-³H. *J Cell Biol* 30 : 119-136, 1966
- 34) Altmann GG: Morphological observations on mucus-secreting nongoblet cells in the deep crypts of the rat ascending colon. *Am J Anat* 167 : 95-117, 1983
- 35) Tandler B: Ultrastructure of the human submaxillary gland. I. Architecture and histological relationships of the secretory cells. *Am J Anat* 111 : 287-307, 1962
- 36) Ozawa H, Picart R, Barret A, Tougaard C: Heterogeneity in the pattern of distribution of the specific hormonal product and secretogranins within the secretory granules of rat prolactin cells. *J Histochem Cytochem* 42 : 1097-1107, 1994
- 37) Thomopoulos GN, Schulte BA, Spicer SS: Light and electron microscopic cytochemistry of glycoconjugates in the rectosigmoid colonic epithelium of the mouse and rat. *Am J Anat* 168 : 239-256, 1983
- 38) Park CM, Reid P E, Owen DA, Volz D, Dunn L: Histochemical studies of epithelial cell glycoproteins in normal rat colon. *Histochem J* 19 : 546-554, 1987
- 39) Reid PE, Walker DC, Terpin T, Owen DA: Histochemical studies of the colonic epithelial glycoproteins of the normal rabbit. *Histochem J* 20 : 533-550, 1988

(7. 9. 6 受稿)