

マウス結腸杯細胞の糖蛋白合成に関する 組織化学的研究

丸 山 正 廣

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 Glycoprotein Synthesis in the Colonic Goblet Cells of Mice

Masahiro MARUYAMA

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

(Director: Prof. Tetsuji NAGATA)

In order to study the aging changes in colonic goblet cells of mice, both radioautography and X-ray microanalysis were carried out. Nine groups of ddY mice, aged from fetal day 19, to 1 year after birth, were used. For radioautography, all the animals were given an intraperitoneal injection of ^3H -glucosamine ($30\mu\text{Ci/g}$ bw). After 1 hr, tissues from the distal colons were doubly fixed in 2.5 % glutaraldehyde and 1 % osmium tetroxide, and embedded in Epon, and thick and thin sections were radioautographed for light and electron microscopy. They were observed with an either Olympus Vanox light microscope or JEOL JEM-4000-EX electron microscope at 300kV. Thin sections from each animal were analyzed with a Tracor-Northern energy dispersive X-ray microanalyzer, TN-5400.

By light and electron microscopic radioautography, silver grains indicating glycoprotein synthesis were found to be localized over endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and mucigen granules. The number of silver grains reached a maximum at 2 weeks and decreased with aging.

With X-ray microanalysis, S-K α peaks were detected in the mucigen granules, reaching a maximum at 2 weeks after birth and decreasing with aging.

From these results, it is concluded that the synthesis and the total contents of glycoproteins in colonic goblet cells reach a maximum at 2 weeks and decrease with aging. *Shinsu Med. J.*, 39: 467-478, 1991

(Received for publication February 4, 1991)

Key words: goblet cell, glycoprotein, radioautography

杯細胞, 糖蛋白, ラジオオートグラフィー

I 緒 言

細胞内糖蛋白質に関する文献は多数あり, 生化学的には大きく3つのタイプ, すなわち細胞膜中の糖蛋白¹⁾⁻⁶⁾, ライソゾーム中の糖蛋白質²⁾⁻⁶⁾, 多くの分泌細胞からの分泌物中の糖蛋白質¹⁾²⁾⁴⁾⁶⁾⁻¹⁷⁾に分類され

ている。各種細胞の中でも結腸の腸陰窩に多数混在する杯細胞は, 腸管腔に糖質を分泌する細胞で, 糖蛋白の研究には試料を得やすい材料であり, 従来より結腸杯細胞から分泌される分泌物中の糖蛋白合成に関して, ラット胎仔や成熟ラットについての光学および電子顕微鏡ラジオオートグラフィーの研究が多数報

告²⁴⁾⁻¹⁹⁾されている。しかし、結腸杯細胞の加齢に関する糖蛋白合成についての研究、特に光学および電子顕微鏡ラジオオートグラフィーによる研究はわずかで、Robert と Donald¹⁰⁾がヒトの妊娠10週胎児から出生20ヵ月乳児と成人を比較検討した研究を発表したがラットやマウスの実験動物を用いて胎仔から生後1年までに至る過程に関する研究はまったくなかった。著者は胎生期より中年期に至る各月齢における正常マウスの結腸杯細胞の糖質合成と糖蛋白量が加齢に伴いどのように変動するかを明らかにすることを目的として、各月齢のマウスに³H-glucosamineを注射し、光学および電子顕微鏡ラジオオートグラフィーを行って糖蛋白合成の変動について観察した。一方、超高圧(透過型)電子顕微鏡(加速電圧300kV)にエネルギー分散型X線分析器を装備した分析電子顕微鏡を使用して結腸杯細胞内のsulfomucinに含まれる総硫黄(S)を定量した文献もまったくない。そこで、著者は、胎生期より中年期に至る各月齢における正常マウスの結腸杯細胞の粘液原顆粒内の硫黄(S)の総量が加齢に伴いどのように変動するかを明らかにするため、X線微小部分分析にて研究を行ったので、あわせて報告する。

II 材料と方法

A 実験動物

実験動物はRI投与前には自由に給食給水し、飼料にクレア製EC-2固形飼料を用いて、教室内で飼育したddY系マウスを使用した。生後2ヵ月の雌雄成熟動物をケージでメイトングして妊娠した雌を分離し、胎生19日、生後1日、3日、1週、2週、1ヵ月、2ヵ月、6ヵ月、1年の各時期に、同腹の各3匹ずつの雌雄動物、9群、27匹を用いた。

B ラジオオートグラフィー

D-6-³H-glucosamine (Amersham, specific activity 5Ci/mM, 30 μ Ci/g bw)を胎仔には母親に、生後の動物にはそれぞれ腹腔内に注射し、1時間後にNembutal麻酔、開胸、左心室から0.1M 燐酸緩衝(pH7.4) 2.5%グルタルアルデヒド液で灌流固定して屠殺した。それぞれのマウスの遠位結腸を採取、細切し0.1M 燐酸緩衝2.5%グルタルアルデヒド液2時間前固定、洗浄してから、0.1M 燐酸緩衝(pH7.4) 1%四酸化オスミウム液で1時間後固定を行った。組織片は十分洗浄して上昇アルコール系列で脱水し、アセトンで浸透、エポン812で熱重合により包埋し、LKBガラスナイフメーカーにより作成したガラスナイフを使用

し、超ミクロトーム(Porter-Blum型MT2B, Dupont Sovall, Newtown, Conn, USA)にて光顕用は2 μ mの厚さの切片を作製した。切片をスライドガラスに貼付し、さくらNR-M2乳剤(小西六写真工業・東京)を用いて、dip法²⁰⁾でラジオオートグラフィーを行い、4°Cの冷蔵庫中で3ヵ月間で露出し、SDX-1現像し、酸性ハイポ液で定着した後、燐酸緩衝0.5%トルイジンブルー液で染色し、光学顕微鏡Olympus Vanox AHB-LB型で観察した。

電顕用には0.2 μ mの厚さの切片を作製した。メッシュ6枚を載せたガラス板をスライドガラスに張り付け、そのガラス板にさくらNR-H2乳剤(小西六写真工業・東京)をwire-loop²⁰⁾を適応し、ラジオオートグラフィーを行い4°Cの冷蔵庫中で22ヵ月間露出し、塩化金増感液で増感後、phenidon現像液で16°C、1分間現像を行った。定着後、水洗、乾燥後クエン酸鉛液で電子染色し、超高圧電子顕微鏡JEOL JEM-4000EX(加速電圧300kV)で観察した。

C X線微小部分分析

ラジオオートグラフィーで用いたddY系マウスの9群から得られた組織片を、ラジオオートグラフィーの場合と同様の方法でエポン812に包埋してから、厚さ0.2 μ mに準薄切し銅メッシュ(VECO)に載せ無染色のままエネルギー分散型検出器(Tracor-Northern-5400)を装備した超高圧電子顕微鏡(JEOL JEM-4000EX型)を用いTEMモードで加速電圧300kVで観察した。観察条件は最初加速電圧を100, 200, 300, 400kVと変化させて測定したがSの分析には300kVが適当であることが判明したので²¹⁾²²⁾定量には300kVとして実験した。Sの定量は試料電流3.2nA, probe径0.2 μ m, 照射時間100秒, dead timeは30%に設定し、杯細胞の粘液原顆粒に電子線をあて、点分析を行った。S-K α 線のスペクトラムは縦軸は16,384, 横軸は20,480eV, S-K α 線のピークのregionは、2,200から2,380KeV, バックグラウンドのregionは15から15.18KeVに設定し、各動物の結腸腸陰窩の浅層(上部)と深層(下部)両方の杯細胞の粘液原顆粒を10個ずつ測定し、S-K α 線の平均ピークカウント(P)とバックグラウンド(B)を測定し、P/B比を算出し、定量分析を行った。得られたデータはコンピューターにより平均値と標準偏差を計算した。

III 結 果

A ラジオオートグラフィー

1 光顕ラジオオートグラフィー

加齢に伴う9群(胎生19日, 生後1日, 3日, 1週, 2週, 1カ月, 2カ月, 6カ月, 1年)の結腸杯細胞を腸陰窩の浅層(上部)と深層(下部)の2部位に分け, その光顕ラジオオートグラムを検討した。胎生19日目マウスの光顕ラジオオートグラムにおいては, 結腸の腸陰窩は浅く未発達で丈の低い単層円柱上皮から成り, その間に杯細胞も少なく, 銀粒子は杯細胞にほとんど認められなかった(Fig. 1)。生後1日目マウスの結腸腸陰窩は, 胎子のそれより深く発達し始め, 杯細胞の数は胎子マウスより多くなったが, まばらに分散していた。杯細胞内には銀粒子はまだほとんど認められなかった。腸陰窩の上部と下部での差は認められなかった。生後3日目マウスの結腸腸陰窩は1日目より深くなったが1週目より浅く, 杯細胞も数が少なく分散していたが銀粒子は粘液原顆粒の基底部にわずかに認められるようになった。腸陰窩上部と下部での差は認められなかった。生後1週目マウスの結腸腸陰窩は, 生後3日目より深く発達し始め, 杯細胞の数も多くなり, 銀粒子は杯細胞の基底部に多く認められるようになった。2週目マウスの結腸腸陰窩は, 著しく深くなり, 杯細胞も数多く, 銀粒子は杯細胞の基底部に多数認められるようになった(Fig. 2)。腸陰窩の上部と下部とを比較すると, 銀粒子数は上部にはるかに多く認められた(Fig. 3)。生後1カ月目マウスの結腸腸陰窩は深く, 円柱上皮細胞の丈も高く数も多く, 杯細胞の数も多くなり, また銀粒子は杯細胞の粘液原顆粒内にも観察されたが, その数は2週目マウスより減少していた。生後6カ月目マウスの結腸腸陰窩は深く, 杯細胞の数も多く, 銀粒子は杯細胞の粘液原顆粒に観察されたが, 2週目マウスより減少していた(Fig. 4)。また腸陰窩の上部と下部の差が認められなくなった。生後2カ月, 6カ月, 1年マウスの形態学的特徴は, 結腸腸陰窩は深く, 杯細胞の数も多く, 2カ月目マウスの特徴とほぼ同様であったが, 杯細胞の粘液原顆粒に観察される銀粒子は, 徐々に減少し, 1年マウスでは観察される銀粒子はきわめて少なかった。

2 電顕ラジオオートグラフィー

胎生19日目マウスの杯細胞を透過電顕で観察すると, 細胞尖端側は電子密度の低い粘液原顆粒が充満し, その基底側の核上部には, ゴルジ層板, ゴルジ空胞, 糸粒体や小胞体が観察され, わずかの銀粒子が粘液原顆粒の基底部に認められた(Fig. 5)。生後1日目マウ

スの結腸腸陰窩の上部と下部の杯細胞は, ゴルジ層板, ゴルジ空胞, 糸粒体は核上部に, 小胞体は粘液原顆粒の周辺に発達し, わずかな銀粒子が小胞体に観察された。生後3日目と1週目マウスの結腸腸陰窩の上部と下部の杯細胞は, ゴルジ層板, ゴルジ空胞や小胞体が核上部のみならず, 粘液原顆粒の周辺にまで発達し, 銀粒子はゴルジ空胞, 小胞体や粘液原顆粒の基底部や内部にも観察された。しかし銀粒子の分布と数については, 上部と下部で差は認められなかった。生後2週目マウスの結腸腸陰窩の上部と下部の杯細胞は, ゴルジ層板, ゴルジ空胞や小胞体が著しく発達し, 銀粒子はこれら細胞小器官や粘液原顆粒内に多数観察され, さらに腸陰窩の上部と下部を比較すると, 銀粒子数は上部で多く下部で少なかった(Fig. 6, 7)。生後1カ月目マウスの結腸腸陰窩の上部と下部の杯細胞の形態学的特徴は, 2週目マウスの特徴とほぼ同様で, ゴルジ層板, ゴルジ空胞や小胞体が著しく発達していたが, 銀粒子はゴルジ装置, 小胞体や粘液原顆粒内にわずかに観察されるだけとなった。生後6カ月目と1年目マウスの結腸腸陰窩の上部と下部の杯細胞は, ゴルジ層板, ゴルジ空胞や小胞体が著しく発達していたが, 銀粒子は粘液原顆粒内にわずかに観察されるのみであった(Fig. 8, 9)。したがって³H-glucosamineの取り込みは2週目から徐々に減少しているのが認められた。

B X線微小部分分析

1 定性的観察

胎生期から生後の各日齢のマウスの結腸腸陰窩の上部と下部に位置する杯細胞の粘液原顆粒を点分析すると, 銅(Cu), オスミウム(Os), 硫黄(S), 塩素(Cl), 鉄(Fe)のピークが認められた(Fig. 10)。これらのピークのうち粘液原顆粒の糖蛋白の成分であるSについて各日齢別に定量を行った。

2 Sの定量

胎生期から生後1日, 3日, 1週, 2週, 1カ月, 2カ月, 6カ月, 1年の各群の結腸腸陰窩上部と下部の杯細胞を各10個ずつ任意に選んで点分析を行い, S-K α 線のピークカウントを測定すると, 結腸腸陰窩上部の杯細胞の粘液原顆粒内のS-K α 線のピークカウント(P)は, 胎生19日目マウス(Fig. 10)から生後1カ月目マウスまでは増加し(Fig. 11a₁-a₅), 2カ月目マウス(Fig. 11a₆)から1年目マウス(Fig. 11a₈)と減少し, 1カ月目マウス(Fig. 11a₅)が最高値を示した。結腸腸陰窩下部の杯細胞の粘液原顆粒内のS-K α 線のピークカウント(P)は, 1日目マウス(Fig.

Table 1 マウス腸陰窩（上部，下部）杯細胞粘液原顆粒内のS-K α 線のピークカウント(P)およびバックグラウンドカウント(B)

腸陰窩 各月齢	P		B	
	腸陰窩上部	腸陰窩下部	腸陰窩上部	腸陰窩下部
胎 仔	1,641	—	190	—
1 日	1,178	1,774	161	196
3 日	1,580	2,018	211	231
1 週	1,616	2,056	178	277
2 週	2,031	1,922	198	201
1 カ月	2,303	2,221	254	285
2 カ月	1,295	1,035	206	211
6 カ月	1,571	919	257	196
1 年	1,228	698	190	205

11b₁) から1カ月目マウス (Fig. 11b₅) までは増加し、2カ月目マウス (Fig. 11b₆) から1年目マウス (Fig. 11b₈) までは減少し、1カ月目マウス (Fig. 11b₆) が最高値を示した。一方、結腸腸陰窩上部の杯細胞の粘液原顆粒内のS-K α 線のバックグラウンドカウント(B)は、1カ月目マウスと6カ月目マウスが高値を示し結腸腸陰窩下部のバックグラウンドカウント(B)は1週目マウスと1カ月目マウスが高値を示した (Table 1)。

各群における粘液原顆粒内に含有されるSを比較するため、ピークカウント(P)とバックグラウンドカウント(B)の比P/B比を各群ごとに計算すると、結腸腸陰窩上部の杯細胞の粘液原顆粒内のP/B比は、胎生19日目から生後2週目まで増加し、1カ月目から1年目まで減少し、2週目が最高値を示した。一方、結腸腸陰窩下部の粘液原顆粒内のS-K α 線のP/B比は、1日目から1週目まで減少し、2週目で増加し、再び1カ月目から1年目まで減少して最低値に達し、2週目が最高値を示した (Fig. 12)。

IV 考 察

A 光顕ラジオオートグラフィー

実験動物の各種組織に観察される糖蛋白については、これまでに組織化学的染色法を用いて分析した多数の研究が発表されている。しかしRI標識化合物を用いて結腸杯細胞の糖蛋白の合成を観察した研究は少ない。今回の光顕ラジオオートグラフィーによる研究の結果、生後3日目マウスから生後1週目マウスまでは、腸陰窩は徐々に深くなり、浅層（上部）と深層（下部）の

区別がはっきりし、生後2週目では、腸陰窩は著しく深くなり、杯細胞の数も急激に増加した。生後1カ月目から1年目マウスでは、腸陰窩の深さや杯細胞の数は生後2週目マウスよりかなり増加していた。加齢に伴う形態については、Levら²³⁾やRobertとDonald¹⁰⁾は、ヒト胎児の結腸で杯細胞が認められる週数は12週目頃からと記している。この時期は著者の使用したddY系マウスでは胎生後期から生後3日目までに相当すると考えられる。

各日齢マウスのラジオオートグラム上の銀粒子は、結腸の杯細胞に局在し、投与された³H-glucosamineの取り込みを示すものであるが、胎生19日目と生後1日目マウスの杯細胞内には銀粒子がほとんど認められなかった。しかし3日目マウスでは腸陰窩の浅層（上部）と深層（下部）で杯細胞の粘液原顆粒の基底部に銀粒子がわずかに認められるようになった。腸陰窩の上部と下部との差は、生後2週目マウスで明らかとなり、銀粒子は上部に多く認められた。銀粒子数は2週で最高に達し、以後1年まで減少し腸陰窩の上部と下部の差も不明瞭となった。これらの結果から、杯細胞の糖蛋白合成は生後増加し、2週で最高に達し、腸陰窩上部で下部より盛んであり、以後減少することが明らかとなった。幼若ラットの結腸杯細胞の糖蛋白合成に関するBennettら⁴⁾の研究では、体重35g~45gのラットに5.0mCiのL-³H-fucoseを静注し、光顕ラジオオートグラフィーを行った結果、結腸腸陰窩の上部と下部の両方における杯細胞へのL-³H-fucoseの取り込みは、早い時間（2分~35分）には粘液原顆粒の基底

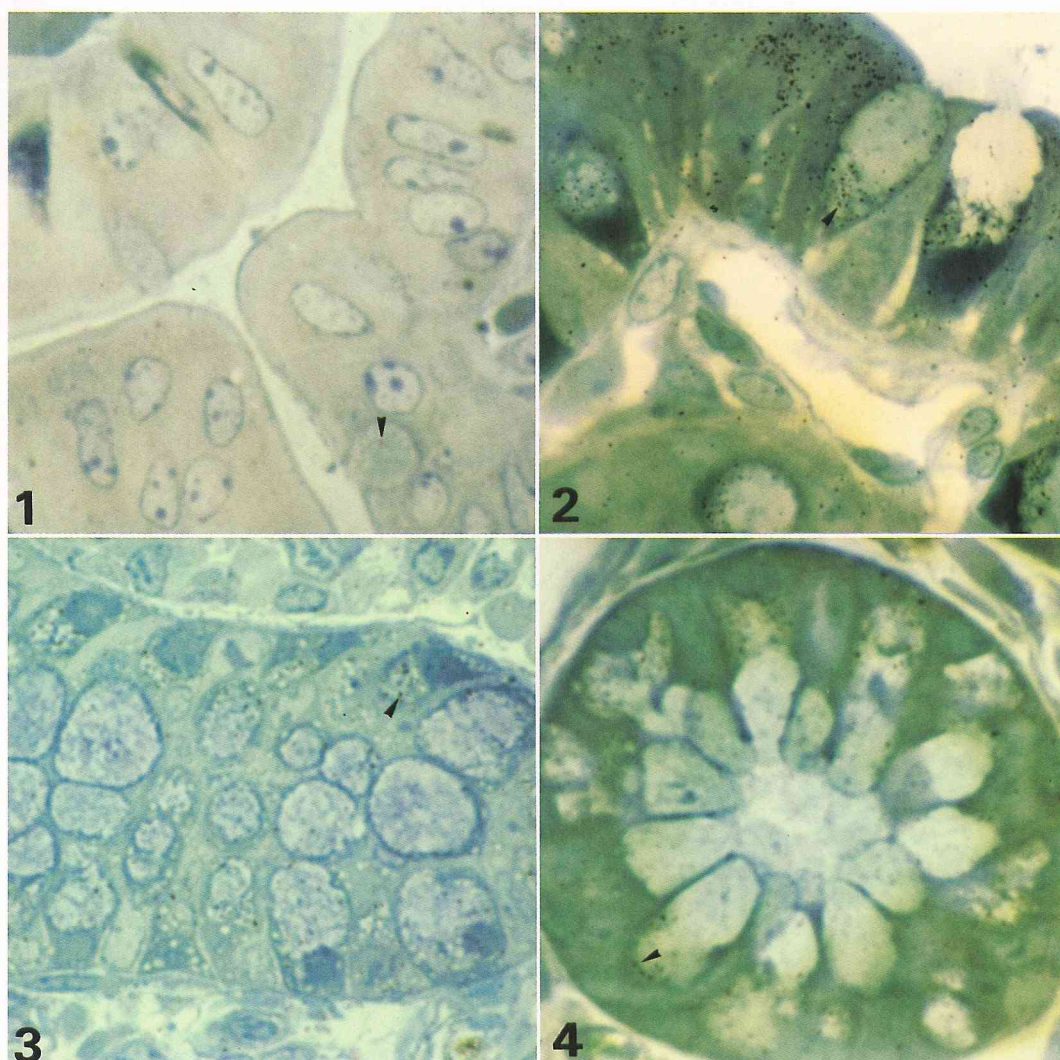


Fig. 1—4 光顕ラジオオートグラフィー

マウス結腸粘膜のエポソ切片，トリジンブルー染色カラー写真。倍率：310倍

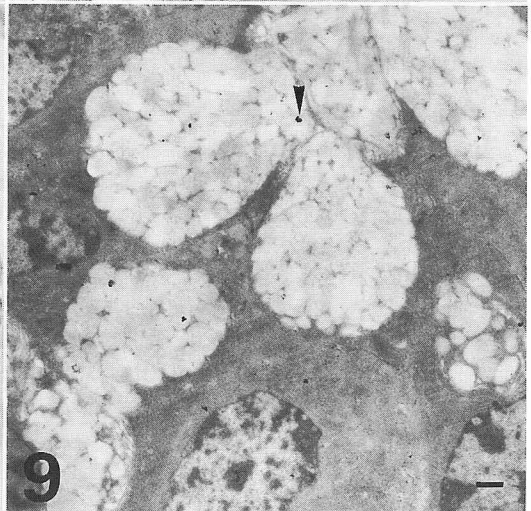
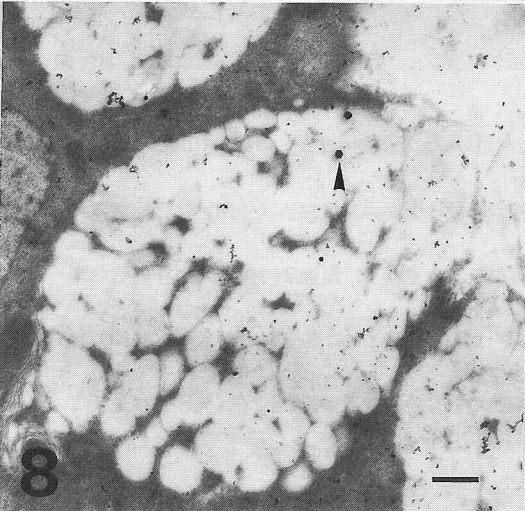
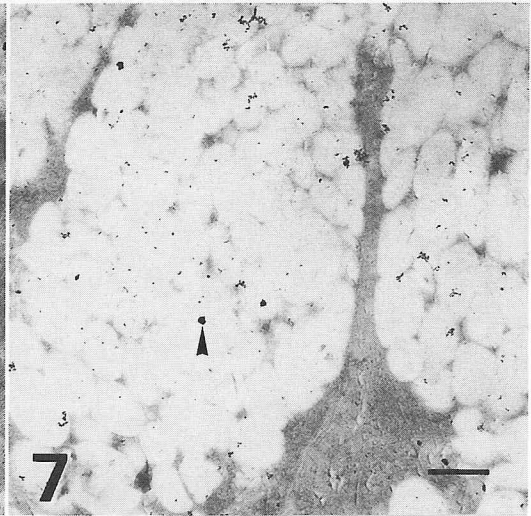
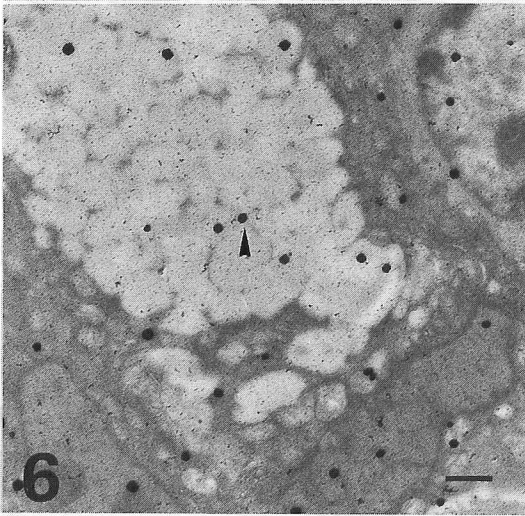
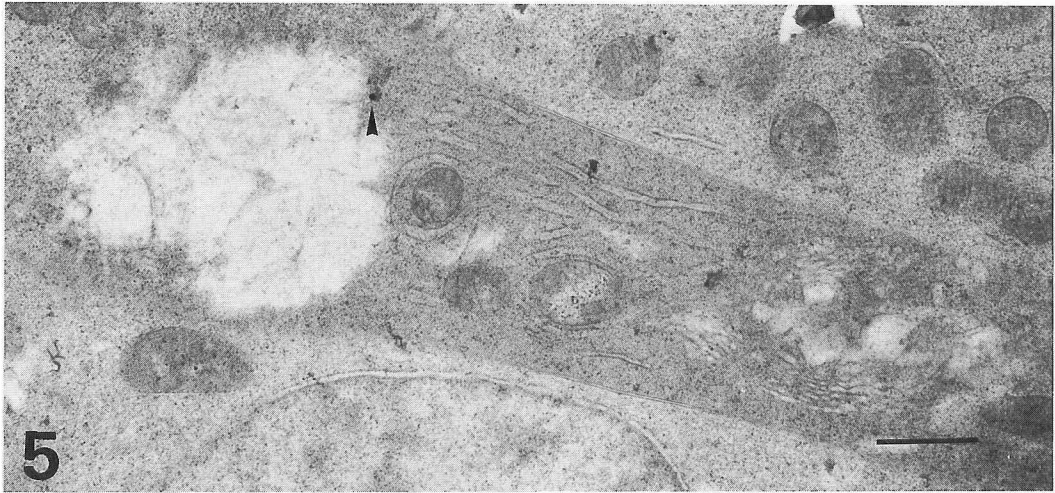
Fig. 3のみ倍率：400倍

Fig. 1 胎生19日マウス。腸陰窩は浅く，杯細胞の数は少ない。銀粒子（矢印）は杯細胞内にほとんど認められない。

Fig. 2 生後2週マウス。腸陰窩上部。杯細胞の数も多くなり，銀粒子（矢印）は杯細胞の基底部に多数認められる。

Fig. 3 生後2週マウス。腸陰窩下部。杯細胞は多い。杯細胞の基底部の銀粒子（矢印）は Fig. 2の腸陰窩上部に比べてはるかに少ない。

Fig. 4 生後6カ月マウス。腸陰窩上部の杯細胞の数も多くなるが，銀粒子（矢印）は生後2週マウスより少ない。



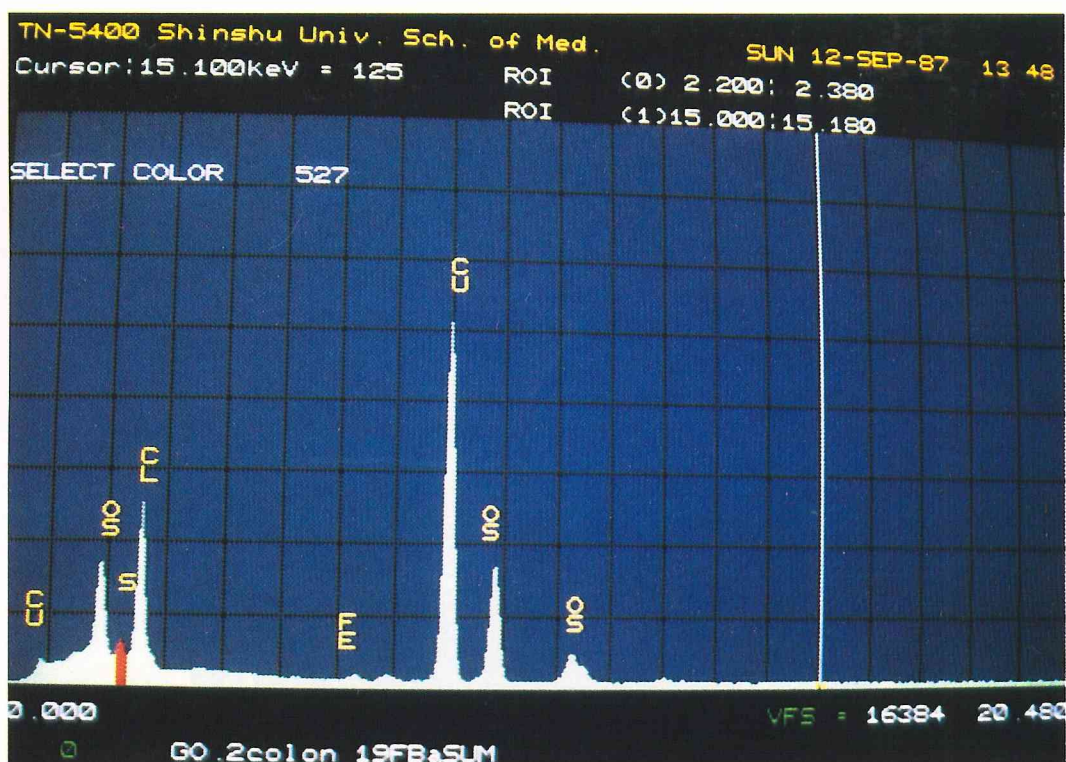


Fig. 10 胎生19日マウスの腸陰窩杯細胞粘顆粒の点分析スペクトラム

部に認められ、遅い時間（1時間～30時間）にかけては、粘液原顆粒の基底部には少なくなり、粘液原顆粒内に多く認められたと述べている。

著者の実験では、注射後1時間での ^3H -glucosamineの取り込みの銀粒子は、粘液原顆粒の基底部に局在しており、Bennettら⁴⁾の早い時間に相当していた。この時間的違いは、ラットとマウスの種の

違いか、または ^3H -fucoseと ^3H -glucosamineの糖蛋白への取り込みの違いによると考えられる。もし、 ^3H -fucoseと ^3H -glucosamineの糖蛋白への取り込みの違いが有るとすれば、Murtyら¹¹⁾による ^3H -fucoseと ^3H -glucosamineに関するモル比の違いによるのかも知れない。またRobertとDonald¹⁰⁾は妊娠10週の胎児から出生20カ月の乳児を合わせた20人と、成人12人

Fig. 5-9 電顕ラジオオートグラフィー

マウス結腸腸陰窩杯細胞のエボン準超薄切片（ $0.2\mu\text{m}$ ）。鉛染色。電顕写真。スケール：

$1\mu\text{m}$

Fig. 5 胎生19日マウス。写真中央の杯細胞には、ゴルジ層板、ゴルジ空胞や小胞体が核上部に観察され、わずかな銀粒子（矢印）が粘液顆粒の基底部に観察される。

Fig. 6 生後2週マウス。結腸腸陰窩上部の杯細胞。銀粒子（矢印）は粘液原顆粒内に多数認められる。

Fig. 7 生後2週マウス。結腸腸陰窩下部の杯細胞。銀粒子（矢印）は粘液原顆粒内に認められるが、Fig. 6の上部より少ない。

Fig. 8 生後6カ月マウス。結腸腸陰窩上部の杯細胞。銀粒子（矢印）は粘液原顆粒内に認められるがきわめて少ない。

Fig. 9 生後6カ月マウス。結腸腸陰窩下部の杯細胞。銀粒子（矢印）は粘液原顆粒内にきわめて少ない。

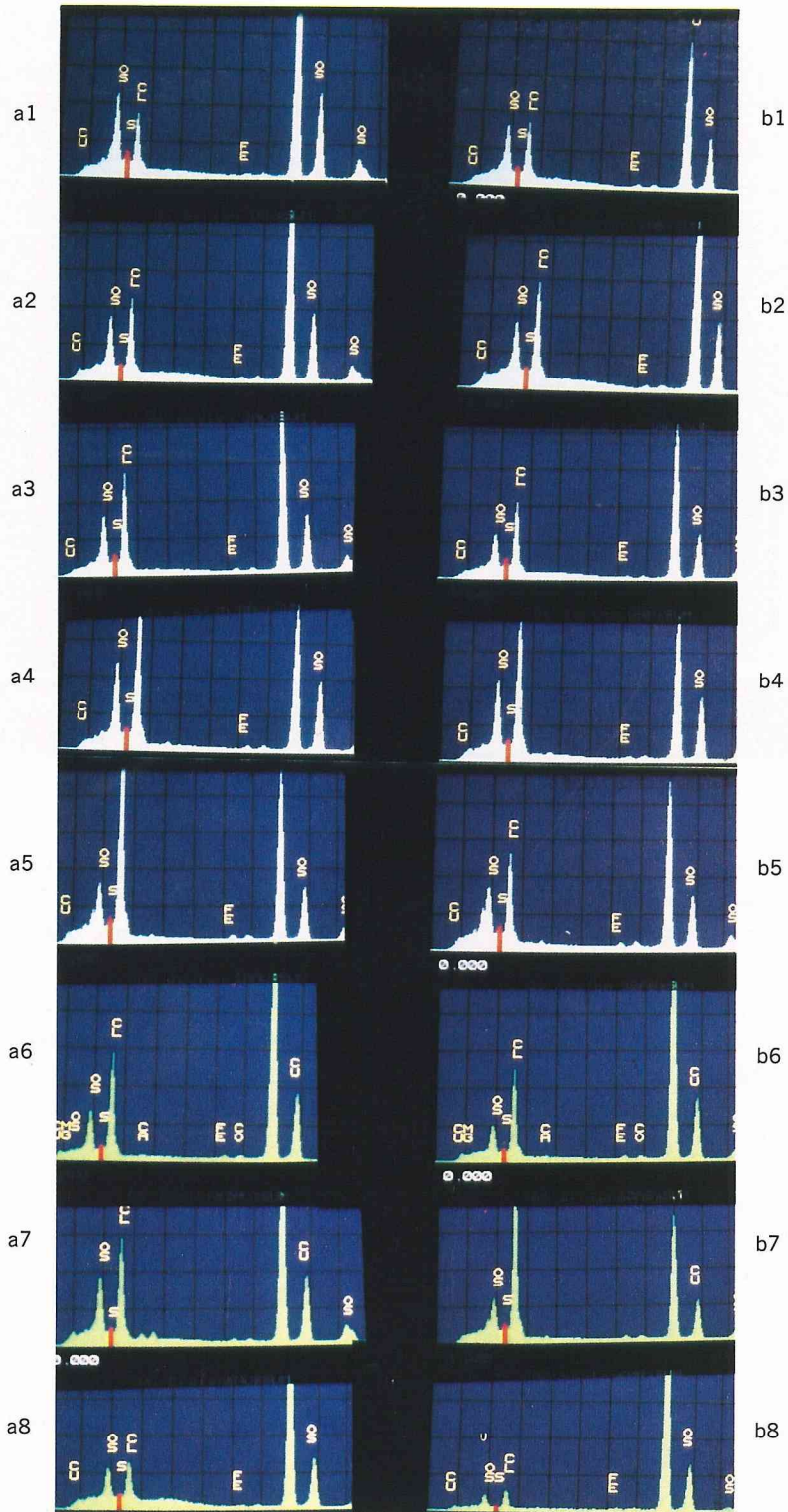


Fig. 11

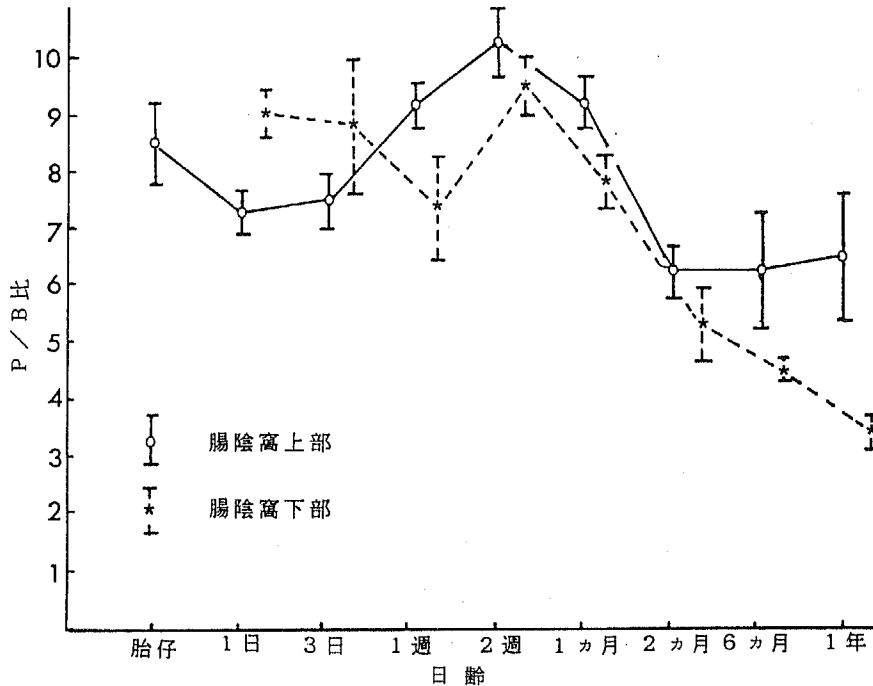


Fig. 12 加齢に伴うマウス結腸杯細胞内の S-K α 線の P/B 比の変化

生後2週の P/B 比は上部と下部両方ともに最大値を示し、以後は減少している。

の右側結腸から生検によって得られた材料を、0.4 mCi の $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ を含んだ Puck's 液 4ml 中で組織培養した結果、すでに妊娠19週目の虫垂において腸陰窩の杯細胞への $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ の取り込みが、粘液原顆粒内と粘液原顆粒の基底部に認められた。しかし、粘膜下組織や腸管腔内には認められなかったと述べている。今回の実験では胎生19日目マウスには ^3H -glucosamine の取り込みがほとんど認められず、Robert と Donald¹⁰⁾ のヒトの結果とは一致していない。これもマウスとヒトという種の違いか、結腸と虫垂の部位の違い、 ^3H -glucosamine と $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ の取り込みの違いによるものと考えられる。

B 電顕ラジオオートグラフィー

今回の研究結果では、胎生19日目マウスの細胞小器官はまだ未発達のもののが核上部に認められるだけであるが、生後1日目マウスでは小胞体の発達が始まり、

3日目マウスではゴルジ装置と小胞体が粘液原顆粒の周辺に徐々に発達してきた。1週、2週目マウスではゴルジ装置や小胞体が粘液原顆粒の周辺に著しく発達し、1ヵ月、2ヵ月、1年目マウスでは細胞小器官が2週目マウスよりさらに著明に発達しているのが観察された。各日齢の銀粒子の局在は胎生19日目、生後1日目までは杯細胞内にほとんど認められないが粘液原顆粒の基底部にわずかに認められる程度であったが、生後3日目と1週目マウスでは、銀粒子は杯細胞の粘液原顆粒の基底部にはっきりと認められるようになった。生後1週までは、腸陰窩の上部と下部を比較すると、差は認められていないが、生後2週目マウスの銀粒子は杯細胞の粘液原顆粒内に認められ、腸陰窩の上部のほうが下部よりはるかに多く認められた。生後1ヵ月、2ヵ月、1年目マウスの銀粒子は、杯細胞の粘液原顆粒内に認められるが、わずかで、1年目マウスではき

Fig. 11 マウス結腸腸陰窩粘液原顆粒の加齢による変化

a_1 は生後1日腸陰窩上部。 b_1 は生後1日腸陰窩下部。 a_2 は生後3日上部。 b_2 は生後3日下部。 a_3 は生後1週上部。 b_3 は生後1週下部。 a_4 は生後2週上部。 b_4 は生後2週下部。 a_5 は生後1ヵ月上部。 b_5 は生後1ヵ月下部。 a_6 は生後2ヵ月上部。 b_6 は生後2ヵ月下部。 a_7 は生後6ヵ月上部。 b_7 は生後6ヵ月下部。 a_8 は生後1年上部。 b_8 は生後1年下部。

わめて少なかった。

幼若ラット結腸の杯細胞の糖蛋白合成に関する Bennett ら⁴⁾の研究で結腸腸陰窩の上部と下部の両方における杯細胞への $L\text{-}^3\text{H}\text{-fucose}$ の取り込みの時間的経過は、早い時間から核上部のゴルジ装置に銀粒子が多く観察され、遅い時間（1時間～30時間）になって、尖端側細胞膜に数多く観察されている。また、Neutra と Leblond⁹⁾は、若いラットに $^3\text{H}\text{-galactose}$ を投与し、結腸杯細胞への取り込みの経過を、時間的に観察した結果、早い時間にはゴルジ装置、特にゴルジ空胞内に取り込みが多く、遅い時間には、細胞膜に観察されたと記している。また、Michaels と Leblond⁹⁾は、成熟ラットに 5.0mCi の $L\text{-}^3\text{H}\text{-fucose}$ を静注して結腸の杯細胞への取り込みを経時的に観察した結果、1時間経過後は、ゴルジ装置やミトコンドリアには少なく、粘液原顆粒内には30分経過後の2倍程多く観察され、また細胞膜にも多量に認めたと報告している。しかし、著者の実験における時間的経過の観察結果によると、生後1カ月目の成熟マウスでは1時間経過後でも、粘液原顆粒内への著明な $^3\text{H}\text{-glucosamine}$ の取り込みは観察されなかった。

Weiser³⁾, Michaels と Leblond⁵⁾, Neutra と Leblond⁹⁾, Robert と Donald¹⁰⁾は、ラットの結腸粘膜への $^3\text{H}\text{-galactose}$ の取り込みは細胞の成熟や糖蛋白の合成に平行して、腸陰窩の下部から上部に徐々に増加していく、と述べている。著者の実験では、 $^3\text{H}\text{-glucosamine}$ の取り込みは生後2週目マウスの杯細胞で最も多く、また、腸陰窩の上部が下部より多かった。その他の各日齢においては、取り込みがほとんど認められないか、あっても2週目マウスより少なく、腸陰窩の上部と下部を比較してみても差が認められなかった。したがって、2週目マウスの杯細胞で、糖蛋白合成機能が最も盛んとなり、その後加齢によって機能が低下するものと考えられる。

また Dawson と Filipe⁷⁾はラットの腹腔内に $D\text{-}L\text{-}^3\text{H}\text{-galactose}$ と $D\text{-}L\text{-}^3\text{H}\text{-fucose}$ を体重当たり $2\mu\text{Ci/g}$ を注射して、1時間後に結腸腸陰窩上部、中部、下部での円柱上皮細胞の $D\text{-}L\text{-}^3\text{H}\text{-galactose}$ と $D\text{-}L\text{-}^3\text{H}\text{-fucose}$ の取り込みを光顕ラジオオートグラフィーで調べた結果を報告している。それによると $^3\text{H}\text{-galactose}$ の取り込みは、結腸腸陰窩の上部の円柱上皮細胞に最も多く観察されたが、 $^3\text{H}\text{-fucose}$ の取り込みは結腸腸陰窩の上部、中部、下部のどの部位でもあまり差がなかったと述べている。今回の著者の実験結

果では $^3\text{H}\text{-glucosamine}$ の取り込みが、光顕的にも、また電顕的にも生後2週目マウスの結腸腸陰窩上部で、下部より多く認められたので、杯細胞は結腸腸陰窩上部と下部とでは機能的に差があると考えられる。結腸腸陰窩における浅層（上部）と深層（下部）において杯細胞の糖蛋白合成の差があることは、すでに、Nagata ら²⁴⁾が SO_4 の取り込みによるラジオオートグラフィーの研究によって明らかにしており、今回の著者の成績もこれらの結果と良く一致している。

C X線微小部分分析

分析電顕によると、粘液原顆粒の中の総硫黄(S)量は、糖蛋白の含有アミノ酸と比例すると考えられ、Sを定量することによって粘液原顆粒の中の総糖蛋白の変動を推定することができる。生体組織のSを定量した文献は少なく、著者ら²¹⁾²²⁾が、加速電圧と各種元素のP/B比との関係を調べた結果を報告したのみである。その結果によると、Agについては、同一試料で加速電圧を100kV から400kV まで上昇させるとP/B比が上昇したが²²⁾、SについてはP/B比が300kV で最大値に達し、400kV で下降することが示された²¹⁾。今回の研究においては、加速電圧はP/B比が極大値になる300kV を用いてSの定性と定量を行った。その結果として動物の加齢に伴い、腸陰窩の上部と下部のSの量は変動の様子がやや異なるが、生後2週で最高となり、以後加齢とともに減少して、1年まで低下していくことが初めて明らかとなった。生後2週前後において、腸陰窩上部と下部の杯細胞粘液原顆粒内のS量の変動が異なる原因は、 $^3\text{H}\text{-glucosamine}$ の取り込みによって示された糖蛋白合成の違いによるものと考えられる。

V 結 論

光学および電子顕微鏡ラジオオートグラフィーを用いて、マウス結腸杯細胞における糖蛋白合成と糖蛋白量が加齢に伴いどのように変動するかを研究し次の結果を得た。

- 1 結腸杯細胞粘液原顆粒への糖蛋白合成の量は、加齢に伴って変動し、胎生期から生後1週までは少ないが生後2週で急激に増加し、生後1カ月以降1年まで減少した。
- 2 生後2週の杯細胞内の糖蛋白合成は、腸陰窩上部では下部より盛んであることが明らかになった。
- 3 電顕的観察により、結腸杯細胞では、 $^3\text{H}\text{-glucosamine}$ の銀粒子は、ゴルジ装置、小胞体、粘

液原顆粒に局在することが明らかにされた。

- 4 X線微小部分分析の結果、結腸腸陰窩上部と下部の粘液原顆粒内のS—K α 線のP/B比は、加齢に伴って変動し、胎生期から生後1週までは増加し、生後2週で最高値を示し、生後1カ月以降1年まで減少することが明らかとなった。

本論文の要旨は第19回日本臨床電子顕微鏡学会（昭和62年9月、東京）および第44回日本電子顕微鏡学会学術講演会（昭和63年6月、仙台）において発表した。

稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導と御校閲をして下さいました信州大学医学部第1解剖学教室の恩師永田哲士教授に深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) Martins-Palono, A.: The surface coats of animal cells. *Int Rev Cytol*, 29: 29-75, 1970
- 2) Spiro, R. G.: Glycoproteins. *Adv Protein Chem*, 27: 350-467, 1973
- 3) Weiser, M. M.: Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. *J Biol Chem*, 248: 2536-2541, 1973
- 4) Bennett, G., Leblond, C. P. and Haddad, A.: Migration of glycoprotein from the Golgi apparatus to the surface of various cell type as shown by radioautography after labeled fucose injection into rats. *J Cell Biol*, 60: 258-284, 1974
- 5) Michaels, J. E. and Leblond, C. P.: Transport of glycoprotein from Golgi apparatus to cell surface by means of "carrier" vesicles, as shown by radioautography of mouse colonic epithelium after injection of ^3H -fucose. *J Microscopie Biol Cell*, 25: 243-248, 1976
- 6) Bennett, G. and Leblond, C. P.: Biosynthesis of glycoprotein present in plasma membranes, lysosomes and secretory materials, as visualized by radioautography. *Histochem J*, 9: 393-417, 1977
- 7) Dawson, P. A. and Filipe, M. I.: A comparison of ^3H -galactose and ^3H -fucose uptake with the morphological and histochemical changes observed in mucous secretion in chemically induced rat colonic carcinoma. *Histochem J*, 12: 23-37, 1980
- 8) Neutra, M. and Leblond, C. P.: Synthesis of carbohydrates of mucus in Golgi complex as shown by electron microscopic radioautography of goblet cells of rats injected with glucose- ^3H . *J Cell Biol*, 30: 119-136, 1966
- 9) Neutra, M. and Leblond, C. P.: Radioautographic comparison of the uptake of galactose- ^3H and glucose- ^3H in the Golgi region of various cells secreting glycoproteins or mucopolysaccharides. *J Cell Biol*, 30: 137-150, 1966
- 10) Robert, L. and Donald, O.: Histochemical and radioautographic studies of normal human fetal colon. *Histochemistry*, 39: 301-311, 1974
- 11) Murty, V. L. N., Downs, F. J. and Pigman, W.: Rat colonic mucus glycoprotein. *Carbohydr Res*, 61: 139-145, 1978
- 12) Ranpal, P., Lamont, J. T. and Trier, J. S.: Differentiation of glycoprotein synthesis in fetal rat colon. *Am J Physiol*, 235: E207-E212, 1978
- 13) Dawson, P. A. and Filipe, M. I.: Changes in ^3H -galactose uptake in human colonic mucosa with carcinoma: An ultrastructural study. *Histochem J*, 14: 361-383, 1982
- 14) Dawson, P. A. and Filipe, M. I.: Uptake of ^3H -threonine in human colonic mucosa associated with carcinoma: An autoradiographic analysis at the ultrastructural level. *Histochem J*, 14: 385-401, 1982
- 15) Dawson, P. A. and Filipe, M. I.: Uptake of ^{35}S -sulphate in human colonic mucosa associated with carcinoma: An autoradiographic analysis at the ultrastructural level. *Histochem J*, 15: 3-13, 1983
- 16) Herrera, H. and Rodriguez, E. M.: Secretory glycoproteins of the rat subcommissural organ are N-linked complex-type glycoproteins. Demonstration by combined use of lectins and specific

- glycosidases, and by the administration of Tunicamycin. *Histochemistry*, 93 : 607-615, 1990
- 17) Phillips, T. E. and Frisch, E. B. : Secretory glycoconjugates of a mucin synthesizing human colonic adenocarcinoma cell line : Analysis using double labeling with lectins. *Histochemistry*, 93 : 311-317, 1990
 - 18) Neutra, M. R., Grand, R. J. and Trier, J. S. : Glycoprotein synthesis, transport and secretion by epithelial cells of human rectal mucosa. *Lab Invest*, 36 : 535-546, 1977
 - 19) Lamont, J. T. and Ventola, A. : Galactosyltransferase in fetal, neonatal and adult colon : Relationship to differentiation. *Am J Physiol*, 235 : E213-E217, 1978
 - 20) 永田哲士 : ラジオオートグラフィー. 理論と実際. 日本組織細胞化学会編 : 組織細胞化学 1985, pp.207-226, 学際企画, 東京, 1985
 - 21) Maruyama, M. and Nagata, T. : X-ray microanalysis with a high voltage electron microscope quantifying sulfur in colonic goblet cells of aging mice. *J Clin Electron Microscopy*, 20 : 678-679, 1987
 - 22) Nagata, T., Maruyama, M. Ichikawa, R. and Usuda, N. : X-ray microanalysis of biological specimens by high voltage transmission electron microscopy. *Proc 8th Intern Cong Histochem Cytochem*, p. 858 Washington, P. C. U. S. A., 1988
 - 23) Lev, R., Siegel, H. I. and Bartman, J. : Histochemical studies of developing human fetal small intestine. *Histochemie*, 29 : 103-119, 1972
 - 24) Nagata, T., Kawahara, I. Maruyama, M. and Ma, H. : Radioautographic study on the glycoconjugate synthesis in the gastrointestinal mucosa of the mouse. In : Ohyama, M. and Muramatsu, T. (eds.), *Glycoconjugates in Medicine*, pp. 252-256, Professional Postgraduate Service, Tokyo, 1988

(3. 2. 4 受稿)