

原 著

胃における粘液蛋白の生成ならびに分泌に関する研究  
第2編 ラット胃粘膜上皮細胞の電顕ラジオオートグラフによる形態学的研究

小宮山 清 洋  
信州大学医学部第二外科学教室  
(指導: 降旗力男教授)

STUDIES ON PRODUCTION AND EXCRETION  
OF GASTRIC MUCOUS PROTEINS  
PART II ELECTRON MICROSCOPIC RADIOAUTOGRAPHIC STUDY  
OF RAT GASTRIC MUCOSAL EPITHELIA

Kiyohiro KOMIYAMA  
Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine  
(Director: Prof. Rikio FURIHATA)

KOMIYAMA, K. *Studies on production and excretion of gastric mucous proteins. Part II. Electron microscopic radioautographic study of rat gastric mucosal epithelia.* Shinshu Med. J., 29: 291-299, 1981

An electron microscopic radioautographic study was designed to clarify the pathway for the incorporation and discharge of the serum albumin in the mucous membrane epithelial cells. Tissues taken aseptically from the pyloric antral mucosa of rat stomach were cut into small pieces and were incubated in Eagle's MEM containing  $^{125}\text{I}$ -albumin ( $100\mu\text{Ci/ml}$ ) and labelled for varying period from 3 minutes up to 30 minutes. After the incubation, the tissues were fixed, dehydrated, embedded in Epon, sectioned and radioautographed for electron microscopy. Electron microscopic radioautograms revealed the localization of silver grains over rough-surfaced endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, secretory granules and glandular lumen. Results of grain counting were expressed by labelling index of each organella and grain number per  $\mu\text{m}^2$  or per  $\mu\text{m}$  of glandular lumen or intercellular space, respectively.

The results of analyses are summarized as follows.

- 1) The labelling index of rough surfaced endoplasmic reticulum increased significantly in the group of 10 minute continuous incubation but decreased significantly in the group of 20 minute chasing after 10 minute labelling.
- 2) The labelling index of the Golgi apparatus increased significantly in the group of 30 minute continuous incubation and tended to decrease in the chased group.
- 3) In the secretory granules, a significant increase of the labelling index was observed in both groups of 30 minute incubation and of chasing.
- 4) Significant increase of the number of grains per  $\mu\text{m}^2$  in the glandular lumen was observed

only in the groups of 30 minute incubation and of chasing.

- 5) The grain number per  $\mu\text{m}$  on intercellular space did not show any significant difference among respective experimental groups.

From those results, it can be concluded that the albumin incorporated from the media into the epithelial cells is at first transferred into the rough surfaced endoplasmic reticulum and then synthesized to glycoprotein passing through the Golgi apparatus. The glycoprotein is then transmitted into secretory granules which are discharged as mucus into the gastric lumen.

(Received for publication ; September 11, 1980)

Key words ; 電顕ラジオオートグラフィー (electron microscopic radioautography)

$^{125}\text{I}$  標識ヒトアルブミン ( $^{125}\text{I}$ -labelled human albumin)

ゴルジ装置 (Golgi apparatus)

分泌顆粒 (secretory granules)

標識率 (labelling index)

## I 緒 言

胃粘膜から分泌される粘液成分は生化学的には、従来、glycoprotein と考えられて来たが、光顕ならびに電顕組織化学的検索によると胃被蓋上皮細胞は、主として中性多糖からなる粘液を大量に分泌し、これが粘膜表面を被覆、保護することが明らかにされた<sup>1)2)</sup>。

著者は第1編<sup>3)</sup>において胃は血中からアルブミンを取り込み、アルブミンに近似の物質として胃内へ分泌することを推測した。そこで、著者は、血中から胃壁へとりこまれたアルブミンが胃粘液として合成される場として被蓋上皮細胞に着目し、被蓋上皮細胞におけるアルブミンの取り込みの可能性ならびに粘液合成の過程を追及する目的で本実験を行った。

## II 研究材料および研究方法

### A 研究材料

体重250 g前後の Wistar 系、雄成熟ラットを4匹使用し、市販の固型飼料(オリエンタル社 FM 型)にて1週間飼育した。

### B 研究方法

実験開始12時間前から絶食とし、水分のみ摂取させた。このラットを断頭屠殺し、ただちに胃を無菌的に取り出し、ハンクス液で洗浄後、幽門腺粘膜から組織片を採取し、無菌的に1 mm×1 mm×1 mmの大きさに細切した後、 $^{125}\text{I}$ 標識ヨウ化ヒト血清アルブミン( $^{125}\text{I}$ -アルブミン)を100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の割合で含む Eagle MEM (10%仔牛血清含有)を2 ml入れた直径3 cmの Petri dish に組織片を3個ずつ浸漬して、37°Cの

$\text{CO}_2$  ふ卵器中(空気95 :  $\text{CO}_2$  5)で標識した。標識時間は、3分、5分、10分、30分の4群と、10分標識後、 $^{125}\text{I}$ -アルブミンを含まない Eagle MEM 中で洗浄し、同培地中で20分間 chase した合計5群とした。

標識終了後、組織片を Hanks 液で洗浄した後、pH7.2の0.1M カコジル酸緩衝液で調整した2.5%グルタールアルデヒドで1.5時間前固定して、カコジル酸緩衝液で一晩洗浄した後、同様に緩衝した1%四酸化オスミウムで1.5時間後固定して、エタノール系裂で脱水し、エポン包埋した<sup>4)</sup>。試料は LKB 社製 Ultrotome 8,800で厚さ600~800Åに超薄切後、超薄切片に、ラジオオートグラフ用乳剤サクラ NR-H<sub>2</sub>をdropping法<sup>5)</sup>で適用し、80日間露出したのち塩化金増感 phenidon 現像液<sup>6)</sup>で現像し、クエン酸鉛<sup>7)</sup>で染色して、電子顕微鏡(日立 HU-11A)で観察した。

電顕写真は、各実験群について形態計測を行ったが、そのためには、3,000倍ないし5,000倍で撮影したネガフィルムを、キャビネ大に引き伸ばして最終倍率6,600倍ないし11,000倍として用いた。各群から無作為的に、電顕写真を10枚ずつ抽出し、被蓋上皮細胞の各小器官について、Grain counting<sup>8)</sup>を行い、各小器官の標識率を求めた。腺腔については、点計数面積計測法<sup>8)</sup>を行い、単位面積( $\mu\text{m}^2$ )あたりの銀粒子数として表した。細胞間隙はキルビメーターを使用し<sup>8)</sup>、単位長( $\mu\text{m}$ )あたりの銀粒子数で表現した。また、back ground は、腺腔へ銀粒子が未だ出現していないと考えられる、標識時間3分の電顕写真の腺腔における単位面積あたりの銀粒子数を計数し、各小器官当たりの銀粒子数から、その銀粒子数を差し引いて補正し

た。

### III 実験成績

微粒子現像をした電顕ラジオオートグラフでは、銀粒子は直径  $1,000\text{\AA}$  の球形の粒子として認められた。標識時間の違いによる銀粒子の局在性と銀粒子数を比較すると、3分標識群では、銀粒子数は一般に少なく、その局在性は核質、細胞質ともに認められたが、主として粗面小胞体に認められた (Photo. 1)。5分標識群においても同様に、銀粒子は主として粗面小胞体に認められたが、銀粒子数はやや増加し、わずかに銀粒子はゴルジ装置および糸粒体にも出現した (Photo. 2)。10分標識群では、銀粒子は粗面小胞体のほかに、ゴルジ装置へも多く出現した (Photo. 3)。30分持続標識群では、銀粒子は小胞体、ゴルジ装置、糸粒体、分泌顆粒等の各小器官に認められ、また銀粒子数は多く、とくに分泌顆粒や腺腔への出現が目立った (Photo. 4)。10分標識後20分 chase 群では、銀粒子数は小胞体、ゴルジ装置、糸粒体で少なく、分泌顆粒や腺腔に多く出現したが、30分持続標識群と比較すれば減少した (Photo. 5)。

以上述べた観察所見を定量的に分析するために、各小器官について標識率の経時的变化を検討すると、Fig. 1 のごとく、ゴルジ装置の標識率は、3分18.2%，5分20.8%，10分34.6%，30分55.6%，chase 群28.6%となり、推計学的には30分で有意の上昇 ( $P < 0.01$ ,  $N=51$ ) を示したが、chase 群の減少は有意ではなかった ( $P > 0.05$ , NS)。

粗面小胞体では、3分11.3%，5分13.6%，10分21.7%，30分29.9%，chase 群15.3%となり、推計学的には10分から有意の上昇 ( $P < 0.01$ ,  $N=1003$ ) を示し、chase 群で有意の減少 ( $P < 0.05$ ,  $N=932$ ) を示した。

糸粒体の標識率は、3分8.5%，5分8.8%，10分10.7%，30分12.0%，chase 群9.0%で、ほとんど経時的变化を認めず、各群間に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ , NS)。

分泌顆粒では、3分6.1%，5分6.6%，10分9.2%，30分22.7%，chase 群14.0%となり、推計学的には、30分ではじめて有意の上昇 ( $P < 0.01$ ,  $N=1715$ ) を示し、さらに chase 群でも有意の上昇 ( $P < 0.01$ ,  $N=2405$ ) を示した。

以上の成績を要約すると、各小器官のうち、標識率が最初に有意の上昇を示したのは、粗面小胞体で、標

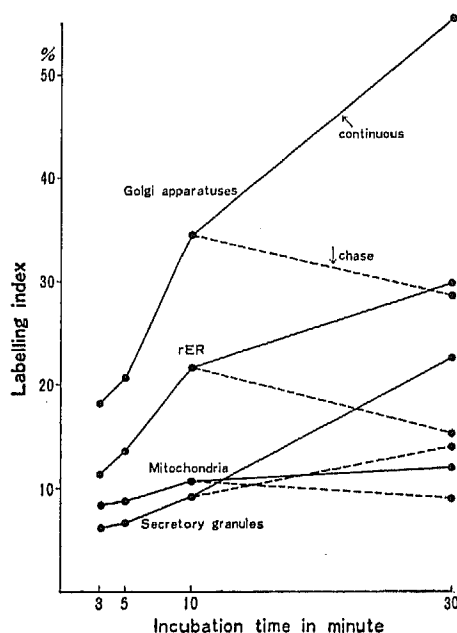


Fig. 1 Transition of labelling index in cell organelles after labelling with  $^{125}\text{I}$ -albumin

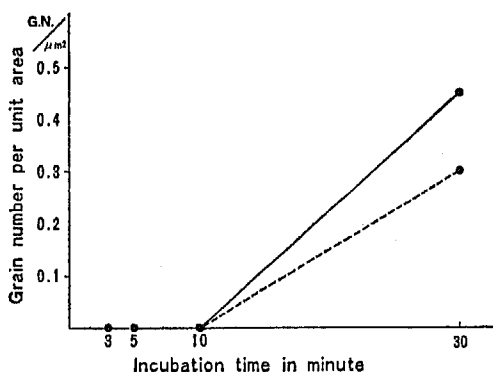


Fig. 2 Transition of grain number in glandular lumens after labelling with  $^{125}\text{I}$ -albumin

識開始10分であった。ゴルジ装置と分泌顆粒は30分で初めて有意の上昇を示したが、前者は chase 群では有意の上昇を示さず、後者は chase 群でも有意の上昇を続けるので、時相はゴルジ装置よりも分泌顆粒が遅れているものと考えられる。

次に、腺腔における単位面積あたりの銀粒子数は Fig. 2 のごとく、30分持続標識群と、chase 群で初

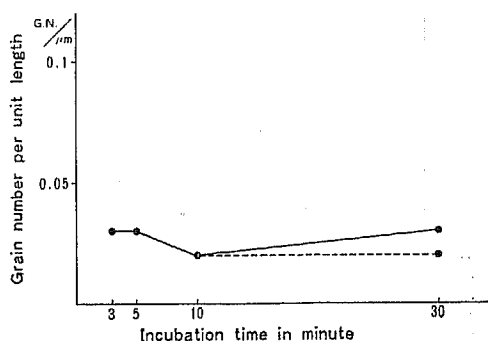


Fig. 3 Transition of grain number in intercellular spaces after labelling with  $^{125}\text{I}$ -albumin

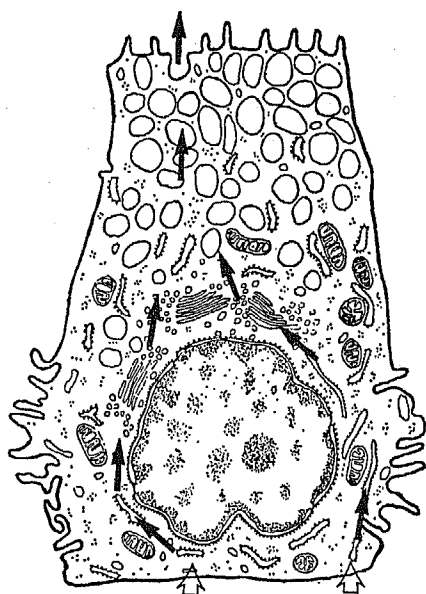


Fig. 4 Diagram indicating the pathway of  $^{125}\text{I}$ -albumin in the mucosal epithelial cell of the rat stomach

めて銀粒子の出現を認めたが、推計学的には、両群の間に有意差は認められなかった ( $P>0.05$ , NS)。

細胞間隙の単位長あたりの銀粒子数は、Fig. 3のごとく、銀粒子の出現数が  $0.02$  個/ $\mu\text{m}$  ないし  $0.03$  個/ $\mu\text{m}$  ときわめてわずかで、しかも経時的变化は有意とは認められなかった ( $P>0.05$ , NS)。

#### IV 考 察

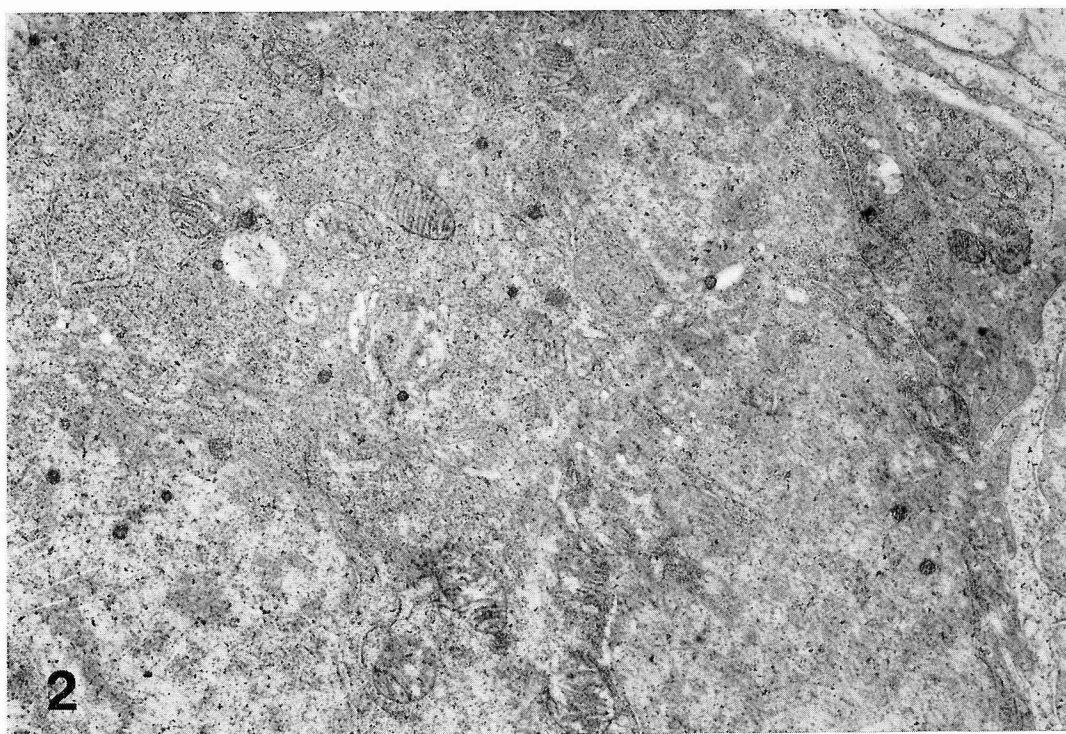
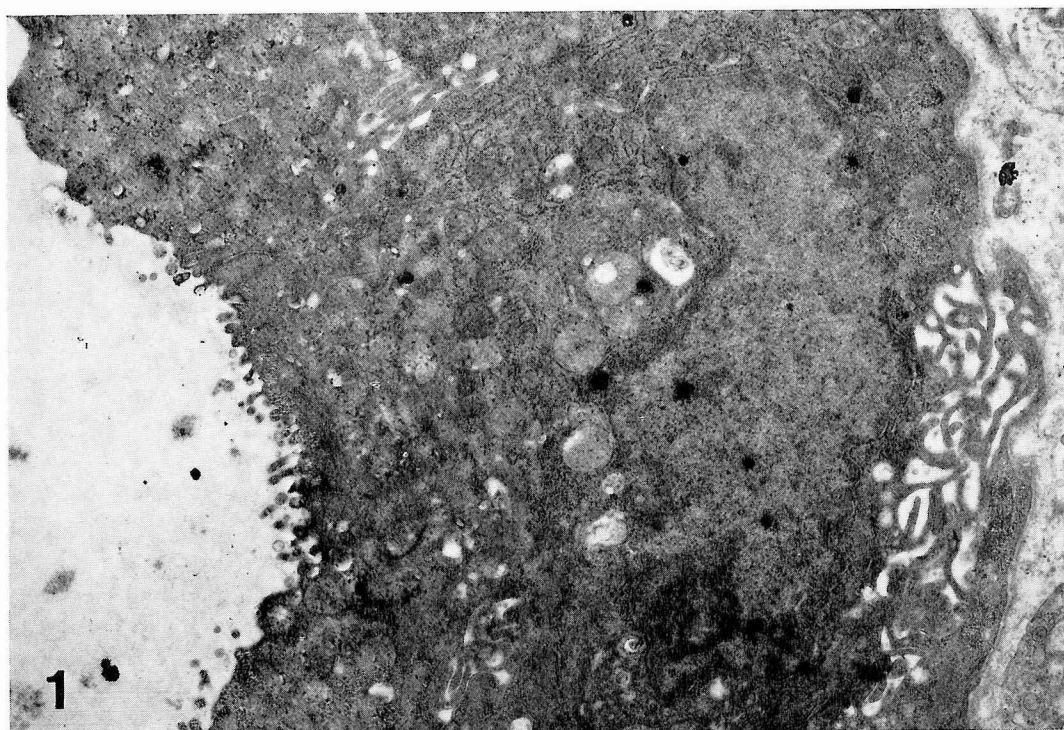
以上の成績から、 $^{125}\text{I}$ -アルブミンは培養液中から胃

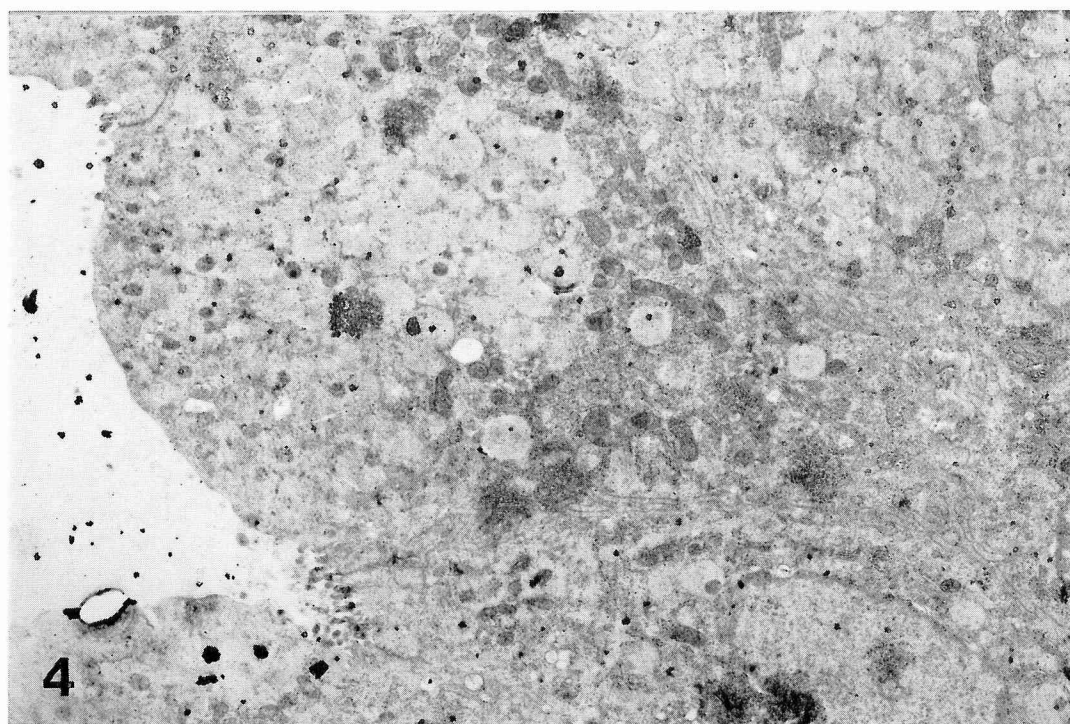
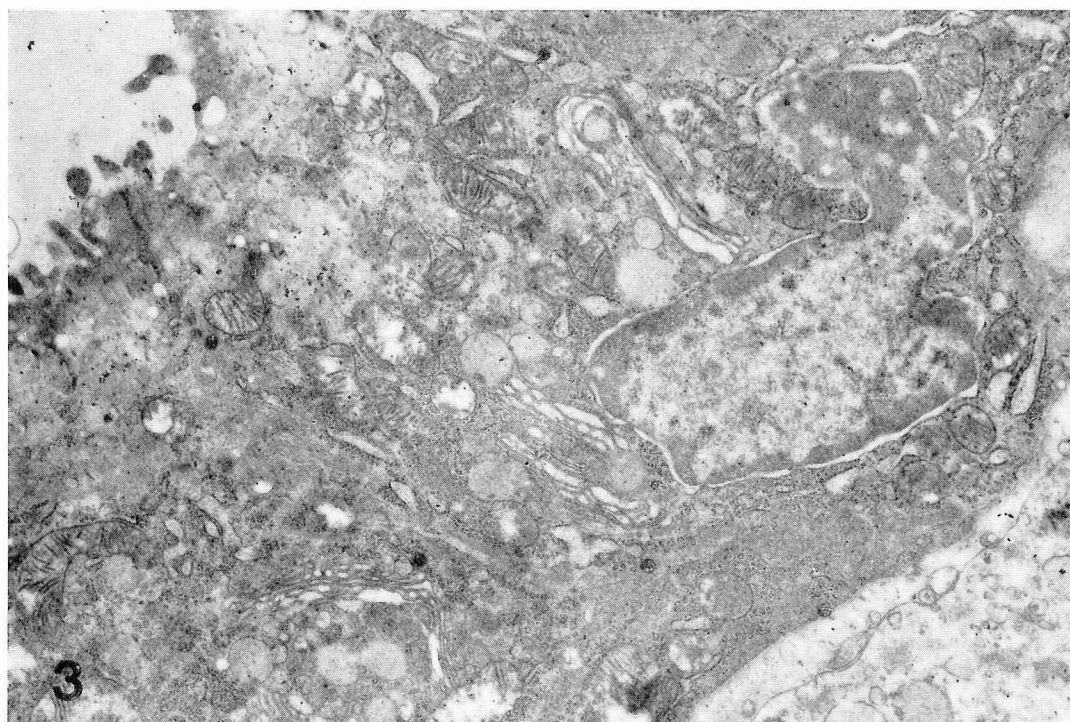
被蓋上皮細胞に取り込まれ、まず、3～5分で粗面小胞体へ集積された後、5～10分でゴルジ装置に移動し、10～30分で分泌顆粒となり、さらに、30分頃から腺腔へ分泌されるものと考えられる。糸粒体は $^{125}\text{I}$ -アルブミンの細胞内通過には関与していないと考えられ、また、 $^{125}\text{I}$ -アルブミンが細胞間隙を通過する可能性は考え難い。以上の物質の細胞内移動を模式図で示すと Fig. 4 のように表すことができる。

血中のアルブミンが消化管とくに胃に大量に取り込まれることは Wetterfors<sup>9)</sup> の報告以来注目されて来たが、著者は第1編<sup>3)</sup>において、血中アルブミンが胃壁に取り込まれた後、アルブミン近似の物質として胃内へ分泌されることを知った。そこでこれを細胞レベルで裏付けるために本研究を行った。本実験では、実験条件を単純化し、経時的变化を定量的に分析するため *in vitro* で標識を行った。また、標識時間を最長30分としたのは、教室の Sato<sup>10)</sup> により10%仔牛血清を含む Eagle MEM 中では、ラット胃粘膜の超微構造が保持される限界は、pH 2.5で30分、pH 8.4で60分であることが明らかにされ、著者の用いた培地は pH 7.4で、Sato の成績から30分以内であれば充分超微構造が保たれると判断し得たからである。

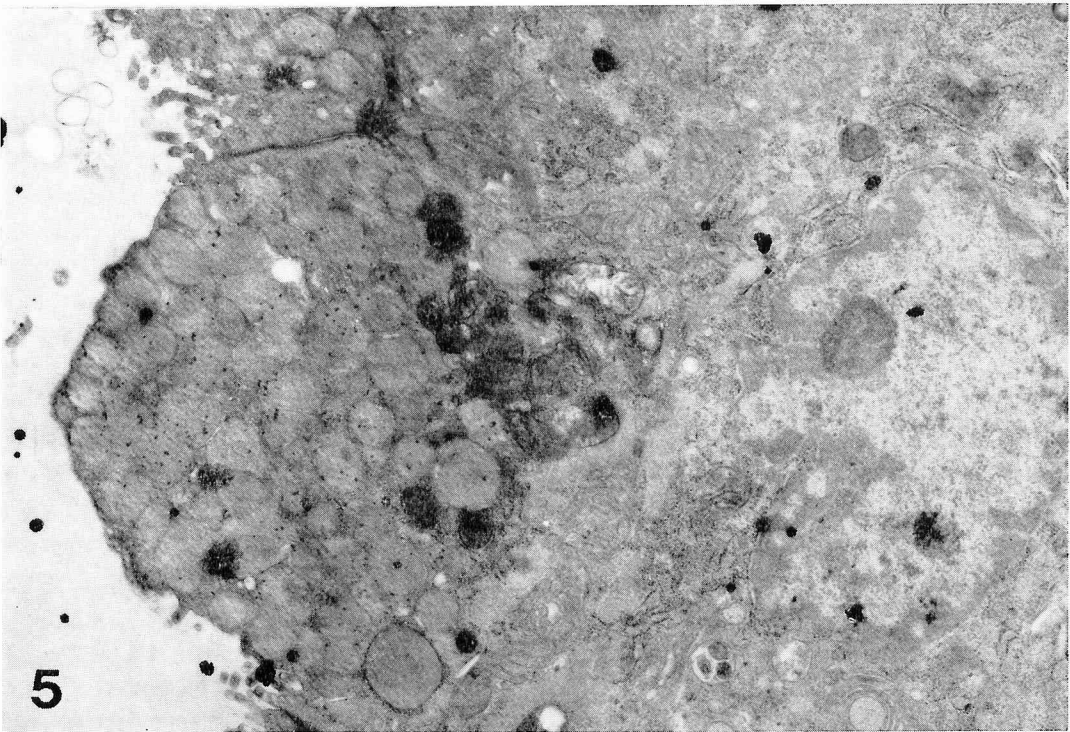
胃被蓋上皮細胞の各小器官の標識率で、最初に有意の上昇を示したのは粗面小胞体であったが、ゴルジ装置と分泌顆粒はこれよりやや遅れ、いずれも30分ではじめて有意の上昇を示した。しかし、chase 群では、前者は有意の上昇を示さなかったのに対し、後者は依然有意の上昇を続けたことから、標識物質の通過からみれば、ゴルジ装置よりも分泌顆粒の方が、時相の遅い位置にあることが考えられ、結局培養液中から取り込まれた標識物質は、粗面小胞体からゴルジ装置、分泌顆粒へと受け渡され、最終的に腺腔へ分泌されることが証明された。胃における粘液分泌細胞である被蓋上皮細胞に $^{125}\text{I}$ -アルブミンが取り込まれ、最終的に、分泌顆粒を経て、腺腔内へ分泌されることは、このアルブミンが胃粘液の素材として利用されている可能性が考えられ、第1編<sup>3)</sup>の成績に一致する。

第1編において、胃液中に出現する $^{125}\text{I}$ 結合蛋白は電気泳動上、免疫学的見地ならびに分子量の上から、アルブミンに近似な物質であることが明らかにされたので、血中アルブミンが、そのまま細胞間隙を通過する可能性も考え、細胞間隙の標識率について検討を行ったが、少なくとも正常ラットでは、標識物質の細胞間隙通過の可能性を肯定する成績は得られなかった。









Explanation of Photographs

Photo. 1 Electron microscopic (EM) radioautogram of a rat gastric mucosal epithelial cell, labelled with  $^{125}\text{I}$ -albumin for 3 minutes.  $\times 3,000$

Photo. 2 EM radioautogram of a rat gastric mucosal epithelial cell, continuously labelled for 5 minutes.  $\times 5,000$

Photo. 3 EM radioautogram of a cell, labelled continuously for 10 minutes.  $\times 3,000$

Photo. 4 EM radioautogram of a cell, labelled continuously for 30 minutes.  $\times 3,000$

Photo. 5 EM radioautogram of a cell, labelled continuously for 10 minutes and chased for 20 minutes.  $\times 3,000$

本実験は、標識アルブミンを用いたラジオオートグラフィ的研究であるので、細胞内を通過する標識物質が、アルブミンそのものであるか否かについては明らかではない。むしろ、外分泌細胞の一般論的立場からいえば、粘液の素材として上皮細胞に取り込まれたアルブミンは、小胞体を通過する過程で固有の蛋白に再合成され、さらに、ゴルジ装置で糖が附加され、glycoprotein に合成、分泌されるものと考えられる。事実、胃被蓋上皮細胞における分泌顆粒の内容が、中性多糖からなる、glycoprotein であることは、教室の Iida ら<sup>11)</sup>によって電顕組織化学的に証明されている。

本研究において問題となるのは、アルブミンのごとく、分子量の大きいものがいかにして細胞内へ取り込まれるかという疑問である。

著者は、標識物質の細胞内取り込みの過程を検索していないが、分子量の大きなアルブミンが細胞膜を通過して細胞質内を移動することは考え難いので、アルブミンのままではなく、数個の polypeptide に分断されて取り込まれる可能性を考えなくてはならない。文献的には、Hollander と Horowitz<sup>12)</sup> はすでに1962年にアルブミンの胃被蓋上皮細胞内への取り込みの可能性を示唆しており、福田と前川<sup>13)</sup>は Ménétrier 氏病の胃粘膜上皮細胞に蛍光抗体法によりアルブミンを証明している。最近では Worshaw ら<sup>14)</sup>が小腸粘膜から、アルブミンが分解されずに吸収されることを報告している。高分子物質の細胞膜通過の問題は現代細胞生物学の大きな研究課題の1つであり、その詳細な機序の解明は今後の研究に待たねばならないが、本実験の結果からも、その可能性はあり得るものと考えられる。

胃粘膜における分泌機構の究明のための電顕ラジオオートグラフィーを用いた研究は多い。藤田と片岡<sup>15)</sup>は  $^3\text{H}$ -leucin が主細胞に取り込まれ、ペプシンノーゲンの素材になっていることを証明し、教室の Sato<sup>10)</sup>は  $^3\text{H}$ -glycin および  $^3\text{H}$ -glutamic acid がG細胞においてガストリンの素材になっていることを観察した。一方、Kramer と Geuzel<sup>16)</sup>は  $^3\text{H}$ -leucin が、ラット胃被蓋上皮細胞の分泌顆粒へ取り込まれ、胃粘液の素材となっていることを *in vitro* の標識で観察し、著者の実験結果と対立している。しかし、彼らの実験は、蛋白成分をまったく含まない、Krebs ring solution で標識しているのに対し、著者は豊富なアミノ酸および10%の仔牛血清を含む Eagle MEM 中で標識したので、両者の成績を比較する場合には、

実験条件の差に留意しなくてはならない。すなわち、被蓋上皮細胞は、主としてアルブミンを素材として粘液合成を行うが、わずかながら各種アミノ酸も取り込んで粘液蛋白を合成する可能性が考えられ、またアルブミンのような蛋白成分を全然含まない環境では、アミノ酸のみを取り込み粘液合成を行う可能性が考えられる。事実、Kramer らの成績によると、 $^3\text{H}$ -leucin 濃度が  $100\mu\text{Ci/ml}$  では標識物質の細胞内取り込みはおこらず、 $500\mu\text{Ci/ml}$  という高濃度で初めて取り込みがおこったと述べている。教室の Iida ら<sup>17)</sup>は  $^3\text{H}$ -glutamic acid および  $^3\text{H}$ -glycin をそれぞれ  $41.6\mu\text{Ci/ml}$  の割合で含む、Eagle MEM (10%仔牛血清を含む) 中で標識したが、分泌顆粒における銀粒子数の有意の上昇は認められず、アルブミンとアミノ酸が共存する環境では、アミノ酸が、粘液の素材となる可能性は少ないことを報告している。胃粘膜において蛋白合成全般にわたって考察すると、前述のごとく、ペプシンノーゲンやガストリン等はそれぞれ主細胞、G細胞でアミノ酸を素材として合成されることが、藤田と片岡<sup>15)</sup>、Sato<sup>10)</sup> らによって明らかにされたが、今回の著者の研究により、胃粘液蛋白の合成に関しては、アミノ酸よりもむしろアルブミンが主なる素材となっていることが明らかにされた。胃の粘液蛋白は化学的には糖蛋白であり、ペプシンノーゲンやガストリンに比較して分子も大きく、化学組成も単一でない<sup>18)</sup>。また分泌面積や分泌量も大きいので、アミノ酸を素材とするよりも、アルブミンを素材とした方が能率的であるという生体の合目的性も考慮すべきであろう。

## V 結 論

ラットの胃幽門腺粘膜から採取した組織片を、 $100\mu\text{Ci/ml}$  の濃度の  $^{125}\text{I}$ -アルブミンを含む Eagle MEM 中で標識し、電顕ラジオオートグラフィーを行い、胃被蓋上皮細胞の小器官の標識率を経時的に観察して以下の結果を得た。

- 1 粗面小胞体の標識率は、標識10分から有意の上昇を示し、chase 群で減少を示した。
- 2 ゴルジ装置の標識率は、30分で有意の上昇を示し、chase 群で減少の傾向を示したが有意ではなかった。
- 3 分泌顆粒の標識率は、30分で有意の上昇を示し、chase 群でも有意の上昇を示した。
- 4 腺腔へは、30分と chase 群で初めて銀粒子の出現を認めたが、両群間に有意差はなかった。



5 糸粒体および細胞間隙への銀粒子の出現数はごくわずかで、しかも、経時的变化を認めなかった。

6 以上の成績から、血中のアルブミンは胃被蓋上皮細胞に取り込まれ、小胞体からゴルジ装置へ送られ、胃粘液蛋白の素材として利用され、分泌顆粒となり、粘液成分として胃内へ放出されるものと考えられる。

本研究の要旨は、第19回(1977年10月)日本消化器病学会秋季大会、第10回(1978年9月)日本臨床電子顕微鏡学会総会において発表した。

稿を終わるにあたり、御指導をいただきました故降旗力男教授、第一解剖学教室永田哲士教授に深甚の謝意を表します。

## 文 献

- 1) 飯田 太, 佐藤 晃: 胃粘膜保護因子としての mucous barrier に関する研究. 日消会誌, 72: 1569-1578, 1975
- 2) Iida, F., Sato, A., Furihata, R., Katsuyama, T., Murata, F., Yoshida, K. and Nagata, T.: PA-TCH-SP reaction of the gastric mucosa in some stomach diseases. J Clin Electron Microscopy, 10: 5-6, 1977
- 3) 小宮山清洋: 胃における粘液蛋白の生成ならびに分泌に関する研究, 第1編 胃におけるアルブミンの動態に関する生化学的研究. 信州医誌, 29: 279-290, 1981
- 4) Luft, J. H.: Improvement in epoxy resin embedding methods. J Biophys Biochem Cytol, 9: 409-414, 1961
- 5) 永田哲士: ラジオオートグラフィー, 電子顕微鏡講習会テキスト, pp. 118-133, 日本電顕学会編, 名古屋, 1973
- 6) Lettré, H. und Paweletz, N.: Probleme des electronen mikroskopischen Autoradiographie. Naturwissenschaften, 53: 268-271, 1966
- 7) Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Biophys Biochem Cytol, 17: 208-212, 1963
- 8) 永田哲士: 顕微鏡的形態計測の原理と手技. 細胞, 8: 284-303, 1976
- 9) Wetterfors, J.: Catabolism and distribution of serum-albumin in the dog. An experimental study with homologous <sup>131</sup>I-albumin. Acta Med Scand [Suppl], 177: 243-256, 1965
- 10) Sato, A.: Light and electron microscopic radioautography of rat stomach G-cells labelled with <sup>3</sup>H-amino acid. Gastroenterol Jpn, 14: 87-94, 1979
- 11) Iida, F., Murata, F. and Nagata, T.: Histochemical studies of mucosubstances in metaplastic epithelium of the stomach, with special reference to the development of intestinal metaplasia. Histochemistry, 56: 229-237, 1978
- 12) Hollander, F. and Horowitz, M. I.: Serum proteins in gastric mucous and other secretions. Implications in relation to the protein-losing enteropathies. Gastroenterology, 43: 75-83, 1962
- 13) 福田 稔, 前川善水: 巨大皺襞と低蛋白血症を呈した1例. 胃と腸, 3: 25-31, 1968
- 14) Worshaw, A. L., Walker, W. A. and Issenbacher, K. J.: Protein uptake by the intestine: Evidence for absorption of intact macromolecules. Gastroenterology, 66: 987-992, 1974
- 15) 藤田尚男, 片岡勝子: 胃の外分泌細胞. 細胞, 5: 13-28, 1973
- 16) Kramer, M. F. and Geuze, J. J.: Glycoprotein transport in the surface mucous cells of the rat stomach. J Cell Biol, 73: 533-547, 1977
- 17) Iida, F., Komiyama, K., Sato, A., Murata, F. and Nagata, T.: Cytochemical studies on mucus production in gastric covering epithelium. Acta Histochem Cytochem, 12: 172, 1979
- 18) 平野茂博, 長谷川栄一, 鈴木 旺, 瀬野信子: ムコ多糖の構造と機能, 第2版, pp. 25-28, 南江堂, 東京, 1971

(55.9.11 受稿)