

ヒト甲状腺の組織化学的研究

——特にレクチン染色による糖鎖構造の解析——

張 裕 泰

信州大学医学部第2外科学教室

(主任: 飯田 太教授)

Histochemical Study of Human Thyroid

——with Special Reference to Oligosaccharide Recognition
by Lectin Stains——

Yutai CHANG

Department of Surgery, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Futoshi IIDA)

Mucosubstances of human thyroids were studied by various techniques, including stains with 12 species of lectin, basic dyes, PAS and immunostains for blood group determinants. The materials were derived from normal thyroid, chronic thyroiditis, Basedow's disease, adenomatous goiter, adenoma, papillary carcinoma, follicular carcinoma, medullary carcinoma and anaplastic carcinoma. The results showed that the colloids in any thyroid tissue, including neoplastic ones, were classified into two groups, Concanavalin A reactive and non-reactive. Lectin receptors in follicular epithelia were restricted to supranuclear regions, basal cytoplasm and apical surface, and the lectin reactivity of these three sites varied extensively according to the pathologic changes, as representatively shown in Dolichos biflorus agglutinin (DBA) reactivity of these three sites. The supranuclear regions exhibited most intense DBA reactivity only in the hyperplastic lesions like papillary hyperplasia, adenomas and well differentiated papillary carcinomas, whereas the apical surface was stained evidently in the hyperplastic lesions and well differentiated papillary carcinomas. In less differentiated carcinomas, the supranuclear regions and the apical surface lacked the DBA reactivity. The present study indicated that the lectins would be useful reagents to detect the anomalous expression of mucosubstances in human thyroids. *Shinshu Med. J.*, 38: 13-39, 1990

(Received for publication April 28, 1989)

Key words: thyroid tumor, lectin, histochemistry

甲状腺腫瘍, レクチン, 組織化学

I 緒 言

甲状腺の濾胞上皮は複合糖質を豊富に産生している。とくに、甲状腺コロイドの主要な部分を占めるサイログロブリンは糖タンパク質として存在している。したがって、甲状腺の様々な病的状態が濾胞上皮の産生する複合糖質の糖鎖の構造の変動として反映されるであろうことは想像に難くない。しかしながら、濾胞上皮あるいはコロイドを糖質組織化学的な観点から追求した研究は少なく、著者が調査した限りではわずかに2編¹⁾²⁾を数えるに過ぎない。

糖鎖の組織化学的な研究には、従来、糖質内の近接水酸基を検出するPAS反応や、酸性基に親和性を示す塩基性色素による染色がもっぱら用いられてきた。しかし、この様な反応基は糖質内には普遍的に存在し、糖鎖構造の微妙な変化を検出することはほとんど不可能であったと言ってよい。最近、主として植物の種子から抽出されたタンパク質、あるいは糖タンパク質で、特定の糖残基あるいは糖残基グループに親和性を示すレクチンや、グリコシダーゼ類が利用できるようになって、糖質の組織化学的研究は飛躍的な進歩を遂げた³⁾⁻⁹⁾。

本研究では、糖質組織化学的な方法のほか、12種類のレクチンとシアル酸水解酵素であるシアリダーゼを用いて、正常および病的な甲状腺組織を検討した。その結果、おのおのの病態に特徴的なレクチン反応性のパターンがあることが明らかにされた。

II 材料と方法

信州大学医学部第2外科で1984年から1988年までに手術された甲状腺疾患のうち、ホルマリン固定、パラフィン包埋材料のヘマトキシリン・エオジン染色による顕微鏡標本を観察して、固定条件の良好な慢性甲状腺炎10例、過形成性病変34例（バセドウ病26例、腺腫様甲状腺腫8例を含む）、濾胞腺腫29例、乳頭癌105例、濾胞癌23例、髄様癌5例、および未分化癌4例を選択して、改めて組織診断を確認したうえで検討の対象とした。なお、これらの材料はいずれも燐酸緩衝液(0.1M 燐酸緩衝液, pH7.4 を使用) 10%ホルマリンに室温で24時間から72時間固定されたものである。さらに、剖検例で、臨床歴上甲状腺機能に異常を認めず、組織学的にも異常を認めなかった症例から11例を選択して検討の対象に加えた。これらの材料の性別、平均年齢、血液型を Table 1 に示した。

Table 1 Materials used in this study

Pathological diagnosis	Total number of cases	Sex		Age			Blood groups			
		Male	Female	Minimum	Maximum	Mean	A	B	O	AB
		(Number of cases)		(years old)			(Number of cases)			
Normal thyroid tissue (autopsy)	11	7	4	60	77	69.0	5	3	3	0
Disease										
Chronic thyroiditis	10	0	10	61	73	64.0	4	3	2	1
Hyperplasia	34									
Basedow's disease	26	5	21	33	49	43.4	8	6	9	3
Adenomatous goiter	8	0	8	39	67	56.5	4	2	1	1
Follicular adenoma	29									
Colloid adenoma	7	0	7	29	62	44.2	3	1	2	1
Tubular adenoma	13	3	10	32	72	53.0	4	4	3	2
Trabecular adenoma	3	0	3	56	62	59.0	1	1	1	0
Oxyphilic cell adenoma	6	0	6	32	72	48.9	3	2	1	0
Papillary carcinoma	105	16	89	11	80	56.7	31	29	35	10
Follicular carcinoma	23	8	15	45	78	58.9	8	6	7	2
Medullary carcinoma	5	2	3	29	56	43.8	2	2	1	0
Anaplastic carcinoma	4	0	4	59	72	69.0	1	1	2	0

Table 2 Lectins used and their sugar and blood group specificities

Lectin	Abbreviation	Specific sugar	Blood group specificity	Concentration for use (μ l/ml)
Canavalia ensiformis	Con A	D-Man	Non	10
Griffonia simplicifolia-II	GSA-II	D-GlcNAc	Non	10
Ulex europeus-I	UEA-I	α -L-Fuc	Anti H	30
Glycine max	SBA	α or β -D-GalNAc	Non	10
Arachis hypogaea	PNA	D-Gal	Anti T	30
Griffonia simplicifolia-I	GSA-I	α -D-Gal	Anti B	20
Maclura pomifera	MPA	D-GalNAc	Anti A	5
Phaseolus vulgaris-E	PHA-E	D-GalNAc	Non	10
Ricinus communis-I	RCA-I	β -D-Gal	Non	5
Triticum vulgaris	WGA	β -D-GlcNAc	Non	5
Limax flavus	LFA	Sialic acid	Non	20
Dolichos biflorus	DBA	α -D-GalNAc	Anti A	10

Fuc=fucose, Gal=galactose, GalNAc=N-acetylgalactosamine, Man=Mannose, GlcNAc=N-acetylglucosamine, Non=nonspecificity.

パラフィン包埋されたブロックの中から各症例ごとに1〜2個を選択し、3ミクロンの連続切片を作製して次の染色を行った。

ヘマトキシリン-エオジン染色:組織学的診断、および形態観察を行った。

レクチン染色: Canavalia ensiformis agglutinin (Con A), Griffonia simplicifolia agglutinin-II (GSA-II), Ulex europeus agglutinin-I (UEA-I), Glycine max agglutinin (SBA), Arachis hypogaea agglutinin (PNA), Griffonia simplicifolia agglutinin-I (GSA-I), Maclura pomifera agglutinin (MPA), Phaseolus vulgaris agglutinin-E (PHA-E), Ricinus communis agglutinin-I (RCA-I), Triticum vulgaris agglutinin (WGA), Limax flavus agglutinin (LFA) および Dolichos biflorus agglutinin (DBA) の12種類のレクチンを使用した。上記のうち、Con A 以外は、ペルオキシダーゼで標識したレクチンを E. Y. (San Mateo, California, U.S.A.) から購入して用いた。また、Con A は、Sigma (St. Louis, Missouri, U.S.A.) 製を使用した。おのおののレクチンの糖鎖特異性および血液型特異性を Table 2 に要約した。その染色条件については、レクチンの濃度、浸漬時間、温度、緩衝液の種類、diaminobenzidine および H_2O_2 の濃度などについて検討を加えた。その結果、すでに発表されている方法^{10,11)}にはほぼ従った。なお、レクチンの濃

度は、各レクチンごとに4段階の希釈系列(原液の30倍、50倍、100倍、200倍)を作製して染色し、その中から最適の濃度を選択した (Table 2)。

標識レクチンによる染色法^{10,11)}:

- 1 脱パラフィン後、100%エタノールから100%メタノールへ移す。
 - 2 0.3% H_2O_2 のメタノール溶液に30分間浸漬する(内因性ペルオキシダーゼを失活させるため)。
 - 3 水洗後、ノイラミナーゼ (Arthrobacter ureafaciens 由来、半井、京都) 溶液 (1mg/ml) で、37°C で4時間消化する。
 - 4 水洗後、0.1M 磷酸緩衝液 (以下PB) で3分間洗う。
 - 5 塩化ナトリウム0.2M 含有の PB (PBS) で3分間洗う。
 - 6 PBS に0.1%の割合で牛血清アルブミンを溶解した溶液に15分間浸漬する。
 - 7 レクチン溶液に4°C で18時間浸漬する。
- なお、標識レクチンを Table 2 に示した濃度に牛血清アルブミン溶液で希釈して、レクチン溶液とした。
- 8 PBS で10分間ずつ6回洗う。
 - 9 diaminobenzidine 溶液に浸漬して発色させる。
- 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) は同仁化学(熊本)から購入したものを使用した。Graham と Karnovsky の原法¹²⁾ の DAB および H_2O_2 濃度では発色が短時間過ぎて調節困難であった

Table 3 Histochemical methods for characterizing complex carbohydrates

Method	Carbohydrates to detect	Reaction color
Diastase-Alcian blue (pH 2.5)-PAS	Mucosubstances	Neutral glycoprotein-purple red ; Acid glycoprotein-blue purple ;
Galactose oxidase-thionin Schiff reaction	β -galactose and β -N-acetylgalactosamine residues	Galactose and N-acetylgalactosamine containing mucosubstances-purple red
High iron diamine-Alcian blue pH 2.5	Sulfomucins and carboxymucins	Carboxyl-rich, nonsulfated mucosubstances-blue ; sulfated mucosubstances-purple black
Periodic acid-sodium borohydride-potassium hydroxide-PAS reaction	8-O-acetylated sialic acid	8-O-acetylated sialic acids-PAS positive
Colloidal iron reaction Alcian blue pH 2.5	Acid mucins Acid mucins	Acid mucins-blue Acid mucins-blue

ので、DAB は原法の0.03%から0.02%に、 H_2O_2 は原法の15 μ l/100ml から1.5 μ l/100ml に希釈して調整した。発色時間は約5分間とした。

10 流水で5分間洗い、ついで1%メチルグリーン溶液（バルビタールアセテート緩衝、pH4.0）で核染する。

11 型のごとく脱水、包埋する。

なお、おのおのの染色標本について、隣接切片をノイラミナーゼ化をせずに染色し、酵素消化の効果を比較した。Con A-ワサビペルオキシダーゼ染色法¹³⁾⁻¹⁶⁾。

Con A については標識レクチン法によらず、Bernhard and Avrameas の原法¹³⁾に従ったが、様々な点で変更を加えた。

1 脱パラフィン後、標識レクチン染色と同様に、内因性ペルオキシダーゼを失活させ、水洗後、アミラーゼ消化を室温で7分間行う。

2 PB、ついで PBS で洗う。

3 Con A 溶液に室温で30分間浸漬する。1mg/ml の割合で牛血清アルブミン溶液に溶解し、Con A 溶液とした。

4 PBS で5分間ずつ3回洗う。

5 ペルオキシダーゼ溶液に室温で30分間浸漬する。ペルオキシダーゼは東洋紡（大阪）製を使用した。1mg/100ml の割合で PB に溶解して酵素溶液とした。

6 PB で5分間ずつ3回洗い、標識レクチン染色と同様に発色した。

おのおのの染色標本について、その隣接切片を Con

A 溶液に浸漬する前にノイラミナーゼで消化し、その効果を比較した。また、Con A で染色するに先立って、過ヨウ素酸についてホウ素化水素ナトリウムで処理するパラドックス染色を行い、いわゆるⅢ型ムコ物質の検出を試みた。

なお、一部の検体について、レクチン液に浸漬するに先立って切片を1%KOH に15分間浸漬し、レクチン反応性およびノイラミナーゼ消化に対する効果を観察した。

レクチン染色と比較検討するために、diastase-Alcian blue pH 2.5-PAS (AB-PAS)¹⁷⁾, galactose oxidase-thionin Schiff (GOTS)¹⁸⁾¹⁹⁾, high iron diamine-Alcian blue pH 2.5 (HID-AB)²⁰⁾, periodic acid-sodium borohydride-potassium hydroxide-periodic acid-Schiff (PA-SB-PH-PAS)²¹⁾²²⁾, コロイド鉄²³⁾²⁴⁾, Alcian blue pH2.5 (AB pH 2.5)¹⁷⁾ などの染色を行った。おのおのの染色を行った目的は Table 3 の通りである²⁵⁾。なお、コロイド鉄反応に対するノイラミナーゼ消化の影響を、レクチン染色の場合と同様に検討した。

さらに、検討例の一部を Table 4 のように、血液型 A, B, O, Le^a, Le^b 物質の組織内分布を間接法を用いて検討した。染色法はすでに述べられた方法²⁶⁾⁻²⁹⁾に従った。

各染色標本を顕微鏡で観察し、組織化学的反應の強さを一からⅢの4段階に分類した。すなわち、無反應を一、標本内における特定の部位の1/3以下に反應が

Table 4 Tissues and blood groups of cases examined

Blood group	Normal thyroid tissue	Basedow's disease	Tubular adenoma	Papillary carcinoma	Follicular carcinoma
A	2	2	2	5	4
B	2	2	2	5	3
O	2	2	2	3	3
AB	0	1	1	1	0
Le ^a *	6	6	6	13	10
Le ^b **	6	6	6	13	10

* Le^a: Lewis a, ** Le^b: Lewis b

みられる場合を+, 1/3 から 2/3 に反応がみられる場合を++, 2/3 以上に反応がみられる場合を+++とした。

III 結 果

A 基礎的事項

切片を 1%KOH に浸漬してもレクチン結合性への影響は認められなかった。また、ノイラミニダーゼ消化については、LFA, PNA 以外ではその効果が明らかではなかった。したがって、両レクチン以外ではこの酵素による消化の影響については特に述べない。なお 1%KOH は、ノイラミニダーゼ消化に影響しなかった。

甲状腺組織内でレクチン親和性の観察対象となる部位は、濾胞上皮の核上部 (Golgi 野に相当する)、細胞質基底部および管腔面、コロイド、血管内皮細胞で、結合組織は使用したレクチンの場合明らかな親和性がみられなかった。正常甲状腺組織では蓄積しているコロイドのために、濾胞上皮が扁平化して、レクチン反応性、特に核上部の反応性の判定がむずかしい場合が少なからずあった。また、上皮性腫瘍細胞が充実性に増殖する髄様癌や未分化癌では、核上部、細胞質基底部、管腔面の識別が困難であり、一部の腫瘍細胞の表面に強い染色性を観察するにとどまった。

腫瘍性組織において、腫瘍細胞が明らかな管腔を形成しつつ増殖している場合、正確には濾胞上皮に分化した腫瘍細胞とすべきであるが、煩雑を避けるため、濾胞上皮と一括して記載した。また、正常甲状腺組織、あるいはおのおのの疾患における甲状腺組織をさす際には、「甲状腺組織」をできるだけ省き、単に正常、濾胞癌などと記載した。また、Basedow 病と腺腫様甲状腺腫における甲状腺組織が同一の所見を示した場合には、一括して過形成性病変として述べた。腫瘍組織

の分化度とレクチン反応性に関連がみられたのは DB A のみであったので、その他の染色では特にこの問題に言及しなかった。

濾胞内のコロイドは、症例により、また、同一の症例でも個々の濾胞によってその組織化学的な反応性は著しく異なっていたが、それぞれのレクチン、塩基性色素、PAS 反応性の間には一定の関係が確認できたので、最後に要約して述べる。

染色結果の概要を、それぞれの染色を行った症例数とともに Table 5 に要約した。

B レクチン染色 (Table 5)

1 Con A (Fig. 1-3) Con A 反応性は濾胞上皮の細胞質基底部、管腔面、濾胞内のコロイドに比較的強くみられた。正常濾胞上皮の核上部には反応を認めなかったが、細胞質基底部は比較的良好に染色された。しかし、細胞間の差が大きかった。慢性甲状腺炎、過形成性病変 (Fig. 1), 濾胞腺腫でもほぼ同様な結果であった。乳頭癌と濾胞癌の濾胞上皮の Con A 反応性はほぼ正常上皮と同様であった (Fig. 2)。髄様癌および未分化癌の腫瘍細胞はほとんど染色されなかった。コロイドの Con A 反応性の強さは、症例により、また、それぞれの症例においても濾胞によって様々であったが、反応性の強いもの、弱いものがそれぞれ集団をなす傾向がみられた (Fig. 3)。検索した症例を疾患別に、Con A 反応性を示した濾胞の比率によって、まったく反応のみられなかった症例、1/3 以下の濾胞に反応がみられた症例、1/3-2/3 の濾胞に反応がみられた症例、2/3 以上に反応がみられた症例に分類した成績を Table 6 に示した。同一の症例において、組織の周辺部と中心部では反応に差はみられなかったが、同一の濾胞内で、コロイドの周辺に反応の強い部分が偏在する同心円状の二重構造が認められた (Fig. 3)。癌

Table 5 Histochemical results of lectin and other stains in various human thyroid tissues

Pathological diagnosis	Con A																Number of cases examined	Supranuclear region					
	Number of cases examined	Supranuclear region				Apical surface				Cytoplasm				Colloid				Number of cases examined	Supranuclear region				
		-	+	##	###	-	+	##	###	-	+	##	###	-	+	##			###	-	+	##	###
Normal thyroid tissue	6	6						3	3		1	3	2		1	3	2	6	6				
Chronic thyroiditis	2	2						2				1	1		1		1	2	2				
Basedow's disease	6	6						4	2			3	3			3	3	5	5				
Adenomatous goiter	2	2						1	1			2				2		2	2				
Colloid adenoma	6	6						3	3		1	3	2		1	3	2	6	6				
Tubular adenoma	4	4					1	2	1			1	3			3	1	2	2				
Trabecular adenoma	1	1							1			1					1	2	2				
Oxyphilic cell adenoma	2	2						2				2					2	2	2				
Papillary carcinoma	17	17				5	5	3	4	3	1	12	1	4	9	3	1	9	9				
Follicular carcinoma	8	8					3	3	2	2	1	1	4	1	5	2		2	2				
Medullary carcinoma	5	5				5				4	1			5				5	5				
Anaplastic carcinoma	4	4				4				4				4				4	4				

Pathological diagnosis	SBA																Number of cases examined	Supranuclear region					
	Number of cases examined	Supranuclear region				Apical surface				Cytoplasm				Colloid				Number of cases examined	Supranuclear region				
		-	+	##	###	-	+	##	###	-	+	##	###	-	+	##			###	-	+	##	###
Normal thyroid tissue	5	5				3	2			5						3	2	4	4				
Chronic thyroiditis	2	2					2			2					1		1	2	2				
Basedow's disease	6	5	1				2	3	1	5	1					3	3	5	5				
Adenomatous goiter	3	2	1					2	1	3						2	1	2	2				
Colloid adenoma	6	5	1				4	1	1	6					1	3	2	5	5				
Tubular adenoma	4	4				3	1			3	1				3		1	2	2				
Trabecular adenoma	1	1					1				1						1	2	2				
Oxyphilic cell adenoma	2	2					2			2							2	2	2				
Papillary carcinoma	24	23	1			3	5	5	11	24				7	12	4	1	10	10				
Follicular carcinoma	8	6	2			3	2	3		8				1	5	2		2	2				
Medullary carcinoma	5	4	1			4	1			4	1			5				5	3	2			
Anaplastic carcinoma	4	4				3	1			4				4				4	4				

Pathological diagnosis	MPA																Number of cases examined	Supranuclear region					
	Number of cases examined	Supranuclear region				Apical surface				Cytoplasm				Colloid				Number of cases examined	Supranuclear region				
		-	+	##	###	-	+	##	###	-	+	##	###	-	+	##			###	-	+	##	###
Normal thyroid tissue	11	11				10	1			11				11				11	11				
Chronic thyroiditis	2	2				1	1			2				2				2	2				
Basedow's disease	6	6				3	3			6				6				5	5				
Adenomatous goiter	2	2				1	1			2				2				3	3				
Colloid adenoma	6	6				4	2			6				5	1			6	6				
Tubular adenoma	4	4				2	1	1		4				4				2	2				
Trabecular adenoma	2	2				1	1			2				2				2	2				
Oxyphilic cell adenoma	2	2				1	1			2				1	1			2	2				
Papillary carcinoma	9	9					4	2	3	9				8	1			15	15				
Follicular carcinoma	8	8				7	1			8				8				7	7				
Medullary carcinoma	5	5				5				5				5				5	5				
Anaplastic carcinoma	4	4				3	1			4				4				4	4				

甲状腺のレクチン組織化学

GSA-II												UEA-I *																							
Apical surface				Cytoplasm				Colloid				Number of cases examined	Supranuclear region				Apical surface				Cytoplasm				Colloid										
-	+	±	≡	-	+	±	≡	-	+	±	≡		-	+	±	≡	-	+	±	≡	-	+	±	≡	-	+	±	≡							
6				6				6				5	5			5				5				5											
2				2				2				2	2			2				2				2											
5				5				5				5	3	2		5				5				5											
2				2				2				2	2			2				2				2											
6				6				6				5	4	1		5				5				3	2										
2				1		1		2				2	2			2				2				2											
2				2				2				2	2			2				2				2											
2					2			2				2	2			2				2				2											
9				7	2			9				8	6	2		4	3	1		7	1			8											
2				2				2				2	2			2				2				2											
5				4	1			5				5	5			4	1			5				5											
4				4				4				4	4			4				4				4											

PNA											GSA- I																	
4				4				3	1			11	11				11				9	2			11			
2				2				2				2	2				1	1			1	1			2			
2	3			5				5				5	4	1			5				5				5			
	2			2				2				2	2				1	1			2				2			
2	2	1		5				4	1			6	5	1			5	1			6				5	1		
1	1			2				2				4	4				2	2			4				3	1		
1	1			2				2				2	1	1			2				2				2			
1	1			2				2				2	2				1	1			2				1	1		
			10	10				9	1			11	11				4	2	2	3	11				9	1	1	
1	1			1	1			2				6	6				3	2	1		5	1			5	1		
5				4	1			5				5	5				5				3	2			4	1		
3	1			3	1			4				4	4				4				4				4			

PHA-E												RCA- I																
10	1			11				4	6	1		10	10				9	1			10					4	5	1
2				2				1		1		2	2				2				2					1		1
5				5					3	2		5	5				5				5						3	2
3				3					2	1		3	3				3				3						2	1
5	1			6				2	2	2		6	6				5	1			6					2	2	2
2				2				1	1			4	4				4				3	1				1	1	2
2				2					1	1		2	2				2				2						1	1
2				2						2		2	2				1	1			2							2
4	3	6	2	13	2			4	7	3	1	15	15					2	4	9	15				4	7	3	1
7				7				1	4	2		7	7				6	1			7				1	4	2	
5				4	1			5				5	5				5				5				5			
4				4				4				4	4				3	1			4				4			

* : Endothelial cells showed intense UEA-I reactivity in all cases examined.

Pathological diagnosis	WGA																					
	Number of cases examined	Supranuclear region				Apical surface				Cytoplasm				Colloid				Number of cases examined	Supranuclear region			
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++		—	+	++	+++
Normal thyroid tissue	11	11				10	1			11				11				2	2			
Chronic thyroiditis	2	2				2				2				2				0				
Basedow's disease	5	5				4	1			5				5				0				
Adenomatous goiter	3	3				3				3				3				1	1			
Colloid adenoma	6	6				5	1			5	1			6				0				
Tubular adenoma	3	3				2	1			2	1			2	1			1	1			
Trabecular adenoma	2	2				2				2				2				0				
Oxyphilic cell adenoma	2	2				2				2				2				0				
Papillary carcinoma	9	9							9	9				8	1			20	20			
Follicular carcinoma	7	7				4	1	2		7				7				7	7			
Medullary carcinoma	5	5				5				5				5				0				
Anaplastic carcinoma	4	4				3	1			4				4				0				

	Diastase-AB-PAS																				
Normal thyroid tissue	10	10				10				10							10	0			
Chronic thyroiditis	2	2				2				2							2	0			
Basedow's disease	6	6				6				6							6	0			
Adenomatous goiter	2	2				2				2							2	0			
Colloid adenoma	7	7				7				7							7	2	2		
Tubular adenoma	2	2				2				2							2	0			
Trabecular adenoma	1	1				1				1							1	0			
Oxyphilic cell adenoma	2	2				2				2							2	0			
Papillary carcinoma	20	20				17	3			20							20	3	3		
Follicular carcinoma	7	7				6	1			7				1		6	0				
Medullary carcinoma	0																0				
Anaplastic carcinoma	0																0				

	HID-AB																				
Normal thyroid tissue	1	1				1				1							1	0			
Chronic thyroiditis	0																0				
Basedow's disease	0																0				
Adenomatous goiter	0																0				
Colloid adenoma	1	1				1				1							1	0			
Tubular adenoma	0																0				
Trabecular adenoma	0																0				
Oxyphilic cell adenoma	0																0				
Papillary carcinoma	5	5				5				5				1		1	3	3	3		
Follicular carcinoma	2	2				2				2						1	1	0			
Medullary carcinoma	1	1				1				1				1			0				
Anaplastic carcinoma	0																0				

* Endothelial cells showed intense VEA-I reactivity in all cases examined.

甲状腺のレクチン組織化学

LFA												DBA																							
Apical surface				Cytoplasm				Colloid				Number of cases examind	Supranuclear region				Apical surface				Cytoplasm				Colloid										
—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++							
		2		2					1	1		10	10			6	3	1		10						6	4								
												10	10					4	6	10					3	4	3								
												26			26				26	26						10	16								
		1		1							1	8			8				8	8						2	6								
												6			6		1	2	3	6					1	3	2								
		1		1							1	13			13		3	10		13					8	2	3								
												3			3			1	2	3						1	2								
												6			6		4	2		6					1	1	4								
			20	20				5	10	4	1	105	102		3	34	14	50	7	105					42	40	17	6							
		2	5	7				1	4	2		23	10	7	5	1	14	2	6	1	23				4	11	5	3							
												5	3	2		5				3	2			5											
												4	4			4				3	1			4											

AB-pH 2.5												Colloidal iron																
												3	3				3			3						1	1	1
												2	2				2			2							1	1
												5	5				4	1		5								5
												2	2				2			2							1	1
1	1			2						2		6	6				5	1		6						2	3	1
												3	3				1	2		3							2	1
												2	2					1	1	2						1	1	
												2	2					2		2								2
	3			3						2	1	16	16				1	5	5	5	16				4	6	4	2
												7	7				1	2	4		7				1	1	2	3
												0																
												0																

PA-SB-PH-PAS												GOTS															
												3	3				3			3							3
												2	2				2			2							2
												5	5				5			5							5
												2	2				2			2							2
												6	6				6			6							6
												2	2				2			2							2
												2	2				2			2							2
												0															
3				3				3				17	17				17			17							17
												7	7				7			7					1		6
												0															
												0															

Table 6 Different expression of Con A-positive thyroid colloids in various thyroid tissues

Tissues	Total number of cases	Number of cases showing different reactivity of thyroid colloid to Con A*			
		—	+	++	+++
Normal thyroid tissue	6	0	1	3	2
Chronic thyroiditis	2	0	1	0	1
Basedow's disease	6	0	0	3	3
Adenomatous goiter	2	0	0	2	0
Colloid adenoma	6	0	1	3	2
Tubular adenoma	4	0	3	0	1
Trabecular adenoma	1	0	0	0	1
Oxyphilic cell adenoma	2	0	0	0	2
Papillary carcinoma	17	4	9	3	1
Follicular carcinoma	8	1	5	2	0
Medullary carcinoma	5	5	0	0	0
Anaplastic carcinoma	4	4	0	0	0

*— : non-reactive, + : under 1/3 of the total colloids, ++ : 1/3 to 2/3, +++ : over 2/3

組織のコロイドではしばしば複雑な斑紋状の被染色性がみられた。

血管内皮は弱い Con A 反応性を示した。

2 Con A パラドックス染色 過ヨウ素酸化-水素化ホウ素ナトリウム還元後、甲状腺組織の Con A 反応性は完全に失われた。すなわち、Ⅲ型のムコ物質は検出されなかった。

3 GSA-II GSA-II は甲状腺組織 に対して著明な親和性を示さなかった。腺腫細胞、癌細胞の一部で細胞質にわずかな GSA-II 反応性がみられた。コロイドは染色されなかった。

4 UEA-I (Fig. 4, 5) 過形成性病変、濾胞腺腫、乳頭癌の一部で核上部に明らかな UEA-I 反応性が認められた。濾胞癌、髄様癌、未分化癌では同様な反応性はみられなかった。濾胞上皮の細胞質基底部は、乳頭癌を除く病的な甲状腺組織および正常甲状腺組織においても、UEA-I 反応性を示さなかった。管腔面については、乳頭癌の一部に強い反応性がみられたほか、髄様癌でも染色された症例があったが、一般的に濾胞上皮の管腔面は染色されない症例が多かった。コロイドはほとんど染色されなかった。

血管の内皮細胞は UEA-I に対して強い親和性を示し、腫瘍組織内の血管分布を観察するのに適当な染色と考えられた (Fig. 4, 5)。乳頭癌、髄様癌および未分化癌では、正常、慢性甲状腺炎、過形成性病変に

比較して細血管が少ない傾向がみられたが、腺腫、濾胞癌では非腫瘍性組織と同程度の血管が観察された。なお、血管内皮の UEA-I 反応性と個体の血液型との間に明らかな関係はみられなかった。

5 SBA (Fig. 6) 過形成性病変、腺腫、濾胞癌で、一部の濾胞上皮の核上部に SBA 反応性がみられた。髄様癌でもおそらく Golgi 野に由来すると思われる点状の反応が核周囲に認められた。過形成性病変、腺腫、髄様癌では、一部の上皮細胞の細胞質基底部がわずかに染色された。正常、慢性甲状腺炎、過形成性病変、腺腫および乳頭癌では大部分の濾胞上皮の管腔面が SBA 親和性を示した (Fig. 6)。特に、乳頭癌の場合、検索した24例中16例で管腔面に強い反応が認められた。濾胞内のコロイドは比較的強い反応を示したが症例により、また同一の症例においても濾胞によって反応性は著しく異なっていた。しかし、Con A 親和性の分布とはほぼ一致していた。ただし、癌組織ではコロイドの SBA 反応性は著しく弱かった。

血管内皮の SBA 反応性には症例により著しい差が見られたが、疾患の種類および患者の血液型との関連はみられなかった。

6 PNA (Fig. 7) ノイラミニダーゼ処理群のみ明らかな PNA 反応性を示したので、その群の所見に限って記載する。一部の髄様癌の癌細胞の Golgi 野に反応がみられた。濾胞上皮の管腔面の PNA 反応性は症

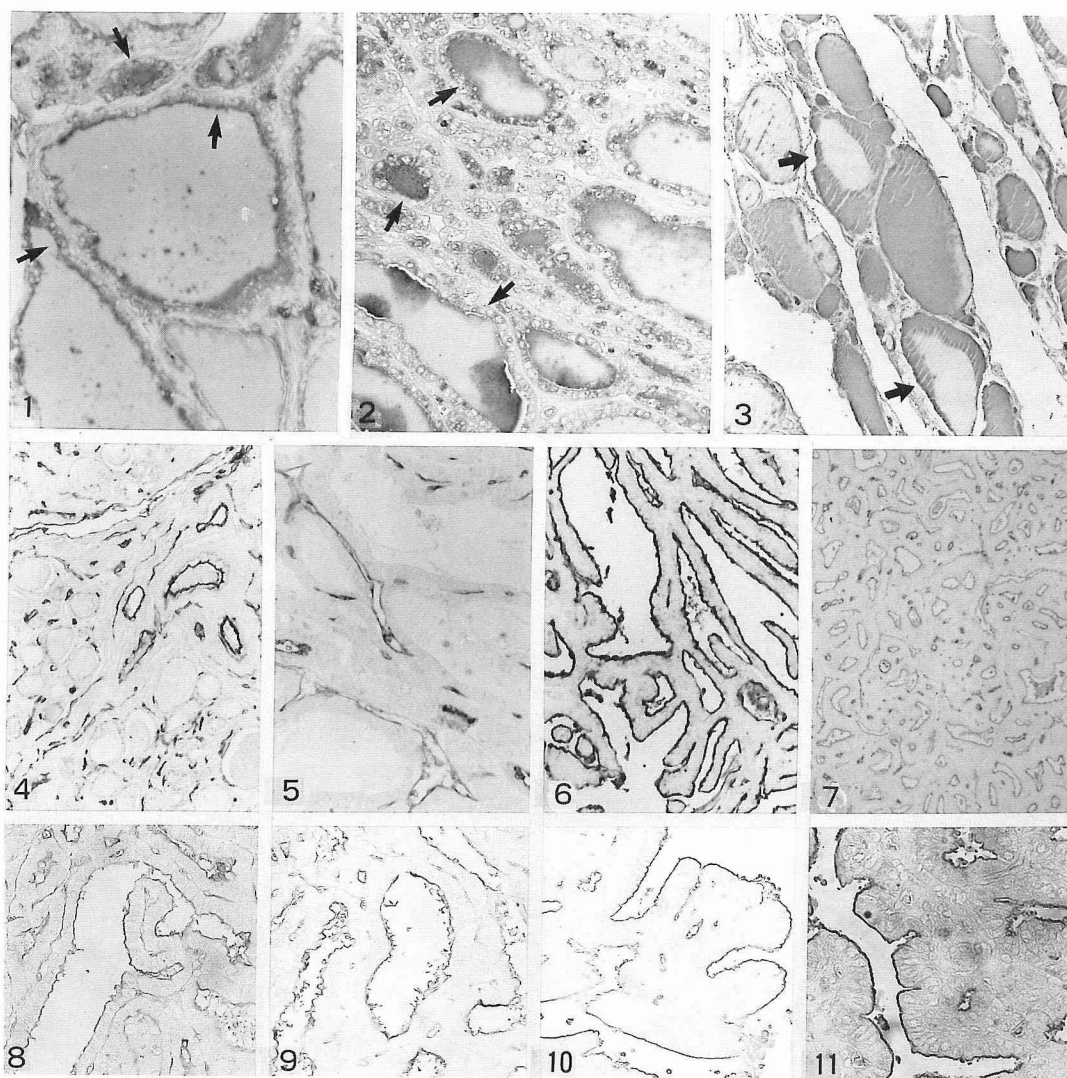


Fig.1 to 3 were prepared from sections stained with Con A-horseradish peroxidase-diaminobenzidine (Con A-HRP) sequence.

Fig.1 The cytoplasm of follicular epithelia (arrows) shows a moderate Con A reactivity. Basedow's disease. $\times 46$

Fig.2 Neoplastic follicular epithelia stained as in Fig. 1. Note that colloids (arrows) vary in their Con A reactivities. Follicular carcinoma. $\times 35$

Fig.3 Colloids vary in their Con A reactivities. Arrows indicate the colloids which show a biphasic concentric pattern. $\times 23$

Fig.4 and 5 were prepared from sections stained with UEA-I-peroxidase sequence.

Fig.4 UEA-I possesses an intense affinity for endothelia. Normal thyroid tissues. $\times 23$

Fig.5 Capillaries are less abundant in carcinoma tissues. Papillary carcinoma. $\times 46$

Fig.6 to 11. These figures illustrate lectin reactivities of the apical surfaces of tumor cells of papillary carcinoma.

Fig.6 SBA-peroxidase. $\times 35$

Fig.7 PNA reactivity appears only after neuraminidase digestion. Neuraminidase-PNA-peroxidase. $\times 35$

Fig.8 MPA-peroxidase. $\times 70$

Fig. 9 PHA-E-peroxidase. $\times 70$

Fig.10 RCA-I-peroxidase. $\times 70$

Fig. 11 WGA-peroxidase. $\times 92$

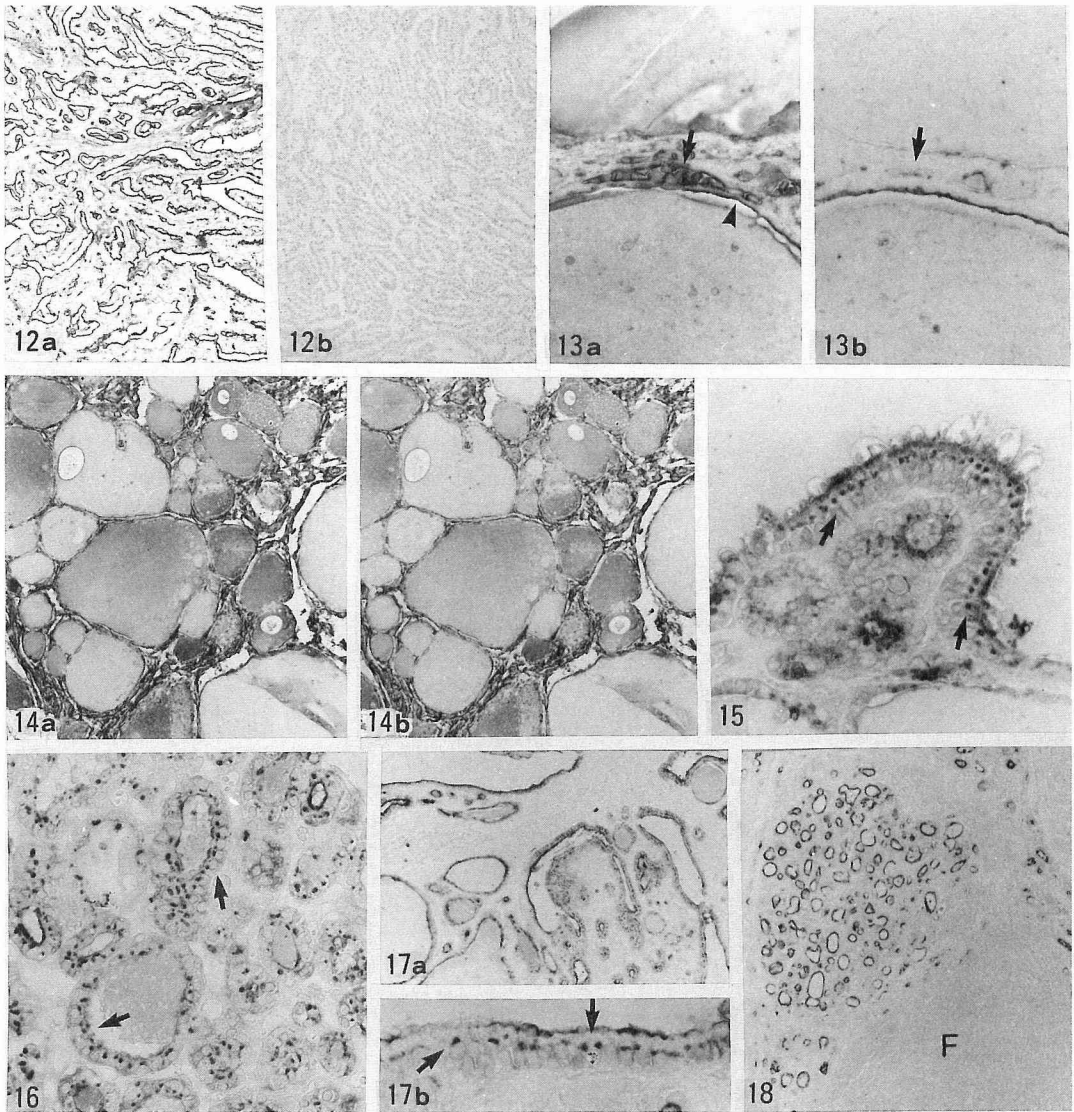


Fig.12 to 14 illustrate LFA reactivities of the thyroid.

Fig.12a The apical surfaces of tumor cells stain intensely. LFA-peroxidase. $\times 35$

Fig.12b Neuraminidase digestion eliminates the LFA reactivity. Neuraminidase-LFA-peroxidase. $\times 35$

Fig.13a The apical surface of follicular epithelia (arrow head) and capillary endothelia (arrow) show intense LFA reactivity. $\times 112$

Fig.13b Prior neuraminidase digestion eliminates the LFA reactivity of endothelia (arrow), although that of the luminal surface of the follicular epithelia persists. $\times 112$
Counterstained with hematoxylin.

Fig.14a Colloids show a variety of LFA reactivities. $\times 23$

Fig.14b Prior neuraminidase digestion does not significantly alter the reactivities. $\times 23$

Fig.15 to 22 illustrate the DBA reactivities of the thyroid, except Fig. 19a and 20a, both of which show morphology of carcinomas by the hematoxylin and eosin stain.

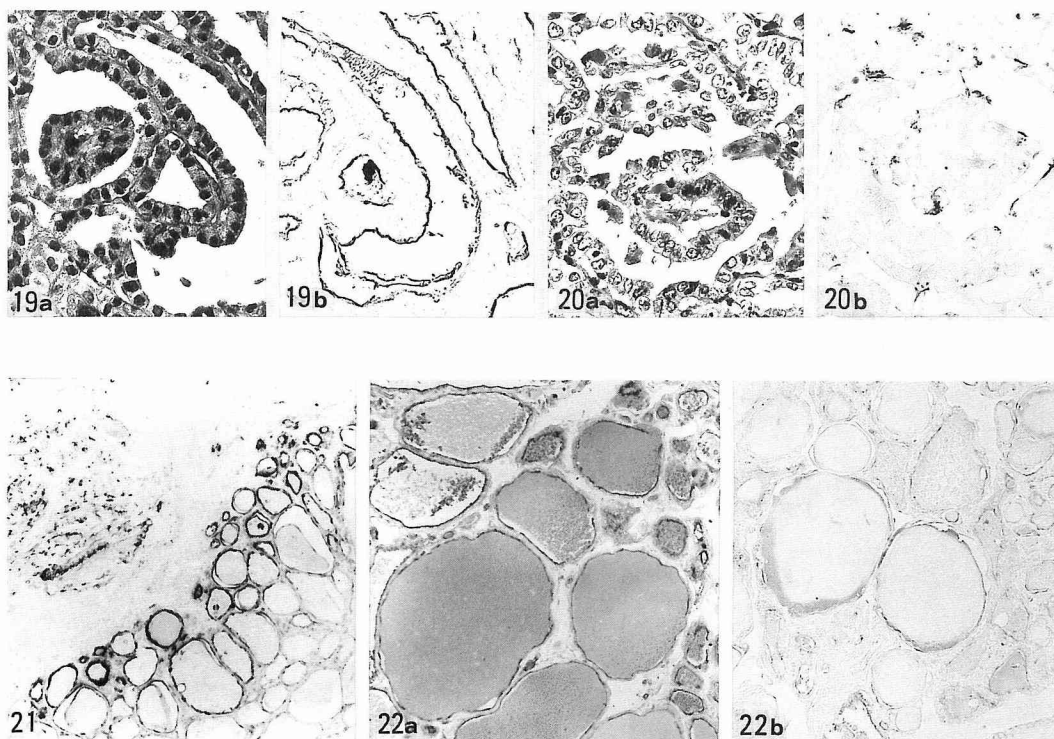


Fig.15 The supranuclear region (arrows) and the apical surface of follicular epithelia show definite reactivities.. Basedow's disease. $\times 140$

Fig.16 The supranuclear region (arrows) of follicular epithelia shows intense reactivities. $\times 70$

Fig.17a Carcinoma tissues of well differentiated papillary carcinoma show intense reactivities. $\times 35$

Fig.17b At higher magnification, the reactivities of the apical surface and supranuclear regions (arrows) are evident. $\times 140$

Fig.18 Follicular epithelia surrounding lymph follicles (F) show intense reactivities. $\times 35$

Fig.19a shows differentiated papillary carcinoma, less differentiated than the case shown in Fig. 17, and more differentiated than the case shown in Fig. 20. Hematoxylin-eosin. $\times 70$

Fig.19b The apical surface stains intensely, although the supranuclear regions do not. Prepared from the section adjacent to that for Fig. 19a. $\times 70$

Fig.20a illustrates papillary carcinoma showing marked nuclear atypism. Hematoxylin-eosin. $\times 70$

Fig.20b Carcinoma cells are almost unstained. Prepared from the section adjacent to that for Fig. 20a. $\times 70$

Fig.21 The apical surface of follicular epithelia shows definite reactivities. Non-neoplastic thyroid tissue adjacent to the carcinoma tissue (left upper portion). $\times 35$

Fig.22a and 22b illustrate DBA reactivities of colloids of normal thyroid.

Fig.22a Colloids varied in their DBA reactivity. $\times 35$

Fig.22b Some colloids revealed biphasic patterns. $\times 35$

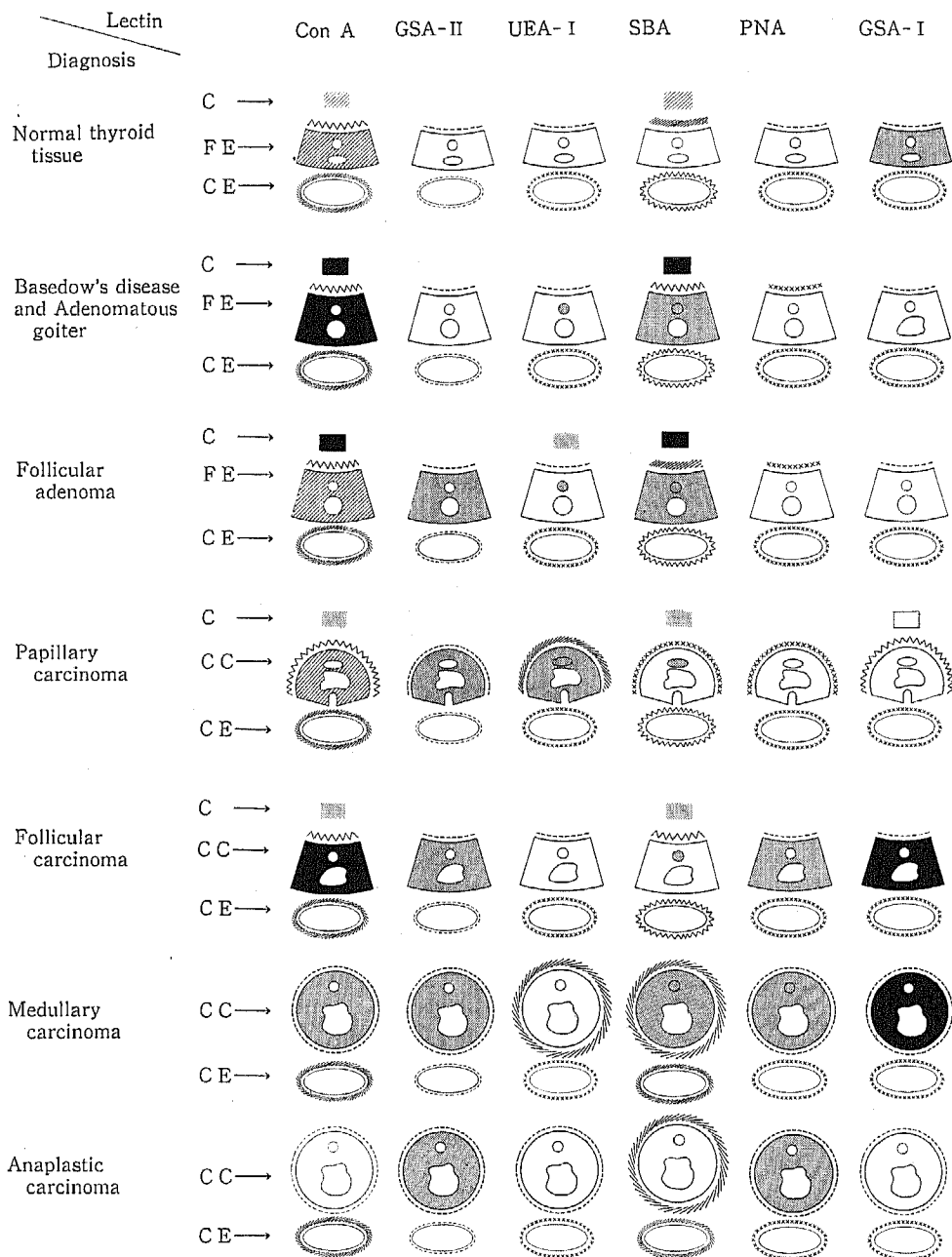
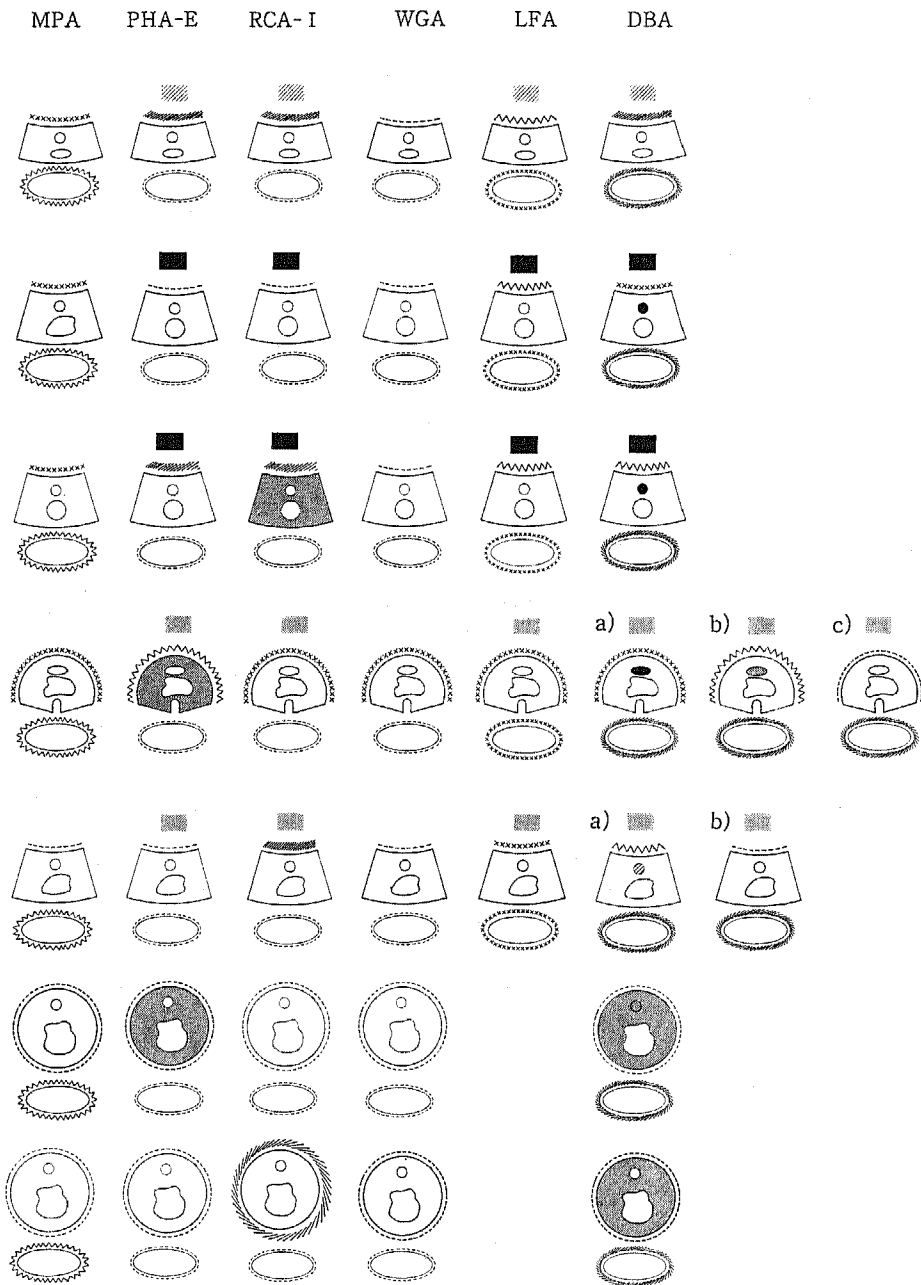


Fig. 23 A schematic illustration of lectin reactivities of thyroid tissues. - : No reaction. + : Less than 1/3 of particular tissue sites showed the reaction. ++ : 1/3 to 2/3 of particular sites stained showed the reaction. +++ : More than 2/3 of particular tissue sites stained showed the reaction.

Abbreviations used. C : Colloid, FE : Follicular epithelia, CE : Capillary endothelia, CC : Carcinoma cell

甲状腺のレクチン組織化学



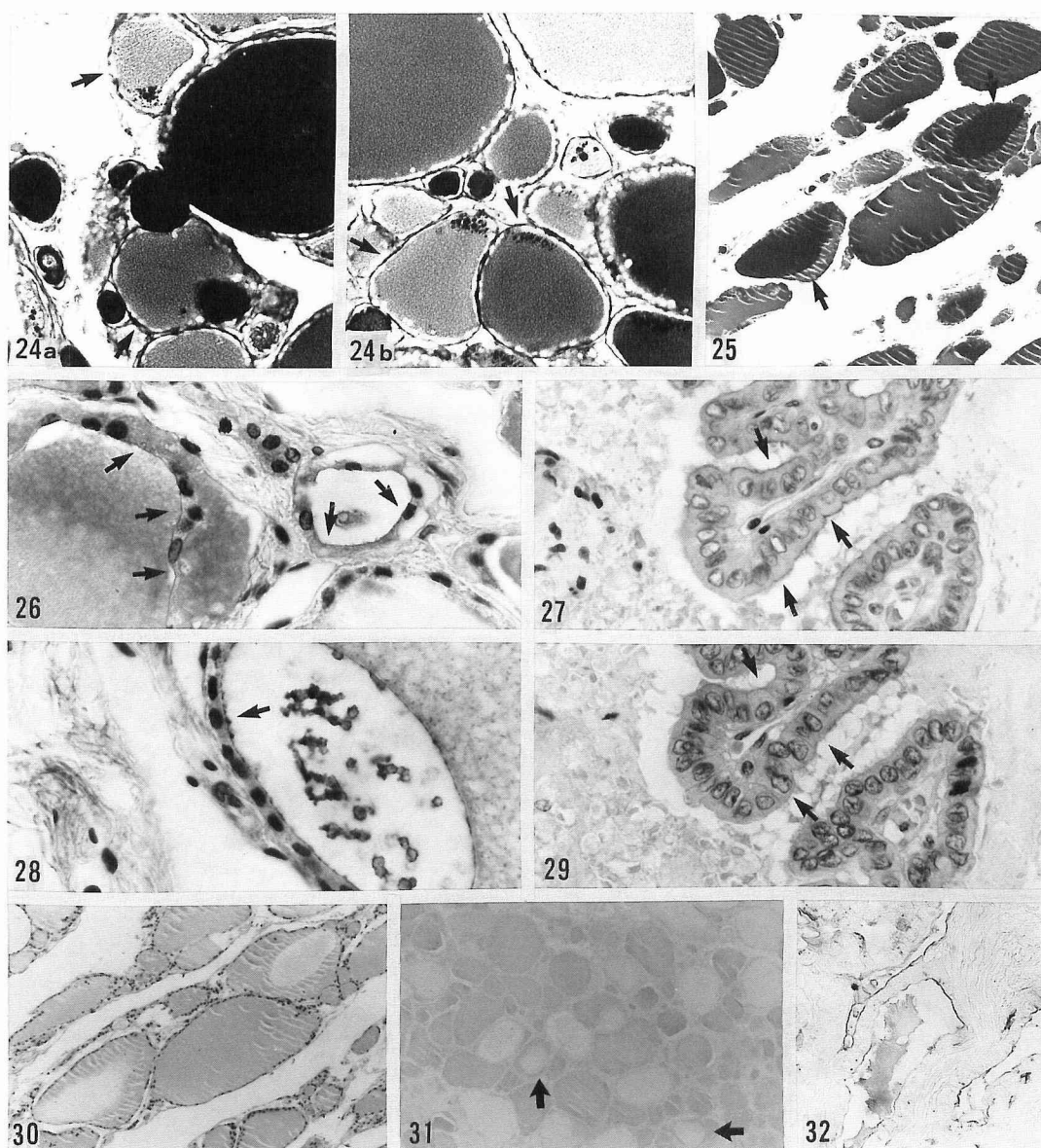


Fig. 24 and 25 were prepared from sections stained with diastase-Alcian blue pH 2.5-PAS.

Fig. 24a and 24b Colloids show a variety of stainabilities. Basement membrane (arrows) also stains. $\times 46$

Fig. 25 This figure reveals biphasic reactivities of colloids. The central regions (arrow) of some colloids show more intense PAS reactivity than the peripheral regions. $\times 23$

Fig. 26 to 30 illustrate colloidal iron reactivities of thyroid tissues.

Fig. 26 The apical surface of follicular epithelia is stained definitely (arrow). Normal thyroid. $\times 140$

Fig. 27 The apical surface of carcinoma cells shows basophilia (arrows). Papillary carcinoma. $\times 112$

例により著しく異なるが、過形成性病変、腺腫の乳頭状増殖部、乳頭癌では特に強い反応が認められた (Fig. 7)。一方、濾胞癌、髄様癌および未分化癌では、管腔面が PNA 反応性を示さない症例が多かった。細胞質基底部は濾胞癌、髄様癌、未分化癌の少数例に陽性反応がみられた。コロイドは染色されなかった。血管内皮細胞は一樣に強い反応を示した。

7 GSA-I 過形成性病変、腺腫のわずかな症例を除き、濾胞上皮の核上部に反応を認めなかった。正常、慢性甲状腺炎、濾胞癌、髄様癌の上皮細胞の細胞質基底部には症例によって弱い反応性を示すものがあった。濾胞癌および髄様癌の一部で、癌細胞の一部に明らかな反応がみられた。管腔面は、乳頭癌で反応がみられたが、その他の組織はまったく染色されなかった。濾胞内のコロイドは、疾患に関係なく GSA-I 親和性を示さなかった。血管内皮細胞は全例でよく染色され、血液型とは無関係であった。

8 MPA (Fig. 8) 濾胞上皮の核上部には、全例で反応がみられなかった。管腔面は、正常、過形成性病変、慢性甲状腺炎、腺腫、および乳頭癌ではっきりした MPA 反応性がみられた。特に乳頭癌は強い反応を示した (Fig. 8)。濾胞癌、髄様癌、未分化癌はほとんど染色されなかった。細胞質基底部とコロイドは全症例で MPA 親和性がみられなかった。検索した大部分の症例で、疾患の種類、血液型に関係なく血管内皮に MPA 反応性を認めた。

9 PHA-E (Fig. 9) 濾胞上皮の核上部、細胞質基底部は、PHA-E に対して反応を示さなかった。濾胞上皮の管腔面は、Fig. 9 に示したごとく乳頭癌で強く染色された以外に、明らかな反応はみられなかった。濾胞内のコロイドは全例 PHA-E に反応性を示した。その強さはコロイドによって、あるいはコロイド内での部位によって様々で、その分布は Con A 反応性と

一致していた。血管内皮はほとんど染色されなかった。

10 RCA-I (Fig. 10) 濾胞上皮の核上部、細胞質基底部は全症例を通してほとんど染色されなかった。上皮の管腔面は、乳頭癌では検討した全例に明らかな RCA-I 反応性がみられた (Fig. 10) が、その他の病変および正常組織ではほとんど染色されなかった。ただし、濾胞内のコロイドは Con A と同様な RCA-I 反応性を示した。血管内皮はほとんど染色されなかった。

11 WGA (Fig. 11) 濾胞上皮の核上部、細胞質基底部は全症例を通してほとんど染色されなかった。上皮の管腔面は、検討した全例の乳頭癌で強い反応がみられた (Fig. 11) が、その他の症例では疾患の種類に関係なく WGA 親和性はみられなかった。コロイドは染色されなかった。また、血管内皮も明らかな親和性を示さなかった。

12 LFA (Fig. 12-14) 核上部と細胞質基底部はほとんど染色されなかった。管腔面は、乳頭癌 (Fig. 12a)、濾胞癌ではノイラミダーゼ処理前に強陽性であったが、消化後 (Fig. 12b) はほとんど反応性を失った。正常 (Fig. 13a) でもかなり強い反応がみられたが、ノイラミダーゼ処理後 (Fig. 13b) の染色性の低下は軽度で、NaOH で処理後にノイラミダーゼ消化を行っても、染色性の低下の度合に変化はみられなかった。

濾胞内コロイドの LFA 親和性は、Con A に類似していた。すなわち、コロイドによってレクチン反応性は著しく異なり、同一コロイド内でも部位による相違がみられた (Fig. 14a)。Con A に対して強い反応を示す濾胞は一般的に LFA に対しても反応するが、反応の強さは2種類のレクチン間で必ずしも平行していなかった。ノイラミダーゼ消化により LFA 親和性はほとんど変化せず (Fig. 14b)、NaOH 処理の影

Fig. 28 Prior neuraminidase digestion fails to remove basophilia. cf. Fig. 29. Prepared from the adjacent section for Fig. 26. $\times 140$

Fig. 29 The apical surface of carcinoma cells loses basophilia after the neuraminidase digestion. Prepared from the adjacent section for Fig. 27. $\times 112$

Fig. 30 Basophilia of colloids varies extensively. Some colloids include unstained regions. Normal thyroid. $\times 23$

Fig. 31 Prior neuraminidase digestion imparts galactose oxidase-thionin Schiff reactivities to colloids. Arrows indicate biphasic colloids. $\times 17$

Fig. 32 The apical surface of carcinoma cells possesses blood group A determinant. Immunostaining for blood group A determinant. $\times 70$

響もみられなかった。なお、血管内皮は一樣に染色され、ノイラミナーゼ消化により完全に被染色性を失った。

13 DBA (Fig. 15-22) 今回検索したレクチンの中で最も興味深い結果を示した。

正常、慢性甲状腺炎の濾胞上皮の核上部と細胞質基底部には明らかな反応性がみられなかった。また、未分化癌の腫瘍細胞の核上部ではまったく反応を認めなかった。過形成性病変の、特に乳頭状増殖部の濾胞上皮の核上部は、不規則ながら強い反応を示した (Fig. 15)。好酸性細胞腺腫を含む濾胞腺腫の核上部もほぼ均一に強く染色された (Fig. 16)。乳頭癌では、細胞異型が軽度で定型的な乳頭構造を示す高分化型の症例では、核上部に明らかな DBA 反応性がみられ (Fig. 17a, 17b)、一方、細胞異型が高度で分化度の低い症例では反応性が低下する傾向にあった。濾胞癌では核上部に中等度の反応を示す症例とまったく無反応の症例があり、乳頭癌と同様、分化度と平行する傾向がみられた。

濾胞上皮の細胞質基底部は、好酸性濾胞腺腫と濾胞癌および髄様癌で、部分的に DBA 親和性が認められたのみであった。そのほかの症例では染色されなかった。

濾胞上皮の管腔面では、一部の正常濾胞上皮細胞の表面に反応がみられた。また、慢性甲状腺炎では、リンパ濾胞の周辺部の濾胞上皮が特に強い反応を示した (Fig. 18)。過形成性病変は正常とほぼ同様であったが、乳頭状増殖部は特に強く反応した。濾胞腺腫の上皮細胞管腔面は正常と同様な所見であった。乳頭癌で高分化癌の組織像を示す症例は強陽性であった (Fig. 19a, 19b) が、分化度の低い症例では染色性は低下していた (Fig. 20a, 20b)。しかし、乳頭癌では一般的に核上部の反応性の消失が管腔面の反応性の消失に先行する傾向にあった。一方、乳頭癌の濾胞型と濾胞癌では一部の症例で癌組織の一部に弱い陽性反応がみられたに過ぎなかった。なお、乳頭癌組織に接する非癌部の濾胞上皮表面は、癌組織から離れた甲状腺組織に比較すると明らかに強く染色された (Fig. 21) が、濾胞癌では核出された組織が多かったため検討できなかった。

髄様癌と未分化癌は DBA ではほとんど染色されなかった。

濾胞内のコロイドの DBA 親和性は、Con A に対する親和性とはほぼ同様であった (Fig. 22a, 22b)。す

なわち、コロイドによって、あるいは同一のコロイド内でも部位によってレクチン親和性は大きく異なるが、Con A 親和性の分布とはほぼ一致していた。しかし、その反応の強さは必ずしも平行しなかった。なお、甲状腺上皮細胞の DBA 反応性は血液型と無関係であった。血管内皮細胞は血液型 A 型症例でのみ染色された。

以上のレクチン染色の成績のうち、主要なレクチンの結果を Fig. 23 に要約した。

C 糖質組織化学的所見 (Table 5)

1 Diastase-AB-PAS (Fig. 24, 25) 正常、腫瘍を通じて濾胞上皮の核上部、細胞質基底部は明らかな反応性を示さなかった。濾胞上皮の管腔面は部分的にアルシンプルー好性を示したが、一般的に強い PAS 反応を示すコロイドの存在のため、その判定は困難であった。濾胞の基底膜は PAS に軽度に応答した (Fig. 24a, 24b)。正常、腫瘍のコロイドは赤紫色から青紫色に染色され、その強さは濾胞により異なっていたが、同程度の反応を示すコロイドが集簇する傾向がみられた。同心円状にコロイドの中心部が強い PAS 反応性を示す濾胞も散見された (Fig. 25)。Con A 反応性と比較すると、Con A 反応性は PAS 反応性と反比例し、好塩基性と平行する傾向がみられた。

血管内皮では基底膜が強い PAS 反応性を示したが管腔面の塩基好性は明らかでなかった。

2 AB pH 2.5 正常および腫瘍組織の濾胞上皮の管腔面はしばしば塩基好性を示したが、コロイド鉄に比較するとその反応は弱かった。コロイドも一部で弱い塩基好性を示した。

3 コロイド鉄反応 (Fig. 26-30) 濾胞上皮の核上部、細胞質基底部はすべての症例を通じて明らかな被染色性を示さなかった。濾胞上皮の管腔面は、正常 (Fig. 26)、過形成性病変、慢性甲状腺炎、腫瘍を通して常に明らかな反応を示した。乳頭癌における濾胞上皮の反応性は他の甲状腺組織に比較して際だって強かった (Fig. 27)。ただし、ノイラミナーゼ消化をあらかじめ行くと、非腫瘍性組織では染色性の低下がさほど明らかではないが (Fig. 28)、癌組織では著明な低下がみられた (Fig. 29)。

コロイドは本法に対して比較的強い反応を示すが、その強さはコロイドによって著しく異なっていた (Fig. 30)。しかし、塩基好性を示すコロイドは集簇する傾向がみられた。また、同心円状にコロイドの周辺部が強い反応を示す濾胞が観察された。AB-PAS 染色と比較すると、PAS 反応性が強い部分はコロイド

鉄反応性を欠き、一方、AB-PAS 染色におけるアルジャンブルー好性とコロイド鉄反応性は平行していた。コロイド鉄反応性は Con A 反応性の分布とほぼ一致していたが、反応の強さは必ずしも平行しなかった。上皮細胞の管腔面と異なり、コロイドのコロイド鉄反応性はノイラミニダーゼの影響をほとんど受けなかった。

血管内皮もコロイド鉄反応性を示し、ノイラミニダーゼでその反応性は完全に失われた。

4 HID-AB 総ての検討症例を通じて濾胞上皮、血管内皮に明らかな反応を認めなかった。コロイドは一様に淡い、しかし濾胞によって多少の濃淡のある HID 反応性を示した。

5 PA-SB-PH-PAS 総ての症例を通じて濾胞上皮、コロイド、血管内皮とも反応を示さなかった。

6 GOTS (Fig. 31) 濾胞上皮は明らかな GOTS 反応性を示さなかった。

濾胞内のコロイドはノイラミニダーゼ消化後においてのみ、弱いながらも明らかな反応を示した (Fig. 31)。いずれの濾胞も GOTS 反応性を示したが、強く反応する濾胞はコロイド鉄反応や Con A 反応性を示さない濾胞に一致していた。

血管内皮の反応性は明らかでなかった。

D 血液型物質の免疫染色

1 A型物質 (Fig. 32) 一部のA型症例の核上部、管腔面およびコロイドにのみ証明された。細胞質基底部分は反応を示さなかった。核上部および管腔面は乳頭癌でのみ明らかな反応がみられた (Fig. 32)。コロイドは正常の2例のごく一部分で僅かに染色されたのみであった。腺腫、癌ともコロイドは反応を示さなかつ

た。血管内皮はA型、AB型でのみ染色された。

2 B型物質 一部のB型症例の管腔面に証明された。核上部、細胞質基底部分はまったく染色されなかった。管腔面は2例の乳頭癌の一部に証明された。コロイドは反応を示さなかった。血管内皮はB型、AB型症例でのみ強い反応を認めた。

3 H型物質 核上部、細胞質基底部分、コロイドはまったくH型物質を含まなかった。A型の濾胞癌の1例で、僅かな癌細胞の細胞質基底部分がH型物質を含んでいた。血管内皮はH型症例でのみ強い反応がみられた。ただし、B型症例の1例で、一部の血管内皮に反応が認められた。

4 Le^a 物質 細胞質基底部分、核上部、コロイドとも検索した全症例で証明されなかった。A型の乳頭癌の2例で、A型物質が証明された部分の一部に、Le^a 物質が認められた。血管内皮は染色されなかった。

5 Le^b 物質 核上部、細胞質基底部分、コロイドにはLe^b 物質はまったく証明されなかった。管腔面は、A型、B型症例の、A型、B型物質が証明されたそれぞれ2例で、型物質や Le^a 物質が証明された部分の一部に Le^b 物質が認められた。

E コロイド染色性

コロイドの組織化学的反応性を、Con A に対する反応性を中心に整理すると、Table 7 の様になる。なお、癌組織ではコロイドはいずれの方法によっても複雑な入り組んだ斑紋状に染色されるが、反応性自体は正常のコロイドと同様であったので一括して示した。レクチンでは、Con A, SBA, PHA-E, RCA-I, LFA, DBA が少なくとも一部のコロイドに対して親和性を示した。そのほか、コロイドは、PAS 反応性

Table 7 Relationship between lectin reactivities and histochemical reactions

Staining method	Con A positive colloid	Con A negative colloid
Lectins		
SBA	positive	negative
PHA-E	positive	negative
RCA-I	positive	negative
LFA	positive	negative
DBA	positive	negative
Histochemical reaction		
PAS	weak	strong
Basophilia	positive	negative
NANAase-GOTS*	weak	strong

* NANAase-GOTS : Neuraminidase-galactose oxidase-thionin Schiff reaction.

を示すほか、アルジャンブルー、コロイド鉄などの塩基性色素に親和性を示し、ノイラミニダーゼ-GOTS 反応性であった。レクチン親和性を示すコロイドは塩基好性で、一方、レクチンに反応しないコロイドは強い PAS 反応性とノイラミニダーゼ-GOTS 反応性を示した。単一の濾胞内のコロイドが同心円状に異なった組織化学的反応性を示した場合、周辺部はレクチン親和性と好塩基性を、また、中心部は強い PAS 反応性とノイラミニダーゼ-GOTS 反応性を示す場合が多かった。なお、HID 反応性はいずれのレクチン染色、コロイド鉄染色、AB-PAS と相関がみられなかった。

IV 考 案

本研究では、糖質に対する組織化学的手法を用いて、ヒト甲状腺組織における糖質代謝の追求を試みた。その結果、すでに報告されている生化学的な知見を裏付ける所見が得られた一方で、従来の報告からは予想されない所見も認められた。

まず、甲状腺組織が多量の糖質を含む臓器であることが組織化学的立場からも改めて確認された。今回著者が用いた方法は、レクチン染色、伝統的な方法である PAS 反応や塩基性色素を用いた染色、血液型物質およびその関連物質の免疫組織化学的染色の3種類である。レクチン染色にはペルオキシダーゼ標識によるいわば直接法を使用し、血液型物質および関連物質の染色には2次抗体にペルオキシダーゼ標識抗体を用いた間接法によった。両染色法とも、酵素標識により特定の糖鎖あるいは糖残基の検出感度が著しく増強されているので、これと伝統的な染色法により得られた結果とを無条件に比較することには問題が多い。しかし、それにもかかわらず、酵素標識を用いた染色と伝統的な染色法の比較により、今回の研究では多くの興味深い結果が得られた。

前述のように、糖質は、濾胞上皮の核上部、細胞質基底部、細胞表面、コロイド、間質の基底膜、血管内皮などに証明された。これらのうち、便宜上、まずコロイドの反応性について考察する。

本研究では、コロイドに多様な反応性が観察された。とくに、種々の染色法で、コロイド間のみならず、同一コロイド内でも、反応性に不均一性が認められた。コロイドに反応性を示す異なった複数の染色法で相互に一定の関連がみられたので、この染色上の不均一性は単なる染色ムラとは考えられず、コロイドの組成の違いを反映していると思われる。ここでは、Con A に

反応したコロイドをかりにA型コロイド、反応しないものをB型コロイドと名付けて議論を進める。

さて、コロイドはサイログロブリンそのものと考えられ、生化学的にもそのような観点から分析が進められてきた。Spiro ら³⁰⁾⁻³²⁾によると、サイログロブリンは糖蛋白で、糖含量は約10%、その糖鎖を構成している単糖は Gal, Man, GlcNAc, NeuAc, Fuc の5種であることが判明している。サイログロブリンは2種類の代表的な糖鎖を持ち、それぞれ unit A および unit B と呼ばれている。Unit A は定型的高マンノース型の糖鎖で、Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) GlcNAc-Asn 型のコアに、多数のマンノースが複雑に枝分かれして結合して、構成されている。一方、unit B は複合型の血清型糖鎖で、糖鎖の末端は Gal と NANA で占められており、コア部分は Man (β 1-4) GlcNAc (β 1-4) [Fuc (α 1-6)] GlcNAc-Asn からなる。なお、最近、Spiro と Bhoyroo³³⁾ は、unit B の糖鎖末端を占める Gal が C-3 位でしばしば硫酸化されていること、ときには Gal にかわって、末端から2番目の位置を占める GlcNAc の C-6 位が硫酸化されていることなどを見いだした。そのほか、Spiro ら³⁰⁾⁻³²⁾³⁴⁾⁻³⁶⁾ は unit C, unit D の存在も指摘しているが、その糖鎖に対する詳細な報告はみられない。Unit C³²⁾³⁴⁾³⁶⁾ は unit B に比較して galactosamine 含有量がやや多く、O-グリコシド結合したムチン型の糖鎖であると言う。Unit D³²⁾³⁶⁾ については明らかではないが、高マンノース型の糖鎖らしい。なお、いずれも microheterogeneity に富んでおり³¹⁾、それが糖鎖構造の解析を困難にしている。

さらに最近、以上のような糖蛋白型の糖鎖のみならず、コンドロイチン硫酸がサイログロブリンの構成成分の1つであることが明らかにされた³⁷⁾³⁸⁾。したがって、現在、本体が不明な unit D を含めると、5種類の糖鎖が知られていることになる。

本研究により著者が得た結果が従来の生化学的な分析結果と一致するか否かについて考察を試みた。

Con A は C-3, 4, 6 の水酸基が置換されていない Man あるいは Glc に強い親和性を示すことが知られている³⁹⁾⁴⁰⁾。したがって、高マンノース型糖鎖である unit A, D は当然 Con A 親和性を示すと考えられる。一方、unit B も Man を含むが、いずれも C-3, 4, 6 のいずれか、あるいは2カ所の水酸基が置換されているので、Con A と結合するとは思えない。また、著者らは 0.2M 以上の塩化ナトリウムを含む緩衝

液を Con A 溶液に使用しているので、Con A とコンドロイチン硫酸との反応は否定できる。

Con A と同様な染色性を示したコロイド鉄反応は、酸性糖残基の中でも特にシアル酸に親和性を示す方法として知られている²⁷⁾⁻²⁹⁾。今回も、A型のコロイドでは、コロイド鉄反応の結果と、シアル酸に特異的なレクチンである LFA による染色の結果はよく一致していた。しかし、いずれの親和性もノイラミナーゼ消化によってほとんど影響を受けなかった。濾胞上皮の細胞表面のコロイド鉄および LFA に対する親和性は、ほぼ完全にこの酵素によって失われるので、A型コロイド内のシアル酸は、細胞膜の構成成分である cell coat の脱落によるものではなく、コロイド鉄反応も LFA も unit B の構成成分であるシアル酸を認識している可能性が大きいと言える。しかし、このシアル酸がノイラミナーゼでなぜ水解されないのか、*Arthrobacter ureafaciens* に由来するこの酵素の structural requirement が十分明らかにされていない現段階では説明が困難である。

Con A, LFA 以外で A型コロイドに親和性を示したレクチンは SBA, PHA-E, RCA-I, DBA で、いずれも GalNAc あるいは Gal に特異的とされている。Unit B の Gal が C-3 位で硫酸化されているとレクチンとは反応しないであろうから、これらのレクチンは Spiro ら³⁰⁾⁻³²⁾がその存在を示唆している unit C と反応している可能性がある。なお、以上のレクチン、塩基性色素は、同一のコロイド、あるいはコロイド内の同一の部分に対してほぼ同一の親和性を示した。Unit A, unit B, unit C がおそらく同一の分子内に含まれていることを示唆する所見と言える。なお、PNA がコロイドと反応しなかったのは β Gal が硫酸化されているため、あるいは末端に位置する Gal が少ないためであろう。また、UEA-I の場合は Fuc がコア領域に存在しているためと考えられる。

以上のように、A型のコロイドについては、生化学的な分析結果とはほぼ一致する結果が得られた。しかし、その一方で、レクチン親和性を示さなかった B型のコロイドは、理解に苦しむ反応性を示した。すなわち、好塩基性は低い、PAS 反応は強く、ノイラミナーゼ消化後のみ明らかとなる GOTS 反応性を有する。PAS 反応が糖に特異的であることにはすでに議論の余地がなく、今回使用したレクチンと結合しない糖鎖構造が存在するものと考えざるを得ない。GOTS 反応は β Gal あるいは β GalNAc に特異的な反応で、

一般的にシアル酸は β Gal あるいは β GalNAc に結合しているので、ノイラミナーゼ GOTS 反応の結果はそれなりに合理性があると言える。しかし、B型のコロイドは先に挙げた 4 種のレクチン、すなわち、SBA, PHA-E, RCA-I, DBA をはじめ、PNA のように Gal あるいは GalNAc に特異性を有するとされているレクチンのいずれとも反応しなかった。現段階では、B型コロイドに含まれる糖鎖構造についてはまったく不明と言うほかはない。

なお、硫酸基に高度な特異性を示す HID 染色ではコロイドは多少の濃淡の差はあるが、ほとんどが淡く染色された。ムコ多糖に結合しているとすれば、ムコ多糖はコロイドに広く分布していることになる。

本研究において、コロイドの多様性を明らかにし得たが、この多様性は、正常組織、炎症性組織、過形成性組織、腫瘍組織を通じて同様であった。種々の病態時における濾胞上皮の細胞膜の構成成分の変化の激しさに比較すると、コロイドの性状には恒常性が認められる。従来の生化学的な分析は、コロイドの均一性を前提にしており、今後、生化学的な分析に当たってもこの多様性を念頭に置く必要がある。

レクチンを用いた甲状腺の研究は、2つのグループから発表されている。1986年の Sobrinho-Simoes と Damjanov¹⁾ による 20 種の蛍光標識をしたレクチンを用いた癌組織の反応性の研究では、コロイドが Con A WGA, LCA, PHA-E, PHA-L, RCA-I, RCA-II に親和性を示したとされているが、コロイドの多様性についてはまったく記載がない。しかし、掲載されている写真から判断すると、LCA, WGA, Con A には、コロイドによって明らかな反応性の差がみられる。次に、1988年の Gonzalez-Campora ら²⁾ による 5 種の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識レクチンを用いた研究では、DBA, SBA, WGA に親和性を認めているが、濾胞間の多様性についてまったく記載がない点では同様である。したがって、著者の得た結果との比較は困難である。教室の Iida⁴⁾ は 1973 年、Azan Mallory (A-M) 染色により、同一患者におけるコロイド間の、および同一コロイドにおける部位による染色の多様性を指摘した。A-M 染色で、好塩基性を示した部分は本論文の A型コロイドに相当する。一方、好酸性を示した部分は、B型コロイドにあたる。A-M 染色での染色性は B型コロイドのペプチド部分に好酸性蛋白が含まれていることを示唆している。B型コロイドには、ノイラミナーゼ消化の効果からシアル酸

の存在が確認されているにも関わらず、糖染色で好塩基性が認められなかった。これは、コロイドのペプチド部分の影響かも知れない。この問題は今後の重要な検討課題と考えられる。Iida が指摘した、癌組織内のコロイドが斑紋状に染色される現象は、本研究でも確認されたが、その意義は明らかにできなかった。

次に、サイログロブリンを合成している濾胞上皮の反応性について述べる。

サイログロブリンのような複合糖質の合成過程は最近次第に明らかにされつつある。すなわち、いずれのタイプの糖鎖にしても、まず細胞内の粗面小胞体で、高マンノース型の糖鎖から複雑な分解、合成過程を経て、その基本骨格が形成され、さらに Golgi 装置に転送されて、末端の糖残基が付加されて完成される⁴²⁾。甲状腺でもその過程はほぼ同様と考えられており⁴³⁾⁻⁴⁶⁾、事実 ^3H で標識した糖残基を用いたラジオオートグラフィー⁴⁶⁾⁻⁴⁸⁾ による研究結果もこれを支持している。

^3H -Man, ^3H -Fuc, ^3H -Gal を用いて、甲状腺組織における経時的な取り込みをラジオオートグラフィーにより観察した Herscovics ら⁴⁶⁾によると、 ^3H -Man の場合、静脈内へ投与後30分では粗面小胞体に最も多くの集積がみられるが、時間とともに Golgi 装置、ついで濾胞上皮細胞表面へ移行して、4時間後には細胞表面に最も多く標識物質が集積すると言う。一方、 ^3H -Fuc, ^3H -Gal では、投与後15分で Golgi に集積がみられるが、30分後には分泌顆粒とコロイドにも標識物質が出現し、135分後にはコロイドに最大の集積が観察される。Man と Fuc, Gal のこのような相違は、Man が主として粗面小胞体で転移されるのに対し、Fuc と Gal は Golgi 装置で転移される糖残基であるためと考えられる。

正常および慢性甲状腺炎組織における濾胞上皮では、核上部、細胞質基底部ともレクチン反応性が弱く、そのうえ濾胞内に充満したコロイドのために胞体が伸展されており、観察に限界があったことは否めない。しかし、過形成性病変と濾胞腺腫では、核上部に DBA, GSA-I, SBA, UEA-I で反応がみられた。とくに DBA はほとんどの検索症例で明らかな反応が観察された。GSA-I と UEA-I はコロイドに親和性を示さなかったレクチンであるが、前述したように unit B のコア部分に Fuc が存在し、また、GSA-I は DBA および SBA と類似の糖鎖特異性を有するので、最終的な糖鎖合成の場である Golgi 野で反応性が認めら

れるのは当然のことである。なお、高分化型乳頭癌および濾胞癌でもほぼ同様な結果であるが、特に DBA に対して強い反応が認められた。

濾胞上皮の細胞質基底部は、特に Con A に対して親和性を示した。細胞質基底部のびまん性の被染色性は小胞体の被染色性を反映していると考えられるが、サイログロブリンの糖鎖の主体⁴⁰⁾⁴²⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾は血清型であり、高マンノース型糖鎖も存在するので、これは当然の所見と言える。また、 ^3H -Man を用いた前述のラジオオートグラフィーの結果とも一致している。細胞間における反応性の著しい相違は代謝活性の相違を反映しているのかも知れない。また、GSA-II に対する反応性も数例に観察された。これは、糖鎖のコア領域に存在する GlcNAc を認識しているものと考えられる。腺腫、濾胞癌、乳頭癌ではよく染色されるが、未分化な癌では、癌細胞の細胞質はほとんど反応性を示さなかった。

サイログロブリンの産生能を免疫組織化学的に検索した Permanetter ら⁵¹⁾の報告によると、濾胞腺腫と濾胞癌の細胞質はサイログロブリンに強く染色されるのに対して、乳頭癌の反応は弱かったと言う。未分化癌と髄様癌では、サイログロブリンの産生は証明されなかった。一方、サイログロブリンの腫瘍マーカーとしての意義を検討した教室の金子⁵²⁾によると、乳頭癌、濾胞癌などの高分化癌ではサイログロブリンは腫瘍マーカーとしての臨床的な意義を有すると言う。乳頭癌では、組織学的に証明できる癌組織内のコロイドは少ないのが普通であるが、金子の結果は癌細胞での生合成のレベル自体が低いわけではないことを示している。Permanetter ら⁵¹⁾、および金子⁵²⁾の報告は著者の Con A 染色の結果とはほぼ一致しており、Con A 染色の結果は細胞のサイログロブリン産生能を反映しているものと考えられる。

濾胞上皮の細胞表面は、正常、慢性炎症では、コロイド鉄、LFA, Con A, SBA, DBA により、また、過形成性病変、腺腫では、コロイド鉄、LFA, Con A, SBA, PNA, DBA により染色された。特に多彩な反応がみられたのは乳頭癌で、コロイド鉄はもちろん、GSA-II と UEA-I を除く全てのレクチンで明瞭に染色された。また、濾胞癌では、コロイド鉄、LFA, Con A, SBA, GSA-I, WGA, DBA に対する反応性を認めた。

細胞の形質膜の構成成分である複合糖質の糖鎖部分は細胞外へ突出しており、いわゆる cell coat を形成している。上皮細胞のように極性のある細胞の場合、

管腔に面する形質膜の cell coat は特に発達しており, surface coat と呼ばれる場合がある。著者が観察した管腔面に分布する糖鎖はこの意味では surface coat に属すると言える。Surface coat は一般にシアル酸に富み(40)(42)(53), 今回の研究でも管腔面にシアル酸の存在を示す被染色性を認めた。しかし, ノイラミニダーゼ消化の影響は正常組織と比較して, 腫瘍組織でより明らかで, シアル酸の結合状態が異なることを意味している。形質膜内の複合糖質についてはすでに広範な研究が展開されており, それが糖タンパク質であっても糖脂質であっても, その糖鎖部分は細胞のおかれた状態, あるいは細胞の変質に伴って変化することが知られている。いわゆる分化抗原, あるいは腫瘍マーカーの多くがこのタイプの糖鎖に属する。今回の研究でも非腫瘍性疾患から良性腫瘍, ついで悪性腫瘍となるにつれて, 濾胞上皮の apical surface に親和性を示すレクチンの種類が増加した。これは, 腫瘍組織では糖鎖の合成系が乱れ, 多種多様な糖鎖を産生するためと考えられる。

濾胞上皮のおかれた状態によってその産生する糖鎖に変動がみられることを最もよく示したのは DBA による染色であった。核上部, 管腔面は一般的に DBA に対する反応性を示すが, 核上部は特に過形成性病変の乳頭状増殖部, 腺腫, よく分化した乳頭癌で, また管腔面は特に乳頭状増殖部と高分化型の乳頭癌で著明な反応がみられる。この結果は, 本来, Golgi 装置で糖鎖の内部に組み込まれる DBA 結合性糖残基が, 上述の病変では, 糖鎖の末端に露出したままで形質膜に組み込まれることを意味している。しかし, 分化度の低い癌組織ではいずれにも DBA 反応性が認められず, このタイプの糖鎖の合成が阻害されている可能性が大きい。

前述の Sobrinho-Simoes と Damjanov¹⁾ および Gonzalez-Campora²⁾ は, 甲状腺組織のレクチン反応性を細胞単位で一括して記載しているが, 細胞内での分布の詳細について述べていないので, 著者の得た結果と比較するのは困難である。しかし, Sobrinho-Simoes と Damjanov¹⁾ によれば, 正常組織では濾胞上皮は WGA 陽性とされ, 一方 DBA は陰性とされているが, 著者の研究では DBA は最も著明な濾胞上皮親和性を示したレクチンの1つであった。また, 腺腫, 癌では, 彼らが, WGA, GSA-II に反応性, DBA, PNA に非反応性としているのに対し, 著者はまったく異なった結果を得た。このような相違が, 染

色法の相違によるものか, それとも観察する視点の相違に基づくものか明らかではないが, 検討課題の1つである。また, UEA-I に関する Gonzalez-Campora²⁾ の報告との違いは, 彼らが癌細胞での UEA-I 反応性を強調しているのに対して, 著者の研究では甲状腺上皮の UEA-I 反応性は, 正常, 腫瘍に関わらず, むしろ弱く, このレクチンは甲状腺組織内の血管分布の研究に適していると考えられた。

今回の研究で非腫瘍性の甲状腺濾胞上皮は, 血液型物質を産生していないことが明らかにされた。レクチンには血液型活性を有するものが多いが, 少なくとも非腫瘍性の甲状腺組織では, レクチン反応性は血液型糖鎖の産生と無関係と考えてよい。コロイドにみられた反応性は陽性例があまりにも少数で, しかも組織のごく一部でのみ観察されたので, 局所的な代謝異常により, たまたま血液型活性を示す糖鎖が産生された可能性が大きい。ただし, 乳頭癌では腫瘍細胞の apical surface に明らかな血液型活性がみられた。しかし, Le^a と Le^b が同一細胞で証明されるような矛盾がみられ, その意義は現時点では不明というほかはない。あるいはモノクローナル抗体の特異性に問題があるのかも知れない。

甲状腺組織に特有な糖鎖や糖鎖にエпитープを持つ甲状腺腫瘍の腫瘍マーカーの研究は緒についたばかりである。大腸癌では, レクチン染色が新しい腫瘍マーカー発見のきっかけをつくっている(54)(55)。この研究で得られた結果を, 将来, 甲状腺組織特異抗原, あるいは甲状腺腫瘍マーカー発見に結び付けたいと考えている。

V ま と め

1 12種類のレクチン, PAS 反応を始めとする糖質組織化学的染色, 血液型物質に対する免疫組織化学的染色を用いて, 種々の甲状腺組織における糖質の分布および変動を観察した。

2 検討対象として, 信州大学医学部第2外科で扱った, 過形成性病変34例, 濾胞腺腫29例, 乳頭癌105例, 濾胞癌23例, 髄様癌5例, 未分化癌4例, および剖検例から得た正常甲状腺組織11例を用いた。

3 甲状腺の上皮性組織でレクチンに反応する場所は, 濾胞上皮の核上部, 細胞質基底部, 細胞の管腔面および管腔に大別された。

4 コロイドの組織化学的な反応性は, 症例によって, あるいは同一の症例においてもコロイドによって

様々であったが、Con A, DBA を始めとする5種類のレクチンおよびコロイド鉄に反応するタイプと、レクチン、コロイド鉄に反応せず、強いPAS反応だけを示すタイプに分類された。コロイドの反応性は正常組織、慢性炎症を伴う組織、腫瘍組織を通じてほぼ同様であったが、癌組織ではより多彩であった。

5 濾胞上皮の細胞質基底部は、Con A に対して親和性を示したが、これはサイログロブリン産生能を反映しているものと考えられた。低分化な癌の腫瘍細胞は反応を示さなかった。

6 病変の種類によって糖鎖合成系に変動が生ずることを象徴的に示したのはDBA染色であった。濾胞上皮の核上部は、特に過形成性病変の乳頭状増殖部、腺腫、よく分化した乳頭癌で、また、管腔面は特に乳頭状増殖部とよく分化した乳頭癌で著明な反応がみられた。しかし、分化度の低い癌組織ではいずれにもDBA反応性が認められなかった。濾胞上皮の表面は一般的にシアル酸の存在を示す反応性が認められたが、正常濾胞上皮、腺腫、癌細胞の順に、組織化学的な反応性は多彩となった。DBA反応性糖残基は、正常、

腺腫の濾胞上皮の管腔面にはあまり観察されなかったが、乳頭状増殖部の濾胞上皮や分化型の癌組織でその存在は明瞭であった。しかし、低分化型の癌組織ではまったく認められなかった。

7 以上の結果は、一面では甲状腺組織における糖産生の多様性を、また、他方では糖鎖構造の変動の法則性を明らかにした。生化学的な研究に際してもこのような結果を前提に進める必要がある。

本研究の一部は、1987年9月第46回日本癌学会、1987年10月第20回甲状腺外科検討会、1988年9月第47回日本癌学会、1988年10月第31回日本内分泌学会甲状腺分科会、1988年11月第21回甲状腺外科検討会、1989年9月第33回万国外科学会で発表した。

謝辞 本研究を遂行するに際し、終始懇篤なご指導を賜った信州大学医学部臨床検査医学教室勝山 努助教授、および技術上の援助をいただいた同附属病院中央検査部、太田浩良医員、山上 修主任技師ほかの皆様に深謝致します。

文 献

- 1) Sobrinho-Simoes, M. and Damjanov, I. : Lectin histochemistry of papillary and follicular carcinoma of the thyroid gland. Arch Pathol Lab Med, 110 : 722-729, 1986
- 2) Gonzalez-Campora, R., Callego, F.S., Lacave I.M., Marin, J.M., Linares, C.M. and Galrera-Davidson, H. : Lectin histochemistry of the thyroid gland. Cancer, 62 : 2354-2362, 1988
- 3) Yonezawa, S., Nakamura, T., Tanaka, S. and Sato, E. : Glycoconjugate with Ulex europeus agglutinin-1-binding sites in normal mucosa, adenoma and carcinoma of the human large bowel. J Natl Cancer Inst, 69 : 777-785, 1982
- 4) Boland, C.R., Montgomery, C.K. and Kim, Y.S. : Alterations in human colonic mucin occurring with cellular differentiation and malignant transformation. Proc Natl Acad Sci USA. 79 : 2051-2055, 1982
- 5) Cooper, H.S. : Peanut lectin-binding sites in large bowel carcinoma. Lab Invest, 47 : 383-390, 1982
- 6) Bresalier, R.S., Boland, C.R. and Kim, Y.S. : Regional differences in normal and cancer-associated glycoconjugates of the human colon. J Natl Cancer Inst, 75 : 249-260, 1985
- 7) Katsuyama, T., Ono, K., Nakayama, J., Akamatsu, T. and Honda, T. : Mucosubstance histochemistry of the normal mucosa and carcinoma of the large intestine. Calactose oxidase-Schiff reaction and lectin stainings. Acta Pathol Jpn, 35 : 1409-1425, 1985
- 8) Nakamura, T., Yonezawa, S., Tanaka, S. and Sato, E. : Lectin histochemistry in colorectal adenomas and early carcinomas. Pathol Clin Med, 3 : 317-322, 1985
- 9) Nakayama, J., Katsuyama, T., Ono, K., Honda, T., Akamatsu, T. and Hattori, H. : Large bowel carcinoma-specific antigens detected by the lectin, Griffonia simplicifolia agglutinin-II. Jpn J Cancer Res (Gann), 76 : 1078-1084, 1985
- 10) Yamada, K. and Shimizu, S. : The histochemistry of galactose residues of complex carbohydrates as studied by peroxidase-labeled Ricinus communis agglutinin. Histochemistry, 53 :

143-156, 1977

- 11) Katsuyama, T., Ono, K., Nakayama, J. and Kanai, M. : Recent advances in mucosubstance histochemistry, In : Kawai, K. (ed.), Gastric mucous and mucous secreting cells, pp.3-18, Excerpta Medica, Amsterdam, 1985
- 12) Craham, R.C. and Karnovsky, M.J. : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney : Ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*, 14 : 291-302, 1966
- 13) Bernhard, W. and Avrameas, S. : Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. *Exp Cell Res*, 64 : 232-236, 1971
- 14) Katsuyama, T. and Spicer, S.S. : Histochemical differentiation of complex carbohydrates with variants of the Concanavalin A-horseradish peroxidase method. *J Histochem Cytochem*, 26 : 233-250, 1978
- 15) Goldstein, I.J. and Hayes, C.E. : The lectins : Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. In : Tipson, R.S. and Horton, D. (ed.), Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry, pp.127-340, Academic Press, New York, 1978
- 16) Hotta, K., Goso, K. and Kato, Y. : Human gastric glycoproteins corresponding to paradoxical Concanavalin A staining. *Histochemistry*, 76 : 107-112, 1982
- 17) Wilg, E.L., Murphy, P., Mendelsohn, G. and Eggleston, J.C. : Distribution of blood group substances in normal human colon. Use of the unlabeled antibody (PAP) immunoperoxidase technic to identify A and B blood group substances. *Am J Clin Pathol*, 76 : 806-809, 1981
- 18) Yuan, M., Itzkowitz, S.H., Palekar, A., Shamsuddin, A.M., Phelps, P. C., Trump, B.F. and Kim, Y.S. : Distribution of blood group antigens A,B,H, Lewis^a and Lewis^b in human normal, fetal, and malignant colonic tissues. *Cancer Res*, 45 : 4499-4511, 1985
- 19) 長村義之 : 酵素抗体法(1)—光顕編, 日本病理学会(編), 病理技術マニュアル4巻, 病理組織化学とその技術, 免疫組織化学, 第1版, pp.201-233, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1986
- 20) Nakayama, J., Ota, M., Honda, T. and Katsuyama, T. : Histochemical demonstration of sugar residues by lectin and immunocytochemical techniques for blood group antigens in human colon. *Histochem J*, 19 : 454-464, 1987
- 21) Spicer, S.S., Horn, P.G. and Leppi, T.J. : Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In : Wagner, B.M. and Smith, D.E. (ed.), The connective tissue, pp.251-303, Williams and Wilkins, Baltimore, 1967
- 22) 勝山 努, 山上 修, 林 茂子, 井口恵美 : PAS 反応とその変法. 検査と技術, 13 : 529-534, 1985
- 23) Schulte, B.A. and Spicer, S.S. : Light microscopic histochemical detection of terminal galactose and N-acetylgalactosamine residues in rodent complex carbohydrates using a galactose oxidase-Schiff sequence and peanut lectin-horseradish peroxidase conjugates. *J Histochem Cytochem*, 31 : 19-24, 1983
- 24) Spicer, S.S. : Diamine methods for differentiating mucopolysaccharides histochemistry. *J Histochem Cytochem*, 13 : 211-234, 1965
- 25) Culling, C.F.A., Reid, P.E., Clay, M.G. and Dunn, W.L. : The histochemical demonstration of O-acetylated sialic acid in gastrointestinal mucins : Their association with the potassium hydroxide-periodic acid-Schiff effect. *J Histochem Cytochem*, 22 : 826-831, 1974
- 26) Culling, C.F.A. and Reid, P.E. : The Histochemistry of colonic mucins. *J Histochem Cytochem*, 27 : 1177-1179, 1979
- 27) Hale, C.W. : Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues. *Nature*, 157 : 802-814, 1946
- 28) Mowry, R.W. : Improved procedure for the staining of acidic polysaccharides by Müller's colloidal (hydrous) ferric oxide and its combination with the Feulgen and the periodic acid-Schiff reaction. *Lab Invest*, 7 : 566-576, 1958

- 29) Spicer, S.S., Baron, D.A., Sato, A. and Schulte B.A. : Variability of cell surface glycoconjugates. *J Histochem Cytochem*, 29 : 994-1002, 1981
- 30) Spiro, R.G. : The carbohydrate units of thyroglobulin. *J Biol Chem*, 240 : 1603-1610, 1965
- 31) Arima, T., Spiro, M.J. and Spiro, R.G. : Studies on the carbohydrate units of thyroglobulin. *J Biol Chem*, 247 : 1825-1948, 1972
- 32) Spiro, M.J. : Presence of a glucuronic acid-containing carbohydrate unit in human thyroglobulin. *J Biol Chem*, 252 : 5424-5430, 1977
- 33) Spiro, R.G. and Bhoyroo, V.D. : Occurrence of sulfate in the asparagine-linked complex carbohydrate units of thyroglobulin. *J Biol Chem*, 263 : 14351-14358, 1988
- 34) Spiro, R.G. and Bhoyroo, V.D. : Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J Biol Chem*, 249 : 5704-5717, 1974
- 35) Spiro, R.G. and Bhoyroo, V.D. : Occurrence of α -D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. *J Biol Chem*, 259 : 9858-9866, 1984
- 36) Godelaine, D., Spiro, M.J. and Spiro, R.G. : Processing of the carbohydrate units the thyroglobulin. *J Biol Chem*, 256 : 10161-10168, 1981
- 37) Schneider, A.B., McCurdy, A., Chang, T., Dudlak, D. and Magner, J. : Metabolic labeling of human thyroglobulin with [35 S] sulfate : Incorporation into chondroitin 6-sulfate and endoglycosidase-F-susceptible carbohydrate units. *Endocrinology*, 122 : 2428-2437, 1988
- 38) Schneider, A.B. and Dudlak, D. : Differential incorporation of sulfate into the chondroitin chain and complex carbohydrate chains of human thyroglobulin : Studies in normal and neoplastic thyroid tissue. *Endocrinology*, 124 : 356-362, 1989
- 39) Ogata, S., Muramatsu, T. and Kobata, A. : Fractionation of glycopeptides by affinity column chromatography on Concanavalin A-sepharose. *J Biochem (Tokyo)*, 78 : 678-696, 1975
- 40) 入村達郎, 辻 勉 : 糖タンパクのアフィニティクロマトグラフィー —膜糖タンパクを中心として— 蛋白質, 核酸, 酵素, 別冊 No.22 : 21-28, 1980
- 41) Iida, F. : Azan-Mallory stain of thyroidal colloid. *Acta Histochem Cytochem*, 6 : 261-266, 1973
- 42) 遠藤正彦 : 糖蛋白質. 検査と技術, 14 : 17-22, 1986
- 43) 樽谷 修 : チログロブリンの化学. 鈴木光雄, 松崎 茂(編), 甲状腺学, その生理と病態, 第1版, pp.53-67, 共立出版株式会社. 東京, 1980
- 44) 細谷東一郎 : チログロブリン合成とヨウ素代謝. 鈴木光雄, 松崎 茂(編), 甲状腺学, その生理と病態, 第1版, pp.68-86, 共立出版株式会社, 東京, 1980
- 45) Ekholm, R. and Björkman, U. : Cell-free incorporation of labeled monosaccharides into thyroid proteins. In : Fellingner, K. and Höfer, K. (ed.), Further advances in thyroid research, pp.381-386, Wiener Medizinischen Akademie, Wien, 1971
- 46) Herscovics, A., Whur, P., Haddad, A. and Smith, M. : Biosynthesis of the carbohydrate of thyroglobulin in rat thyroid. In : Fellingner, K. and Höfer, R. (ed.), Further advances in thyroid research, pp.387-398, Wiener Medizinischen Akademie, Wien, 1971
- 47) Ekholm, R. and Wollman, S.H. : Site of iodination in the rat thyroid gland deduced from electron microscopic autoradiographs. *Endocrinology*, 97 : 1432-1444, 1975
- 48) Herzog, V., Neumüller, W. and Holzmann, B. : Thyroglobulin, the major and obligatory exportable protein of thyroid follicle cells, carries the lysosomal recognition marker mannose-6-phosphate. *EMBO J*, 6 : 555-560, 1987
- 49) 谷口直之 : 腫瘍マーカーとしての糖蛋白および糖脂質と糖鎖構造. 臨床検査 MOOK No.19 腫瘍マーカー, pp.39-52, 金原出版, 東京, 1984
- 50) Spiro, R.G., Spiro, M.J. and Arima, T. : Studies on the carbohydrate units of human thyroglobulin. In : Fellingner, K. and Höfer, R. (ed.), Further advances in thyroid research, pp.363-370, Wiener Medizinischen Akademie, Wien, 1971
- 51) Permanetter, W., Nathrath, W.B.J. and Löhns, U. : Immunohistochemical analysis of thy-

- roglobulin and keratin in benign and malignant thyroid tumours. Virchows Arch [A], 398 : 221-228, 1982
- 52) 金子源吾 : 悪性甲状腺腫における血清中免疫抑制物質 (ISS) の臨床的意義—とくに他の腫瘍マーカーとの比較検討—. 信州医誌, 34 : 330-345, 1986
- 53) 木幡 陽 : 癌細胞の糖蛋白質をめぐって—アスパラギン結合糖鎖に起こる変化を中心に—. 代謝, 20 : 773-782, 1983
- 54) Chia, D., Terasaki, P.I., Suyama, N., Galton, J., Hirota, M. and Katz, D. : Use of monoclonal antibodies to sialylated Lewis^x and sialylated Lewis^a for serological tests of cancer. Cancer Res, 45 : 435-437, 1985
- 55) Fukushima, K., Hirota, M., Terasaki, P.I., Wakisaka, A., Togashi, H., Chia, D., Suyama, N., Fukushima, Y., Nudelman, E. and Hakomori, S. : Characterization of sialosylated Lewis^x as a new tumor-associated antigen. Cancer Res, 44 : 5279-5285, 1984

(1. 4. 28 受稿)