

綜 説

シアル酸の組織化学

勝 山 努 小 野 謙 三

信州大学医学部第2病理学教室

HISTOCHEMISTRY OF SIALIC ACIDS

Tsutomu KATSUYAMA and Kenzo ONO

Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine

Key words ; 組織化学 (histochemistry)

シアル酸 (sialic acid)

I はじめに

シアル酸 sialic acid は自然界に広く分布しているアミノ糖の一種で、1936年、Blix によって牛頸下腺の粘液 (sialo- は唾液を意味する) から始めて分離、結晶化された¹⁾。この系統の親化合物であるノイラミン酸 neuraminic acid²⁾ は不安定な物質で、そのままの形では天然に存在しない。その誘導体のなかで C-5 位に N-acyl 基を有するものをシアル酸と総称している³⁾⁴⁾。動物界では、代表的なシアル酸である N-acetylneuraminic acid (以下 NANA, 一般名は 5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactonulosonic acid である) をはじめ、N-glycolylneuraminic acid (以下 NGNA), およびそれらの O-acetyl あるいは O-glycolyl 誘導体など17種以上が今までに発見されている⁵⁾。

哺乳類は普通、複数のタイプのシアル酸を体内で産生している。しかし、ヒトは NANA だけを有する例外的な存在と久しく信じられていた⁶⁾。しかし、これは誤りで、最近次々に反証があげられている⁷⁾⁸⁾。

生体内では、シアル酸は多方面にわたって様々な役割を演じており、その重要性は改めて強調するまでもない。すべての動物細胞の形質膜表面に分布する陰性荷電は、大部分シアル酸の carboxyl 基に由来するし、

その上シアル酸は、上皮性粘液、血清中の多くの糖タンパク質、一部のホルモンや酵素、ガングリオンド、さらにはケラタン硫酸や構造糖タンパク質などの構成成分としても存在している。

シアル酸を対象とする組織化学的研究は、「sialic acid」という用語が Blix らによって提唱された⁹⁾直後の1955年、Bial 反応⁹⁾の組織化学的应用という形で Diezel により第一歩を印された¹⁰⁾。さらに、1960年には、シアル酸の代表的な定量法である酢酸-パルピツール法を開発した Warren¹¹⁾ の協力を得て、Spicer が sialidase を組織化学的研究に始めて応用している¹²⁾。1960年代前半には、Scott と Doring による臨界電解質濃度現象に基づく Alcian blue 染色法¹³⁾、および Spicer の high iron diamine 染色法¹⁴⁾が相次いで発表され、粘液組織化学は1つのピークを迎えた。シアル酸の組織化学的研究はその後しばらく、特に技術面で足跡が続いていたが、1970年代末からの発展には注目すべきものがあり、粘液組織化学のごく小さな部分を占めるに過ぎなかったこの領域の研究にも、ようやくスポットがあてられつつある。今回は、特に技術的な面に焦点を絞って、ほぼ25年に及ぶシアル酸の組織化学の歴史を方法別に振り返るとともに、将来への展望についても述べたい。

II シアル酸の組織化学的証明法

シアル酸の構造は、carboxyl 基を有すること、環状構造外に連続した近接水酸基を有すること、環内に近接水酸基を欠いていること、などの点で糖タンパク質の糖鎖を構成するシアル酸以外の6種の糖残基と異なっている(図1)。さらに、シアル酸は常に糖鎖の末端に位置し、シアル酸、ガラクトース、ガラクトサミンのいずれかと結合している。組織化学的には、シ

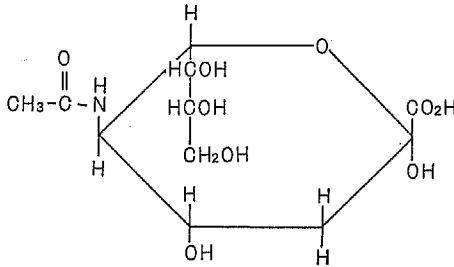


図1 N-acetylneuraminic acid

アル酸のこのような特徴的な構造、あるいは存在様式を染色に利用できれば、より特異的な反応を期待できるわけである。現在、シアル酸の組織化学的証明法としては表1に挙げたような方法が用いられている。なお、原理的にはいずれも電顕レベルの染色に応用できるが、その詳細は別稿にゆずる¹⁵⁾。

1 近接水酸基の存在に基づくシアル酸の染色法—シアル酸を証明するための PAS 反応変法

C-7—C-8—C-9にある近接水酸基を利用する方法である。

(1) NANA を証明するための mild periodate oxidation-Schiff 反応¹⁵⁾

シアル酸の環状構造外末端炭素原子鎖上にある近接水酸基は、きわめて酸化を受けやすく¹⁶⁾⁻¹⁸⁾、その性質を利用すると NANA を選択的に染色することが可能となる。

Van Leuten と Ashwell は、低温、低濃度の NaIO₄ 水溶液で、一種のシアロムチンである セルロプラスミンやオロソムコイドを酸化した後、NaB⁹H₄ で還元し、NANA の環状構造外末端炭素原子のみを

Table 1. Histochemical methods for common mucosubstances and sialic acids

	Common mucosubstances	Sialic acids
I. Demonstrating vicinal glycols with oxidation-chromogen sequence	PAS, Bauer, Casella, PA-TCH-SP	mild periodate oxidation-Schiff, PA-NaBH ₄ -NaOH-PAS
II. Visualizing acid groups with basic dyes	colloidal iron, Alcian blue (AB), high iron diamine (HID), aldehyde fuchsin	none
III. Dual staining	AB-PAS, HID-AB pH2.5, aldehyde fuchsin-AB pH2.5	HID-AB pH2.5, aldehyde fuchsin-AB pH2.5
IV. Chemical modification	methylation-basic dyes, sulfation-basic dyes, acetylation-PAS, acid hydrolysis, alkaline hydrolysis	mild methylation-basic dyes, active methylation-alkaline hydrolysis-basic dyes
V. Enzymatic removal of reactive components	sialidase, hyaluronidase, chondroitinase	sialidase
VI. Lectin staining	con A	LPA, PNA
VII. Specific chemical reaction	Dische's reaction for uronic acid	modified Bial's reaction
VIII. Radioautography	labelled sugar residues	³ H-N-acetylmannosamine

N-ACETYLNEURAMINIC ACID

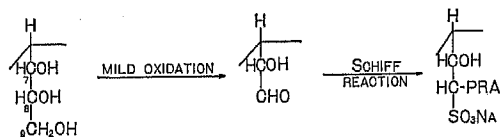


図2 N-acetylneuraminic acid の染色原理。

Mild な条件で過ヨウ素酸酸化を行うと、シアル酸の C-8—C-9 が選択的に酸化され、一般的な近接水酸基は過ヨウ素酸の作用を受けない。

標識した試料を得るのに成功している¹⁷⁾。彼らの用いた酸化条件では、NANA の酸化は10分以内に完了するのに対して、NANA 以外の糖残基は酸化されず、アグリコンへの影響もみられない。また、McLean によると、Van Leuten と Ashwell と類似の条件で NANA あるいはシアロムチンを酸化すると、まず NANA の C-8 類似体が生成し、ついで C-7 類似体に移行するという¹⁸⁾。以来、mild periodate oxidation はシアル酸の選択的酸化やシアル酸の C₇ あるいは C₈ 類似体を得るために用いられている¹⁹⁾²⁰⁾。

このような生化学的な報告を踏まえて、私達は組織化学的なレベルで過ヨウ素酸酸化の条件を検討した。結論だけを述べると、あらかじめ十分に冷却した組織切片を 0°C、pH5.5、1mM の NaIO₄ 溶液で10-20分間酸化し、ついで同様に 0°C に冷却したエチレングリコール水溶液で洗ってから Schiff 反応を行うと、NANA に選択的な反応がみられる (図2)¹⁵⁾。その特異性は、染色に先立って sialidase 消化で NANA を除いておくと、反応がまったく陰性化することからも明らかである。ただ、この条件で生成するアルデヒドの量は少なく、特異性を保ちながらもっと強い反応を得る工夫が必要である。

なお、NANA のみならず、7-O-acetyl NANA および 9-O-acetyl NANA も環外炭素原子鎖に近接水酸基を有するシアル酸である。前述したように、NANA の C-8—C-9 はきわめて酸化を受けやすいので、7-O-acetyl NANA が mild periodate oxidation-Schiff 反応を示す可能性は否定できない。ただし、C-7 位の置換基が酸化速度を遅延させる可能性も同様に指摘されている²¹⁾。一方、C-7—C-8 の近接水酸基は trans 型に近い配位をとっており²²⁾、それも一つの要因となって、9-O-acetyl NANA は通常の条件では酸化されず⁷⁾、mild periodate oxidation-Schiff

反応を示すシアル酸からは除外できる。

さて、粘液組織化学の過去に立ち返ってみると、PAS 反応が実用化された²³⁾直後の1952年、Lhotka は、四酢酸鉛—Schiff 反応によって近接水酸基の cis 型と trans 型、つまりマンノース残基とガラクトース残基を区別できると報告している²⁴⁾。彼が cis 型に富む組織としてあげたものは、いずれも mild periodate oxidation-Schiff 反応陽性で、おそらく私達と同様、NANA を染色していたのではなからうか。

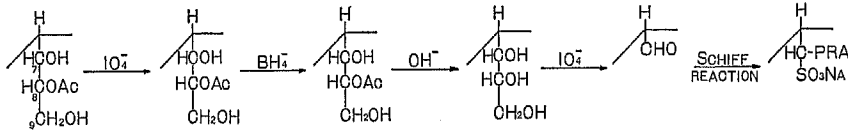
(2) 8-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid (および環状構造外炭素原子鎖に近接水酸基を有しない O-acetyl 化シアル酸) の証明 (PA-NaBH₄-NaOH-PAS 反応)

この染色法は、コロイド鉄反応を発展させた Hale の報告に端を発する。1953年、彼は、あらかじめ 0.2M NaOH で組織切片を15分間処理すると、ヒト直腸粘膜の杯細胞や家兎十二指腸の Brunner 腺の PAS 反応性が著しく高まることを知って、その理由を NaOH 処理によって新たに生ずる近接水酸基に求めた²⁵⁾²⁶⁾。のちには、固定に用いたホルマリンと反応した近接水酸基が、アルカリ水解によって回復するためとも述べている²⁷⁾。シアル酸の存在さえ十分に知られていなかった当時 (ちなみに Blix らが「シアル酸」という用語を提唱したのは1952年である³⁾) のこととて、Hale の研究に限界があったのはやむを得ない。

Lev と Spicer がこの染色法の発展に果たした役割も忘れられない。Lev はまず Turner (1963)²⁸⁾と、ついで Spicer (1965)²⁹⁾との研究で、アルカリ水解は大腸杯細胞の PAS 反応性だけでなく、異調染色性にも影響すること、同様な現象はアルカリ水解によらずともホルマリン固定をカルノア固定に変えただけで出現することなどを見出した。彼らはその原因を、シアル酸の carboxyl 基と隣接糖残基の水酸基間の残基間ラクトンに求めている。さらに翌年、Spicer と Duvenci は、ラット舌下腺のシアロムチンはアルカリ水解後始めて sialidase 感受性になると述べている³⁰⁾。

その後 Ravetto (1968)³¹⁾は、Failliard³²⁾ や Gibbonsら³³⁾ の舌下腺シアロムチンについての生化学的研究に示唆を受けて、Spicer らが観察した現象は N-acetyl-O-diacetylneuraminic acid の存在にもとづくものではないかと推測している。アルカリ水解で誘導される PAS 反応性の問題は、基本的にはこの段階で解決されていたことになる。

8-O-ACETYL-N-ACETYLNEURAMINIC ACID



ORDINARY VICINAL GLYCOLS

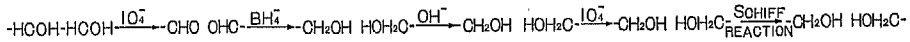


図3 8-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid, およびそれに類するシアル酸の染色原理。
シアル酸以外の糖残基中にある近接水酸基の反応を下段に示した。

1971年, おそらく Ravetto の報告に気づかなかった Culling らは, Hale 以来の問題を再び取り上げた。彼らは, ヒトを含む4種類の哺乳類の大腸でアルカリ水解が PAS 反応性に及ぼす効果を再確認しただけでなく, 固定法による差はみられず, クリオスタット切片でも同様な現象がみられることをつけ加えた³⁴⁾。

翌1972年に発表された Neuberger と Ratcliff の O-acetyl NANA を扱った論文³⁵⁾は Culling らの研究を強く刺激した。というのは, この論文には長い間組織化学者を悩ませてきた問題を解決する鍵が示されていたからである。すなわち, 家兎の Tamm-Horsfall 糖タンパク質に含まれるシアル酸は, アルカリ水解 (0.5M NaOH, 4°C, 2時間) 後, 過ヨウ素酸酸化, 酸水解, sialidase 消化などを非常に受けやすくなる。実験結果はシアル酸の C-8 位に O-acetyl 基が存在する可能性を示していた。

この研究を受けて Culling らが 8-O-acetyl NANA の選択的染色法として過ヨウ素酸酸化—水素化ホウ素ナトリウム還元—アルカリ水解—PAS 反応より成る一連のステップ (図3) を発表したのは, Hale の報告以来約20年を経た1974年のことである³⁶⁾。

しかし, 後に Haverkamp らによって指摘されたように²¹⁾, アルカリ水解した後過ヨウ素酸感受性となるシアル酸は, 8-O-acetyl NANA や, あるいは環外炭素原子鎖に近接水酸基のない O-acetyl NANA に限らない。前述したように 9-O-acetyl NANA もそのままでは過ヨウ素酸酸化に抵抗性である。

ここで研究の進展につれ, いつしか影の薄くなってしまった固定の影響と好塩基性の問題について改めてふれておきたい。短時間の冷固定では固定法による差

が生じない点は Culling らが述べた通りである³⁴⁾。しかし, 10%ホルマリンあるいはカルノア液では, 固定が長引くにつれてアルカリ水解の効果は漸減する。いずれの固定液もかなりの酸性溶液なので, シアル酸残基のグリコシド結合と同等, あるいはそれ以上に酸に不安定な O-acetyl 基が酸性溶液中で次第に遊離するためと思われる³³⁾³⁵⁾。アルカリ水解によって粘液の好塩基性が高まる現象については, Lev と Spicer の, ラクトンの水解によるという見解²⁹⁾に賛成したい。

本染色法の特異性を論ずる上で考慮しなければならぬ問題がさしあたり2つ残されている。1つは磷脂質との関連である。というのは, 磷脂質の主体は diacyl phosphoglyceride の形をとっており, 従ってアルカリ水解後 PAS 反応を示す可能性は十分に考えられる。事実, 我々の経験でも, 酸性のホルマリン溶液に長時間固定した (磷脂質の固定される条件に相当する³⁷⁾) 材料では, 神経の髄鞘, 胞体内の膜系に富む壁細胞, 尿管上皮, 形質細胞などはかなり強い PA-NaBH₄-NaOH-PAS 反応を呈する。しかし, 緩衝パラホルムアルデヒド溶液に短時間固定した材料では反応は著しく減弱し, さらに磷脂質を抽出する溶媒でもあるクロロホルム・エタノール溶液で固定すると, 反応性は完全に失われる。傍証ではあるが, 磷脂質の関与を示唆する所見である¹⁵⁾。次に, 本染色法のステップである一段階スミス分解—PAS反応は, Scott により GAG の特異染色法として利用されている³⁸⁾。軟骨や血管壁では陽性反応を呈する物質の評価は難しい。

ここで取り上げたシアル酸, すなわち NANA と, 近接水酸基を持たない O-acetyl NANA 以外に, 7-O-acetyl NANA および 9-O-acetyl NANA も,

7-O-ACETYL-N-ACETYLNEURAMINIC ACID

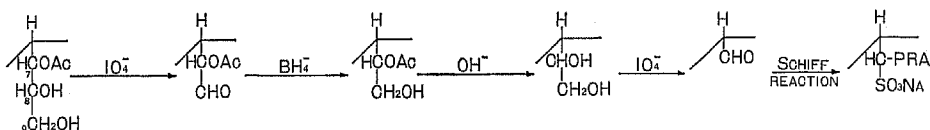


図4 7-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid の示す反応。このシアル酸は通常の PAS 反応も、アルカリ水解後に生ずる PAS 反応も示すが、Schiff 反応を示すアルデヒドの数はともに1である。

9-O-ACETYL-N-ACETYLNEURAMINIC ACID

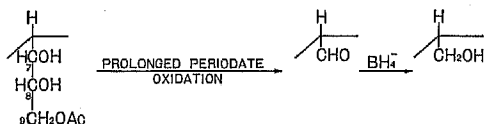


図5 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid の反応。48時間に及ぶ酸化でC-7—C-8間が開裂する。

その存在する条件によっては選択的に証明できる。

7-O-acetyl NANA に対して Culling らは、過ヨウ素酸化30分後 thionin-Schiff 反応を行い、そのうち NaOH で水解して再び PAS 反応を行っている³⁸⁾。このステップで青色に染色され、しかもアルカリ水解で誘導される PAS 反応を示す粘液は 7-O-acetyl NANA を含むシアロムチンである。しかし、酸化30分後に thionin-Schiff 反応を行って一般的な近接水酸基はすべてブロックされるのであろうか。これに対し、私達は、7-O-acetyl NANA の場合、アルカリ水解の有無にかかわらず Schiff 反応に利用し得るアルデヒド基は1つである点を重視している(図4)¹⁵⁾。

一方、9-O-acetyl NANA の場合、Culling らの示したステップは、C-7—C-8 の酸化され難い性質を利用しており、一旦酸化—還元のもの2時間酸化して Schiff 反応を行っている³⁹⁾。しかし、glycosaminoglycans (GAG) の反応も予想され、特異反応とは考えられない。むしろ48時間以上の酸化によって、アルカリ水解で誘導される PAS 反応性が失われる性質を利用すべきである(図5)¹⁵⁾。

なお、C-4位のO-acetyl基はシアル酸の酸化速度に影響を与えない²¹⁾ので、この項で述べたいずれのシアル酸にしても4-O-acetyl基を持つ可能性が残されている。

個々の染色法に問題は残っているにせよ、定量的反応である Schiff 反応を利用したシアル酸染色法が開発された意義は大きい。すでに確立された技術である Schiff 反応の顕微蛍光測光法⁴⁰⁾により細胞単位でシアル酸量を測定する道が開かれただけでなく、電顕レベルの応用も期待される。

2 酸性度に基づくシアル酸の染色法

シアル酸はC-1位に carboxyl 基を有するので、シアル酸を含む粘液に好塩基性を与える。

塩基性色素による酸性粘液染色法の主流は、適当な pH に調節した色素溶液の酸性粘液に対する選択的な染色性を利用する方法である。この種の方法は、色素溶液の調整法によって2種類に分類できる。

第1は、強酸あるいは弱酸溶液、または緩衝液に色素を溶解した比較的単純な組成の染色液を用いるもので、代表的な Alcian blue(AB)染色の場合、溶液の水素イオン濃度を上昇させると、pH3.0前後で核酸⁴¹⁾、ついで pH1.5~1.7 でシアロムチンが好塩基性を失う⁴²⁾。しかし、含硫ムチンはpH0.5においてもなお被染色性を保っている⁴²⁾⁴³⁾。ほぼ同様な染色性は Alcian yellow⁴⁴⁾ あるいは ruthenium red 染色⁴⁵⁾、acridine orange による蛍光染色⁴⁶⁾、thiazin 系色素による異調染色⁴⁷⁾などにおいても観察される。

第2に、溶液中で生成する色素、あるいはコロイド荷電粒子を染色に利用する方法があり、この場合、溶液の組成が複雑であるだけでなく、色素自体の性状も十分明らかにされていない。コロイド鉄⁴⁸⁾、high iron diamine (HID)¹⁴⁾ 染色および aldehyde-fuchsin⁴⁹⁾ 染色などはその代表的な染色法である。

いずれの染色液にしても、水素イオン濃度と染色されるムチンの種類との関係は意外に複雑である。たとえばAB染色の場合、シアロムチンの種類、特にシアリダーゼ感受性の違いに応じて、染色されうる水素イオン濃度の上限が異なるといわれている⁵⁰⁾。また、お

よそ pH1.6 で行われるコロイド鉄反応⁵¹⁾は、シアル酸に高度な親和性を示すが、強く硫酸化されたムチンとはほとんど反応しない⁴⁹⁾。同様な染色特性は AB pH2.5 染色においてもみられる⁴⁷⁾。一方、pH1.5 から pH1.7 程度で行われる HID 染色⁵²⁾ (aldehyde fuchsin 染色もほぼ同様) は硫酸化ムチンに特異的な方法である。

いずれの染色法もイオン結合に基づく染色法である⁵³⁾にもかかわらず、水素イオン濃度と染色性の間になぜこのような錯綜した関係が生ずるのであろうか。

シアル酸の pK は、およそ 2.6 (4-O-acetyl NANA) ~ 2.75 (NGNA) と測定されている⁵⁴⁾。しかし我々の対象は遊離のシアル酸ではなく、シアル酸を 1 つの構成成分とする高分子電解質である。この類いの物質では、溶液中の水素イオン濃度が変わると解離基の相互作用や分子の conformation も変化し、その結果、実効 pK は pH とともに変動してしまう⁵⁵⁾。また、組織化学的な実例をあげたように、AB 好性の保たれる水素イオン濃度の範囲は、シアロムチンのすべてを通じて一様ではなく、シアロムチンの分子構造の相違によって実行 pK も当然異なっているのであろう。なお、コロイド鉄反応や AB pH2.5 染色が一部の硫酸化ムチンと反応しない理由は明らかではないが、ここではこれ以上この問題に立ち入らない。いずれにしても、このような疑問に答えるために、染色の行われる条件で、おのおのの酸性ムチンの pK をまず測定する必要がある。

さて、酸性ムチンの好塩基性はシアル酸残基のみならず、ウロン酸残基、さらに糖タンパク質や GAG の硫酸基にも由来している。したがって塩基性色素でシアル酸残基を証明しようとする、多少の工夫を必要とする。Spicer はこの問題に HID (あるいは aldehyde fuchsin) -AB pH2.5 (あるいはコロイド鉄) 重染色法をもって答えた¹⁴⁾。いずれの組み合わせにおいても、第一段階の染色法は硫酸エステルに特異的なもので、ついで行う染色スペクトルのより広い後染色に対しては、carboxyl 基だけ反応することになる。同様な着想に基づく染色法に、HID 法より少し前に発表された Alcian blue pH1.0-Alcian yellow pH2.5 法がある⁴⁴⁾。上皮性粘液に含まれるカルボン酸はすべてシアル酸なので、HID-AB pH2.5 染色で AB に反応する上皮性粘液はシアロムチンとみなしてよい。もちろん、重染色法でシアル酸を同定できる場合はむしろ限られており、そのため PAS 反応変法、酵素消

化法などと併用されている。

塩基性色素による粘液の染色法としては、Scott によって見出された臨界電解質 (あるいは塩) 濃度 (critical electrolyte concentration, CEC, あるいは critical salt concentration, CSC と) 現象⁵⁶⁾を利用する方法も忘れられない。

Cetylpyridinium chloride のような第 4 級アンモニウム化合物は、ポリアニオンである GAG と水に難溶性の塩をつくって沈澱する。しかし、溶液に $MgCl_2$, $NaCl$ のような強電解質を加えていくと、GAG の酸性度に応じた固有の濃度 (CEC) で再び解離する。のちに Scott は Dorling とともに、類似の現象が GAG と AB の塩に対しても成立することを利用して CEC 現象に基づく AB 染色法を発展させた¹³⁾。色素としては、AB のほか、Alcian yellow⁶⁶⁾ や acridine orange⁵⁷⁾ なども使用されている。本来、GAG を対象とした方法ではあるが、Scott 自身も指摘しているように¹³⁾、酸性ムチンすべてに應用できるはずで、その意味では、Staple の試みた AB- $MgCl_2$ 0.05-1.5M-Alcian yellow- $MgCl_2$ 0.05M 重染色法⁵⁶⁾は検討に値する。

3 化学的処理—塩基性色素染色によるシアル酸の検出

次にあげる方法はいずれも除去反応である。

(1) 酸水解—塩基性色素染色による検出

シアル酸を発見した当初から、Blix らは温和な条件の酸水解によって遊離のシアル酸を得ていた⁵⁴⁾。組織化学的なレベルでの酸水解の応用は、Quintarelli ら (1961)⁵⁸⁾、Lamb と Reid (1972)⁵⁹⁾、Johnes と Reid (1973)⁴²⁾、Culling ら (1979)³⁹⁾ によって報告され、生化学的条件に準じて、0.1N の塩酸あるいは硫酸で、60°C—80°C、1~2 時間の範囲内で行われている。一般に組織化学者は酸水解の有効性を強調し過ぎるきらいがあり、Johnes と Reid は酸水解によってすべてのシアル酸残基は遊離すると述べている⁴²⁾。しかし Gibbons の *in vitro* での研究からも明らかのように³³⁾、酸水解に抵抗するシアロムチンも決して少なくはない。また、酸水解と sialidase に対する粘液の感受性はしばしば平行する傾向にあり³³⁾³⁵⁾、私達の組織化学的経験もそれを裏付けている。温和な条件下での酸水解とはいえ、この処理によってシアル酸残基の脱 O-acetyl 化や、シアル酸以外の糖残基の遊離など、非特異的反応も考慮しなければならない。塩基性色素による染色性の低下を評価する難し

さもあって、酸水解の応用される範囲は限られている。
(2) メチル化—アルカリ水解 (saponification) —塩基性色素法によるシアル酸の検出

メチル化により carboxyl 基はメチルエステル化され⁶⁰⁾、一方硫酸基はメチル基で置換される⁶¹⁾。メチル化は Wigglesworth⁶²⁾ や Fisher と Lillie⁶³⁾ によって組織化学に紹介され、のちに Spicer は組織化学的条件を整理した⁶⁴⁾。すなわち、塩酸酸性メチルアルコールで 37°C、4 時間組織切片を処理 (mild methylation) すると carboxyl 基のみエステル化されて好塩基性を失う。より厳しい条件、60°C、4 時間の処理 (active methylation) により、carboxyl 基のエステル化だけでなく、硫酸基は置換され、酸性ムチンの好塩基性が失われる。メチル化にひきつづいてアルカリ水解を行うと、carboxyl 基は回復し、本来硫酸基の存在した部分は水酸基となる。したがって、active methylation—アルカリ水解後に好塩基性を示す上皮性粘液はシアロムチンである。

Turner と Lev によると、ピリジン—酢酸処理により、糖質の carboxyl 基は分子内ラク톤を形成し、選択的に好塩基性を失うという²⁹⁾。再検討されてよい報告である。

4 Sialidase (neuraminidase) によるシアル酸の検出

Sialidase は Spicer と Warren (1960) により組織化学的レベルで始めて使用された¹²⁾。通常、組織切片を sialidase で消化後、AB、コロイド鉄などの塩基性色素で染色し、被染色性の低下、あるいは消失した組織を観察する。その意味では HID-AB pH2.5 あるいは aldehyde fuchsin-AB pH2.5 染色が便利である。電子顕微鏡レベルでの sialidase の応用例も枚挙にいとまがない⁶⁵⁾。しかし、現状では、どちらかという膜結合性糖タンパク質の研究に偏っている。

さて、生化学的に十分精製された活性の高い、しかも由来によって基質特異性の異なる sialidase がそれぞれに利用できれば、シアロムチンに関する組織化学的問題はすべて解決しそうであるが、実際応用してみると、塩基性色素による染色、PAS 反応変法、あるいは生化学的研究などによりシアロムチンと同定されている粘液が、しばしば sialidase に抵抗性を示す。つまり、酵素消化法の例にもれず、本法においても、組織化学的レベルで sialidase 抵抗性を示すシアロムチンの存在が、染色結果の評価を難しくしている。

試みにラットの唾液腺および消化管で *Clostridium perfringens* 由来の sialidase に対するシアロムチンの感受性をみてみよう。まず、舌下腺のシアロムチンは 8-O-acetyl NANA (あるいはそれに類する O-acetyl 化されたシアル酸) を含んでおり、アルカリ水解後には sialidase に対して高い感受性を示すようになる。一方、胃の被覆上皮のシアロムチンはそのまま sialidase 感受性である。しかし、胃の被覆上皮と同様に NANA を含んでいると推定される小腸の杯細胞や、舌下腺と同様なタイプのシアル酸を構成成分としている大腸起始部の杯細胞のシアロムチンは、アルカリ水解を行った後も sialidase 抵抗性である。同様な傾向はヒトの消化管粘液でも認められている⁶⁶⁾。

このような一見矛盾した現象は、sialidase の基質としての粘液の多様性に基づいているのであろう。すなわち、sialidase の作用は、シアル酸の N-acetyl 基⁶⁷⁾や C-4 位および環外炭素原子鎖上の水酸基⁶⁸⁾を分子量の大きなもので置換すると低下するだけでなく、糖鎖のなかでのシアル酸のあり方、つまりシアル酸と隣接糖残基の結合様式⁶⁹⁾、シアル酸の存在する位置⁷⁰⁾、さらにはシアル酸を含む分子のおかれた状態⁷¹⁾などによって影響される。そのほか sialidase の濃度を高め、作用時間を延長すると基質特異性が変わることも知られている⁷²⁾。

しかし、私達はラットの消化管に分布するシアロムチンについてなら生化学的なデータを持ち合わせていない。したがって sialidase 感受性の差を基質分子構造の違いに結びつけて理解するのは大変難しく、近い将来においても現象面での分析にとどまっているにちがいない。

5 シアル酸のためのレクチン染色法

シアル酸の同定のために、特異性の異なる 2 種類のレクチンが用いられている。

第 1 は、シアル酸と「特異的」に結合するレクチンで、カブトガニ *Limulus polyphemus* の hemolymph から精製された凝集素 (LPA) に代表される⁷³⁾。LPA が結合するのに必要なシアル酸の構造は十分明らかにされていない。組織化学的な応用も緒についたばかりである⁷⁴⁾が、期待したほどの特異的染色性は得られていないようである。レクチンのいわゆる「特異性」は絶対的なものではなく、むしろ相対的な親和性であり、無数の糖残基を含む組織内で、すべてのレクチン分子が特異糖残基と結合していると考えられる根拠は

乏しい。シアル酸残基により特異的なレクチンの発見が待たれる。

第2は、シアル酸の隣接糖残基に特異的なレクチンを利用する方法で、現在 Gal-GalNAc に結合する⁷³⁾ ピーナッツ凝集素 (PNA) が用いられている⁷⁵⁾。シアル酸検出法としての応用例を挙げると、ラット小腸の杯細胞に含まれるシアロムチンは、塩基性色素による染色で観察する限り、一般的に sialidase の作用を受けない。しかし、PNA 染色では sialidase で消化後、明らかに被染色性が高まる。後者はあるいは分秘顆粒の限界膜に由来しているのかも知れない。PNA 染色法はこの例のように、シアロムチンの鋭敏な検出法でもあるが、この立場からの報告はいまのところ見当たらない。

6 糖の呈色反応によるシアル酸の証明法

シアル酸の化学的な呈色反応、すなわち Bial 反応の変法によってシアル酸を証明しようとする試みが続けられている。

神経組織中のガングリオンドを研究していた Diezel (1955)¹⁰⁾は、脳の凍結切片あるいはホルマリン固定材料のパラフィン切片を脱脂して後、Klenk と Langerbeins の報告⁷⁶⁾に基づいて Bial 反応を行った。脳組織のみならず、心筋、血管壁平滑筋、骨格筋、前立腺のアミロイド小体、赤血球、好酸球顆粒などに反応を認めている。

Shear と Pearse (1963)⁷⁷⁾は、Svennerholm⁷⁸⁾による *in vitro* での定量的呈色反応を利用して、ホルマリン蒸気で軽く固定したクリオスタット切片を resorcinol-Cu²⁺-HCl 試薬、ついで硝酸ナトリウム溶液と反応させた。ブタの顎下腺、ラットの小腸や大腸の杯細胞など、既知のシアロムチン産生組織に加え、ラット顎下腺の粘液部(?)、気管軟骨、甲状腺コロイドなどが同等以上の反応を示しており、理解に苦しむ。なお、彼らはホルマリン水溶液による前固定は反応性を喪失させるとも述べている。

一方、Ravetto (1964)⁷⁹⁾は、やはり Svennerholm の研究⁷⁸⁾に基づいて、ホルマリン固定した材料の凍結切片に resorcinol-Cu²⁺-HCl 溶液を噴霧し、ついで HCl 蒸気で処理して、それまで問題となっていた切片の損傷を最少限にとどめる工夫を加えた。染色結果は示されていないが、後の報告で、ラット顎下腺の顆粒管に強い反応を得たと記載している。

村井 (1971)⁸⁰⁾ および Hirose ら (1972)⁸¹⁾は、Ravetto の噴霧法⁷⁹⁾に準じて、20%ホルマリンに固

定した材料のパラフィン切片に Bial 反応を行っている。ヒトの消化管で反応を示したのは、胃粘膜の主細胞、小腸吸収上皮の胞体や刷子縁などで、当然反応すべき杯細胞や印環細胞型癌細胞の空胞はまったく反応せず、シアル酸の分布を反映しているとは思えない。

以上のように、化学的呈色反応を利用してシアル酸を証明しようとする試みは、今までのところ、ことごとく失敗に帰している。著者は、村井、Hirose らの方法を推す森の見解⁸²⁾に賛成できない。

7 ラジオオートグラフィによるシアル酸の研究

いままで述べてきた方法と原理的に異なり、対象とする物質をあらかじめ標識して取り込ませる。生体内における経時的な消長、移動を追求できる点ではラジオオートグラフィに比肩し得る方法はない。

シアル酸の研究では、その前駆物質である ³H-N-acetylmannosamine が用いられている⁸³⁾⁸⁴⁾。

Bennett らのラットを用いた研究によると、投与10分後には Golgi 野への集中がみられ、この所見は、Golgi 装置は sialyltransferase に富むとした Schacter らの報告⁸⁵⁾に一致している。投与4時間後、組織内放射能の55~90%は生化学的にシアル酸に由来するとみなしてよい結果が得られた。しかし、ラジオオートグラフィによる研究では、シアル酸に対する特異性は必ずしも十分ではないし、シアル酸のタイプもわからない。今後、一般的な方法と組み合わせることにより、新たな知見を加えることができよう。

III おわりに

シアル酸の組織化学を技術面に焦点を絞って概説した。組織化学的方法の応用については、別稿を参照していただきたい¹⁵⁾。材料の処理方法については、特に項を設けなかったが、電顕レベルの染色ではしばしばそれが決め手となる。

振り返ってみると、解決を迫られている問題があまりにも多い。その一部をあげると、シアル酸の構造という面では、

- 1 4-O-acetyl 基を組織化学的にどのように同定したらよいか、
- 2 NANA と NGNA は組織化学的に区別可能であろうか、
- 3 糖鎖内におけるシアル酸の空間的位置、特に Gal あるいは GalNAc との結合様式、シアル酸と硫酸基の位置関係 (同一分子内にあるのかどうか) などを明らかにするにはどうしたらよいか、

などの問題が残されている。一方技術面では、

- 1 塩基性色素による染色機構を明らかにする、
- 2 光顕、電顕レベルともに、定性的反応から定量的反応への移行をはかる、
- 3 作用条件の検討により、sialidase の応用範囲を拡大する、
- 4 生化学的分析と組織化学的染色を平行して行う、などがさし当たっての課題となる。

ここに述べたシアル酸の染色法や私達が報告したコンキナーバリンAパラドックス染色法⁸⁶⁾などが組合わせて用いられるようになった結果、消化管の上皮性粘液はいまや30種以上に分類されている⁸⁷⁾。言い換えるならば、組織化学的反応性から、細胞あるいは組織の種類を同定することができるわけで、それにともなって組織学あるいは病理組織学的領域への応用範囲も

広がってきた。

数年前、私達が粘液組織化学的方法を主題とした学会発表を始めて行った当時、関連した発表は高々1~2題であった。しかし、本年度の癌学会では10題近くの発表が予定されているという。粘液組織化学的研究が活気を帯びつつあるなによりの願れであろう。この領域の研究にたずさわっている研究者の一人として、現在の状態がピークでなく、播種期であるよう願ってやまない。

稿を終るにあたり、御援助いただいた教室の皆様感謝いたします。また、アルカリ水解放後磷脂質もPAS反応性を示す可能性があることを御指摘下さった順応生化学教室武富教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Blix, G. : Über die kohlenhydratgruppen des Submaxillarismucins. *Z Physiol Chem*, 240 : 43-65, 1936
- 2) Klenk, E. : Neuraminsäure. Das Spaltproduct eines neuen Gehirnlipoid. *Z Physiol Chem*, 268 : 50-73, 1941
- 3) Blix, G., Svennerholm, L. and Werner, I. : The isolation of chondrosamine from submaxillary mucin. *Acta Chem Scand*, 6 : 358-368, 1952
- 4) Blix, G., Gottschalk, A. and Klenk, E. : Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature*, 175 : 340, 1957
- 5) Ledeen, R.W. and Yu, R.K. : In "Biological roles of sialic acid", Rosenberg, A. and Schengrund, C. L. (eds.), pp. 1-57, Plenum Press, New York, 1973
- 6) Tuppy, H. and Gottschalk, A. : In "Glycoproteins, part A", 2nd ed., Gottschalk, A. (ed.), pp. 403-449, Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 1972
- 7) Haverkamp, J., Schauer, R. and Wember, M. : Neuraminic derivatives newly discovered in humans. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 357 : 1699-1705, 1976
- 8) Reid, P.E., Culling, C.F.A., Dunn, W.L., Clay, M.G. and Ramey, C.W. : A correlative chemical and histochemical study of the O-acetylated sialic acids of human colonic epithelial glycoproteins in formalin fixed paraffin embedded tissues. *J Histochem Cytochem*, 26 : 1033-1040, 1978
- 9) Bial, M. : Die Diagnose der Pentosurie. *Deutsch Med Wochschr*, 28 : 253-254, 1902
- 10) Diezel, P.B. : Bestimmung der Neuraminsäure im histologischen Schnittpräparat. *Naturwissenschaften*, 42 : 487-488, 1955
- 11) Warren, L. : The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *J Biol Chem*, 234 : 1971-1973, 1959
- 12) Spicer, S.S. and Warren, L. : Histochemical demonstration of rodent sialomucins. *J Histochem Cytochem*, 8 : 325, 1960
- 13) Scott, J.E. and Dorling, J. : Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian blue salt solutions. *Histochemie*, 5 : 221-233, 1965
- 14) Spicer, S.S. : Diamine methods for differentiating mucopolysaccharides histochemically. *J Histochem Cytochem*, 13 : 211-234, 1965
- 15) 勝山 努, 小野謙三 : 病理学マニュアル, 日本病理学会編, 医歯薬出版, 東京, 印刷中

- 16) Krotoski, W. A. and Weiner, H. E. : Peptide associated and antigenic changes accompanying periodic acid oxidation of human plasma orosomucoid. *Arch Biochem*, 115 : 337-344, 1966
- 17) Van Leuten, L. and Ashwell, G. : Studies on the chemical and enzymatic modification of glycoproteins. *J Biol Chem*, 246 : 1889-1894, 1971
- 18) McLean, R.L., Suttajit, M., Beidler, J. and Winzler, R.J. : N-acetylneuraminic acid analogues. *J Biol Chem*, 246 : 803-809, 1971
- 19) Durand, G., Feger, J., Coignoux, M., Agneray, J. and Pays, M. : Rapid estimation of small amounts of formaldehyde liberated during periodate oxidation of a sialoglycoprotein. *Anal Biochem*, 61 : 232-236, 1974
- 20) Veh, R.W., Corfield, A.P., Sander, M. and Schauer, R. : Neuraminic acid-specific modification and tritium labelling of gangliosides. *Biochim Biochem Acta*, 486 : 145-160, 1977
- 21) Haverkamp, J., Schauer, R., Wember, M., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F.G. : Synthesis of 9-O-acetylated and 4,9-di-O-acetyl derivatives of the methyl ester of N-acetyl-D-neuraminic acid methylglycoside. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 356 : 1575-1583, 1975
- 22) Lutz, P., Lochinger, W. and Taigel, G. : Zur Konformation der N-acetyl-neuraminsäure. *Chem Ber*, 101 : 1089-1094, 1968
- 23) McManus, J.F.A. : Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158 : 202, 1946
- 24) Lhotka, J.F. : Histochemical differentiation of cis-trans 1, 2 glycols. *Nature*, 170 : 751-752, 1952
- 25) Hale, A.J. : The effect of sodium hydroxide on the periodic-acid-Schiff reaction. *Stain Technol*, 28 : 160, 1953
- 26) Hale, A.J. : Observations on substances that react weakly to the periodic acid-Schiff test. *Quart J micr Sci*, 94 : 303-313, 1953
- 27) Hale, A.J. : The effect of formalin on the periodic acid Schiff staining of certain types of mucus. *J Histochem Cytochem*, 3 : 421-429, 1955
- 28) Terner, J.Y. and Lev, R., : Lactone formation in the histochemical evaluation of acid polysaccharides : mucin. *J Histochem Cytochem*, 11 : 804-811, 1963
- 29) Lev, R. and Spicer, S. S. : A histochemical comparison of human epithelial mucins in normal and in hypersecretory states including pancreatic cystic fibrosis. *Am J Pathol*, 46 : 23-47, 1965
- 30) Spicer, S.S. and Duvenci, J. : Histochemical characteristics of mucopolysaccharides in salivary and exorbital lacrimal glands. *Anat Rec*, 149 : 333-355, 1964
- 31) Ravetto, C. : Histochemical identification of N-acetyl-O-diacetylneuraminic acid resistant to neuraminidase. *J Histochem Cytochem*, 16 : 663, 1968
- 32) Faillard, H. : Die Wirkung der Neuraminidase auf verschiedene Formen des Rinder-Submaxillarismucins. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 317 : 257-268, 1959
- 33) Gibbons, R.A. : The sensitivity of the neuraminosidic linkage in mucosubstances towards acid and towards neuraminidase. *Biochem J*, 89 : 380-391, 1963
- 34) Culling, C.F.A., Reid, P.E. and Dunn, W.L. : The effect of saponification upon certain histochemical reactions of the gastrointestinal tract. *J Histochem Cytochem*, 19 : 654-662, 1971
- 35) Neuberger, A. and Ratcliff, W.A. : The acid and enzymic hydrolysis of O-acetylated sialic acid residues from rabbit Tamm-Horsfall glycoprotein. *Biochem J*, 129 : 683-693, 1972
- 36) 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. *J Histochem Cytochem*, 22 : 826-831, 1974
- 37) Jones, D. : In "Fixation in histochemistry", Stoward, P. J. (ed.), pp. 1-45, Chapman and Hall, London, 1973

- 38) Scott, J.E. and Dorling, J. : Periodate oxidation of acid polysaccharides. III. A PAS method for chondroitin sulfates and other glycosamino-glycuronans. *Histochemie*, 19 : 295-301, 1969
- 39) Culling, C.F.A. and Reid, P.E. : The histochemistry of colonic mucins. *J Histochem Cytochem*, 27 : 1177-1179, 1979
- 40) 藤田哲也 : 組織細胞化学の最新技術, 浜島義博, 藤田哲也編, pp.27-54, 日本組織細胞化学会, 京都, 1977
- 41) Mowry, R. W. : Alcian blue technics for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J Histochem Cytochem*, 4 : 407, 1956
- 42) Jones, R. and Reid, L. : The effect of pH on Alcian blue staining of epithelial acid glycoproteins. I. Sialomucins and sulfomucins (singly or in simple combinations). *Histochem J*, 5 : 9-18, 1973
- 43) Lev, R. and Spicer, S.S. : Specific staining of sulphate groups with Alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem*, 12 : 309, 1964
- 44) Ravetto, C. : Alcian blue-Alcian yellow : A new method for the identification of different acidic groups. *J Histochem Cytochem*, 12 : 44-45, 1964
- 45) Yamada, K : Dual staining of some sulfated mucopolysaccharides with Alcain blue (pH 1.0) and ruthenium red (pH 2.5). *Histochemie*, 23 : 13-20, 1970
- 46) Schuemmelfeder, N. : Histochemical significance of the polychromatic fluorescence induced in tissues stained with acridine orange. *J Histochem Cytochem*, 6 : 392-393, 1958
- 47) Spicer, S.S., Horn, R.G. and Leppi, T.J. : In "The connective tissue", Wagner, B.M. and Smith, D. E. (eds.), pp, 251-303, Williams and Wilkins, Baltimore, 1967
- 48) Rinehart, J.F. and Abul-Haj, S. K. : An improved method for histologic demonstration of acid mucopolysaccharides in tissues. *Arch Path*, 52 : 189-194, 1951
- 49) Halmi, N.S. and Davies, J. : Comparison of aldehyde fuchsin staining, metachromasia, and periodic acid-Schiff reactivity of various tissues. *J Histochem Cytochem*, 1 : 447-459, 1953
- 50) Jones, R. and Reid, L. : The effect of pH on Alcian blue staining of epithelial acid glycoproteins. II. Human bronchial submucosal gland. *Histochem J*, 5 : 19-27, 1973
- 51) 羽山正義 : 私信
- 52) Sorvari, T.E. : Histochemical observations on the role of ferric chloride in the high-iron diamine technique for localizing sulfated mucosubstances. *Histochem J*, 4 : 193-204, 1972
- 53) Scott, J.E., Quintarelli, G. and Dellovo, M. C. : The chemical and histochemical properties of Alcian blue. I. The mechanism of Alcian blue staining. *Histochemie*, 4 : 73-85, 1964
- 54) Blix, G., Lindberg, E., Odin, L. and Werner, I. : Studies on sialic acids. *Acta Soc med upsala*, 61 : 1-25, 1956
- 55) Scott, J.E. : Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues. *Methods Biochem Anal*, 8 : 145-197, 1960
- 56) Staple, P.H. : Demonstration of biologic polyanions by Alcian blue in salt solutions and by Alcian yellow or hexaadecylpyridinium-hexathiocyanatoferrate. *J Histochem Cytochem*, 15 : 552-554, 1967
- 57) Saunders, A. M. : Histochemical identification of acid mucopolysaccharides with acridine orange. *J Histochem Cytochem*, 12 : 164-170, 1964
- 58) Quintarelli, G., Tsuiki, S., Hashimoto, Y. and Pigman, W. : Studies of sialic acid-containing mucins in bovine submaxillary and sublingual glands. *J Histochem Cytochem*, 9 : 176-183, 1961
- 59) Lamb, D. and Reid, L. : Quantitative distribution of types of acid glycoprotein in mucous cells of human bronchi. *Histochem J*, 4 : 91-102, 1972
- 60) Fraenkel-Conrat, H. and Olcott, H.S. : Esterification of proteins with alcohols of low molecular weight. *J Biol Chem*, 161 : 259-268, 1945
- 61) Kantor, T.G. and Schubert, M. : A method for the desulfation of chondroitin sulfate. *J Am Chem Soc*, 79 : 152-153, 1957

- 62) Wigglesworth, V.B. : The role of iron in histological staining. *Quart J Micro Sci*, 93 : 105-118, 1952
- 63) Fisher, E.R. and Lillie, R.D. : The effect of methylation on basophilia. *J Histochem Cytochem*, 2 : 81-87, 1954
- 64) Spicer, S.S. : A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J Histochem Cytochem*, 8 : 18-35, 1960
- 65) Katsuyama, T. and Spicer, S.S. : In "Histochemistry of secretory processes", Garrett, J. R., Harrison, J.D. and Stoward, P.J. (eds.), pp. 261-287, Chapman and Hall, London, 1977
- 66) 勝山 努, 小野謙三 : 未発表データ
- 67) Faillard, H. und Do Amaral, C.F. und Blohm, M. : Untersuchungen zur enzymatischen Spezifität der Neuraminidase und N-acyl-neuraminat-lyse in Bezug auf die N-substitution. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 350 : 798-802, 1969
- 68) Schauer, R. and Faillard, H. : Zur Wirkungsspezifität der Neuraminidase. Das Verhalten isomerer N. O.-Deacetylneuraminsäureglykoside in Submaxillarismucin von Pferd und Rind bei Einwirkung bakterieller Neuraminidase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 349 : 961-968, 1968
- 69) Drzeniek, R. : Differences in splitting capacity of virus and *V. cholerae* neuraminidases on sialic acid type substrates. *Biochem Biophys Res Commun*, 26 : 631-638, 1967
- 70) Kuhn, R. and Wiegandt, H. : Die Konstitution der Ganglio-N-tetraose und des Gangliosids G₁. *Chem Ber*, 96 : 866-880, 1960
- 71) Sharon, N. : In "Complex carbohydrates", p. 55, Addison Wesley Publishing Co. Inc., Massachusetts, 1975
- 72) Drzeniek, R. : Viral and bacterial neuraminidases. *Curr Top Microbiol Immunol*, 59 : 35-74, 1972
- 73) Goldstein, I.J. and Hayes, C.E. : The lectins : carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, 35 : 127-340, 1978
- 74) 山田和順 : 組織細胞化学講習会テキスト, 渡辺慶一編, pp.68-76, 卒後教育センター, 東京, 1980
- 75) Stoward, P.J., Spicer, S.S. and Miller, R.L. : Histochemical reactivity of peanut lectin-horseradish peroxidase conjugate. *J Histochem Cytochem*, 28 : 979-990, 1980
- 76) Klenk, E and Lungerbeins, H. : Über die Verteilung der Neuraminsäure im Gehirn (mit einer Mikromethode zur quantitativen Bestimmung der Substanz im Nervengewebe). *Z Physiol Chem*, 270 : 185-198, 1941
- 77) Shear, M. and Pearse, A.G.E. : A direct histochemical method for the demonstration of sialic acid. *Nature*, 198 : 1273-1275, 1963
- 78) Svennerholm, L. : Quantitative estimation of sialic acids. III. An anion exchange resin method. *Acta Chem Scand*, 12 : 547-554, 1958
- 79) Ravetto, C. : Histochemical identification of sialic (neuraminic) acids. *J Histochem Cytochem*, 12 : 306, 1964
- 80) 村井紳浩 : シアル酸の新検出法と胃癌組織における反応. 阪大医誌, 23 : 188-203, 1971
- 81) Hirose, S., Yasutomi, M., Murai, N., Iwasa, Z., Hirose, M., Shindo, K., Aso, R., Kikkawa, N. and Razaq, A.K.A. : Examination of Bial's reaction, which is a histochemical demonstration method of sialic acid. *Acta Histochem Cytochem*, 5 : 80-89, 1972
- 82) 森 富 : "新組織化学", 小川和朗, 武内忠男, 森 富編, pp. 569,, 朝倉書店, 東京, 1975
- 83) Nayyar, R. and Koenig, H. : Biosynthesis of lysosomal glycoproteins in rat kidney : An E. M. radioautographic study in the proximal convoluted tubule. *J Cell Biol*, 55 : 187, 1972
- 84) Bennett, G. and Leblond, C.P. : In "Histochemistry of secretory processes", Garrett, J. R., Harrison, J.D. and Stoward, P.J. (eds.), pp. 47-71, Chapman and Hall, London, 1977
- 85) Schacter, H., Jabbal, I., Hudgin, R., Pinteric, L., McGuire, E. and Roseman, S. :

Intracellular localization of liver sugar nucleotide glycoprotein glycosyltransferases in a Golgi rich fraction. J Biol Chem, 245 : 1090-1100, 1970

86) 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

87) 勝山 努 : 組織細胞化学, 日本組織細胞化学会編, pp. 175-194, 学際企画, 東京, 1981

(56.8.28 受稿)
