粘液中ムコ多糖類の組織学的研究 (第一報)

堀 みどり・間島 雄一・坂倉 康夫・三吉 康郎

Histochemical Identification of Glycoproteins in Mucus Secreting Cells

Midori Hori, Yuichi Majima, Yasuo Sakakura and Yasuro Miyoshi
(Mie University)

Glycoproteins within mucus secreting cells of airway epithelium can be subdivided into two groups, acid and neutral. The acid glycoproteins include sialylated glycoproteins which are either sensitive or resistant to the enzyme sialidase, and sulfated glycoprotein. This study is concerned with the staining of glycoproteins by Alcian Blue at various pH levels combined with periodic acid-Schiff, as described by Jones and Reid.

Tracheal glands of the mouse, sublingual glands of the rat, and submaxillary glands of the dog were chosen for study because the nature of their glycoproteins is known. In the mouse there is a mixture of neutral and sialidase sensitive sialylated glycoproteins. In the rat only sialidase resistant sialylated glycoproteins are present. In the dog glycoprotein is sulfated. Serial tissue sections of each species were stained with a combination of the Alcian Blue and periodic acid-Schiff techniques. The result proved that the method is useful in identifying these glycoproteins. With Alcian Blue at pH+2.6 all acid glycoproteins stained blue. After sialidase treatment with similar staining, both sialidase resistant and sulfated glycoproteins stained blue. With Alcian Blue at pH=1.0 only sulfated glycoprotein stained blue. With Alcian Blue at pH=1.0 only sulfated glycoprotein stained blue. With this sequence of techniques, the neutral form of glycoprotein failed to stain with Alcian Blue and stained red.

ムコ多糖は、ヒト及び各種動物組織に広く分布し、組織の形態形成や、外部からの保護等といった重要な機能をもつ。酸性基の有無により、酸性ムコ多糖と中性ムコ多糖に大別され、前者は更に、カルボキシル基をもつシアル酸ムコ多糖と、硫酸基をもつ硫酸ムコ多糖とに分けられる。シアル酸ムコ多糖は、シアリダーゼ感受性のものと、抵抗性のものを含む。今回我々は、これら4種類のムコ多糖の存在が既に確かめられている動物組織を用いて、Jones と Reid¹⁾²⁾ の異なった pH 下のアルシアンブルー・PAS 重染色法を施行し、その有用性を確認した。

実 験 方 法

—実験動物—

組織中のムコ多糖は、種及び組織により、特異性があるとされている³⁾。本実験においては、存在するムコ多糖が既に同定されている動物組織を用いた。マウス気管腺は、主に、中性ムコ多糖とシアリダーゼ感受性シアル酸ムコ多糖を産生し⁴⁾、ラット舌下腺は、シアリダーゼ抵抗性シアル酸ムコ多糖を⁵⁾、イヌ顎下腺は硫酸ムコ多糖を主に産生する⁶⁾とされている（表—1）。

C₃H系マウス（生後6週，雄）の気管，Sprague-Dawley系ラット（生後6週，雄）の舌下腺，イヌの顎下腺を，屠殺直後に採取し，0.5% C P C 中性ホルマリンで24時間以上固定後，上昇アルコール系列にて脱水し，パラフィン包埋した。4 μ mの連続切片を各々4枚ずつ作製し，脱パラフィン後，以下の染色を行なった。なお，本染色法に関しては，1973年に Jones と Reid¹⁾²⁾ が詳細に報告しており，今回我々もこの方法に順じた。

—染色方法—

染色液は，①1%酢酸溶液，及び②0.1N塩酸溶液に1%の割合でアルシアンブルー8GX（以下ABと略す）を溶解し，pHメーターに

て，①はpH=2.6に，②はpH=1.0に補正したものを使用した。

1) AB—PAS 重染色法

先に用意した切片中2枚を，水洗後，AB（①pH=2.6，②pH=1.0）でそれぞれ30分間染色した。①は流水で洗浄後，②は水洗せずに，切片の水分を濾紙で吸収乾燥後，①②共に0.3%炭酸ナトリウムで30分間処理した。洗浄後，1%過ヨウ素酸中で5分間反応させ，10分間流水洗浄し，25℃のシッフ試薬に5分間入れた。亜硫酸水で3分間づつ3回洗ったのち水洗し，マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行なった。アルコールで脱水，透徹後，バルサムで封入した。

2) シアリダーゼ消化法

残り2枚の切片を，蒸留水でよく洗ったのち，自然乾燥し，体積比で蒸留水9に対して1の割合で4%塩化カルシウム溶液を含む溶媒中に，溶媒4に対して1の割合に1U/mlのシアリダーゼ（Calbiochem社）を溶解した。この溶液で1枚の切片をおおい，もう1枚は溶媒のみを滴下し，37℃で12時間反応させた。洗浄後，前述の如く，AB（pH=2.6）—PAS 重染色を行なった。

表—1. 本研究に用いた動物組織中のムコ多糖

種 組織	ム コ 多 糖			
	中性	酸 性		
		シ ア ル 酸		硫酸
		シアリダーゼ感受性	シアリダーゼ抵抗性	
マウス, 気管腺	+	+	—	—
ラット, 舌下腺	—	—	+	—
イヌ, 顎下腺	—	—	—	+

結

果

1) マウス気管腺

AB (pH=2.6) -PAS染色では、腺細胞の約半分が青又は青紫に染色し、残り半分が赤又は赤紫に染色した。シアリダーゼ消化後AB (pH=2.6) -PAS染色およびAB (pH=1.0) -PAS染色では、細胞の大部分が赤又は赤紫に染色した (図-1)。

2) ラット舌下腺

AB (pH=2.6) -PASおよびシアリダーゼ消化後AB (pH=2.6) -PAS染色では、大部分の腺細胞が青又は青紫に染色したが、AB (pH=1.0) -PAS染色では、その染色性が失われ、赤又は赤紫に染色した (図-2)。

3) イヌ顎下腺

AB (pH=2.6) -PAS, シアリダーゼ消化後AB (pH=2.6) -PAS, AB (pH=1.0) -PASいずれにおいても、大部分の腺細胞は青又は青紫に染色した (図-3)。

以上をまとめると表-2の如くなる。AB (pH=2.6) -PAS染色では、マウス気管腺の約半分、ラット舌下腺、イヌ顎下腺が青染し、

マウス気管腺の残り半分が赤染した。シアリダーゼ消化後AB (pH=2.6) -PAS染色では、ラット舌下腺イヌ顎下腺は青染したが、マウス気管腺は全て赤染した。AB (pH=1.0) -PAS染色では、イヌ顎下腺は青染したがマウス気管腺、ラット舌下腺は赤染した。

なお、シアリダーゼ溶媒のみにて反応させた切片においては、AB (pH=2.6) -PAS染色と同様の結果を示した。

図2 ラット舌下腺×100

図1 マウス気管腺×100

図3 犬顎下腺×100

表一 2. 動物組織における異なった pH 下の AB—PAS 重染色結果

	マウス気管腺	ラット舌下腺	イヌ顎下腺
① AB (pH=2.6) —PAS	青	青	青
② Sialidase— AB (pH=2.6) —PAS	赤	青	青
③ AB (pH=1.0) —PAS	赤	赤	青
同定された酸性ムコ多糖	シアリダーゼ 感受性 シアル酸ムコ多糖	シアリダーゼ 抵抗性 シアル酸ムコ多糖	硫酸ムコ多糖

考 察

ムコ多糖は、アミノ糖を含む多糖類の総称で、各種動物組織からみいだされている。ヒト生体内にも広く分布し、大別して、結合組織の基質成分として存在する「狭義のムコ多糖」と、結合組織にも存在するが、細胞の各種の膜、粘膜粘液、血液、その他の体液等に存在する「糖タンパク」の 2 つがあり、両者はかなり異なった役割を果たしている⁷⁾。「狭義のムコ多糖」は、主に組織の構築物質として形態形成にあずかり、又、細胞外液の容量およびイオンを調節する事によって細胞環境の定常性保持に働く。一方、「糖タンパク」は、潤滑油的働き、および組織や体表面の保護等といった機能をもつと言われている。今回我々は、両者のうち、「糖タンパク」を資料として研究をすすめた為、本文中の「ムコ多糖」は「糖タンパク」を表わすものとして理解されたい。

ムコ多糖は、組織において、タンパクと結合して存在する。タンパク core に結合する単糖としては、アミノ糖として、D—グルコサミンと D—ガラクトサミンがあり、他に、D—グルクロン酸や L—イズロン酸等のウロン酸や、D—ガラクトース、D—グルコース、L—フコース等の中性等がある⁸⁾。ムコ多糖の構成成分としては、この他に、カルボキシル基や硫酸基、アセチル基等の官能基も重要である。これら官能基のうち、特にカルボキシル基や硫酸基等の

酸性基を持つか否かによりムコ多糖は大別され、分子中に酸性基をもつものを酸性ムコ多糖、これらを含まないものを中性ムコ多糖とよぶ。更に酸性ムコ多糖の中で、特にカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) をもつものをシアル酸ムコ多糖、硫酸基 ($-\text{SO}_3\text{H}$) をもつものを硫酸ムコ多糖とよぶ。なお、現在までにわかっている範囲では、酸性ムコ多糖の大部分は、シアル酸ムコ多糖と硫酸ムコ多糖で占められると考えられている³⁾。1957 年、Popenoe ら⁹⁾は、シアル酸ムコ多糖がシアリダーゼ酵素により選択的に消化され、他のムコ多糖から区別される事を報告した。ところが、その後の研究により、シアル酸ムコ多糖の中には、シアリダーゼによって消化されるものと、消化されないものの二つがある事が判明した⁵⁾。以上を Jones は、図—4 の如くまとめた³⁾。すなわち、ムコ多糖は、酸

図 4 ムコ多糖の分類

性基の有無により、酸性ムコ多糖と中性ムコ多糖とに大別され、酸性ムコ多糖には、シアル酸ムコ多糖と硫酸ムコ多糖があり、更に前者には、シアリダーゼ感受性のものと抵抗性のものとが含まれる。1960年、Lison は、「多糖類の組織化学的研究に利用しうる反応」として、それまでに発表されていた様々の反応を、反応に関係あると考えられる基、あるいは、一般物理特性に従って、表一3の如く分類した¹¹⁾。組織化学の発展によりムコ多糖の分類は、Lison の頃とは異なっている。しかし、現在なお、表一3の反応の多くは、ムコ多糖の証明および鑑別の基礎をなしていると考えられる。

Periodic Acid-Schiff (以下PAS) 反応は、多糖類一般の染色で、その原理は、分子中の1, 2グリコール (-CHOH・HOHC-) を過ヨウ素酸で酸化し、ジアルデヒド (-CHO・OHC-) とし、これをシッフ試薬で呈色、証明するものである。この際、過ヨウ素酸は、1, 2グリコールの他に、その水酸基 (-OH) をア

ミノ基、又はアルキルアミノ基で置換したもの (-CHOH・CHNH₂-, -CHOH・CHN< $\frac{H}{R}$ -)

および、酸化型の (-CHOH・CHCO-) などとも反応し、ジアルデヒドを形成すると言われている。この反応により、グリコーゲン、中性ムコ多糖、酸性ムコ多糖、および糖脂質が赤又は赤紫に染色する。ただし、酸性ムコ多糖においては、分子中に、1, 2グリコール基を有するにもかかわらず、その周囲に多くの酸性基が存在して負に帯電している為、通常の方法では過ヨウ素酸が作用しにくく、PAS陰性、ないしは染色不確実と言われている¹²⁾。

メタクロマジー、コロイド鉄染色法、アルシアンブルー染色法は、全て酸性ムコ多糖染色法で、これにより、酸性ムコ多糖は、中性ムコ多糖から鑑別される¹³⁾。この中で、アルシアンブルーは、銅を含むフタロシアニン系の塩基性色素で、陰性荷電をもつ物質と結合する。よって酸性ムコ多糖中の酸性基とも結合し、酸性ムコ

表一3. 多糖類の組織化学的研究に利用しうる反応の瞥見

-
1 : vic-glicol (-CHOH-CHOH-) およびこの近縁群の存在に基づく反応
A. 過沃素酸 Schiff の反応 (PAS)
B. pb tetraacetate-Schiff およびその他の酸化 -Schiff の反応
C. 酸化後, Schiff 以外の試薬を用いる反応
D. Acetylation 或いは benzolation による封鎖
2 : 酸性群 (sulfuric ester および carbonyl ester) の存在に基づき、酸性多糖類と中性多糖類とを識別しうる反応
E. メタクロマジー
F. 鉄の捕捉反応 (Hale) およびその他
G. 好塩基性および見かけ上の等電点の決定
H. Methylation による -COOH の封鎖, および desulfatation
3. アルコール群 (-OH) の反応
I. Sulfuric esterification
4. 指示染色
J, Alcian blue および Astra blue
K. Aldehyde-fuchsin
5 : 酵素的消化の方法
L. 単純多糖類と加水分解する酵素 (amylase)
M. 粘液多糖類および粘液蛋白を加水分解する酵素
-

多糖は青染する. この方法は, ムコ多糖分子中の酸性基を利用して, 酸性ムコ多糖を証明する方法であるが, この場合, 酸性ムコ多糖全てが同様に染色され, シアル酸ムコ多糖と硫酸ムコ多糖を区別する事はできない. そこで, 硫酸ムコ多糖のみ選択的に染色する方法が考案された. アルデヒドフクシン/アルシアンブルー法, 硫酸アルミニウム溶液中のアルシアンブルー法, High Iron Diamin 染色法等がこの中に含まれる¹⁰⁾. 又, 放射性同位元素を用いて硫酸ムコ多糖を検出する方法も行なわれた. 更に, 80℃の0.1N硫酸でムコ多糖を処理すると, シアル酸ムコ多糖のみ除去される事より¹⁴⁾, この酸加水分解にアルシアンブルー染色を併用した方法が, シアル酸ムコ多糖, 硫酸ムコ多糖の鑑別に用いられている. しかし, これらの方法は, いずれも非常に複雑である. そこで, 1973年, Jones と Reid は, アルシアンブルー染色液の pH を変える事により, シアル酸ムコ多糖と硫酸ムコ多糖の染め分けが可能である事をみだし, 本法にシアリダーゼ消化法を加えた方法により, ムコ多糖の鑑別が可能である事を報告した¹⁾. 今回, 我々は, 組織中のムコ多糖が既に同定されている動物を用いて, Jones と Reid の染色法の有用性を検討した.

結果に示した如く, AB (pH=2.6) -PAS 染色では, マウス気管腺の一部, ラット舌下腺, イヌ顎下腺の酸性ムコ多糖が青染し, マ

ウス気管腺の残り半分を占める中性ムコ多糖が赤染した. シアリダーゼ消化後 AB (pH=2.6) -PAS染色では, ラット舌下腺のシアリダーゼ抵抗性シアル酸ムコ多糖, およびイヌ顎下腺の硫酸ムコ多糖は青染したが, マウス気管腺のシアリダーゼ感受性シアル酸ムコ多糖はA Bに反応せず, 赤染した. AB (pH=1.0) -PASでは, イヌ顎下腺の硫酸ムコ多糖のみ青染したが, マウス気管腺, ラット舌下腺のシアル酸ムコ多糖は赤染した (表-2). すなわち, pH=2.6のアルシアンブルーは, シアル酸ムコ多糖, 硫酸ムコ多糖いずれの酸性基にも親和性があり, AB (pH=2.6) PAS-染色により, 酸性ムコ多糖は全て青染したが, 中性ムコ多糖はA Bに親和性なく P A S 陽性で赤染した. pH=1.0のアルシアンブルーは, 硫酸ムコ多糖等の強酸性の酸性基をもつムコ多糖とは反応するが, シアル酸ムコ多糖等の弱酸性の酸性基をもつムコ多糖とは反応しない. よって, AB (pH=1.0) -PAS染色では, 硫酸ムコ多糖は青染したが, シアル酸ムコ多糖, 中性ムコ多糖は赤染した. シアリダーゼ消化後 AB (pH=2.6) -PAS染色では, シアリダーゼ抵抗性シアル酸ムコ多糖, 硫酸ムコ多糖は, シアリダーゼの影響を受けず青染したが, シアリダーゼ感受性シアル酸ムコ多糖は, 酵素反応でA Bに対する染色性を失ない赤染した. 以上をまとめたのが表-4である. AB (pH=2.6) -PAS 染色では, 全

表-4. 異なったpH下のA B-P A S重染色法によるムコ多糖類の鑑別

ム コ 多 糖			
中 性	酸 性		
	シ ア ル 酸		硫 酸
	感 受 性	抵 抗 性	
A B (pH=2.6) — P A S ← 赤 + 赤紫 → ← 青 + 青紫 →			
Sialidase —			

ての酸性ムコ多糖が青染し、中性ムコ多糖は赤染した。シアリダーゼ消化後、AB (pH=2.6) —PAS染色では、シアリダーゼ抵抗性シアル酸ムコ多糖と硫酸ムコ多糖は青染したが、シアリダーゼ感受性シアル酸ムコ多糖は赤染した。AB (pH=1.0) —PAS染色では、硫酸ムコ多糖

は青染したが、シアル酸ムコ多糖、中性ムコ多糖は赤染した。これにより、4種類のムコ多糖の染め分けが可能である事が確かめられた。又、本法は、一連の染色を同時に行なう事ができ、従来の方法に比し、より簡便で、ムコ多糖の組織学的分類に有効な方法と考えられた。

結 語

シアリダーゼ感受性シアル酸ムコ多糖と、中性ムコ多糖を主に産生するマウス気管腺、シアリダーゼ抵抗性シアル酸ムコ多糖を産生するラット舌下腺、硫酸ムコ多糖を産生するイヌ顎下腺を用いて、異なった pH 下の AB-PAS 重染色法、およびシアリダーゼ消化法を施行し、以下の事を確認した。

1) AB (pH=2.6) —PAS 重染色法で、酸性ムコ多糖は青染し、中性ムコ多糖は赤染する。

2) シアリダーゼ消化後 AB (pH=2.6) —PAS 染色で、シアリダーゼ抵抗性シアル酸ムコ多糖と、硫酸ムコ多糖は青染するが、シアリダーゼ感受性シアル酸ムコ多糖、中性ムコ多糖は赤染する。

3) AB (pH=1.0) —PAS 染色で、硫酸ムコ多糖は青染するが、シアル酸ムコ多糖、中性ムコ多糖は赤染する。

以上より、本法が、ムコ多糖の鑑別に有効かつ簡便である事が確かめられた。

稿を終えるにあたり、AB—PAS染色について、御指導、御教示をいただいた北海道大学免疫科学研究所細胞免疫部門奥山春枝教授に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第21回鼻副鼻腔学会にて口演した。

参 考 文 献

- 1) Jones, R. and Reid, L.: The effect of pH on Alcian Blue staining of epithelial acid glycoproteins. I. Sialomucins and sulphomucins. *Histochemical J* 5: 9~18, 1973.
- 2) Jones, R. and Reid, L.: The effect of pH on Alcian Blue staining of epithelial acid glycoproteins. II. Human bronchial submucosal gland. *Histochemical J* 5: 19~27, 1978.
- 3) Jones, R.: The glycoproteins of secretory cells in airway epithelium. *Ciba Found Symp* 54: 175~188, 1978.
- 4) McCarthy, C. and Reid, L.: Acid mucopolysaccharide in the bronchial tree in the mouse and rat. *Q J Exp Physiol* 49: 81~84, 1964.
- 5) Spicer, S.S. and Warren, L.: The histochemistry of sialic acid containing mucoproteins. *J Histochem Cytochem* 8: 135~137, 1960.
- 6) Butler, M.G.: A new method of hydrolysis for the identification of acid glycoprotein. *Medical Laboratory Technology* 30: 105~112, 1973.
- 7) 吉沢善作: ムコ多糖の構造と機能. 臨床病理 XXIV 11: 865~871, 1976.
- 8) 瀬野信子: 酸性ムコ多糖の基礎と臨床—その1 基礎 酸性ムコ多糖の構造の多様性. リウマチ 17(3): 359~368, 1977.
- 9) Popenoe, E.A. and Drew, R.M.: The action of an enzyme of *Clostridium perfringens* on orosomucoid. *J Biol Chem* 228: 673~683, 1975.
- 10) Lamb, D. and Reid, L.: Histochemical types

of acidic glycoprotein produced by mucous cells of the tracheobronchial glands in man. J Path 98(4) : 213~229, 1969.

- 11) Lison, L. : 組織化学および細胞化学, 今泉正訳 : 361~405, 白水社, 東京 1960.
- 12) 金子 仁 : カラーアトラス病理組織標本. 染色法シリーズ, 1980.
- 13) 影山圭三, 渡辺陽之輔 : 病理組織標本の作り方. 医学書院 1957.
- 14) Gibbons, R.A. : The sensitivity of the neuraminosidic lincage in mucosubstances towards neuraminidase. Biochem J 89 : 380~391, 1963.

原稿到着 : 昭和56年 6 月15日
別刷請求先 : 堀 みどり
〒514 津市江戸橋 2-174
三重大学医学部耳鼻咽喉科学教室