化学的修飾法を用いたレクチン染色による ヒト正常顎下腺の組織化学的研究

小谷 英二

Histochemical study on mucosubstances of human normal submandibular gland by lectin staining with chemical modification

Eiji OTANI

Abstract: Histochemical properties of mucosubstances derived from human normal submandibular glands of 20 autopsied cases were investigated by staining with 9 different kinds of lectins including ConA, UEA-I, GS-I, GS-II, BPA, DBA and WGA. Immunohistochemical staining with anti-lysozyme antibody was also carried out to identify serous cells. Furthermore, prior to lectin binding, oxidation with periodic acid followed by reduction with sodium borohydride was performed in order to compare the tissue-specific staining properties of simple lectin stain with those after chemical modification. GS-II exclusively reacted with mucous cells and staining was enhanced by oxidation. SBA and DBA lectins also bound remarkably to mucous cells after chemical modification. No lectins reacted only with serous cells, and only UEA-I showed obvious signs of reaction with serous cells even after 10-min oxidation, while the other lectins exhibited minimal binding. DBA and BPA lectins were characterized by the existence of site-specific staining in intercalated duct cells. SBA showed strong binding with cells of the striated ducts and interlobular ducts. In addition, the existence of cells possessing mixed characteristics of serous and mucous cells was suggested in the acini, since glycoproteins and lysozymes were present in the same cytoplasm.

These results indicated that cell-species of the human submandibular glands could be differentiated by staining techniques employing appropriate combinations of lectins and chemical modification. These techniques may be useful in studying the mechanisms of cell differentiation and tumorigenesis.

Key words: human normal submandibular gland (ヒト正常顎下腺), lectin (レクチン), chemical modification (化学的修飾法)

緒 言

糖と蛋白質の複合体である粘液物質は、生体のさまざまな組織から産生され、それぞれ重要な役割を果たしている。しかし、その正確な生理的意義に関しては、必ず

しも解明されていない。近年、上皮性の粘液物質、すなわち糖蛋白質を染色する新しい組織化学的手法が次々に開発され、従来、組織にとらわれず、一様に考えられていた粘液が、組織あるいは細胞レベルで、特異的な性質を示すことがあきらかになってきた¹⁻³⁾。特に、一定の糖鎖構造に特異的に結合するレクチンは、生体のさまざまな組織が産生する粘液を生化学的、および組織化学的に細分するのにきわめて有用である⁴⁻⁹⁾。各種唾液腺にレクチンを用いた組織化学的研究はすでに散見されているが、多くはヒト以外の諸動物による報告で、その粘液の性状や分布は唾液腺の種類や動物種間によって多様である¹⁰⁻¹⁹⁾。

受知学院大学歯学部口腔外科学第1講座

(主任：深谷昌彦教授)

1st Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University
(Chief: Prof. Masahiko Fukaya)

受付日：平成4年8月18日

表 1 使用したレクチンの特異性

略 名	レクチン	糖的特異性	血液型特異性
UEA-I	<i>Ulex europaeus</i> -I	α -L-Fuc	抗H (O)
GS-I	<i>Griffonia simplicifolia</i> -I	α -D-Gal	抗B
GS-II	<i>Griffonia simplicifolia</i> -II	α , β -D-GlcNAc	非特異性
BPA	<i>Bauhinia purpurea</i>	D-GalNAc>D-Gal	非特異性
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β -D-Gal- β (1 $\rightarrow$ 3)-D-GalNAc	非特異性
SBA	<i>Glycine max</i>	α , β -D-GalNAc> α -D-Gal	非特異性
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	β -D-GlcNAc, NANA	非特異性
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	α -D-GalNAc	抗A
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-Man> α -D-Glc	非特異性

Fuc: fucose, Gal: galactose, GlcNAc: N-acetyl-glucosamine, GalNAc: N-acetyl-galactosamine, NANA: N-acetyl-neuraminic acid, Man: mannose, Glc: glucose

著者はヒト正常顎下腺組織を材料として、従来のレクチン染色法に前処置として、酸化もしくは還元などの化学的修飾を加えることにより、正常顎下腺の産生する粘液の組織化学的性格、および顎下腺各部位での染色性の違いについて詳細に検討し、粘液の性格および各部位の特異性をあきらかにすることを試みた。顎下腺は混合腺であり、同一条件下において漿液細胞と粘液細胞の組織化学的な性質の比較が可能となる点からも材料として有用であると考えられる。

研究材料および方法

1. 研究材料

材料の提供を受けた屍体は20例(男性13, 女性7)で、その平均年齢は66歳であった。血液型はO型4例, A型12例, B型1例, AB型2例, 不明1例であり、いずれも死後2時間以内に剖検され、採取した顎下腺組織は肉眼的に病変を認めないもので、摘出後速やかに10%緩衝ホルマリン水溶液により、室温12時間以上の固定を施した。

さらに通法によりH-E染色標本を作製し、組織学的に唾液腺病変のないことを確認して研究に供した。

2. 研究方法

本研究には通常のレクチン染色と、酸化および還元による化学的修飾を施したレクチン染色を用いて、顎下腺各部位の染色性を光顕的に比較観察した。

なお、用いたレクチンはHorseradish peroxidase (HRP) 標識を施したUEA-I, GS-I, GS-II, BPA, PNA, SBA, WGA (E-Y Lab. Inc., USA), DBA (Honen Co., Japan)で、ConAに関しては未標識(Type IV, Sigma. Co., USA)の9種類(表1)で、各レクチンの糖残基特異性と、血液型特異性は関連を有するので併せて表示した。

また抗リゾチーム抗体を用いた免疫組織化学的染色も

漿液細胞を同定するために行った。

1) レクチン染色法

通法によるパラフィン切片をキシレンにて脱パラフィンした後、組織中の内因性ペルオキシダーゼを失活させるために、0.3% H₂O₂-メタノール溶液に30分間浸漬し、流水で水洗した。その後、9種類のレクチンとそれぞれ4°Cにて一晩(12時間程度)反応させ、0.01M リン酸緩衝食塩水(pH 7.4 PBS)で十分洗浄し、3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride(DAB)-0.03% H₂O₂溶液に浸漬して発色(5分程度)させ、ヘマトキシリンで核染し脱水後、透徹・封入した。

使用した各レクチンではできる限り同じlot番号の製品を用い、結合性を検討したうえで1%(W/V)ウシ血清アルブミン(BSA, Fraktion V, Boehringer., W. Germany)加0.01M PBSにて40倍に希釈して使用した。ただし、ConAのみは0.025%(W/V)(0.01M PBS溶液)の希釈倍率にて反応させ、0.001%(W/V)HRP(0.01M PBS溶液)(Peroxidase I-C Toyobo Co., Japan)に30分間浸漬後、同様にDAB溶液で発色させた。DBAを用いた染色では内因性ペルオキシダーゼを除去した後、0.4%Pepsin(Sigma. Co., USA) in 0.01N HClで37°C 40分間の酵素消化を行った。

2) 酸化および還元法による修飾法

勝山ら²⁰⁾のコンカナバリンAパラドックス染色法にない、レクチン染色の前処置として1%(W/V)過ヨウ素酸水溶液による10分間または60分間の酸化、さらに各酸化後、0.2%水素化ホウ素ナトリウム・1%第二磷酸ナトリウム溶液による2分間の還元をそれぞれ組合わせた。観察した修飾法とレクチン染色法の組合わせは、10分酸化、10分酸化後-還元、60分酸化、60分酸化後-還元の4つの組合わせである。

3) 併用した染色法

組織化学的に漿液性および粘液性物質の局在をみるため Alcian blue pH 2.5-Periodic acid Schiff 反応(AB

表 2 顎下腺各部位におけるレクチンの染色性

		粘液部				漿液部				介在部				線条部				小葉間導管									
		±	W	+	卅	±	W	+	卅	±	W	+	卅	±	W	+	卅	±	W	+	卅						
UEA-I	0'		8	12	•		3	1	16	•		3	17	•		1	17	2		1	16	3					
	10'-O			12	8	•		6	14	•	•	5	10	5	•		7	13	•	•	7	13	•	•			
	10'-R		15	5	•	•			•	•	•		•	•	•			•	•	•		•	•	•	•		
	60'-O			•	•	•			•	•	•		•	•	•			•	•	•		•	•	•	•		
	60'-R			•	•	•			•	•	•		•	•	•			•	•	•		•	•	•	•		
GS-I	0'		4	3	13		9	11	•	•		12	6	2	•		5	13	2	•		2	12	6	•	•	
	10'-O		4	2	10	4			•	•	•		•	•	•		14	6	•	•		17	3	•	•	•	
	10'-R		6	3	7	4			•	•	•		•	•	•		16	4	•	•			2	•	•	•	
	60'-O			•	•	•			•	•	•		•	•	•			1	•	•	•		•	•	•	•	
	60'-R			•	•	•			•	•	•		•	•	•			•	•	•		•	•	•	•	•	
GS-II	0'	*11	*8	1	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•	
	10'-O		3	5	*10	*2			•	•	•			•	•			•	•	•			•	•	•	•	
	10'-R	*10	*8	2	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•	
	60'-O		4	5	9	2			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	
	60'-R	*15	5	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•	
*基底部+	BPA	0'	1	6	11	2		2	11(5)	2	•		3	4	9	4			•	•	•			•	•	•	•
	10'-O		3	11	6	•			•	•	•		9	(5)	(5)	1			•	•	•			•	•	•	•
	10'-R			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	60'-O			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	60'-R			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
PNA	0'	*13	*7	•	•		9	1(8)	(2)	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•	
	10'-O		6	*11	3	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	10'-R			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	60'-O			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	60'-R			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
*基底部+	SBA	0'	1	6	10	3		8	5(7)	•	•		11	(9)	•	•			1	10	9			4	15	1	
	10'-O			4	5	11			•	•	•			•	•	•		11	9	•	•			8	8	3	1
	10'-R		5	1	5	9			•	•	•			•	•	•			•	•	•			15	4	1	•
	60'-O		9	•	4	7			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	60'-R		11	6	3	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
DBA	0'	4	3	3	10			•	•	•		3	6	9	1		5	9	3	2			1	10	9		
	10'-O		8	•	4	8			•	•	•			•	•	•		14	6	•	•			16	4	•	•
	10'-R		8	•	2	10			•	•	•			•	•	•			•	•	•			2	•	•	•
	60'-O			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	60'-R			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
ConA	0'	*12	*8	•	•			16	4	•		2	17	1	•		2	12	6	•			2	14	4	•	
	10'-O			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	10'-R			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	60'-O			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
	60'-R			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•			•	•	•	•
*基底部+																											

注 数字は症例20例中の結果を示す。() 内は部分的反応例を示す症例数。• not recognize
0' : 無修飾, 10'-O : 10分酸化, 10'-R : 10分酸化後-還元, 60'-O : 60分酸化, 60'-R : 60分酸化後-還元
- : negative, ± : trace, W+ : weakly positive, + : positive, 卅 : strong positive

pH2.5-PAS)と抗リゾチーム抗体(ヒストファイン第一抗体, ウサギポリクロナール抗体, 生化学 K.K., Japan)を一次抗体として用いたABC法による酵素抗体法を行い, またこれらの染色法とレクチン染色との重染色も併せて施行した。

結 果

組織学的に顎下腺腺房部を粘液部, 漿液部, さらに導管系上皮を介在部, 線条部, 小葉間導管に区分し, それぞれのレクチンに対する各部位の細胞の反応性と酸化・還元後のレクチン染色性の変化を比較した。なおWGAに関しては化学的修飾法の有無にかかわらず, 全く同じ染色性を示したため結果から省略した。また筋上皮細胞はどのレクチンにもほとんど反応せず, さらに漿液性半月については染色性が各個体により著しく異なるため本結果より割愛した。

1) 粘液細胞

すべてのレクチンは無修飾で染色性の程度に差はあれ, 粘液細胞に反応性を示した。特にGS-IIは, 他の部位とは反応せず, 粘液細胞のみに染色性を示した。しかし, 無修飾では弱陽性までの弱い反応を示したにすぎなかったが, 10分酸化で陽性から強陽性と反応性の増強がみられた。さらに10分酸化後-還元では無修飾の染色性とはほぼ同じ程度で, 60分酸化では反応性の増強を認め, 60分酸化後-還元では反応性はほとんど消失した(表2, 写真1A~D)。SBAにおいても無修飾で弱陽性から陽性を示した反応が, 10分酸化で陽性から強陽性と増強傾向にあった。10分酸化後-還元でもやや減弱が同等が多く, 60分酸化では陽性から強陽性を示し, 60分酸化後-還元の反応性は減弱した(表2, 写真2A~E)。PNAについても同様に無修飾では陰性から弱陽性であったが, 10分酸化を行うことにより弱陽性から陽性を示す症例が増加した。しかしそれ以上の酸化・還元では反応性は消失した(表2, 写真3A, B)。このようにGS-II, SBA, PNAでは過ヨウ素酸化後その反応性が増強された。

またDBAは無修飾で陽性から強陽性の反応を示すものが多く, 10分酸化および10分酸化後-還元の化学的修飾を施しても同等かもしくは若干の染色性の増加を示すに止まった(表2, 写真4A, B)。

GS-Iを用いた染色は化学的修飾を行わないと強い反応性を示したが, 10分酸化, 10分酸化後-還元を行うことによりその染色性はやや減少し, 60分酸化で消失した(表2, 写真5A~C)。BPA, UEA-Iの染色でも10分酸化で染色性は減少し10分酸化後-還元ではほぼ消失した(表2, 写真6A, B)。

またConA染色では無修飾で粘液細胞の胞体全体がきわめて弱い反応から弱陽性を示すのでみであった。し

かし全例, 細胞基底部に特徴的な粗大顆粒を認め, これは化学的修飾法を行うと消失した(表2, 写真7)。この粗大顆粒はGS-II, PNA染色で化学的修飾を行った一部の症例にも認められた。

2) 漿液細胞

GS-II, DBAは化学的修飾の有無によらず漿液細胞に反応しなかった。ConAでは無修飾の多くの症例が胞体全体に彌漫性に弱陽性から陽性の反応性を示した。GS-Iは約半数の症例が無修飾で弱陽性に反応し, BPAもほぼ同様であった。SBA, PNA染色も無修飾で陰性から弱陽性を示すものが多かった。しかしいずれも10分間の酸化でその反応性は消失した。

無修飾のUEA-I染色ではほとんどの症例で胞体が彌漫性の陽性反応を示し, 10分酸化ではその反応性は減弱したが, 腺房の管腔側に一致して不規則なまだら状の弱陽性反応が残存した。しかし10分酸化後-還元, 60分酸化, 60分酸化後-還元などではいずれも反応性は消失した(表2, 写真8A, B)。

このように漿液細胞部のみに特異的に反応するレクチンは認められず, 各レクチンに対する漿液細胞の反応性はUEA-Iを除いて弱かった。

またH-E染色では組織学的に漿液細胞と判断されるが, 数種のレクチンに強い反応性を示す, ピラミッド型細胞が腺房内に認められた。同部はABpH 2.5-PAS染色で茄子紺から赤紫に染まり, また抗リゾチーム抗体を用いた酵素抗体法でも同部に陽性を示し, 重染色でも両染色の共存がみられた(写真9A~D)。

このような粘液, 漿液両方の性格を示す粘漿液細胞と考えられる細胞はBPA, GS-I, DBA, PNA, SBAによって, 散在性に認められたが, 10分酸化さらに10分酸化後-還元でその染色性は減弱し, 数も減少した。

またDBAに対して胞体全体が均一無構造な陽性反応を呈する細胞も腺房内に存在し, H-E染色では淡明な胞体を有していた。この種の細胞はGS-IIと化学的修飾の有無によらず粗大顆粒状に反応し, ConA 10分酸化後の染色でも同様の染色性を認め, 通常の漿液細胞や上記の粘漿液細胞とは異なる像を示した(写真10A~D)。

3) 介在部

介在部の導管上皮細胞は無修飾では, UEA-I, BPA, DBAに弱陽性から陽性の反応を示し, ConAに対しては大部分の症例が弱陽性を示した。特にBPA, DBAはこの部位に特異的な反応性を示した。すなわちDBAは胞体全体に陽性を示し(表2, 写真11), またBPAも胞体全体もしくはApical cytoplasmに陽性から強陽性の強い反応性を示した(数例でsurface coatにも反応)。DBAの反応性は酸化により消失したが, BPA染色では10分酸化後でも陽性を示す症例が認められた(表2, 写真12A, B)。この場合特に腺体近位の介在部に染色性が残存する傾向を示した。

4) 線条部

線条部の上皮細胞は無修飾の UEA-I, SBA に対して陽性から強陽性を示し, GS-I, ConA には弱陽性から陽性を示した. 10分酸化でその染色性が減少または消失する症例が多く, 10分酸化後-還元では消失した. また SBA, UEA-I の多くは surface coat と反応した.

以上のなかで SBA は線条部, ことに基底部の線条構造に比較的特異的な反応を呈した(表2, 写真13A, B).

5) 小葉間導管

小葉間導管の上皮細胞もほぼ線条部と同様の染色性を示し, SBA に対して特異性がみられた. また無修飾の DBA 染色でその一部の上皮細胞が強陽性に染色された(表2, 写真14).

考 察

細胞および組織の生物学的特徴や機能を研究するために, 多様なアプローチの方法が存在するが, 細胞・組織の産生する物質を検討することもその1つの手段として行われている. その観点より, 細胞の産生する糖と蛋白質の複合物質である粘液に焦点を絞り, その組織化学的な性格をあきらかにし, 最終的には細胞・組織の特性を形態学の立場から解明する試みが多数なされてきている. 近年, 粘液に対する生化学的な知見が増加するにつれ, 従前に比し, より組織あるいは細胞レベルでの検索に利用しうる組織化学的染色法が開発されている. 特に特有の糖鎖構造を認識するレクチンを用いた染色法は, 免疫組織化学的手法と並んで多用されている. 代表的な粘液産生組織である唾液腺についても, これまで数多くの組織化学的検索が報告されており, レクチンを使用したものも少なからず認められるが, その大半はヒト以外の動物に関する研究であった^{10-19, 21-23)}. また, ヒト唾液腺のなかでも混合腺である顎下腺だけを対象とした組織化学的研究は特に少なく²⁴⁻²⁷⁾, さらに顎下腺を各部位に細分してその染色性を詳細に比較検討した報告はほとんどなかった. この事実を踏まえ, 本研究では従来のレクチン染色法に加えて, 酸化・還元など, 前処置に化学的修飾法も行い, ヒト顎下腺産生粘液の組織化学的特性をできる限り詳細に検討するよう試みた. 以下に今回得られた染色結果について各細胞種ごとに考察を加える.

1) 粘液細胞

化学的修飾法を行わない場合, 粘液細胞は今回使用したすべてのレクチンと反応した. なかでも, GS-II は粘液細胞のみに反応を示し, さらに酸化によりその染色性は増強した. これは勝山ら²⁰⁾が ConA を用いて行ったパラドックス染色と類似の現象といえる. すなわち, 酸化により糖蛋白質の糖鎖構造が変化し, レクチンとの結

合性が失われるはずであるにもかかわらず, 逆に染色性が増強するという不可解な現象が生じている. 他に粘液細胞に特異的とはいえないが, PNA を用いた染色でも同様な増強がみられた.

その機序についてはコンカナバリンAパラドックス染色同様, 1) 過ヨウ素酸による酸化が本来その対象となる糖鎖末端の糖残基の近接水酸基に反応を及ぼさず, レクチンに対する結合部として温存される, 2) 酸化・還元により末端またはそれに隣接する糖残基になんらかの立体構造の変化が生じ, より結合性が増加する, 3) 酸化・還元によりレクチン結合部位を隠べいしていた他の糖鎖が破壊され, レクチンが結合しやすくなる²⁰⁾, などの可能性が示唆されるが, 推測の域を出ない.

また, DBA は酸化・還元を施すと粘液細胞のみに特異的な反応を示すようになった. 他に GS-I, SBA もほぼこのような傾向が認められた. いずれにせよ, 今回の検索により酸化・還元と GS-II, PNA, DBA, GS-I, SBA を組合わせた染色を用いることにより, ヒト顎下腺粘液細胞を他の部位の細胞から区別しうるものがあきらかとなった.

次にレクチン染色の染色性の強弱を基準として粘液細胞に含まれる粘液の末端糖鎖構造について検討を加えれば, 無修飾の状態では染色性の強い順に, GS-I, DBA, SBA, UEA-I, BPA, GS-II, PNA, ConA となった. すなわちホルマリン固定の標本においては粘液の糖鎖末端およびその近傍には α -galactose(α -Gal)や α -N-acetyl-galactosamine (α -GalNAc)が多く, α -mannose (α -Man), β -Gal は比較的少ないと類推された. この結果を従来の報告と比較すると, SBA, PNA, ConA に関してはほぼ一致したが, DBA, UEA-I では弱陽性とされ^{24, 28-31)}, 本結果と著しい相違がみられた. DBA, UEA-I は血液型物質に特異性を有するレクチンであるため³²⁾, 対象となった症例の血液型により, その反応性が大きく左右されると考えられる. 今回, 検索した20例のうち, 分泌型・非分泌型についての情報は確認しえなかったが, 16例はA型かO型であり, A型に特異性を有する DBA, H(O)型に特異性を有する UEA-I に比較的強い反応性を示したものと思われる. しかし, 唾液腺粘液細胞のレクチンに対する反応性は症例によりまちまちであり, また, 同一個体においても個々の細胞により反応性が異なるという報告も少なからずされている^{33, 34)}. 今回の検索でも症例により各レクチンとの反応性に若干のばらつきが認められ, 粘液細胞とレクチンの結合性は単に粘液のもっている糖鎖の種類とレクチンの結合性のみでは判定し難く, 粘液巨大分子構造と密接な関係がある. すなわち年齢, 性別, 食習慣, 遺伝などの個体による相違にかなり左右されることが示唆された.

なお無修飾の ConA 染色と化学的修飾を行った GS-II, PNA 染色において細胞基底部に特徴的な粗大顆粒

が認められた。ConA は Golgi 野、粗面小胞体など細胞内膜系とも結合するとされるので³⁵⁾、単にこれらの小器官を認識していると考えられるが、組織の固定により分泌粘液が濃縮されて顆粒状に観察された可能性もあり、これについてはさらに検討を加える余地を残している。

2) 漿液細胞

今回使用したレクチンのなかで漿液細胞のみに特異性を示すものは認められなかった。染色性の点からみると、UEA-I が陽性反応を呈した以外は、いずれも弱い反応しか示さなかった。このことは、漿液細胞には α -fucose (α -Fuc) が比較的多く含まれていることを示唆しており、Laden ら³³⁾や Takai ら²⁴⁾の報告と一致している。他の報告でも同様に漿液細胞とレクチンとの反応は UEA-I を除けば概して弱いとされている^{28,31)}。また粘液細胞と異なり、漿液細胞においては UEA-I などの血液型に特異性を有するレクチンに対しても個体の血液型に関係なく反応を示した。この結果も従来報告されているものとよく一致しており^{32,36)}、個体の血液型によらず漿液細胞には Fuc が含まれていると考えられる。

化学的修飾を行うと、UEA-I のみが10分酸化後においても弱陽性反応を示したに過ぎず、他のレクチン染色では酸化によりすべて反応が消失した。UEA-I でも還元を行うと反応は認められなくなった。すなわち、漿液細胞では粘液細胞にみられた化学的修飾による染色性の増強はみられず、酸化・還元により予想どおり糖鎖の構造が変化し、レクチンが結合しなくなったと考えられる。

また、今回の検索により漿液部に粘液・漿液両方の性質を示す細胞が認められた。これらの細胞は形態学的には漿液細胞と全く区別ができなかったが、BPA, GS-I, DBA, PNA, SBA 染色で孤在性に反応を示し、さらに連続切片にて同細胞にリゾチーム、ABpH 2.5-PAS 染色で陽性となる上皮性の粘液物質も存在することがあきらかとなった。リゾチームは正常顎下腺の漿液細胞と、介在部導管上皮細胞に存在しており、漿液細胞の指標とされている³⁷⁻³⁹⁾。顎下腺介在部の増殖細胞帯から分化した漿液細胞のなかで、粘液細胞の性質をいまだ保有しているのか、あるいはどちらかの細胞に分化しつつある、中間型の細胞であるのかははっきりしない。山科^{40,41)}は漿液細胞に含まれる粘液物質などを生化学的に分析し、これらの細胞が完全に独立したものなのか、状況に応じて相互に変わりうるのか、いまだあきらかでないとするものの、やはり漿粘液細胞というべき中間型の細胞の存在を認めている。

さらに漿液部には H-E 染色で淡明な胞体を有し、GS-II, ConA 染色で粗大顆粒状に反応する物質を有する細胞が認められた。これは漿液細胞や上記の中間型細胞とあきらかに異なる細胞で、比較的介在部に近い部位

に小集団をなして認められるために、介在部上皮細胞との関係が示唆されるが、両者は形態学的にもレクチンに対する染色性も異なり、ほとんど類似性をみない。調べた限りにおいてこの種の細胞についての記載はなく、その性格については今後の検討が必要であるが、漿液細胞部は決して一様ではなく、数種の細胞から構成されていることが認識された。

3) 介在部導管上皮細胞

従来の唾液腺の組織化学的研究において、介在部導管を詳細に記載したものはきわめて少ない^{28,36)}。しかし、介在部は組織発生の過程において重要な部位として知られ⁴²⁻⁴⁴⁾、成熟組織においても唾液腺の増殖細胞帯に相当し、また唾液腺腫瘍の原基細胞とも考えられている部位である⁴³⁾。この観点より今回の検索では特に介在部を他の導管系と区別して染色結果を比較検討した。その結果、この部分の上皮細胞は化学的修飾を行わない状態で、特に DBA, BPA と強い反応性を示した。これらのレクチンは粘液細胞とも反応したが、介在部導管上皮細胞とは形態学的にあきらかに区別できること、および症例の血液型にかかわらず同部の細胞と反応することから、DBA, BPA とともにこの細胞を認識するうえで非常に有用である。事実、顎下腺の介在部は耳下腺などに比べかなり短く⁴⁵⁾、H-E 染色でははっきりしないものであるが、上述のレクチンを使用することにより明瞭に識別できた。他に UEA-I, ConA とも反応したがいずれも部位特異的とはいえない染色性を示した。糖鎖構造の点から考えると、糖鎖末端付近には主として α -GalNAc, Gal が存在すると思われる。また、化学的修飾法では増強を示す症例はなく、反応性はほぼ一様に減弱あるいは消失した。

4) 線条部および小葉間導管上皮細胞

線条部と小葉間導管の上皮細胞は、ほぼ同様なレクチン反応性を示した。従来の報告^{29,30,33)}どおり SBA はこの両者に対して特によく反応し、両部位ともに10分酸化後、小葉間導管では10分酸化後還元でも粘液細胞を除いてこの部分にのみ陽性となった。すなわち、この部分には α , β -GalNAc が含まれていることが類推される。ただし、線条部では還元を加えるとその染色性が消失するのでその染色態度が小葉間導管と若干異なり、両者の区別も可能である。

その他にも小葉間導管には DBA に強い反応を示す孤在性の細胞が認められた。これについても従来の報告例に記載がなく、その機能や性質については全く不明であるが、導管上皮内腔表面に粘液を分泌することにより、潤滑剤あるいは粘膜保護剤としての役割を担っているかもしれない。ただし、H-E 染色では、他の導管上皮細胞と明瞭に区別しえず、消化管上皮の粘液細胞である杯細胞などとは、かなり異なる細胞種である。この細胞は腺房細胞のごとく分泌型の細胞か否かあきらかでないが、

小葉間導管の上皮には少なくとも二種類の細胞が存在していることが確認できた。

また、線条部導管の surface coat において SBA, UEA-I に対する反応がみられたが、これが単なる分泌物の付着によるものか、それとも細胞膜に固有の膜糖蛋白質の一部を認識しているのかはあきらかではなく、今後電顕による観察が必要であると思われる。なお、線条構造が SBA 染色であきらかに認められ、この部分の膜構造に GalNAc, Gal が多く含まれるものと考えられる。

以上、ヒト顎下腺につきその各部位の細胞における、各種レクチンに対する反応性を検討した。この結果、レクチン染色と化学的修飾法をさまざまに組み合わせることにより、顎下腺の細胞種を区別できうことがあきらかとなった。これにより、顎下腺各部位における機能の相違を組織学的により詳細に検索しうる可能性が開かれ、さらに顎下腺由来の種々の疾患、特に腫瘍の発生や分化の方向を検討するうえで有力な情報を提供するものと考えられる。

結 語

ヒト正常顎下腺20例を材料に9種類のレクチンを用いた染色法を施し、さらに前処置とし酸化、還元による化学的修飾を施し、顎下腺各部位に存在する細胞のレクチンに対する反応性の違いについて検討し、以下のような結論を得た。

1. 粘液細胞に対してはほとんどのレクチンが反応したが、なかでも GS-II が特異的な染色性を示し、この染色性は酸化により増強した。また SBA, DBA は酸化・還元を通して強い反応性が粘液細胞に残存した。

2. 漿液細胞のみに特異性を示すレクチンは存在せず弱い反応がほとんどであったが、そのなかでは UEA-I が比較的良好に反応し、10分酸化でも反応性の残存を認めた。

3. 介在部導管上皮細胞では DBA, BPA が強い反応を示した。

4. 線条部導管上皮細胞は無修飾で SBA に強く反応し、10分酸化でもその反応性は残存した。

5. 小葉間導管上皮細胞は DBA, SBA とよく反応した。

6. 粘液・漿液両方の性質を示すと思われる中間的細胞が漿液部に存在した。

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました教室主任恩師深谷昌彦教授に深甚なる謝意を表します。またご校閲を賜りました本学病理学講座亀山洋一郎教授に深謝いたします。同時に本研究に際し、終始多大なるご指導ご教示を賜り、剖検例から材料の提供を

いただきました公立陶生病院病理部部長小野謙三博士に厚く感謝の意を表します。またご協力をいただいた同病理部技師諸氏ならびに当教室員各位に感謝いたします。さらにこの研究に対して深い理解とご助言をいただいた公立陶生病院歯科口腔外科部長大谷端夫博士に心よりお礼申し上げます。

本論文の要旨は、第46回日本口腔科学会総会（平成4年4月、名古屋）において発表した。

引用文献

- 1) 勝山 努：複合糖質の組織化学。日本組織化学会編：組織細胞化学の基礎技術と応用。日本メディカルセンター、東京、1978、219-239頁。
- 2) 勝山 努、小野謙三：糖質の組織化学。日本病理学会編：病理技術マニュアル4。医歯薬出版、東京、1986、369-406頁。
- 3) 小野謙三：大腸の正常粘膜および上皮性腫瘍における粘液の組織化学的研究。信州医誌 30: 110-139 1982。
- 4) 石井恵子、勝山 努：多糖体染色。病理技術研究会編：病理標本の作り方。文光堂、東京、1992、63-77頁。
- 5) 村田長芳：標識レクチンの糖組織化学への応用。日本組織細胞化学会編：組織細胞化学。学際企画、東京、1982、111-128頁。
- 6) 平野 寛、高田邦昭：レクチンの組織細胞化学的応用。日本組織細胞化学会編：組織細胞化学。学際企画、東京、1983、113-132頁。
- 7) 佐藤栄一：レクチンの組織化学およびその応用。病理と臨床 2: 1418-1426 1984。
- 8) Debray, H., Decout, D., et al.: Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. Eur J Biochem 117: 41-55 1981。
- 9) 辻 勉、大沢利昭：レクチンとその糖結合特異性。蛋白質核酸酵素 28: 118-131 1983。
- 10) Naito, R., Takai, Y., et al.: Use of lectins for differential localization of secretory materials of granular convoluted tubules and ducts in the submandibular gland. Acta Histochem Cytochem 16: 483-493 1983。
- 11) 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 conjugate. J Histochem Cytochem 31: 19-24 1983。
- 12) Schulte, B.A. and Spicer, S.S.: Light microscopic detection of sugar residues in glycoconjugates of salivary glands and the pancreas with lectin-horseradish peroxidase conjugates. I. Mouse. Histochem J 15: 1217-1238 1983。

- 13) Schulte, B.A. and Spicer, S.S.: Light microscopic detection of sugar residues in glycoconjugates of salivary glands and the pancreas with lectin-horseradish peroxidase conjugates. II. Rat. *Histochem J* 16: 3-20 1984.
- 14) Tajima, Y., Ohno, J., et al.: Histochemical evaluation of lectin binding in the submandibular glands of *suncus murinus*. *Jpn J Oral Biol* 28: 375-379 1986.
- 15) Menghi, G., Bondi, A.M., et al.: Visualization of carbohydrate chains in rabbit salivary glands by means of enzymatic degradation and plant lectins. *Acta Histochem* 84: 163-177 1988.
- 16) Schulte, B.A., Spicer, S.S., et al.: Lectin histochemistry of secretory and cell-surface glycoconjugates in the ovine submandibular gland. *Cell Tissue Res* 240: 57-66 1985.
- 17) Menghi, G., Accili, D., et al.: Enzymatic degradation and quantitative lectin labeling for characterizing glycoconjugates which act as lectin acceptors in cat submandibular gland. *Histochemistry* 90: 331-338 1989.
- 18) Schauer, R., Casals-Stenzen, J., et al.: Subcellular site of the biosynthesis of O-acetylated sialic acids in bovine submandibular gland. *Glycoconjugate J* 5: 257-270 1988.
- 19) 野田陽子, 保坂松治, 他: 家畜哺乳動物大唾液腺の Lectin Histochemistry (抄). *口科誌* 33: 830 1984.
- 20) 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.
- 21) Hosaka, M., Takai, Y., et al.: Distribution difference of lectin binding in salivary gland treated with sialidase and trypsin. *Acta Histochem* 79: 11-22 1986.
- 22) Hosaka, M., Takai, Y., et al.: Lectin binding patterns in salivary glands treated with amylase. *Acta Histochem* 78: 49-63 1986.
- 23) 森 昌彦: 酵素消化レクチン染色による糖の証明. 日本組織細胞化学会編: 組織細胞化学. 学際企画, 東京, 1985, 253-270頁.
- 24) Takai, Y., Noda, Y., et al.: Different bindings to lectin in human submandibular gland after enzymatic digestion. *Acta Histochem* 78: 111-121 1986.
- 25) Ito, N., Nishi, K., et al.: Histochemical analysis of the chemical structure of blood group-related carbohydrate chains in serous cells of human submandibular glands using lectin staining and glycosidase digestion. *J. Histochem Cytochem* 37: 1115-1124 1989.
- 26) 伊藤信彰, 西 克治, 他: 糖質分解酵素ならびに標識レクチンを用いた組織切片上での糖質分析の試み—ヒト顎下腺について—(抄). *日法医誌* 41: 690 1987.
- 27) 伊藤信彰, 西 克治, 他: ヒト顎下腺の粘液組織化学的研究 (抄). *日法医誌* 39: 631 1985.
- 28) 高井良昭, 野田陽子, 他: ヒト唾液腺の Lectin Histochemistry (抄). *口科誌* 33: 829 1984.
- 29) 相樂貞文: 唾液腺多形性腺腫のレクチン結合性に関する組織化学的研究. *口科誌* 37: 911-933 1988.
- 30) Nakai, M., Tsukitani, K., et al.: Histochemical studies of obstructive adenitis in human submandibular salivary glands. II. Lectin binding and keratin distribution in the lesions. *J Oral Pathol* 14: 671-679 1985.
- 31) McMahon, R.F.T., Benbow, E.W., et al.: Human salivary gland glycoconjugates: a lectin histochemical study. *Histochem J* 21: 663-674 1989.
- 32) 中島 充, 伊藤信彰, 他: レクチン—金コロイド法によるヒト唾液腺における ABH 型物質局在の電顕的検索. *法医学の実際と研究* 29: 33-41 1986.
- 33) Laden, S.A., Schulte, B.A., et al.: Histochemical evaluation of secretory glycoproteins in human salivary glands with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *J Histochem Cytochem* 32: 965-972 1984.
- 34) 菊池泰人: ヒト組織における ABH 血液型抗原の動態. *帝京医誌* 7: 307-322 1984.
- 35) 平野 寛: 細胞表面の糖鎖と細胞認識. *代謝* 14: 1743-1754 1977.
- 36) 伊藤信彰, 西 克治, 他: ヒト顎下腺並びに脾臓における α -L-fucosidase 処理のレクチン染色性に与える影響 (抄). *日法医誌* 42(補冊): 90 1988.
- 37) 高田 隆, 小川郁子, 他: 唾液腺腫瘍の免疫組織化学的研究. *歯基礎誌* 26: 1190-1199 1984.
- 38) 水野智之: 口腔外科領域における腺リンパ腫の組織化学的検討. *日口外誌* 35: 599-613 1989.
- 39) 綿谷和也, 白砂兼光, 他: ヒト顎下唾液腺における種々の唾液蛋白の分布. *日口外誌* 31: 222-229 1985.
- 40) 山科正平: 細胞—唾液腺の分泌細胞. *臨床科学* 17: 91-100 1981.
- 41) 山科正平: 唾液腺の組織学的特性とその病態 I. 唾液腺の組織像と組織発生. *医学のあゆみ* 119: c332-336 1981.
- 42) Jacoby, F. and Leeson, C.R.: The post-natal development of the rat submaxillary gland. *J Anat* 93: 201-219 1959.
- 43) 山科正平: 耳下腺の組織発生. 奥田稔他編集: 耳下腺腫瘍—その基礎と臨床—. 文光堂, 東京, 1989, 2-7頁.

44) Bhaskar, S.N.: Orban's oral histology and embryology. 9th Ed., CV Mosby Co, St. Louis, 1981, p 336-370.

45) Martinez-Madrigal, F. and Micheau, C.: Histology of the major salivary glands. Am J Surg Pathol 13: 879-899 1989.

写真 1A~4B

写真 1~7 まで顎下腺の粘液細胞

- 1A: GS-Ⅱ レクチン染色, 1B: 10分酸化-GS-Ⅱ レクチン染色,
 1C: 10分酸化-還元-GS-Ⅱ レクチン染色, 1D: 60分酸化-GS-Ⅱ レクチン染色 (×200).
 2A: SBA レクチン染色, 2B: 10分酸化-SBA レクチン染色,
 2C: 10分酸化-還元-SBA レクチン染色, 2D: 60分酸化-SBA レクチン染色,
 2E: 60分酸化-還元-SBA レクチン染色 (×200).
 3A: PNA レクチン染色, 3B: 10分酸化-PNA レクチン染色 (×200).
 4A: DBA レクチン染色, 4B: 10分酸化-還元-DBA レクチン染色 (×200).

写真 5A～9D

5A: GS-I レクチン染色, 5B: 10分酸化-GS-I レクチン染色,

5C: 10分酸化-還元-GS-I レクチン染色 ($\times 200$).

6A: BPA レクチン染色, 6B: 10分酸化-BPA レクチン染色 ($\times 200$).

7: ConA レクチン染色 ($\times 400$).

写真 8～10まで顎下腺の漿液細胞

8A: UEA-I レクチン染色, 8B: 10分酸化-UEA-I レクチン染色 ($\times 400$).

9A: BPA レクチン染色, 9B: ABpH 2.5-PAS 染色, 9C: 抗リゾチーム抗体を用いた酵素抗体法, 9D: BPA-PAS 重染色 ($\times 400$).

写真 10A~14

10A: DBA レクチン染色, 10B: H-E 染色, 10C: GS-II レクチン染色,

10D: 10分酸化-ConA レクチン染色 ($\times 400$).

写真11, 12 顎下腺の介在部

11: DBA レクチン染色 ($\times 200$).

12A: BPA レクチン染色 ($\times 200$), 12B: 10分酸化-BPA レクチン染色 ($\times 400$).

写真13 顎下腺の線条部

13A: SBA レクチン染色, 13B: 10分酸化-SBA レクチン染色 ($\times 400$).

写真14 顎下腺の小葉間導管

14: DBA レクチン染色 ($\times 400$).