ラット前立腺上皮細胞のホスファターゼ活性局在とレクチン 結合部位とに関する電顕的細胞化学的研究

東京大学医学部泌尿器科学教室 東 海 林 文 夫
(主任: 新島端夫教授)

AN ULTRACYTOCHEMICAL STUDY ON THE LOCALIZATION OF PHOSPHATASE ACTIVITIES AND LECTIN BINDING SITES IN RAT PROSTATIC EPITHELIAL CELLS

Fumio Shoji

Department of Urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo
(Director: Prof. T. Nijijima)

An ultracytochemical study was performed on the epithelial cells of rat ventral prostate under various hormonal conditions. Adult rats of Wistar strain weighing about 200 gm were used. The prostatic tissues were obtained from normal, castrated as well as castrated and androgen administrated rats.

Acid phosphatase (ACPase) and thiamine pyrophosphatase (TPPase) activities and horseradish peroxidase (HRP) labeled lectin binding sites were studied ultracytochemically in these specimens. The lectins used were concanavalin A (Con A), which bound to mannose-like sugars, and *Ricinus Communis* agglutinin (RCA), which bound to galactose-like sugars.

Normal prostatic epithelium was lined with tall columnar cells having well-developed endoplasmic reticulum and Golgi apparatuses. Castration induced an involution of epithelial cells. The cells reduced their sizes and organellae diminished both in number and in size. Restoration of morphology was apparent after testosterone injection in the castrated animals.

ACPase activities were localized in lysosomes and Golgi apparatuses. TPPase activities were found in Golgi cisternae and occasionally on microvilli. The localization of ACPase and TPPase activities were unchanged, although marked modulation of positive organellae were found in various hormonal conditions.

Con A bound to the cisternal surface of rough and smooth endoplasmic reticulum, nuclear envelope, Golgi membrane and multivesicular bodies. The outer surface of plasma membrane and basement membrane were also stained. RCA-HRP binding sites were Golgi membrane, multivesicular bodies, plasma membrane and basement membrane. The lectin binding sites on the cell membranes indicated the presence of respective specific sugars, e.g. Con A to mannose and RCA to galactose, and their differing distribution showed different surface properties of the membrane. The distribution pattern of each lectin binding sites was similar irrespective of cell proliferation or involution, although the amount of positive membrane varied according to the cell function. Therefore, the Con A and RCA staining can be used as a cytochemical marker of membranes in fixed tissue cells.

The lectin binding sites of the prostatic epithelial cells were revealed for the first time ultracytochemically. These markers of the membranes indicated the relationship between the cytoplasmic membranes and the plasma membrane. The present study showed the usefulness of phosphatase activities and lectin binding sites as cytochemical markers in the evaluation of cell structure in relation to its function.

要旨: ラット前立腺上皮細胞においてホスファターゼ活性局在とレクチン結合による生体膜糖鎖の電顕的細胞化学的検索を行ない, 細胞の構造と機能との関連を追究した。

ウィスター系成熟雄ラットを正常群(無処置), 去勢群(去勢7日及び28日), 回復群(去勢7日及び

28日よりプロピオン酸テストステロン1mg/日を7日間投与)に分けた。各群の前立腺腹葉につき酸性ホスファターゼ(ACPase, Gomori 法)とチアミンピロホスファターゼ(TPPase, Novikoff & Goldfischer 法)活性局在及び西洋わさびペルオキシダーゼを標識したコンカナバリンA (Con A) 又はヒマ凝集素(RCA)結合部位を細胞化学的に検出した。前立腺上皮細胞において ACPase はライソソーム, ゴルジ装置, 多胞体に, TPPase はゴルジ装置, 時にライソソーム, 微絨毛に活性局在を示した。マンノース結合 Con A 結合部位は小胞体, ゴルジ装置, 核膜, 多胞体, 形質膜, 基底膜であり, ガラクトース結合 RCA 結合部位はゴルジ装置, 多胞体, 形質膜, 基底膜であった。内分泌環境により前立腺上皮細胞の形態は著明に変化した。酵素活性局在部位とレクチン結合部位は不変であった。

前立腺上皮細胞のレクチン結合部位を始めて電顕的に検出した。生体膜指標は細胞膜系の消長に対応し, 細胞内膜系と形質膜との関連を示唆した。酵素活性局在と生体膜指標の検出は細胞機能を多面的に表わし, 細胞の構造と機能の関連を解明する有力な手段と考えられる。

結 言

前立腺はアンドロゲン依存性の分泌器官であり内分泌環境に応じて形態と, 機能が変化することが各種動物において知られている¹⁾。ラットでは性成熟に伴う, あるいはテストステロン投与等によるアンドロゲン優位状態が前立腺上皮細胞の機能亢進を来たし¹⁾²⁾, 逆に去勢やエストロゲン投与が機能の低下を来た³⁾⁴⁾。In vitro でもテストステロンは細胞形態の保持に必要であり, エストロゲンは上皮細胞の萎縮と間質の増加を促すことが示されている⁵⁾。

前立腺上皮細胞の機能については電顕的酵素細胞化学によるホスファターゼ活性の検出¹⁾⁶⁾⁷⁾や電顕的オートラジオグラフィによる蛋白合成過程⁸⁾の検索が行なわれている。Okada ら⁷⁾は前立腺上皮細胞においてライソソームの指標となる酸性ホスファターゼ(ACPase)とゴルジ装置の指標となるチアミンピロホスファターゼ(TPPase)活性を検出し, 去勢あるいは去勢後のテストステロン投与によりそれらの酵素活性が細胞形態の変化を反映すると報告した。

一方, 前立腺上皮細胞における形質膜や細胞内膜系などの生体膜の細胞化学的研究は少ない。細胞表面には糖衣(glycocalix)が存在し, これを構成する糖鎖は細胞の分化や情報伝達, 免疫応答などの細胞レベルでの認識過程に関与している⁹⁾。糖鎖の形態学的検出は糖結合特異性をもつレクチンの細胞化学的応用によって可能となった¹⁰⁾。タチナタマ由来マンノース結合concanavalin A (Con A) やヒマ由来ガラクトース結合ヒマ凝集素(*Ricinus communis* agglutinin, RCA)などのレクチンをフェリチン¹¹⁾や西洋わさびペルオキシダーゼ(horseradish peroxidase, HRP)¹²⁾で標識することにより, 各種の糖鎖を電顕的に可視化することが出来る。

レクチン-フェリチン法は生体膜の“膜流動モザイクモデル”(membrane fluid mosaic model)¹³⁾の提唱の契機となった。レクチンを生きた細胞や組織に作用させた場合, その結合部位の分布に移動を生じることが赤血球膜¹⁴⁾, リンパ球膜¹⁵⁾, 甲状腺上皮細胞¹⁶⁾, 癌細胞¹⁷⁾等で検索された。更にレクチンの結合した形質膜の細胞内への取り込み過程¹⁸⁾が示されている。生体膜に関する分子レベルでの研究は進み, 細胞内骨格成分により膜の流動性が調整されていることも知られ, トランスメンブランコントロールの概念へと発展した¹⁵⁾。一方, 固定した組織を標識レクチンと反応させ細胞内の生体膜糖鎖の分布を追求した研究も多い^{19)~22)}。しかし, 前立腺上皮細胞での電顕レベルでの報告は未だ無い。

本研究は各種内分泌環境下でのラット前立腺上皮細胞におけるホスファターゼ活性とレクチン結合部位を電顕的に検索し, これらを指標として細胞構造を機能との関連において追究した。而して, 酵素活性の変化は細胞の形態変化とよく平行することを認めた。また前立腺上皮細胞内における生体膜の糖鎖の分布と性状をはじめて明らかにし, これと細胞機能との関連についても新知見を得たのでここに報告する。

材料と方法

1) 動物実験: 成熟雄性ウィスター系ラット(体重180ないし200g)を用いた。ラットを, ① 無処置成熟ラット(正常群6匹), ② 去勢7日及び28日(去勢群各6匹), ③ 去勢7日又は28日後よりプロピオン酸テストステロンを一匹につき1mg/日を7日間連続筋注投与(回復群各4匹)に分け各群の前立腺腹葉を対象とした。ラットをネブタール腹腔内投与麻醉下にて開腹し前立腺腹葉を摘出し以下の検索に供した。

2) 電顕標本の作成: 細切した前立腺組織を冷1.5%

パラホルムアルデヒドと2%グルタルアルデヒド (GLA) 混液 (8%蔗糖添加) に一夜浸漬固定した。0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) にて3回洗滌し冷1% オスミウム酸溶液にて3時間固定しエタノール脱水、プロピレン置換を行ないエポン812に包埋した。

3) 酵素細胞化学：酸性ホスファターゼ (acid phosphatase, ACPase; EC 3,1,3,2) 活性の検出は β -グリセロリン酸 (第1化学) を基質とする Gomori 法 (1952)²³⁾により、チアミンピロホスファターゼ (thiamine pyrophosphatase, TPPase) 活性の検出はチアミンピロホスフェート (cocarboxylase, Sigma) を基質とする Novikoff & Goldfischer 法 (1961)²⁴⁾にてそれぞれ行なった。

取出した組織を細切し、冷2%GLA (8%蔗糖添加) 溶液中にて60分間前固定し、0.1M カコジル酸緩衝液で3回洗滌した後、厚さ約40 μ mの凍結切片を作成した。切片を再度洗滌した後、酵素反応液中に浸漬した。固定及び浸漬条件は予備実験により決定した。すなわち、2%GLA 溶液による60分間固定、浸漬は37℃にて ACPase は pH 5.0、10分間、TPPase は pH 7.1、20分間である。反応液浸漬終了後、切片は冷1%オスミウム酸溶液にて45分間の後固定を施し、エタノール脱水を経てエポンに包埋した。浸漬終了後の切片の一部は1%硫化アンモニウム液にて2分間発色し洗滌後グリセリンゼリー封入を行ない光学顕微鏡の観察に供した。

酵素活性検出における対照実験は40 μ m 切片を、基質を抜いた反応液 (substrate-free medium) 又は阻害剤添加反応液中にて浸漬した。阻害剤である弗化ソーダを、ACPase に対して最終濃度10mM、TPPase には25mM となるようそれぞれの反応液に添加した。

4) 生体膜糖鎖の細胞化学的検出：レクチンの糖結合特異性を利用し生体膜糖鎖を細胞化学的に検出した。レクチンは Con A (Miles-Yeda) 及び RCA を用い、西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP, Sigma, type II 又は IV) を標示物質とした。Con A 結合部位は Bernhard & Avrameas¹²⁾の二段法、RCA 結合部位は Yokoyama ら²⁵⁾の直接法に従って検出した。RCA は RCA-I (分子量約120,000) を用い予め過ヨウ素酸ソーダ (NaIO₄) 法にて RCA-HRP コンジュゲートを作成した²⁵⁾。一部の実験では E-Y 社製 RCA-HRP 結合物を用いた。

細切した前立腺組織を冷2.5%GLA 溶液にて60分間浸漬前固定し、冷10%dimethyl sulfoxide を含む生食

加リン酸緩衝液 (PBS) 中で一夜洗滌した。更に PBS にて3回洗滌した後に厚さ約40 μ mの凍結切片を作成した。切片とレクチンの反応は Con A-HRP 法では Con A (100 μ g/ml PBS) に4℃にて15ないし20時間行ない、ひきつづき反応液を替え室温にて3時間反応させた。PBS で3回洗滌し HRP (100 μ g/ml PBS) と室温にて40分間反応させた。RCA-HRP 法では切片を RCA-HRP コンジュゲート (150 μ g RCA/ml PBS) に4℃にて15ないし20時間、更に室温にて3時間反応させた。反応終了後の切片を PBS にて3回洗滌し、冷2.5%GLA 溶液にて10分間再度固定した。切片を0.1M Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.6) にて3回洗滌後 DAB 反応²⁶⁾を行ない HRP 活性を検出した。切片を室温にて10分間 DAB 溶液 (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 5mg を Tris 塩酸緩衝液10ml に溶解) に浸漬し、次いで1%過酸化水素を100対1容の割合で添加しさらに5分間反応させた。DAB 反応後切片を1%オスミウム酸溶液にて45分間後固定し、エタノール脱水を経て、エポンに包埋した。DAB 反応後の切片の一部は水洗後グリセリンゼリーに封入し光学顕微鏡用標本を作成した。

細胞化学的対照実験には結合特異性をもつハブテン糖を用いた。Con A-HRP 法では α -メチルマンノサイド (α -methyl mannoside, 最終濃度0.2M) を、RCA-HRP 法ではラクトース (lactose, 最終濃度0.2M) をそれぞれ反応液に添加した。DAB 反応のみの対照実験も行なった。

5) 電顕の観察：樹脂包埋試料より LKB 4801型超ミクロトームを用いて超薄切片を作成した。形態観察用超薄切片には酢酸ウラン及びクエン酸鉛の二重電子染色を、細胞化学用切片にはクエン酸鉛単染色を施し、JEM 100B 又は100C 型透過型電子顕微鏡 (80KV) 下で観察した。

結 果

1. 形態像及びホスファターゼ活性の局在

1) 正常群：前立腺上皮は背の高い一層の円柱上皮細胞よりなる。基底部に位置する核は円形で大きく核質は均質でしばしば核小体がみられる。核上野には発達した粗面小胞体があり槽腔は比較的電子密度の高い物質で満たされる。ゴルジ装置は発達し3ないし5層のゴルジ層板が明瞭であり周辺には多数のゴルジ小胞をみる。ミトコンドリアは大型で細胞体内に散在し、ライソソームは核周辺にあり大きさはほぼ一定である。細胞頂部には分泌空胞もみられ、腔面核質膜には

微絨毛が発達している。側面形質膜は指状嵌合(inter-digitation)によって隣接細胞と相接し、細胞頂部近辺には細胞間結合装置があり閉鎖結合(tight junction)構造がみられる。これらの上皮細胞は腺腔を形成し基底膜の周囲には線維芽細胞、平滑筋、血管などからなる粗な間質がみられる(Fig. 1)。

ACPase 活性局在部位：ライソソーム及びゴルジ層板槽腔内に ACPase 活性局在を示す鉛の沈着をみた(Fig. 2)。ACPase 活性は限界膜に囲まれた dense body にも陽性であった。反応陽性部位における ACPase 活性の反応の強さは均一であった。

TPPase 活性局在部位：TPPase 活性は著るしく発達したゴルジ装置に局在した(Fig. 3)。反応陽性部位はゴルジ層板の内側 2 ないし 3 層の槽腔とゴルジ小胞であった(Fig. 4)。この他に少数のライソソーム及び微絨毛表面に弱いながら TPPase 活性が陽性であった。

2) 去勢群：去勢 7 日後の前立腺は萎縮し、前立腺上皮細胞の丈は低く細胞基質の電子密度は低下し明るい。核は陥凹し、変形と縮小がみられヘテロクロマチンが目立った。核上野にある粗面小胞体は著るしく減少、縮小し、その槽腔は空虚になった。ゴルジ装置は小型化し、層板は数を減じかつ短縮し槽腔内は空虚になった。ミトコンドリアは小型で数も減少した。一方、ライソソームは増加、増大しその大きさは不揃いであった。腔面形質膜では微絨毛の短縮と減少がみられ、側面形質膜の突起は減少したが細胞間結合装置は保たれていた(Fig. 5)。去勢 28 日では上皮細胞の萎縮と細胞内小器官の退縮及び核の変化が更に著明となった。

ACPase 活性局在：去勢群においても活性はライソソームとゴルジ装置に陽性であった。ライソソームは細胞基質に比べて大きな面積を占めることが ACPase 活性局在からも示された。核周辺にある退縮したゴルジ装置の槽腔内に ACPase 活性が僅かに局在した(Fig. 6)。

TPPase 活性局在部位：小型化したゴルジ装置の層板は 2 ないし 3 層に減り、ここに TPPase 活性が残存した。微絨毛表面にも僅かながら TPPase 活性が認められた(Fig. 7)。

3) 回復群：テストステロン投与 1 週間後には前立腺は正常大になり上皮細胞は正常細胞に一見類似する。しかし、細胞基質はなお電子密度が低く、核は不整形であり基底部形質膜から離れて存在した。粗面小胞体とゴルジ装置は増加増大したがこれらの槽腔は拡張し

空虚であった。ミトコンドリアは大型で増加の傾向にあるがライソソームはなお大小不揃いであった。細胞間の指状嵌合は減少したが細胞間結合装置は保たれ、微絨毛は増加、発達を示した。

ACPase 活性局在部位：大小不揃いのライソソームとゴルジ装置に ACPase 活性は陽性であり、その局在は正常と同様の分布を示した。

TPPase 活性局在部位：ゴルジ層板の内側 2 ないし 3 層の槽腔に TPPase 活性は局在した。微絨毛表面にも活性は陽性であった(Fig. 8)。

4) 酵素細胞化学的対照実験：酵素反応液から基質をぬいた実験では各群とも ACPase 及び TPPase 活性は陰性であった。阻害剤である弗化ソーダを反応液に添加すると ACPase 及び TPPase は完全に抑制された。

2. 生体膜糖鎖の細胞化学的検出：レクチン—ペルオキシダーゼ法での糖鎖局在部位は HRP 活性で示され DAB 反応の結果オスミウム黒として検出される。予備実験によって Con A-HRP 及び RCA-HRP は組織切片内への浸透に乏しいことが判明した。反応は組織切片辺縁の数層の細胞に限られ、切片中央部では反応は陰性であった。そこで切片辺縁を確認しつつ観察を行なった。

1) Con A 結合部位：正常前立腺上皮細胞における Con A-HRP 陽性部位は微絨毛を含む腔面形質膜外側(Fig. 9)、側基底面形質膜外側、粗面小胞体の槽面膜と槽腔内(Fig. 9&10)、核膜とその槽腔内(Fig. 10)、ゴルジ装置の槽面膜と槽腔内(Fig. 11)、多胞体(Fig. 11)、基底膜などであった。しかし、ミトコンドリア、核質、細胞基質では陰性であった。側面形質膜は Con A-HRP 陽性であるが、しばしば陽性部位は腔面形質膜にだけ限られ細胞間結合装置と基底部形質膜間の側面形質膜では反応陰性を示す部位があった。同一組織切片においても Con A-HRP 陽性細胞と陰性細胞は共存し、また陽性細胞においても Con A 反応陽性の小胞体膜と陰性の小胞体膜とは常に混在していた。

去勢後の萎縮した前立腺上皮細胞でも Con A-HRP 陽性部位は小胞体とゴルジ装置の槽面膜及び槽腔内、核膜とその槽腔内、腔面及び側基底面形質膜外側、多胞体、基底膜などであった(Fig. 12)。

テストステロン投与による回復群においても Con A-HRP 陽性部位は小胞体、核膜、形質膜(Fig. 13)、ゴルジ装置、多胞体、基底膜であった。しかし、回復群における小胞体での Con A-HRP の局在様式には細胞

附 圖 說 明

Fig. 1 The epithelial cells of normal ventral prostate from adult rat. Tall columnar cells with large nucleus have a large amount of rough endoplasmic reticulum and a prominent Golgi apparatus in the supranuclear region of the cytoplasm. $\times 3,000$

Fig. 2 ACPase activities of the normal rat prostatic epithelial cells. Reaction products localized in lysosomes and in Golgi cisternae. $\times 30,000$

Fig. 3 TPPase activities in the normal rat prostatic cells. Lead precipitates indicating TPPase activities are found in the cisternae and vesicles of well-developed Golgi apparatus. $\times 10,000$

Fig. 4 TPPase activities in the normal rat prostatic cells. The activities are positive in 2 to 3 layers of Golgi cisternae and in vesicles. $\times 30,000$

Fig. 5 Prostatic epithelial cells of rat castrated for 7 days. The reduction of cell size and involution of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are marked. $\times 9,000$

Fig. 6 ACPase activities in the prostatic cells of a rat castrated for 28 days. Large lysosomes have ACPase activities and weak reaction products are seen in cisternae of involuted Golgi apparatus. N ; nucleus. $\times 14,000$

Fig. 7 TPPase activities in the prostatic epithelial cells from a rat castrated for 7 days. The activities are seen in one to two layers of Golgi cisternae, although the apparatus are markedly reduced in size. $\times 34,000$

Fig. 8 TPPase activities in prostatic epithelial cells of the rat castrated for 7 days and followed by testosterone administration. The Golgi apparatus recovered its size and the exzyme activities are found in the several Golgi cisternae and on the apical plasma membrane. $\times 12,000$

Fig. 9 Con A-HRP staining in the prostatic epithelial cells of adult rat. Con A binds the outer surface of apical plasma membrane and the cisternal side of endoplasmic membrane. $\times 25,000$

Fig. 10 Con A-HRP staining in the normal rat prostatic epithelial cells. Staining is positive in the cisternae and on the cisternal side of the membrane of rough endoplasmic reticulum and nuclear envelope. N ; nucleus. $\times 30,000$

Fig. 11 Con A-binding sites in the normal rat prostatic epithelial cells are in the cisternae and vesicles of Golgi apparatus and multivesicular bodies. $\times 34,000$

Fig. 12 Con A staining of the rat prostatic epithelial cells 7 days after castration. Con A stains membranes of rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus as well as all portions of plasma membranes. Basement membrane is also positively stained. N ; nucleus. $\times 14,000$

Fig. 13 Con A staining in the prostatic epithelial cells of the rat castrated for 7 days and subsequently testosterone administered. Con A-binding sites are seen in dilated cisternae of endoplasmic reticulum and in nuclear envelope. The binding sites are also seen in the cell at the left upper corner. But a cell between these two cells is not stained. N ; nucleus. $\times 9,000$

Fig. 14 RCA-HRP staining in rat prostatic epithelial cells. Positive binding sites are seen in Golgi cisternae and in multivesicular bodies. $\times 15,000$

Fig. 15 RCA-HRP staining in rat prostatic epithelial cells after 7-days castration. Positive sites are seen on the inner surface of the membrane of dilated Golgi cisternae and on the plasma membrane. N ; nucleus. $\times 23,000$

Fig. 16 RCA-HRP staining in the prostatic epithelial cells castrated for 7-days and followed by testosterone administration. Positive sites are on the surface of apical and lateral plasma membrane and on the inner surface of Golgi cisternae. $\times 25,000$

Fig. 17 Schematic representation of positive sites for Con A and RCA in rat prostatic epithelial cells. BM denotes basement membrane, G ; Golgi apparatus, LY ; lysosome, M ; mitochondria, MV ; microvilli, MVB ; multivesicular body, N ; nucleus, RER ; rough endoplasmic reticulum, TJ ; tight junction, respectively.

間に相違があった。正常細胞と同様の槽腔に均質な内容をもつ細胞と拡張した空虚な槽腔内に Con A-HRP 反応産物が顆粒状に分布する細胞がみられ、しばしば両者は共存していた (Fig. 13)。

2) RCA 結合部位：正常前立腺上皮細胞における RCA-HRP 陽性部位はゴルジ装置の槽面膜、多胞体 (Fig. 14) の他に微絨毛を含む腔面形質膜と側基底面形質膜外側及び基底膜であった。小胞体膜と核膜は陰性であった。去勢群において RCA-HRP 結合部位は小型化した空虚なゴルジ層板の槽面膜と腔面及び側基底面形質膜外側であった (Fig. 15)。回復群における実験では拡張したゴルジ層板と小胞の槽面膜及び腔面形質膜外側 (Fig. 16)、更に側基底面形質膜外側、多胞体、基底膜に RCA-HRP は陽性であった。

レクチン-HRP 法における対照実験：Con A の競合阻害剤 α -メチルマンノサイド、RCA の競合阻害剤 ラクトースを加えた反応液中の浸漬では Con A-HRP、RCA-HRP の両反応はそれぞれ抑制された。DAB 反応のみを行なった場合も膜系に陽性所見は認められなかった。

考 察

前立腺はアンドロゲン依存性の器官であり、その形態と分泌機能は内分泌環境に応じて変化する。去勢により縮小した前立腺はテストステロン投与により形態と機能を回復する¹⁾²⁾。前立腺の微細構造はラット、マウス、イヌ等の動物とヒトにおいて観察され¹⁾、去勢やエストロゲン、アンドロゲン投与時の形態と ACPase

などの酵素局在との関連が検索された¹⁾³⁾⁷⁾。

ラット前立腺上皮細胞の微細構造をみると正常前立腺上皮細胞は背の高い一層の円柱上皮細胞であり発達した粗面小胞体とゴルジ装置、多数の大きなミトコンドリア及び大きな円形の核が特徴である。これらの形態より前立腺上皮細胞は活発な分泌機能を有することが推察される。

去勢7日後の上皮細胞は萎縮し、細胞基質の電子密度は低下する。細胞内小器官の変化は著しく粗面小胞体の縮小、ゴルジ装置の退縮とそれらの槽腔の拡張と虚脱が目立つ。更に核の縮小とミトコンドリアの小型化と減少、微絨毛の短縮と減少が起こる一方、ライソソームは増加増大を示し、これらの所見はこれまでの報告¹⁾³⁾⁷⁾²⁷⁾に類似した。これは前立腺上皮細胞の機能低下を示唆する形態である。

去勢により萎縮した前立腺上皮細胞はテストステロン(1mg/日)の7日間投与により形態の回復を示した。上皮細胞は増大し、粗面小胞体とゴルジ装置は著明に発達しミトコンドリアは大型で細胞体内に散在する。しかし、小胞体とゴルジ層板の槽腔はなお分泌物に乏しく、核は去勢群に比べて大きいものの不整形であり基底面形質膜から離れた位置にあった。こうした所見は去勢群と正常群の中間の形態を示し、細胞機能が回復しつつある状態にある²⁾と考えられた。これに対して Okada ら⁷⁾は去勢1週後よりテストステロン(2mg/日)を14日間投与すると前立腺上皮細胞は正常の細胞形態に回復すると述べており本実験の結果とは相

違した。これはテストステロン投与期間の差によるものと推察された。

前立腺上皮細胞における ACPase 活性はライソソーム、多胞体、ゴルジ装置に局在した。ACPase 活性局在に関して Helminen ら²⁸⁾はゴルジ層板、分泌顆粒、細胞頂部の空胞に活性陽性と述べ、Okada ら⁷⁾はライソソーム、ゴルジ層板と小胞、多胞体に陽性と報告している。しかし、今回の検索では分泌顆粒に ACPase 活性はみられなかった。前立腺上皮細胞の ACPase は生化学的には分泌型とライソソーム型に分けられ²⁹⁾、その分泌様式は超微構造²⁸⁾及びオートラジオグラフィ⁸⁾、凍結割断法³⁰⁾などによる結果より merocrine 型分泌であると示唆されている。前立腺性酸性ホスファターゼ (prostatic acid phosphatase) に対する特異的基質の検索が進められ³¹⁾、近年 Serrano ら³²⁾は生化学的に前立腺性酸性ホスファターゼに特異的な基質である phosphoryl choline を用いて酵素組織化学的に分泌顆粒を検出した。しかし、phosphoryl choline が前立腺性酸性ホスファターゼに特異的とする彼らの報告を生化学的に否定する報告³³⁾もあり、酵素細胞化学的にも特異性に疑問をもつ報告³⁴⁾³⁵⁾が出され尚議論の余地が残されている。

前立腺上皮細胞における TPPase 活性はゴルジ層板の内側 (trans 側) の 1 ないし 3 層とゴルジ小胞に局在し、ゴルジ装置の形態変化に対応した。去勢後の著明に退縮したゴルジ層板の 2 ないし 3 層に TPPase 活性は存続しており、これは去勢によって TPPase 活性陰性のゴルジ層板が退縮消失したことを示す所見と考えられる。TPPase はチアミン (ビタミン B₁) の活性型であるチアミンピロホスフェートをチアミンモノホスフェートに変換する。チアミンピロホスフェートは糖代謝酵素群の補酵素であり、ピルビン酸とアセチル CoA の生成に関与し、ひいては TCA 回路の流速に影響を与える。従って、TPPase 活性局在は糖代謝状態を反映すると考えられる。ゴルジ装置における TPPase 活性の量は細胞内での糖代謝状態を示し、去勢時にはゴルジ装置の退縮と TPPase 活性の減少がみられ、糖代謝が低下していることを示唆した。

ゴルジ装置の機能³⁶⁾は分泌顆粒形成、細胞膜への糖鎖の組み込み、ライソソーム形成、膜系の再利用などである。ゴルジ装置ではオスミウム好性部位や TPPase、ACPase などの酵素活性局在部位が細胞化学的に検索された。各指標の局在は相違し、ゴルジ装置にも形態的及び機能的極性³⁷⁾があると考えられ、ゴ

ルジ装置の極性の機能的意義は今後とも解明すべき重要な問題である。今回、TPPase 活性が微絨毛表面にも検出され、特に回復群で強い反応をみた。これはゴルジ膜と形質膜との関連性を酵素細胞化学的に示唆するものである。

生体膜の構造と機能は生体膜糖鎖の分布や性状及び移動などの検索からも解明されつつある。生体膜糖鎖の検出はレクチンを用いた細胞化学によっても可能である。レクチンは特定の糖構造と特異的に結合する蛋白質であり、細胞化学的分野に応用することにより、生体膜を構成する各種複合糖質糖鎖の形態学的検出が行われてきた¹⁰⁾³⁸⁾³⁹⁾。標識 (marker) としてフェリチン¹¹⁾やペルオキシダーゼ¹²⁾などが用いられる。レクチン結合部位は、フェリチン法では粒子で、ペルオキシダーゼ法では酵素反応産物であるオスミウム黒としてそれぞれ示される。このため後者では鋭敏度は高いが局在性の点で劣り、且定量性は少ないと考えられている¹⁰⁾。

固定した細胞や組織では Con A は形質膜と細胞内膜系に結合する¹²⁾。ラット小脳プルキニエ細胞では、Con A は核膜、ゴルジ膜、小胞体の槽面に結合する。また、細胞突起内では Con A 反応陽性部位が連続しており、細胞内での物質輸送に関連すると考えられる¹⁹⁾。腎糸球体²⁰⁾では小胞体、ゴルジ装置及び係蹄基底膜に、ラット肝細胞²¹⁾では形質膜、小胞体膜及びゴルジ膜に一致してそれぞれ Con A-HRP 反応陽性である。ヒト下垂体腺腫²²⁾においては Con A が形質膜と小胞体、ゴルジ膜、核膜などの細胞内膜系に陽性であり、レクチン結合部位と分布による下垂体腺腫の組織型分類が試みられている。更に RCA-HRP 法は腎、副睾丸、消化管、神経等の組織において形質膜、ゴルジ膜、多胞体を染色することが分かり、本法はゴルジ膜の新しい細胞化学的染色法になることが示されている²⁵⁾。

一方、レクチンを生きた細胞に作用させることによって、その結合部位の分布と移動が細胞化学的に検索された。レクチン-フェリチン法による実験から生体膜は二層の脂質層とそこに浮ぶ蛋白分子からなり、その蛋白分子は脂質層を移動すると考える生体膜の“膜流動モザイクモデル”が提唱された¹³⁾。赤血球膜ではレクチンの結合によって膜流動性の上昇、膜代謝の亢進、膜内粒子の再配置を来す¹⁴⁾。リンパ球膜¹⁵⁾では膜表面のレクチンレセプターが移動し cap 形成が起こる。これはレクチンがリンパ球膜を構成する高分子を架橋するためと考えられる。甲状腺小胞上皮細胞で

は形質膜の極性がレクチン結合部位の分布から指摘され、かつ機能亢進状態では結合部位が増加する¹⁶⁾。このように細胞膜表面の変化の他に、形質膜の細胞内への取り込み過程¹⁸⁾が示される。肝由来の培養細胞では Con A 結合形質膜は細胞内への陥入内在化 (internalization)、エンドサイトーシス (endocytosis) によりゴルジ装置に運ばれ、形質膜とゴルジ膜間の“膜の再利用”過程が示唆された¹⁸⁾。更に悪性腫瘍細胞においてはヒト尿路移行上皮癌細胞形質膜はレクチンの作用によって陥入内在化すると共に、レクチン結合部位の側方移動がみられ、癌細胞での膜流動性の亢進が示されている¹⁷⁾。

このようにレクチンの細胞化学は生体膜糖鎖の分布と性状を示し、未固定の細胞では生体膜の分子レベルでのダイナミックな変化を形態的に検出した。更に形質膜と細胞内膜系での膜糖鎖の性状、ひいては両者間の膜の移送過程を示した。従って、レクチンの細胞化学は生体膜の機能と分子レベルでの形態との関連性を解明する上で極めて有力な研究手段と考えられる。

本研究はラット前立腺上皮細胞のレクチン結合部位を明らかにした (Fig. 17)。マンノース系糖鎖と結合する Con A の HRP 法による陽性部位は形質膜、小胞体膜、ゴルジ膜、核膜、多胞体および基底膜である。これに対して RCA-HRP 陽性部位で示されるガラクトース系糖鎖は形質膜、ゴルジ膜、多胞体、基底膜に分布する。このようにラット前立腺上皮細胞での生体膜糖鎖の分布と性状は膜系によって若干の相違がみられた。Con A と RCA の結合部位に関して、Hirano ら⁴⁰⁾は細胞分画法によりミエローマ細胞の膜分画をつくり滑面膜には Con A と RCA、粗面膜には Con A が結合することを示した。固定した組織では Con A 結合部位^{9)12)19)~22)41)}は形質膜、ゴルジ膜、小胞体膜、核膜、多胞体であり、RCA 結合部位²⁵⁾は形質膜、ゴルジ膜、多胞体であると報告されている。今回の前立腺上皮細胞における Con A 及び RCA 結合部位の検索結果はそれらの報告に一致した。去勢群及び回復群においても Con A と RCA 結合陽性部位の分布は正常群と同様であった。従って、前立腺上皮細胞の形態は内分泌環境下で著明に変化するが、形質膜と細胞内膜系での糖鎖の分布と性状は変わらないことが明らかになった。これらの膜系の分子レベルでの基本的構造は常に一定であることが推測された。更に RCA-HRP は内分泌環境によるゴルジ装置の消長に対応して変化した。これは RCA-HRP 染色法がゴルジ膜の指標になりう

るとする Yokoyama らの報告²⁵⁾を裏付けるものである。

Con A-および RCA-HRP 陽性を示すオスミウム黒は去勢群において淡く、槽腔内での分泌物の量が減少したと考えられる。一方、回復群において粗面小胞体槽腔内での Con A-HRP 陽性を示すオスミウム黒が均一に分布する細胞と拡張した槽腔の膜に沿って顆粒状に分布する細胞がある。この所見は粗面小胞体が先に増殖し、そこで増加する糖蛋白の量がなお少ない状態、或いは回復期の細胞では固定条件により槽腔内の物質が漏失しやすいなどの原因が考えられる。このように Con A-HRP 反応物質の量は去勢群、回復群において低下しており、更にフェリチン法などの定量的解析を試みる必要があろう。

本研究におけるレクチン結合部位の検索から生体膜糖鎖の付加及び形質膜の糖鎖合成の過程が推測された。粗面小胞体において膜のペプチド鎖にマンノースが付加され、ついでゴルジ装置にてガラクトースが付加される。そして、ゴルジ膜は形質膜へ運ばれると推察され、これは平野ら⁴¹⁾の生体膜の生合成過程の見解を支持する所見である。すでにオートラジトグラフィ⁴²⁾を用いた研究は糖蛋白合成において³H-ガラクトースはゴルジ装置を通過し、糖衣の合成では³H-フコース、³H-マンノースがゴルジ装置を経ることが示されている。又、粗面小胞体における Con A-HRP 陽性はマンノース残基の局在を示し、糖蛋白合成の初期をとらえるとも考えられる²²⁾。RCA-HRP はゴルジ膜と形質膜に陽性である。これは生化学的にガラクトースがゴルジ膜と形質膜に豊富であり、かつ galactosyl transferase がゴルジ分画に富むことから裏付けられる²⁵⁾。近年、ゴルジ装置が形質膜の新生と再利用の中心となることがレクチン¹⁸⁾やカチオン化フェリチン⁴³⁾と結合した形質膜の細胞内への取り込みから明らかにされた。更に生体膜糖鎖はアピニン・ビオチン系を用いても検出可能であり⁴⁴⁾、今後生体膜に関する細胞化学的研究⁴¹⁾が急速に進むことが期待される。

レクチン結合陽性部位と酵素局在の関連は必ずしも明確でない。神経細胞における Con A 結合陽性部位と ACPase 活性局在部位の比較⁴⁵⁾が検討されているが同様の研究報告は少ない。粗面小胞体槽腔にはマンノース系糖鎖をもつ糖蛋白の貯留が Con A-HRP 陽性から明らかである。ACPase は Con A 親和性の糖蛋白であり⁴⁶⁾、この粗面小胞体槽腔内に検出された糖蛋白は前立腺性酸性ホスファターゼ或いはその前駆物質の可能

性がある。従って、酵素組織化学により検出されるライソソーム ACPase と粗面小胞体における Con A-HRP 陽性物質は前立腺上皮細胞における ACPase あるいは糖蛋白の合成と分泌の指標となると考えられる。特に去勢後の粗面小胞体での Con A-HRP 陽性物質の減少とライソソームでの ACPase 活性の増強は分泌型前立腺性酸性ホスファターゼの減少を伴う上皮細胞の退行性変化を示唆すると考えたい。ゴルジ装置におけるレクチン結合陽性は生体膜への糖付加及び糖蛋白の局在を示す一方、チアミンピロホスフェートの局在が TPPase 活性からも証明され両指標とも細胞の糖代謝を反映すると考えられる。今回の検索において TPPase 活性がゴルジ装置及び形質膜外側に局在し、特に回復群での微絨毛表面の活性は強く、これは形質膜の形成が活発な状態にあると推察された。すでに 5'-nucleotidase 活性の検出からゴルジ装置が形質膜の合成に重要であることが示唆されている⁴⁷⁾。更に前立腺上皮細胞において 5'-nucleotidase 活性がゴルジ装置に陽性であること⁶⁾や TPPase, nucleoside diphosphatase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase 活性がそれぞれゴルジ層板に陽性を示すことから酵素組織化学的に形質膜の合成過程の追究⁴⁸⁾が可能と考えられる。従って、本研究における TPPase 活性が微絨毛に陽性であることはこの方面からも形質膜合成過程の検索を示唆し、レクチン結合陽性部位の検出による生体膜の移送過程との比較検討は重要である。生体膜複合糖質糖鎖構造の検出は生体膜機能と構造を明らかにし、酵素活性局在との対応は細胞の機能と構造との関連を多面的に解明する極めて有力な検索手段になると考えられる。

結 語

ラット前立腺上皮細胞の細胞化学的研究を行ない細胞の形態と機能の関連を検索した。成熟雄性ウィスター系ラットを正常群(無処置)、去勢群(去勢7日又は28日)、回復群(去勢7日又は28日以降プロピオン酸テストステロン1mg/日を7日間投与)に分けそれぞれの前立腺組織を超微形態観察、酵素細胞化学、レクチンを用いた生体膜糖鎖検出の実験に供した。

超微形態観察：正常前立腺上皮細胞は円柱上皮細胞であり核は大きく粗面小胞体とゴルジ装置が発達した分泌機能亢進の細胞形態である。去勢群では上皮細胞は萎縮し、核の縮小、粗面小胞体とゴルジ装置の著明な退縮と減少、ミトコンドリアの小型化と減少、ライソソームの増加を来した機能低下の形態を示した。回

復群では上皮細胞は正常細胞に近い形態を示したが核の変形、粗面小胞体とゴルジ装置の槽腔の拡張と虚脱が認められた。テストステロンの7日間投与では細胞形態は急速に回復したもののこれらの点において正常細胞とはなお相違が認められた。

酵素細胞化学：前立腺上皮細胞における ACPase 活性はライソソーム、ゴルジ装置、多胞体に局在した。去勢群では ACPase 活性はライソソームで増加し、ゴルジ装置では退縮した層板に極く僅かな活性が残った。回復群では大小のライソソームとゴルジ装置に ACPase 活性がみられた。TPPase 活性はゴルジ層板と小胞、一部のライソソームに局在した。去勢群では退縮したゴルジ装置に弱い TPPase 活性が局在した。これに対して回復群では増大したゴルジ層板と微絨毛表面に強い TPPase 活性を検出した。内分泌環境下の細胞の形態変化に応じて ACPase 及び TPPase 活性陽性を示す細胞内小器官の量は変化した但这些の酵素局在部位は不変であった。微絨毛表面における TPPase 活性局在はゴルジ装置と形質膜との関連を示唆する酵素細胞化学的所見と考えられる。

生体膜糖鎖局在部位の検出：レクチンを用いた細胞化学により、前立腺上皮細胞における生体膜複合糖質糖鎖構造をはじめて電顕的に検出した。マンノース系糖鎖局在を示す Con A-HRP 陽性部位は粗面及び滑面小胞体膜、ゴルジ膜、核膜、多胞体膜、形質膜外側及び基底膜であった。ガラクトース系糖鎖局在を示す RCA-HRP 陽性部位はゴルジ膜、多胞体膜、形質膜外側及び基底膜であった。従って、糖鎖の分布と性状は細胞内膜系により相違があった。しかし、去勢群及び回復群において形態像が変化しても各膜系のレクチン結合パターンは変わらず、生体膜を構成する複合糖質糖鎖構造、ひいては基本的な分子レベルの構造は保持されたと考えられた。各膜系の糖鎖の検出は粗面小胞体においてマンノースが、ゴルジ装置においてガラクトースがそれぞれ生体膜に付加されると推測される。更に生体膜生合成過程に際して粗面小胞体、ゴルジ装置を経て形質膜に達する経路を示唆するものである。

酵素細胞化学と生体膜糖鎖分布の比較：粗面小胞体槽腔内に検出された Con A-HRP 反応陽性物質は酵素細胞化学では検出されない分泌型 ACPase である可能性がある。その量とライソソーム ACPase の増減は細胞の分泌機能を反映すると考えられる。ゴルジ装置における ACPase と TPPase の活性局在とマンノースとガラクトースの分布とはゴルジ装置の機能的局在

を酵素及び生体膜レベルで明らかにしようと考える。レクチン細胞化学はゴルジ膜と形質膜の関連性を示したが、回復群における微絨毛表面の強い TPPase 活性は酵素細胞化学的にも両膜系の関連を示唆するものであり今後の検討が待たれる。

酵素細胞化学的指標と生体膜糖鎖系指標の比較対応は細胞の微細構造と機能の関連性を形態学的に一層明らかにする有力な検索手段になると考えられた。

本論文の要旨は第44回日本泌尿器科学会東部連合総会(昭和54年10月5～6日)、第68回日本泌尿器科学会総会(昭和55年4月2～5日)及び第21回日本組織細胞化学会(昭和55年10月23～24日)において発表した。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った恩師新島端夫教授、直接御指導いただいた横山正夫助教授ならびに技術的御指導、御助言をいただいた杏林大学医学部解剖学教室 平野 寛教授に感謝いたします。西山文朗博士(杏林大学解剖学教室)、福田 稔氏、大里行弘氏(同大学医学部電顕室)、黒沢園子氏(東大分院泌尿器科)各位の技術的援助に感謝いたします。常に御協力を惜しまれなかった東京大学泌尿器科の諸先生方に謝意を表します。

文 献

- 1) Brandes, D.: The fine structure and histochemistry of prostatic gland in relation to sex hormones. *Int. Rev. Cytol.*, **20**, 207—276, 1966.
- 2) Tuohimaa P.: Control of cell proliferation in male accessory sex glands. in *Male Accessory Sex Glands*, ed. by Spring-Milles, E. and Hafez, E.S.E., 1st ed., p. 131—153, North Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1980.
- 3) Kirchheim, D. and Scott, W.W.: The effects of castration and sex hormones upon aminopeptidase and phosphatases of the rat prostate. *Invest. Urol.*, **2**, 393—404, 1965.
- 4) Thompson, S.A., Rowley, D.R. and Heidger, P. M. Jr.: Effects of estrogen upon the fine structure of epithelium and stroma in the rat ventral prostate gland. *Invest. Urol.*, **17**, 83—89, 1979.
- 5) Feyel-Cabanes T., Secchi, J., Rabel, P. and Baulieu, E.-E.: Combined effects of testosterone and estradiol on rat prostate in organ culture. *Cancer Res.*, **38**, 4126—4134, 1978.
- 6) Mao, P., Nakao, K. and Angrist, A.: Acid phosphatase and 5-nucleotidase activities of human nodular prostatic hyperplasia as revealed by electron microscopy. *Lab. Invest.*, **15**, 422—434, 1966.
- 7) Okada, K., Yokoyama, M., Tokue, A. and Takayasu, H.: Ultracytochemical and morphological studies of some phosphatases in the epithelial cells of the rat ventral prostate under various hormonal conditions. *J. Electron Microsc.*, **23**, 277—284, 1974.
- 8) Flickinger C.J.: Protein secretion in the rat ventral prostate and the relation of Golgi-vesicles, cisternae and vacuoles, as studied by electron microscope radioautography. *Anat. Res.*, **180**, 427—447, 1974.
- 9) 平野 寛: 細胞表面の糖鎖と認識. *代謝*, **14**, 1743—1754, 1977.
- 10) 入村達郎, 平野 寛: レクチンの細胞化学的応用. レクチン. 大沢利昭, 森 良一編, p. 74—97, 講談社サイエンティフィク, 東京, 1976.
- 11) Nicolson, G.L. and Singer, S.J.: Ferritin conjugated plant agglutinin as specific saccharide stains for electron microscopy: Application to saccharides bound to cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 942—945, 1971.
- 12) Bernhard, W. and Avrameas, S.: Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A. *Exp. Cell Res.*, **64**, 232—236, 1971.
- 13) Singer, S.J. and Nicolson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720—731, 1972.
- 14) Nakajima, M., Tamura, E., Irimura, T., Toyoshima, S., Hirano, H. and Osawa, T.: Mechanism of the concanavalin A induced change of membrane fluidity of chicken erythrocytes. *J. Biochem.*, **89**, 665—675, 1981.
- 15) Nicolson, G.L.: Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. 1. Cytoplasmic influence over cell surface components. *Biochem. Biophys. Acta*, **475**, 57—108, 1976.
- 16) Nishiyama, F. and Hirano, H.: Changes in lectin-binding sites on the thyroid follicle cell surface shown by ferritin-labeling technique. *Cell Struct. Funct.*, **5**, 335—346, 1980.
- 17) Yokoyama, M.: An electron microscopic study on the lectin-binding sites and their mobility in human and rat urologic tumor cells. *Acta Histochem. Cytochem.*, **13**, 139—153, 1980.
- 18) Roth, J.: Membrane internalization into the Golgi apparatus by concanavalin A induces a compensatory membrane biogenesis and membrane exocytosis. *Exp. Pathol.*, **14**, 351—354, 1974.
- 19) Wood, J.G., McLaughlin, B.J. and Barber, R.P.: The visualization of concanavalin A binding sites in Purkinje cell somata and dendrites of rat cerebellum. *J. Cell Biol.*, **63**, 541—549, 1974.

- 20) Bretton, R. and Bariety, J.: A comparative ultrastructural localization of concanavalin A, wheat germ and ricinus communis on glomeruli of normal rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 1093—1100, 1976.
- 21) Guillouzo, A. and Feldman, G.: Surface and intracellular localization of concanavalin A binding sites in rat liver cells. *J. Histochem. Cytochem.*, **25**, 1303—1310, 1977.
- 22) 堀 智勝, 松谷雅生, 寺尾栄夫, 田村 晃, 佐野圭司, 西山文朗, 平野 寛: ヒト下垂体腺腫のレクチンによる電顕的研究. *神経外科*, **19**, 1183—1195, 1979.
- 23) Gomori, G.: In *Microscopic Histochemistry, Principles and Practice*, p. 139, Univ. Chicago Press, Chicago, 1952.
- 24) Novikoff, A.B. and Goldfischer, S.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **47**, 802—810, 1961.
- 25) Yokoyama, M., Nishiyama, F., Kawai, N. and Hirano, H.: The staining of Golgi membrane with ricinus communis agglutinin-horseradish peroxidase conjugate in mice tissue cells. *Exp. Cell Res.*, **125**, 47—53, 1980.
- 26) Graham, R.C. Jr. 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.
- 27) Paris, J.E., Brandes, D., Anton, E.B. and Barnard, S.: Effects of castration on histochemistry and biochemistry of acid hydrolases in rat prostate gland. *J. Cancer Inst.*, **49**, 1685—1696, 1972.
- 28) Helminen, H.J. and Ericson, J.L.E.: On the mechanism of lysosomal enzyme secretion. Electron microscopic and histochemical studies on the epithelial cells on the rat ventral prostate lobe. *J. Ultrastr. Res.*, **33**, 523—549, 1970.
- 29) Vanha-Pertulla, T., Mierni, P. and Helminen, H.J.: Separate lysosomal and secretory acid phosphatases in rat ventral prostate. *Invest. Urol.*, **9**, 345—352, 1972.
- 30) Kachar, B. and Pinto, da Silvia, P.: Freeze-fracture study of rat ventral prostate: Secretory mechanism in the epithelial cell. *Anat. Rec.*, **198**, 549—565, 1980.
- 31) Roy, A.V., Brower, M.E. and Hayden, J.E.: Sodium thymolphthalein monophosphate: A new acid phosphatase substrate with greater specificity for the prostatic enzyme in serum. *Clin. Chem.*, **17**, 1093—1102, 1971.
- 32) Serrano, J.A., Shannon, W.A. Jr., Sternberger, N.J., Wasserkrug, N.L., Serrano, A.A. and Seligman, A.M.: The cytochemical demonstration of prostatic acid phosphatases using a new substrate, phosphorylcholine. *J. Histochem. Cytochem.*, **24**, 1046—1056, 1976.
- 33) Helms, S.R., Brattain, M.G., Pretlow, T.G. II and Kreisberg, J.I.: "Prostatic acid phosphatase" a comparison of acid phosphatase activities in epithelial cells, granulocytes, monocytes, lymphocytes, and platelets purified by velocity sedimentation in isokinetic gradients of Ficoll in tissue culture medium. *Am. J. Path.*, **83**, 529—537, 1977.
- 34) Shofield, B.H., McDonald, D.F. and Geffert, M. A.: Acid D-ephedrine-O-phosphatase activities in rat ventral prostate lysosomes. *J. Histochem. Cytochem.*, **26**, 193—195, 1978.
- 35) Seitz, J. and Aumüller, G.: Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases. I. Cytochemistry and isoelectric focussing of acid phosphatases of the rat ventral prostate. *Histochemistry*, **67**, 99—111, 1980.
- 36) 藤田尚男: ゴルジ装置—微細形態から. *生体の科学*, **31**, 2—11, 1980.
- 37) Hand, A.K. and Oliver, C.: Relationship between the Golgi apparatus, GERL, and secretory granules in acinar cells of the rat exorbital lacrimal gland. *J. Cell Biol.*, **74**, 399—413, 1977.
- 38) 平野 寛: レクチンの組織細胞化学的応用. *組織細胞化学1981*, 日本組織細胞化学会編, p. 17—39, 学際企画, 東京, 1981.
- 39) 村田長芳: 標識レクチンの糖組織化学への応用. *組織細胞化学1982*, 日本組織細胞化学会編, p. 111—128, 学際企画, 東京, 1982.
- 40) Hirano, H., Parkhouse, B., Nicolson, G.L., Lennox, E.S. and Singer, S.J.: Distribution of saccharide residues on membrane fragments from myeloma-cell homogenate: Its implications for membrane biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2945—2949, 1972.
- 41) 平野 寛, 高田邦昭, 川上速人, 西山文朗: 免疫細胞化学的にみた細胞膜. *細胞*, **14**, 126—134, 1982.
- 42) 斉藤多久馬, 松下正也: ゴルジ装置の細胞化学. *生体の科学*, **31**, 12—21, 1980.
- 43) Takata, K., Nishiyama, F. and Hirano, H.: A double labeling study of anionic sites and Con A-binding sites in monkey macrophages. *J.*

- Histochem. Cytochem., 29, 858—863, 1981.
- 44) Hsu, S.M. and Baine, L.: Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 30, 157—161, 1982.
- 45) Gonatas, N.K., Kim, S.U., Stieber, A. and Avrameas, S.: Internalization of lectins in neuronal GERL. *J. Cell Biol.*, 73, 1—13, 1977.
- 46) Lee, C-I., Wang, C.W., Murphy, G.P. and Chu, T. M.: A solid-phase fluorescent immunoassay for human prostatic acid phosphatase. *Cancer Res.*, 38, 2871—2878, 1978.
- 47) Morre, D.J., Merlin, L.M. and Keenan, T.W.: Localization of glycosyl transferase activities in a Golgi apparatus-rich fraction isolated from rat liver. *Biocem. Biophys. Res. Comm.*, 37, 813—819, 1969.
- 48) 齊藤多久馬, 松下正也, 荒木正介, 増沢紀男, 赤星隆幸: 酸素組織化学からみた細胞膜. *細胞*, 14, 135—142, 1982.

(1983年5月29日受付)