

牛と豚の食道腺の超微細構造と 糖質の組織化学

清水俊一*・阿部光雄*・岩佐憲二*
平賀武夫*・竹花一成*

A Fine Structure and Carbohydrate Histochemistry of Oesophageal Glands in the Cattle and Pig

Toshikazu SHIMIZU*, Mitsuo ABE*, Kenji IWASA*
Takeo HIRAGA* and Kazushige TAKEHANNA*
(May, 1982)

緒 論

家畜の食道腺の形態については多くの報告^{1),2),4),10),11),18),19)}があるが、その大部分は光学顕微鏡によるものが主であり、電子顕微鏡による腺細胞の超微細構造の観察は、わずかに牛¹⁹⁾と犬¹¹⁾で行なわれているにすぎない。また腺細胞が分泌する糖質の組織化学的観察は、いまだに報告されていない。そこで牛と豚の食道腺の終末部の電子顕微鏡による超微細構造の観察、ならびに腺細胞の分泌物、特に糖質の光学顕微鏡による組織化学的観察を行ない、両者を比較検討した。

材料および方法

材料は全てと畜場より入手した約24カ月齢のホルスタイン種16例および約6カ月齢のランドレースとヨークシャーのF₁種17例の食道で、肉眼的に異常を認めないものを使用した。電子顕微鏡による観察のために、牛で6例、豚で6例の食道腺存在部位から組織片を採取し、直ちに0.1Mリン酸緩衝液—2.5%グルタルアルデヒド液(pH 7.4)とMillonigのリン酸緩衝液—1%四酸化オスミウム液(pH 7.3)で二重固定し、アルコール脱水後、樹脂包埋を施した。その後、ウルトラミクロームによって超薄切片を作製し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色を施し、電子顕微鏡JEM-100Sにて観察した。また光学顕微鏡による組織化学的観察のために、牛で10例、豚で11例の食道腺存在部位から組織片を採

* 獣医学科、家畜解剖学教室

Laboratory of Veterinary Anatomy, Department of Veterinary Medicine, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069-01, Japan

取し、直ちに2%酢酸カルシウム-10%ホルマリン液で24~48時間固定し、アルコール脱水後、パラフィン包埋を施し、約5 μ 厚の切片を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色および以下の組織化学的反応を施し観察した。

- 糖質の検出法
 - 過ヨウ素酸・Schiff法 (PAS)⁸⁾
- 弱酸性ムコ糖の検出法
 - アルシアンブル-pH 2.5 (AB pH 2.5)¹⁵⁾
 - 低鉄ジアミン (LID)¹⁴⁾
- 強酸性ムコ糖の検出法
 - アルシアンブル-pH 1.0 (AB pH 1.0)⁷⁾
 - 高鉄ジアミン (HID)¹⁴⁾
 - アルデヒドフクシン (AF)³⁾
- 中性糖の検出法
 - 過ヨウ素酸酸化 LID (酸化 LID)¹⁴⁾
 - 過ヨウ素酸酸化 HID (酸化 HID)¹⁴⁾
- 酵素消化法
 - ジアスターゼ消化法 (D-D)¹⁵⁾
 - シアリダーゼ消化法 (Silase)¹⁵⁾
 - 睾丸ヒアルロニダーゼ消化法 (T-Hase)²⁰⁾
 - 放線菌ヒアルロニダーゼ消化法 (St-Hase)²⁰⁾
 - コンドロイチナーゼ AC 消化法 (Chase AC)²⁰⁾
 - コンドロイチナーゼ ABC 消化法 (Chase ABC)²⁰⁾

結 果

I. 終末部の光学顕微鏡ならびに電子顕微鏡所見

a. 牛

牛の食道腺は食道前庭に存在する腺で、終末部は粘液細胞と漿液細胞およびそれを取り囲む筋上皮細胞によって構成されていた。

粘液細胞は大きさ13×17 μ mで終末部の大部分を構成する細胞で、核は暗く扁平で基底に位置し、細胞質は明るく網状を呈していた (Fig. 1)。電子顕微鏡的には細胞基質の電子密度が比較的高く、核は楕円形もしくは不定形で基底に位置し、核上部から細胞頂部にかけて中等度ないし低電子密度の直径0.4~1.6 μ mの多角形の分泌顆粒が充満していた (Fig.

2)。これらの分泌顆粒の幾らかは融合し一部限界膜を有するものも認められた。ゴルジ装置は比較的良く発達し核上部や分泌顆粒間に存在していた (Fig. 3)。また粗面小胞体や遊離リボソームも分泌顆粒間および基底側にわずかに認められた。ミトコンドリアは円形ないし楕円形で分泌顆粒間に疎に分布していた。粘液細胞間には細胞間分泌細管は認められなかった。また細胞基底面において基底嵌入といわれる構造も認められなかった。

漿液細胞は大きさ $10 \times 15 \mu\text{m}$ で粘液細胞に比べ数が少なく食道腺存在部全般に認められ、粘液細胞が構成する終末部に半月ないし単独で終末部を構成し、核は明るく基底に位置し細胞質にはエオジン好性の顆粒を含んでいた (Fig. 4)。電子顕微鏡的には細胞基質は電子密度が高く暗調で、核は不定形で基底に位置していた。細胞頂部には、一層の限界膜で包まれた電子密度が中等度で直径 $1.0 \sim 1.8 \mu\text{m}$ の類円形の分泌顆粒と、一層の限界膜で包まれた電子密度の高い直径 $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$ の類円形の分泌顆粒の2種類が存在し、前者は後者に比べ少数であった (Fig. 5)。また若干の漿液細胞の核上部に低電子密度の微細粒子を含む不定形の空胞が認められた (Fig. 5)。ゴルジ装置は核上部に存在し、粗面小胞体は短棒状ないし小胞状を呈し細胞質全体、特に核周囲に比較的豊富に認められた (Fig. 5)。ミトコンドリアは円形もしくは楕円形で分泌顆粒間に分布していた。隣接する漿液細胞間ならびに漿液細胞と粘液細胞間には細胞間分泌細管が存在していた (Fig. 5)。しかし細胞基底面において基底嵌入といわれる構造はみられなかった。

b. 豚

豚の食道腺は食道の前 $2/3$ まで存在し、その終末部は後述の組織化学的反應で漿粘液細胞と同定される一種類の腺細胞と、それを取り囲む筋上皮細胞によって構成されていた。

漿粘液細胞は大きさ $13 \times 18 \mu\text{m}$ で暗い核が基底に位置し、細胞質は明るく網状を呈していた (Fig. 6)。電子顕微鏡的には、細胞基質の電子密度が比較的高く暗調で、核上部から細胞頂部にかけて中等度ないし低電子密度で高電子密度の微細粒子を疎に含む直径 $0.3 \sim 3.0 \mu\text{m}$ の不定形分泌顆粒が充満していた (Fig. 7)。これらの分泌顆粒の幾らかは融合し、一部限界膜を有するものも認められた。ゴルジ装置は比較的良く発達し核上部ならびに分泌顆粒間に豊富に存在していた (Fig. 8)。ミトコンドリアは円形ないし楕円形で分泌顆粒間に疎に分布していた。漿粘液細胞間には細胞間分泌細管が存在していたが (Fig. 9)、細胞基底面には基底嵌入は認められなかった。

II. 分泌物の糖質の組織化学的所見

a. 牛

牛の食道腺の粘液細胞が分泌する糖質は、組織化学的には PAS (Fig. 10), AB pH 1.0 (Fig. 11), AB pH 2.5 (Fig. 12), AF, HID, LID, 酸化 HID, 酸化 LID はいずれも陽性を示

したが、今回実施した全ての消化法において、酵素消化後の染色性に変化は認められなかった。

また牛の食道腺の漿液細胞が分泌する糖質は、組織化学的にはPAS (Fig. 10), 酸化HID, 酸化LIDで陽性を示したが、AB pH 1.0 (Fig. 11), AB pH 2.5 (Fig. 12), HID, LID, AF, において陰性で、今回実施した全ての消化法において、酵素消化後の染色性に変化は認められなかった。

以上のことから牛の食道腺の粘液細胞の分泌物は中性糖, 弱酸性ムコ糖, 強酸性ムコ糖を含むが, グリコーゲン, シアル酸, ヒアルロン酸, コンドロイチン, コンドロイチン硫酸を含まないことが判明した。また漿液細胞の分泌物は中性糖のみを含み, グリコーゲンを含まないことが判明した。

b. 豚

豚の食道腺の漿粘液細胞が分泌する糖質は、組織化学的にはPAS (Fig. 13), AB pH 2.5 (Fig. 15), LID, 酸化HID, 酸化LIDにおいて陽性を示したが、AB pH 1.0 (Fig. 14)において陰性もしくはまれに陽性を示し、AF, HIDにおいて陰性を示した。また今回実施した

Table 1. Histochemical reactions of the oesophageal glands

Species Cell type	cattle		pig
	mucous cell	serous cell	seromucous cell
PAS	##	##	##
AB pH 1.0	+	-	-~+
AB pH 2.5	##	-	##
AF	+	-	-
HID	+~##	-	-
LID	##	-	##
Oxidized HID	+	+	+
Oxidized LID	+	+	##
PAS after D-D	##	##	##
AB pH 2.5 after Silase	##	-	+
AB pH 2.5 after St-Hase	##	-	##
AB pH 1.0 after T-Hase	+	-	-~##
AB pH 2.5 after T-Hase	##	-	##
AB pH 1.0 after Chase AC	+	-	-~+
AB pH 2.5 after Chase AC	##	-	##
AB pH 1.0 after Chase ABC	+	-	-~##
AB pH 2.5 after Chase ABC	##	-	##

-~##: the intensity of reaction.

消化法において、Silase 後の AB pH 2.5 (Fig. 16) で染色性の低下を示した以外は全て染色性の低下を示さなかった。

以上のことから豚の食道腺の漿粘液細胞の分泌物は中性糖、弱酸性ムコ糖を含むが、強酸性ムコ糖を含まないかまたはまれに含み、さらにシアル酸を含むが、グリコーゲン、ヒアルロン酸、コンドロイチン、コンドロイチン硫酸を含まないことが判明した。

以上の組織化学的反応を Table 1 に示す。

考 察

一般に腺細胞はその形態学的特徴、すなわちその核の状態や位置、細胞質のヘマトキシリンに対する染色性などから、粘液細胞と漿液細胞の2つに分類され、粘液細胞のみからなる腺を粘液腺、漿液細胞のみからなる腺を漿液腺、両者が混在するものを混合腺と呼んでいる。

一方、腺細胞の分泌物、特に糖質の組織化学的性状により、Shackelford and Klapper¹²⁾ は粘液細胞、漿液細胞、漿粘液細胞の3つに分類している。すなわち、分泌物の内容が蛋白質の他に中性糖のみを含むものを漿液細胞、酸性ムコ糖を主体とするものを粘液細胞、両者をあわせもつものを漿粘液細胞とするものである。これは近年広く一般に腺細胞の分類として認められ使用されている。また Munger⁹⁾ も同様の分類を行なっているが、それは分泌物の内容が、蛋白質のみものを漿液細胞、酸性ムコ糖に富むものを粘液細胞、中性糖を含むものを漿粘液細胞とするものである。しかしこの分類方法は一般に採用されるにいたっていない。上述の Shackelford and Klapper¹²⁾ のいう粘液細胞、漿液細胞および漿粘液細胞を電子顕微鏡的に観察すると、次のような特徴を有することが知られている。すなわち、漿液細胞、漿粘液細胞には細胞間分泌細管が存在するが、粘液細胞には存在しない。また粘液細胞の分泌顆粒は中等度ないし低電子密度の不規則なものであり、漿液細胞のそれは一層の限界膜に包まれた中等度ないし高電子密度の球形顆粒である。さらに漿粘液細胞のそれは口腔腺^{16),17)} で認められるように中等度ないし低電子密度の中に高電子密度の芯がみられる顆粒である。

食道腺にかんする研究で Helm⁴⁾ は、牛と豚はともに粘液細胞と漿液細胞からなると述べているが、加藤⁵⁾、川田と醍醐⁶⁾ は粘液細胞のみからなると述べている。また和栗と鹿野¹⁸⁾ は牛で漿液細胞と粘液細胞からなると述べている。著者らの観察では、形態学的には牛の食道腺は漿液細胞と粘液細胞からなる混合腺であり、これは和栗と鹿野¹⁸⁾ の所見と一致する。また豚の食道腺は粘液腺の形態を呈した。先に述べた Shackelford and Klapper¹²⁾ の組織化学的分類 (Table 2) によると、今回の牛の食道腺は漿液細胞と粘液細胞、豚の食

Table 2. Classification of glandular cells based on histochemical observation

	PAS	AB
Mucous units	Positive	Positive
Serous units	Moderately Positive	Negative
Seromucous units	Positive	Moderately Positive

道腺は漿粘液細胞からなっていた。これらは前述の電子顕微鏡的分類によっても同様に同定されたが、ただ豚の漿粘液細胞だけは細胞間分泌細管の存在、ゴルジ装置や粗面小胞体の発達など口腔腺^{16),17)}などの漿粘液細胞の所見と一致するものの、分泌顆粒が高電子密度の芯を持たずに、中等度ないし低電子密度の顆粒中に高電子密度の微細粒子として散在的に存在している点で口腔腺の漿粘液細胞とは異なっていた。このような所見は組織化学的に漿粘液細胞と同定された豚の食道腺に特有な形態所見と考えられ、本報告で初めて明らかとなった。このように組織化学的に漿粘液細胞と同定されてもその電子顕微鏡所見において必ずしも一様ではないことは今後の腺細胞の分類において組織化学的なものだけではなく電子顕微鏡所見も必要欠くべからざるものとする。

牛と豚の食道腺の組織化学的観察において、豚の食道腺ではシアル酸が証明されたが、牛の食道腺ではシアル酸が証明されなかった。シアル酸は糖タンパク質の安定化に重要な働きをするものと考えられており¹³⁾、また糖タンパク質に高い粘性を与える物質であることが知られている²¹⁾。しかし山科²¹⁾は、糖タンパク質を安定化させる物質はシアル酸だけでなく、他の物質もあると述べ、その物質としてフコースをあげている。このことから牛の食道腺の粘液細胞が分泌する糖タンパク質の安定化は、糖タンパク質糖鎖の非還元末端にフコースなどが付加することによって行なわれていることが示唆されるが、今後さらに詳細な検討が必要であろう。

要 約

牛と豚の食道腺の終末部の超微細構造と腺細胞が分泌する糖質の組織化学的反応を観察し以下の結果を得た。

1. 牛の食道腺の終末部は粘液細胞と漿液細胞と、それらを取り囲む筋上皮細胞によって構成されていた。
2. 牛の食道腺の粘液細胞はゴルジ装置がよく発達し、その分泌物の糖質は中性糖、弱酸性ムコ糖、強酸性ムコ糖を含むが、シアル酸を含まなかった。
3. 牛の食道腺の漿液細胞は、粗面小胞体がよく発達し、その分泌物の糖質は中性糖のみを含んでいた。

4. 豚の食道腺の終末部は漿粘液細胞とそれを取り囲む筋上皮細胞によって構成されていた。

5. 豚の食道腺の漿粘液細胞は、ゴルジ装置と粗面小胞体の発達がよく、その分泌物の糖質は中性糖、弱酸性ムコ糖を含み、強酸性ムコ糖を含まないかまたはまれに含み、シアル酸を含んでいた。

文 献

- 1) Goetsch, E. 1910. The structure of the mammalian oesophagus. *Am. J. Anat.* **10**: 1-40.
- 2) Haane, G. 1905. Ueber die Drüsen des Oesophagus und des Uebergangsbereiches zwischen Pharynx und Oesophagus. *Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkd.* **31**: 466-483.
- 3) Halmi, N. S. and Davies, J. 1953. Comparison of aldehyde fuchsin staining, metachromasia and periodic acid-schiff reactivity of various tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **1**: 447-459.
- 4) Helm, R. 1907. Vergleichend anatomische und histologische Untersuchungen über den Oesophagus der Haussäugetiere. Dissertation, Zürich.
- 5) 加藤嘉太郎 1979. 家畜比較解剖図説 上巻. 養賢堂, 東京. 226-227.
- 6) 川田信平・醍醐正之 1980. 図説家畜比較解剖学 上巻, 第4版. 文永堂, 東京. 290-292.
- 7) Lev, R. and Spicer, S. S. 1964. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* **12**: 309.
- 8) McManus, J. F. A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* **23**: 99-108.
- 9) Munger, B. L. 1964. Histochemical studies on seromucous- and mucous-secreting cells of human salivary glands. *J. Anat.* **115**: 411-430.
- 10) Rubeli, O. 1890. Ueber den Oesophagus des Menschen und der Haustiere. *Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkd.* **16**: 161-197.
- 11) 最勝寺慧・吉村雄雄・永田貴久 1977. イヌの食道腺の微細構造. *医学研究*, **47**: 603-610.
- 12) Schackelford, J. M. and Klapper, C. E. 1962. Structure and carbohydrate histochemistry of mammalian salivary glands. *Am. J. Anat.* **111**: 25-48.
- 13) Sharon, N. 1975. *Complex Carbohydrates — Their Chemistry, Biosynthesis and Functions*, Addison-Wesley Publishing Co. Inc., Mass. (訳書) 大沢利昭 1977. 複合糖質—構造, 生合成, 機能, 学会出版センター. 東京 85-94 および 109-117.
- 14) Spicer, S. S. 1965. Diamine methods for differentiating mucosubstance histochemically. *J. Histochem. Cytochem.* **13**: 211-234. (Cited from *Acta Anat.* **94**, 449-456 (1976)).
- 15) Spicer, S. S., Horn, R. G. and Leppi, T. J. 1967. In *The Connective Tissue*, Wagner, B. M. and Smith, D. E. editors, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 251-303.
- 16) 鈴木秀作・亀井吉宣・大塚潤一 1975. 山羊, 犬の口腔腺の微細構造について I. 耳下腺. *鹿大農学術報告*. **25**: 25-41.
- 17) 鈴木秀作・大塚潤一 1977. 馬の口腔腺の微細構造について II. 下顎腺. *鹿大農学術報告*. **28**: 25-35.
- 18) 和栗秀一・鹿野 胖 1963. 牛の食道腺に関する組織学的研究. *麻布獣大研究報告*, 第11号. 1-11.
- 19) Wakuri, H. and Muto, K. 1972. The fine structure of the cattle esophageal gland with a special reference to the myoepithelial cells. *Kitasato Arch. Exp. Med.* **45**: 45-50.
- 20) 山田和順 1972. ムコ糖の組織細胞化学的研究法. *蛋白質・核酸・酵素*. **17**: 775-790.
- 21) 山科郁男 1979. シアル糖蛋白質. *代謝*. **16**: 17-23.

Summary

The fine structure of the terminal portion and histochemical reaction of mucosaccharides which were secreted from glandular cells on the oesophageal glands of the cattle and pig were studied.

The results are summarized as follows.

1) The terminal portion of the oesophageal glands of the cattle consisted of mucous cells, serous cells and myoepithelial cells that surrounded them.

2) The mucous cells of the oesophageal glands of the cattle showed abundant Golgi apparatus and its mucosaccharides of secretion contained acid mucosaccharides, neutral mucosaccharides and sulphated acid mucosaccharides but did not contain sialic acid.

3) The serous cells of the oesophageal glands of the cattle showed numerous rough surfaced endoplasmic reticulum and the mucosaccharides of secretion contained only neutral mucosaccharides.

4) The terminal portion of the oesophageal glands of the pig consisted of seromucous cells and myoepithelial cells that surrounded them.

5) The seromucous cells of the oesophageal glands of the pig showed abundant Golgi apparatus and rough surfaced endoplasmic reticulum and the mucosaccharides of secretion contained acid mucosaccharides, neutral mucosaccharides and sialic acid, but rarely contained sulphated acid mucosaccharides.

Explanation of Figures**Plate I.**

- Fig. 1. In the mucous cells of the oesophageal glands in the cattle, the mucous cells form most of the terminal portion, and their squashy nucleus is located at the basal portion. Their cytoplasm shows a light network. The arrow shows myoepithelial cells. H-E. $\times 400$.
- Fig. 2. Electron micrograph showing mucous cells in the cattle. The mucous cells possess a relatively opaque nucleus (N) in their basal portion and are crowded by lucent mucous droplets. L: lumen, MC: myoepithelial cells. $\times 3200$.
- Fig. 3. Electron micrograph showing mucous cells in the cattle. Golgi apparatus (G), which are in contact with the secretory granules (SG), are well developed in the upper portion of the nucleus. $\times 30000$.
- Fig. 4. The serous cells (arrow) of the oesophageal glands in the cattle. The serous cells are less than the mucous cells. They form the terminal portion or appear at the terminal portion of mucous cells in the form of semilunar cells. The serous cells are stained with eosin. H-E. $\times 320$.
- Fig. 5. Electron micrograph showing serous cells in the cattle. The serous cells possess round moderately electron dense (MSG) or electro-dense (SG) secretory granules. Moderately electron dense secretory granules are less in number than electro-dense secretory granules. Large electro-lucent vesicles (V) are often seen in the supranuclear region of serous cells. The intercellular canaliculi (IC) are seen at the apical region of the serous cells. The rough surfaced endoplasmic reticulum (ER) is well developed in the supranuclear region. $\times 3100$.
- Fig. 6. In the seromucous cells of the oesophageal glands in the pig, the squashy nucleus is located at basal portion and their cytoplasm shows a light network. The arrow shows myoepithelial cells. H-E. $\times 600$.
- Fig. 7. Electron micrograph showing seromucous cells in the pig. The seromucous cells possess an irregular nucleus (N) in their basal portion. Their cytoplasm are filled with electro-lucent secretory granules (SG). L: lumen. $\times 3000$.
- Fig. 8. Electron micrograph showing seromucous cells in the pig. Golgi apparatus (G) is well developed in the upper portion of nucleus (N) and between secretory granules (SG). Rough endoplasmic reticulum (ER) is well developed. $\times 20000$.

Plate II.

- Fig. 9. Electron micrograph showing apical region of the seromucous cells in the pig. The intercellular canaliculi (IC) are seen. $\times 20000$.
- Fig. 10. Mucous cells and serous cells (arrow) in the cattle showing PAS-positive. PAS. $\times 320$.
- Fig. 11. Mucous cells in the cattle showing AB pH 1.0-positive and serous cells (arrow) showing negative. AB pH 1.0. $\times 320$.
- Fig. 12. Mucous cells in the cattle showing AB pH 2.5-positive and serous cells (arrow) showing negative. AB pH 2.5. $\times 320$.
- Fig. 13. Seromucous cells in the pig showing PAS-positive. PAS. $\times 320$.
- Fig. 14. Seromucous cells in the pig showing AB pH 1.0-negative or positive. AB pH 1.0. $\times 320$.
- Fig. 15. Seromucous cells in the pig showing AB pH 2.5-positive. AB pH 2.5. $\times 320$.
- Fig. 16. Seromucous cells in the pig showing AB pH 2.5-positive after treatment with sialidase. AB pH 2.5. $\times 320$.



