

論文目録

氏名 神谷 誠治



学位論文

題 目 家禽におけるホルモン誘導性アポトーシス機構に関する
生理化学的研究

学位論文の基礎となる論文

題 目 ニワトリヒナのファブリシウス嚢におけるグルココルチコ
イド誘導性のアポトーシスに関する免疫組織化学的検討

著 者 名 神谷誠治, 小野雅章, 土井 守, 中村孝雄

学術雑誌名 日本家禽学会誌 に発表

(巻・号・頁) 33 巻・6 号・366-370

発行年月 1996 年 11 月

題 目 Contribution of Ubiquitin to Glucocorticoid-induced
Apoptosis in the Bursa of Fabricius

著 者 名 神谷誠治, 土井 守, 仲舛文男, 赤山照也, 中村孝雄

学術雑誌名 日本畜産学会誌 に発表予定

(巻・号・頁) _____

発行年月 _____

題 目 _____

著 者 名 _____

学術雑誌名 _____

(巻・号・頁) _____

発行年月 _____

家禽におけるホルモン誘導性アポトーシス機構
に関する生理化学的研究

1996年

岐阜大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学
(岐阜大学)

神谷誠治

②

家禽におけるホルモン誘導性アポトーシス
機構に関する生理化学的研究

神谷 誠治

目 次

序 論	-----	1-7
第1章 グルココルチコイドの投与によるファブリシウス囊の 形態変化とアポトーシスの発現に関する組織学的検討	-----	8-31
第2章 ファブリシウス囊におけるグルココルチコイド誘導性の アポトーシスの発現に関する生化学的・免疫組織化学的 検討	-----	32-50
第3章 ファブリシウス囊におけるグルココルチコイド誘導性の アポトーシス関連タンパク質	-----	51-67
論 議	-----	68-76
総 括	-----	77-79
謝 辞	-----	80
文 献	-----	81-86

序 論

ニワトリヒナに強度のストレスを与えると、胸腺やファブリシウス嚢(F嚢)などのリンパ器官の発達が妨げられるとともに、それらの重量が減少することもある(Newcomer and Connally, 1960; Glick, 1964)。胸腺は、哺乳類や鳥類において共通に存在するリンパ器官であり、主に細胞性免疫の構築に重要な役割を果たしている。一方、F嚢は、総排泄口背側部に存在する鳥類特有のリンパ器官であり、免疫抗体の産生に関与するB細胞の分化・成熟が行われる主要な臓器である(Glick, 1956; Ekino, 1993)。したがって、ストレスによりこれらのリンパ器官の発達に障害が与えられると、抗病性が低下し疾病が発生しやすくなり、生存率の低下、成長あるいは産卵量の低下を引き起こす。このようなストレスによる抗病性の低下には、副腎皮質で生産・分泌されるグルココルチコイドが関与する。

副腎皮質から分泌されるコルチコステロン(B)、コルチゾールあるいはコルチゾンなどのコルチコステロイドは、生体内における糖新生作用がきわめて顕著であるため、グルココルチコイド(GC)とよばれる。GCは糖新生作用だけではなく、抗炎症作用、血管収縮作用、抗発熱作用、胃液の分泌促進作用など、広範な生体機能に影響を与える(一井, 1980)。哺乳類のなかでもラットやマウス、鳥類、爬虫類、両生類、魚類のうちウナギやエイなどでは、副腎における 17α -ヒドロキシラーゼ活性が弱いあるいは全くなく、コルチゾールおよびコルチゾンがほとんど生成されない。このため、これらの動物では、Bが主たるGCとしての役目を果たしている。鳥類であるニワトリのGCはBであり、コレステロールを原料として、プレグネノロンからプロジェステロンを経て、前駆物質の 11- デオキシコルチコステロンより生成される(Sandor *et al.*, 1963; Nakamura and Tanabe, 1973)。ニワトリでは、この生合成経路の特性や各段階における生成物の転換に関わる酵素の細胞内局在などがすでに詳細に解明されている(Nakamura and Tanabe, 1973)。

ニワトリのヒナに対してBを投与すると、血中のリンパ球数が減少すると同時に、胸腺や脾臓などのリンパ器官が萎縮する(Davison *et al.*, 1983a; Davison *et al.*, 1983b; Gross and Siegel, 1983; Gross *et al.*, 1980)。また、BやコルチゾンなどのGCをニワトリヒナへ投与することにより、B細胞の産生に関与するF嚢が萎縮することが示されている(Dieter and Breitenbach, 1970; Gross *et al.*, 1980; Davison *et al.*, 1983a; Compton *et al.*, 1990)。以上のような、GCの作用によるリンパ器官の萎縮に関する生体メカニズムは、鳥類ではほとんど明らかにされていない。一方、哺乳類であるラットでは、GCにより引き起こされる胸腺の萎縮にアポトーシスという細胞死滅機構が関与することが明らかとなってきた(Kerr *et al.*, 1972; Wyllie, 1980)。

多細胞生物の細胞は、細胞分裂により増殖・分化し、様々な機能を果たしているだけでなく、自らを死滅させる機能を持っている。Kerr *et al.* (1972)は、このような能動的な細胞死滅を「アポトーシス」という新しい生体制御機構として提唱した。彼らは、細胞の死滅過程を電子顕微鏡で観察しているときに、ネクローシスとは本質的に異なる細胞死滅形態を見つけた。ネクローシスでは細胞は膨潤し崩壊するのに対して、彼らが観察したのは細胞の縮小であり、さらに細胞自身の断片化であった。そして、このような細胞死滅現象を細胞分裂と表裏一体をなす高度な生体制御機構の一つであると考え、「生」の特徴とも言えるマイトーシス(細胞分裂)に対比させて、新たな「死」の概念としてアポトーシス(apoptosis; 細胞自滅)と名付けた。

従来から知られてきたネクローシスは、主に病理的な細胞損傷による細胞内の恒常性調節の全般的な不調により起こる受動的な細胞死滅機構である。これに対して、アポトーシスは特定の誘発刺激に対する感受性細胞の能動的かつ細胞内在の遺伝子により高度に制御される細胞死滅機構であり、両者の間には数々の形態的な相違が認められる(Kerr *et al.*, 1972; Cohen, 1991; Thompson *et al.*, 1992)。ネクローシス

では、細胞質内のミトコンドリアの膨潤に加え、細胞自体が膨化し、細胞内の浸透圧の調整不全により細胞膜が破壊し細胞が崩壊する。また、このような細胞の崩壊による流出物のため白血球が集属し、周辺組織には炎症反応が認められることが多い。一方、アポトーシスでは細胞表面の微絨毛が消失して表面は平滑になり、核内のクロマチンが凝縮すると同時に、細胞が縮小し、隣接細胞との間隙が大きくなる。

アポトーシスは、生物の発生や発育段階における自然細胞死(Naturally-occurring cell death)との関わりが深い。たとえば、ニワトリ胚の翼芽や後肢芽における指間組織の細胞群が、発生過程の特定のステージでアポトーシスによる細胞死滅によって形態形成が行われることが知られている(Tone *et al.*, 1994)。また、両生類のカエルでは変態時にオタマジャクシの尾部が急速に退縮し除去されるが、この現象にもアポトーシスが関与することが示されている(吉里, 1993)。また、アポトーシスは免疫系や神経系などとも密接な関係がある。細胞性免疫を担うT細胞の分化・成熟における過程では、ネガティブ選択による自己反応性のT細胞の排除にアポトーシスが関与している(Smith, 1989; 多田隈・木崎, 1993)。さらに、体液性免疫を担うB細胞の分化・成熟の過程において、免疫抗体の産生能を持たない非機能的なB前駆細胞あるいは自己反応性の成熟B細胞は、アポトーシスによる細胞死滅により排除される(鏗田, 1993)。加えて、神経細胞の発生段階におけるシナプス結合形成期には、アポトーシスにより約半分の神経細胞が死滅することが示されている(高島・小池, 1993)とともに、アルツハイマー病をはじめとする神経疾患における特定の神経細胞集団の選択的死滅にもアポトーシスが関与していることが明らかにされてきた(Lowe *et al.*, 1988; 小池, 1992)。さらに、エイズウイルスによるリンパ細胞の死滅にアポトーシスが関与することや(Meyaad *et al.*, 1992; 小林・中西, 1993)、特定の抗癌剤がアポトーシスを誘起して癌細胞を破壊することなどが明らかとなってきた(Williams, 1991)。以上のことは、アポトーシスが広範な生命現象に密接な関わりを持っていることを示しており、この分野における研究は急速に

進展し、そのメカニズムの一端が徐々に解明されつつある（大山，1989）。

線虫である *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は、発生段階において発現するアポトーシスの関連遺伝子が10数種同定され、アポトーシスが細胞内在の遺伝子によって高度に制御される細胞死滅機構であることを示す典型的なモデルである（小原，1995）。*C. elegans* では、発生段階の細胞死滅過程における特定のステージで、細胞死を停止する突然変異体が多数分離されている。そして、それらの遺伝解析の結果10の遺伝子が特定されると同時に、これらの遺伝子とその表現型から、*ced-1* ~ *ced-10* (cell death abnormal) と名付けられた（Ellis *et al.*, 1991）。この中では、たとえば *ced-3* や *ced-4* のどちらかの遺伝子が不活化されると、細胞死を起こすべき細胞が生き残ってしまうことから、これらの遺伝子の発現はアポトーシスによる細胞死滅に必須であることや、*ced-9* がこれらの遺伝子の発現を抑制していることなどがわかっている（Hengartner *et al.*, 1992）。

一方、ラットの培養胸腺リンパ細胞に低レベル放射線を照射するとアポトーシスが誘導され、死滅したリンパ細胞ではアポトーシスに特有の細胞の縮小や細胞表面の微絨毛の消失ならびにクロマチンが凝縮することが示されている（Yamada and Ohyama, 1988）。この際に、アポトーシスを発現したリンパ細胞の核DNAをアガロースゲル電気泳動法によって解析すると、約180塩基対を単位とした整数倍のオリゴヌクレオチドの断片群が、ハシゴ状の泳動パターン（ラダーパターンあるいはラダーストラクチャー）として観察される（Yamada and Ohyama, 1988）。これは、DNAの断片化現象とよばれ、アポトーシスの発現過程でDNAがヌクレオソーム単位に切断された結果生じるもので、現在ではアポトーシスを検証する上での重要な生化学的指標の一つとされている（Wyllie, 1980; Wyllie, 1984; Thompson *et al.*, 1992）。このようなDNAの断片化現象は、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミドやRNA合成阻害剤であるアクチノマイシンDなどで抑制されることから、アポ

トーシスの発現あるいは進行過程における遺伝子産物として、新たに合成される蛋白質の関与が示唆されている(Sellins and Cohen, 1987; Yamada and Ohyama, 1988)。

高等動物では、*c-myc* の遺伝子産物や p53蛋白質がアポトーシスを誘導することが示されている。*c-myc* 遺伝子はもともと細胞の増殖を正に制御することが確認されていたが、その発現過剰や低下はアポトーシスを誘起することが明らかとなってきた (Evan *et al.*, 1992; 口野, 1993)。また、放射線の照射、抗ガン剤あるいは特定のアルキル化剤により DNA が損傷されると、細胞内に p53蛋白質が急速に出現しアポトーシスが発現することが示されている (Yonish-Rouach *et al.*, 1991; Lowe *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 1993)。一方、ヒト濾胞性 B 細胞リンパ腫から発見された *bcl-2* の遺伝子産物はアポトーシスの抑制因子として知られ (Vaux *et al.*, 1988; Hockenbery *et al.*, 1990)、アポトーシスと関わりの深い免疫系ならびに神経系などの組織において高い発現が見られる (Negrini *et al.*, 1987; 辻本, 1993)。これらの他にも、アポトーシスに関係する遺伝子やそれに関連する蛋白質についてはいくつかの報告はあるが (Nunez and Clarke, 1994; Pan and Griep, 1994; Wu and Levine, 1994)、現段階ではその本質的な解明にはいたっていない。

アポトーシスによる神経細胞の死滅が原因となるアルツハイマー病などの神経疾患では、その病変部の神経原繊維変化 (neurofibrillary tangles) を構成する PHT (paired helical filament) に、ストレス蛋白の一種であるユビキチンが認められ (Mori *et al.*, 1987; Lowe *et al.*, 1988)、神経疾患における病理検査を行う上での重要な一指標とされている。一方、Delic *et al.* (1993) は、低レベル放射線の照射で誘起されるヒト培養リンパ細胞のアポトーシスの発現過程でユビキチンの mRNA が増加することを明らかにし、アポトーシスの発現にユビキチンが関与することを示唆した。また、Lauzon *et al.* (1993) は、原索動物である群体性ホヤのテイクオーバーとよばれる zooid (個虫) の世代交代には、アポトーシスが必須であり、これに

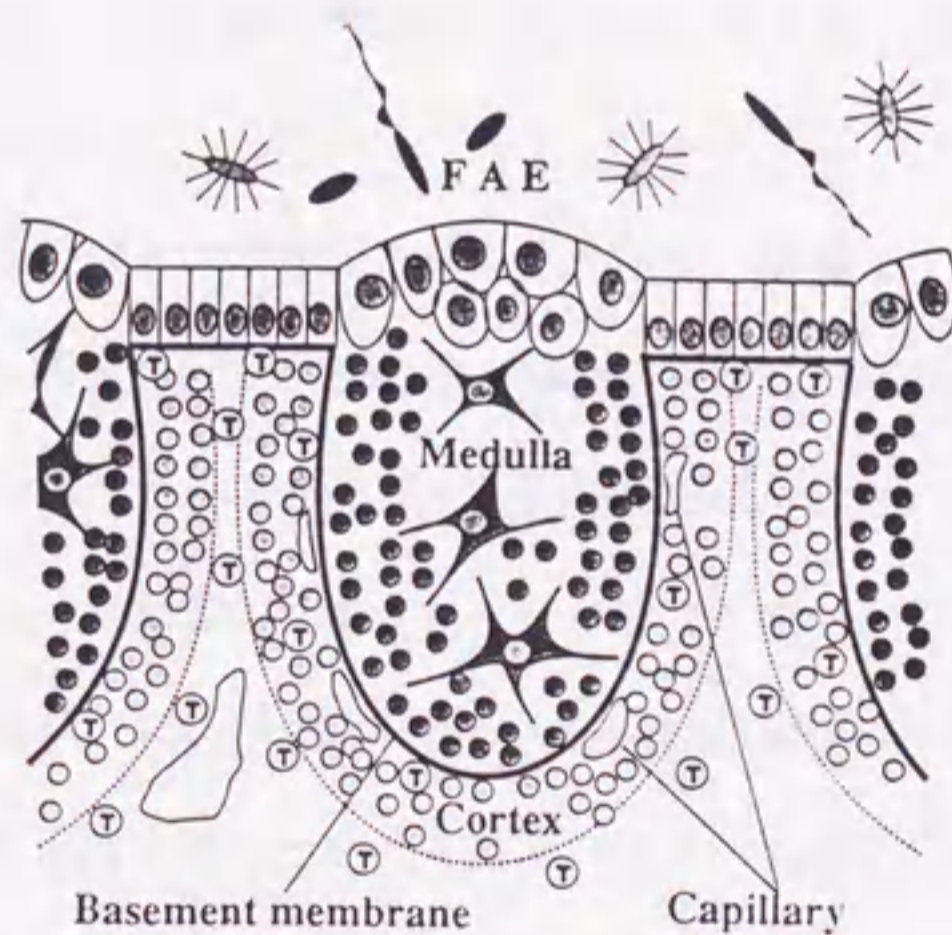
ユビキチンが関与することを示した。さらに, Phillips and Platt(1994)は, 甲状腺ホルモンの作用で退縮過程にあるオタマジャクシの尾部ではユビキチン含量が増加し, ユビキチンがアポトーシスの発現に関与することを示唆した。これらのようにユビキチンは, 下等動物から高等動物までの様々な動物種における種々の生命現象の場面で観察されるアポトーシスに関与している。

ユビキチンは真核細胞にのみ存在する分子量が約8,600の蛋白質であり, 76個のアミノ酸で構成され, ヒト, ウシ, ブタ, ニワトリあるいは昆虫の他にもほとんどの真核生物ではアミノ酸の一次構造が同一であり, ヒトと酵母の間でも約96%のホモロジーがある(Goldstein, 1975; Gavilanes *et al.*, 1982)。このことから, 真核生物の系統進化の上で高度に保存されたubiquitousな蛋白質であることからユビキチン(ubiquitin)とよばれるようになった。ユビキチンは高温などのストレスにより細胞内で合成が誘導されるストレス蛋白質の一種で, その作用は多様であるとされるが(Finley *et al.*, 1989; Finley and Chau, 1991), 主に細胞内の異常蛋白質や半減期の短い蛋白質の分解・除去に関与していると言われている(Hershko, 1988; Chau *et al.*, 1989; Rechsteiner, 1991; 田中・田村, 1993)。このようなユビキチンの生物学的特性から, ユビキチンはアポトーシスのメカニズムに普遍的に介在する可能性のある蛋白質の一つであると考えられる。

これまで述べてきたように, GCによるリンパ系機能の低下には, 細胞内在の遺伝子により高度に制御されるアポトーシスという細胞死滅機構が関与している。しかしながら, GC誘導性のアポトーシスに関しては, 哺乳類では詳しく調べられているが, 鳥類ではほとんど調べられていない。また, アポトーシスの発現や進行には特定の遺伝子とその産物である蛋白質の介在が示されているとともに, いくつかの重要な蛋白質の存在も明らかとなってきたが, この点についても鳥類ではほとんど調べられていない。

本研究では, ニワトリのF囊におけるGC誘導性のアポトーシスの発現形態を調

べるとともに、その現象に関して生化学的な検討を加えた。まず第1章では、GCの投与によって起こるF囊の萎縮がアポトーシスに起因することを組織学的に検証するとともに、F囊におけるアポトーシスの発現形態に関して検討を加えた。そして、第2章では、GCにより萎縮過程にあるF囊のリンパ細胞におけるDNAの断片化について調べ、GC誘導性のF囊の萎縮がアポトーシスに起因することを生化学的に検証しようとした。また、DNAの断片化を利用してアポトーシスの発現を免疫組織化学的に検出する手法を用いて、F囊におけるアポトーシスの発現形態とその特徴について検討した。さらに第3章では、アポトーシスの発現や進行に介在する蛋白質に関して生化学的に解析するとともに、ユビキチンの関与について検討を加えた。



ニワトリのF囊組織の模式図

(FAE:濾胞関連上皮, Follicle Associated Epithelium)

第1章

グルココルチコイドの投与によるファブリシウス囊の 形態変化とアポトーシスの発現に関する組織学的検討

緒 論

ファブリシウス囊 (F囊) は、総排泄口背側部に存在する鳥類特有のリンパ器官であり、1621年にイタリアの解剖学者Hieronymus Fabriciusが、ニワトリヒナにその存在を発見したことからBursa of Fabriciusと呼ばれる。F囊は球形ないしは紡錘形をした囊状構造物であり、白色レグホーン種の孵化直後の初生ヒナにおける重量は約0.04gである。そして、ヒナの成長とともに発達し、10~11週齢で最大重量の平均4gに達する。その後は性成熟に伴い退縮し、27週齢以降では0.3g以下となり、やがてはほとんどの個体で消失する (山田ら, 1973)。一方、アヒルやウズラのF囊も育成期に最大重量まで発達し、性成熟を経て成鳥になるころには退縮するが、ニワトリのように完全に消失することはない (杉村, 1979)。他方、ダチョウ類ではF囊は退縮することなく終生残存するといわれる (小林, 1968)。

F囊はニワトリの雌ヒナで発見されたことから、当初は、受精時における精液の貯蔵器官であると推定された。その後、卵の貯蔵器官や粘液分泌腺の一種あるいは生殖腺に関係した器官であるなど様々な仮説があげられた。しかし、当初は摘出実験を行ってもみるべき影響がなかったことから、F囊の本質的な機能は長い間不明であった。ところが、Glickおよび一門の研究者は、ニワトリを実験材料にネズミチフス菌に対する抗血清を得るための実験を行っている中で、孵化直後にF囊を摘出したヒナの多くが、ネズミチフス菌の接種により間もなく死亡することを認めた。そして、生き残ったヒナを調べた結果、血中の抗体価が全く上がっていないことをつきとめ、F囊が抗体産生と関連のある臓器であることを発見した (Chang *et al.*,

1955; Glick, 1956)。それ以来, F囊の機能解明に関する研究が進展し(高木, 1970; 佐藤, 1971; Glick, 1984; 松田, 1990), 現在では, 盲腸扁桃やパイエル板などと同様の腸管関連リンパ組織(GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue)に分類され, 外的環境の抗原情報により自己の棲息する環境に最も適したB細胞レパトリーを造成するためのB細胞の分化・成熟が行われる主要なリンパ器官であるとされている(Ekino, 1993)。

このように鳥類の体液性免疫の構築に重要な役割を果たすF囊は, ニワトリヒナに強度のストレスが加わると, その発達が妨げられ重量が減少するが(Newcomer and Connally, 1960; Glick, 1964), これにはストレスにより分泌が亢進されるGCの関与が示唆される。また, ニワトリヒナにGCあるいはACTHを投与すると, F囊とともに胸腺や脾臓などのリンパ器官が萎縮することが示されている(Dieter and Breitenbach, 1970; Glick, 1960; Glick, 1967; Gross *et al.*, 1980; Davison *et al.*, 1983a; 近藤ら, 1986)。このようなGCの作用によるリンパ器官の萎縮には, アポトーシスという細胞死滅機構が関与していることが哺乳類において示されており(Wyllie, 1980), その細胞死滅過程では, 細胞が縮小するとともに核内のクロマチンが凝縮することや, 組織内では隣接細胞との間隙が大きくなることなどの形態的な特徴が明らかにされている(Kerr *et al.*, 1972; Wyllie, 1980)。また, ラット胸腺から得たリンパ細胞ではアポトーシスによる細胞死滅過程において細胞表面の微絨毛が消失し, 細胞表面が平滑になることが示されている(Yamada and Ohyama, 1981)。さらに, アポトーシスにおける細胞核内のクロマチンの凝縮形態は, 半月状あるいは三日月状の特有な形態に凝縮するケースが多いと言われる(Itoh *et al.*, 1991; Ogasawara *et al.*, 1993)。一方, 鳥類ではGCによるF囊の萎縮過程を組織学的に調べた例は少なく(Glick, 1967), 加えて, その萎縮機構に対するアポトーシスの関与について組織学的に検討した研究報告はない。

そこで, 本実験ではニワトリヒナにGCを投与し, F囊の萎縮形態を光学顕微鏡

により観察し、GC誘導性のF囊の萎縮に対するアポトーシスの関与について組織学的に検索した。また、哺乳類で報告されているようなアポトーシスに特有の細胞の微細な形態変化が、ニワトリのF囊リンパ細胞でも起こっているかどうかを調べるために、走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行った。さらに、伝染性ファブリシウス囊病感染下のF囊における変性壊死を光学顕微鏡で観察し、F囊組織におけるアポトーシスとネクローシスの形態変化の特徴に関して比較検討を行った。

材料および方法

実験1. コルチステロン(B)あるいはデキサメタゾン(Dex)がF囊に与える影響

<供試鶏および実験計画>

本実験には、30日齢の白色レグホーン種(デカルプ系)雌ヒナを供試した。供試ヒナは餌付け日のみ24時間連続照明下にて飼育し、その後は12時間照明、12時間暗黒(6:00点灯, 18:00消灯)の照明条件下で飼育した。飼料および水は自由摂取とした。以下の実験においても、餌付けから実験日までは同様の飼育方式とした。

30日齢において、コーンオイルに懸濁したデキサメタゾン(Dex, Dexamethasone: カライスク株)またはコルチステロン(B, corticosterone: Sigma Chemical Co.)を、ヒナの体重1kg当たり2mgあるいは10mgとなるように、頸部皮下にそれぞれの体重に合わせて約200 μ lずつ注射した。また、コーンオイルを同様に200 μ l投与した実験区も設けた。

投与後、24, 48および72時間目に、それぞれの実験区において3羽ずつのヒナの体重を測定後、断頭と殺し、直ちにF囊を摘出した。湿重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリン液(pH 7.0: 純正化学株)に投入し3~4日間固定した。

<F囊組織切片の作成>

F囊の組織を観察するためのヘマトキシリン・エオジン染色標本の作成法を図1に示した。ホルマリン固定試料は、成形カットし、上昇エタノール系列(70, 80, 90,

95, 100%エタノール) にて脱色・脱水を行い, キシレンにより透徹を行った。続いて, 混合パラフィン (Histrep 580:パラフィン, 3:1, 和光純薬(株)) にて包埋しパラフィンブロックを作成し, 冷却保管 (4℃) した。パラフィンブロックを滑走型マイクロトームにて, 約2 μ mに薄切し, 湯冷ましの温水上 (40℃) にて仮伸展させ, ポリ-L-リジンにてコーティングしたスライドガラスに切片をすくい取り, パラフィン伸展器上で40℃にて一晩伸展した。

<染色および観察>

F囊切片をキシレン中でパラフィンを除去し, エタノール下降系列 (100, 95, 90, 80, 70%) にそれぞれ1分間ずつ浸漬し, 続いて流水中で軽く洗浄した。その後, ヘマトキシリン (和光純薬(株)) で約5分間染色し, 流水中で10分間以上洗浄した後, エオジン (和光純薬(株)) にて約10分間染色した。続いて軽く水洗し, 上昇エタノール系列を経てキシレンにて透徹を行い, 封入剤 (MOUNT-QUICK, (株)大同産業) にて封入した。以上の方法により, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 標本を作成し, 光学顕微鏡下で観察した。

以下の実験においても, F囊のHE標本の作製は同様の方法により行った。なお, 本実験の予備実験を数回実施して, DexによるF囊の萎縮に伴う組織変化について種々検討した結果, 表1に示したような組織変化に関する判定基準を得た。以下の実験では, この判定基準に基づきF囊の組織変化を判定した。

実験2. Dex誘導性のF囊の萎縮に関する経時的調査

本実験では42日齢の雌ヒナを供試した。コーンオイルに懸濁したDexを, ヒナの体重1kg当たり10mgとなるように, 頸部皮下にそれぞれの体重に合わせて約400 μ lずつ注射した。また, コーンオイルを同様に400 μ l投与した実験区も設けた。Dexを投与してから2, 4, 6, 12, 24, 48ならびに72時間目に, 3羽ずつのヒナの体重を測定後, 断頭と殺し, 直ちにF囊を摘出した。F囊の湿重量を測定後, 10%中性緩衝ホ

ルマリン液に投入し3～4日間固定した。上記と同様にHE標本を作製し、光学顕微鏡下で観察した。

実験3. Dex誘導性のF囊の萎縮に関する走査型電子顕微鏡による観察

本実験には28日齢のヒナを供試した。コーンオイルに懸濁したDexを、ヒナの体重1kg当たり10mgとなるように、頸部皮下にそれぞれの体重に合わせて約200 μ lずつ注射した。Dexを投与してから24ならびに48時間目に、5羽ずつを断頭と殺し、直ちにF囊を摘出した。

F囊断面の走査型顕微鏡標本は、田中ら(1995)の方法を修正して作成した。その手順の概要を図2に示した。摘出したF囊は氷冷した0.5%パラホルムアルデヒド(和光純薬株)・0.5%グルタルアルデヒド(和光純薬株)混液にて約1時間固定した。その後、脱脂したカミソリ刃にて約3～5mm大にサンプルを切り出し、氷冷1/15Mリン酸緩衝液(PBS: pH7.4, 和光純薬株)にて洗浄後、1%オスミウム酸(和光純薬株)で2時間、氷冷下で固定した。氷温から室温に戻しながらPBSにて十分洗浄し、25%から50%ジメチルスルフォキシド(DMSO, 和光純薬株)PBSへ置換した。その後、凍結切断器(エイコーTF-2)上でDMSO切断を行った。切断された試料は洗浄後、0.1%オスミウム酸にて約2時間、表面の暴出処理(オスミウム浸軟処理)を行い、1%オスミウム酸で1時間、後固定を行った。その後、1%タンニン酸PBS(直前調製: 関東化学株)で導伝処理を6時間行い、続いて1%オスミウム酸で1時間再度固定した。その後、上昇エタノール系列により脱水し、酢酸イソアミル(和光純薬株)に置換し、超臨界点乾燥(臨界点乾燥装置, 日立HCP-2)を行った。最後に、白金・パラジウムにて蒸着(スパッタ装置, 日立E-102)し、走査型電子顕微鏡(日立S-570)にて観察した。

実験4. 伝染性ファブリウス囊病ウイルス(IBDV)感染によるF囊の壊死形態との比較

本実験には35日齢の雌ヒナを供試した。ヒナ1羽当たりに、 $10^{3.6}$ EID₅₀/0.1mlのIBDのF囊乳剤(愛媛株, 農水省 家畜衛生試験場より分与)を0.1mlずつ経口接

種した。また、対照として正常ヒナのF囊乳剤を経口接種した実験区も設けた。接種6日後に実験区は5羽を、陰性対照区は3羽を断頭と殺後、直ちにF囊を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液に投入した。上記と同様にHE標本を作製し、光学顕微鏡下で観察した。

結 果

実験1. BあるいはDexがF囊に与える影響 (F囊組織の経日変化)

30日齢の白色レグホーン種雌ヒナに、体重1kg当たり2mgあるいは10mgのBまたはDexを投与し、24、48および72時間後に採取したF囊の湿重量とその体重に対する比率を、それぞれ表2ならびに図3に示した。Bの2mgあるいは10mgの投与では、48時間後にF囊重量およびその重量比率が最も小さかった。72時間後の値は48時間後の値よりも大きかった。また、投与48および72時間後では、F囊の湿重量およびその重量比率は、投与量に依存して有意に小さかった($p < 0.05$)。

一方、Dexの2mgあるいは10mg投与により、48および72時間後までF囊重量ならびに重量比率は経日的に小さくなり、キャリアーのコーンオイルを投与したキャリアー投与区との間に統計的に有意差($p < 0.05$)が認められた。また、投与48および72時間後では、F囊重量およびその重量比率の値は、Dexの投与量に依存して有意に小さかった($p < 0.05$)。

本実験におけるF囊の組織変化に関する観察結果を表3に示した。また、コーンオイルを投与したキャリアー投与区のF囊のHE染色像を図4に示した。キャリアー投与区のF囊は、非投与のF囊とほぼ同様の組織像であった。すなわち、F囊内腔には十数条の粘膜ヒダが認められ、ヒダの腔側表面は粘膜上皮組織で覆われていた。よく発達したヒダには、中央部に筋繊維と連なる中隔結合織が認められ、ヒダの固有層には多面性を示す多数のリンパ濾胞(スタニウス濾胞)が観察された。リンパ濾胞は、外側にリンパ細胞の密度の高い皮質部と内側に密度がやや低い髄質部に分けられ、これらが表層の粘膜上皮の基底膜と連続する基底膜により明瞭に区分

されていた。皮質部のリンパ細胞は髄質部のそれに比べてやや暗調であるが、大きさや形態にはほとんど差が認められなかった。髄質部と連続性を示すリンパ濾胞の粘膜上皮部には、濾胞関連上皮(FAE:Follicle Associated Epithelium)が認められた。一方、リンパ濾胞内は多数のリンパ細胞で満たされていたが、ごく一部に核凝縮を伴う細胞死滅像が観察されたことから、キャリアー投与区ならびに非投与区のF囊の組織は±と判定した。

Bを10mg投与して24時間後のF囊の組織像を図5に示した。リンパ濾胞は小型化する傾向が認められるとともに、髄質部ではリンパ細胞数が減少し、核凝縮像を示す死滅したリンパ細胞が増加した。粘膜上皮組織は全体的に肥厚し、一部で褶曲変化も観察された。これらのことから、F囊の組織変化は+と判定された。また、Bの10mg投与区の72時間後の組織変化の判定は++であった。一方、Bの2mg投与区では48および72時間後において+であった。

Dexの10mg投与区における48時間後のF囊の組織像を図6に示した。粘膜ヒダの固有層のリンパ濾胞は小型化し、髄質部のリンパ細胞数は顕著に減少し、明らかな退行性変化を示した。リンパ濾胞の皮質部においてもリンパ細胞がやや減少した。また、リンパ濾胞髄質部では核凝縮を伴う死滅細胞数の顕著な増加が認められた。さらに、粘膜上皮組織は著しく肥厚し、ヒダの遊離端全般にわたる褶曲が観察された。リンパ濾胞の中には、リンパ細胞が著しく減数した空胞様の構造を呈する囊胞も観察された。Dex投与24時間後のF囊の組織変化はいずれの投与量によっても+であった。Dexの2mg投与区では、投与48時間後ならびに72時間後では、それぞれ+、++、また、Dexの10mg投与区では、投与48時間後ならびに72時間後では、それぞれ++、+++と判定した。

実験2. Dex誘導性のF囊の萎縮に関する経時的調査

白色レグホーン雌ヒナにDexを投与し、その後の経時的な組織変化の判定結果を表4ならびにF囊重量とその重量比率を図7に示した。Dexの投与によりF囊

重量は経時的に減少した。F囊の組織変化の判定結果は、Dex投与0, 2, 4時間目では±であり、明瞭な退行性変化は認められなかった。また、Dex投与6, 12, 24時間目では+であった。さらに退行性変化は進み、投与48時間では++および72時間目では+++であった。

実験3. Dex誘導性のF囊の萎縮に関する走査型電子顕微鏡による観察

12日齢の無処理のヒナにおけるF囊の断面像を図8に示した。12日齢のF囊は皮質部はよく発達しリンパ細胞が多く存在したのに対し、髄質部ではリンパ細胞密度がやや低かった。髄質部では、網眼とよばれる星型の細網細胞から、数本の伸張した細網繊維同士により網工（ネットワーク）が形成され、その間に大、中、小のリンパ細胞や形質細胞が観察された。皮質部では細網細胞は乏しかった。

本実験においてキャリアーとして使用したコーンオイルを投与した28日齢のヒナのF囊髄質部の断面像を図9の上図に示した。28日齢のヒナではリンパ濾胞が十分に発達し、髄質内部は多数のリンパ細胞で満たされていた。また、細網細胞も観察された。各リンパ細胞同士が細網繊維により形成された支持組織により連絡し合っていた。リンパ細胞は暗調かつ緻密な大型の核とやや明調で粗な細胞質から構成されていることが観察された。

Dexを投与してから24時間後に採取したF囊の断面像を図9の下図に示した。リンパ細胞の減少が著しいリンパ濾胞の髄質部では、リンパ細胞間の連絡を担う細網繊維が消失傾向にあった。また、細胞の縮小とともに核の凝縮を呈するリンパ細胞が散見された（矢印）。さらに、図9下図の中央部のリンパ細胞では、核内のクロマチンが三日月状に凝縮していると思われる形態が捉えられた（矢先）。Dexを投与したリンパ細胞では、キャリアー投与のリンパ細胞（上図）と比較して、細胞核をとりまく細胞質が消失傾向にあり、細胞表面が平滑化しているように観察された。

実験4. 伝染性ファブリクス囊病ウイルス (IBDV) 感染によるF囊の壊死形態との比較

IBDVを経口感染させてから6日後のF囊の組織像を図10に示した。リンパ濾胞の皮質部と髄質部の区分が不明瞭になり、退行性変化の進行が観察された。リンパ濾胞内には多くのマクロファージが出現し、死細胞の貪食が認められるとともに、組織全体としては炎症を呈していた。これらのことより、IBDVによるF囊リンパ濾胞の病変は、典型的な変性壊死（ネクロシス）であると判定された。また、粘膜ヒダの遊離端に近いリンパ濾胞ほど変性壊死に陥っているものが多く認められた。濾胞内部のリンパ細胞の中には、核凝縮を伴う細胞死滅形態を呈するものもごく一部に観察された。

考 察

細胞の死滅機構といえば従来はネクロシスを思い浮かべることが多かったが、最近になりアポトーシスという細胞死滅機構が明らかとなり(Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980), 現在では細胞死滅機構は2つに大別されるようになった。

主に病理的な要因により発生するネクロシスは、細胞膜の変性ととともに細胞の膨潤ならびに核やミトコンドリアの膨化などの形態変化を特徴とする受動的な細胞死滅機構である。一方、アポトーシスは特定の誘発刺激に対する感受性細胞の能動的な死滅機構であり、特有の形態変化として核が凝縮すると同時に細胞自体が縮小し、組織内では隣接細胞との間隙が大きくなるなど、ネクロシスとは明らかに異なる組織像を示すと言われる(Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980)。

実験1では、ニワトリヒナにDexまたはBを投与し、F囊の萎縮形態を光学顕微鏡下で観察した結果、リンパ濾胞髄質部を中心にリンパ細胞が減少し、隣接の細胞との間隙が拡大した。また、核凝縮を呈するリンパ細胞の増加が観察された。これは、ラットの胸腺において認めらるGC誘導性のアポトーシスと同様の形態変化であり(Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980), ニワトリにおけるGC誘導性のF囊の萎縮過程においてアポトーシスによるリンパ細胞の死滅機構が発現しているこ

とを示唆しているものといえる。

また、図5ならびに6に示したように、GCの投与によるリンパ細胞の死滅による減少は、リンパ濾胞皮質部よりも髄質部のリンパ細胞で顕著であることは明らかであり、この両者のリンパ細胞間にはGCに対する反応に明確な違いが認められた。F囊のリンパ濾胞髄質部ではリンパ細胞の造成が行われ、未成熟なものから成熟したものまで各時期の発育段階のリンパ細胞が存在し、この中でも未成熟な細胞が大半を占めるのに対して(Naukkarinen and Sorvari, 1982)、皮質部では成熟したリンパ細胞が大多数を占めると言われている (Clawson *et al.*, 1967; 佐藤, 1971; Frazier, 1974)。これらのことから、未成熟なリンパ細胞は成熟したリンパ細胞と比較してGCに対する感受性が高いことが推定され、GC誘導性のアポトーシスの発現が髄質部でより顕著であったと考えられた。

実験1におけるDexとBの作用を比較すると、F囊の重量の減少度合いならびに組織の退行性変化の程度から、Dexの作用がより強いことが明らかとなった。ニワトリにおけるDexの生物学的な半減期はBよりもおよそ1.5倍長く、Dexの生物活性はBの20~30倍高いとされる(Birrenkott and Wiggins, 1984)。表3に示したように、Bの10mg投与区とDexの2mg投与区の48時間後におけるF囊重量の生体重に対する比率は、それぞれ0.31%と0.33%とほぼ同等の値であった。また、24あるいは72時間後の値ではDex 2mg投与区がB 10mg投与区よりも小さかった。これらのことから、F囊の萎縮に対する作用は、本実験ではDexがBよりも少なくとも5倍以上高いことがわかる。また、組織変化の結果からも、核凝縮を伴うリンパ細胞の死滅を誘導する作用がDexを使用した場合に高かった。以上のように、Dexを投与することで容易かつ速やかにアポトーシスを誘導できることが確認されたことから、以下の実験ではGCとしてDexを使用した。

実験2では、Dex誘導性のF囊の萎縮に関する経時的な形態変化を調べた。その結果、Dex投与後4時間目までは、明確な組織変化は観察されなかった。一方、

6時間目において、リンパ濾胞の小型化、髄質部のリンパ細胞の減少や核凝縮死滅細胞の増加、あるいは粘膜上皮組織の肥厚などの組織変化が認められ、以降、経時的に退行性変化が進行した。これらのことから、Dexを投与してから数時間以内に、リンパ細胞の生存機能に障害をもたらす生理化学的变化が発現し、その結果として細胞の死滅が誘導され、リンパ細胞が減少することによりF囊が萎縮するものと推察された。

実験3では、GC誘導性のF囊リンパ細胞の死滅現象をSEMで観察した。Dexの投与により髄質部ではリンパ細胞間の結合の疎化が観察された。このことは、Dexはリンパ細胞だけではなく、支持組織の構成を担う細網細胞系にも影響を及ぼすことを示している。また、Dexの投与により、リンパ細胞核内のクロマチンがほぼ三日月状に凝縮している像が観察された。正常な細胞では核内のクロマチンは網状構造をなし核内全体を満たしているが、アポトーシス発現細胞ではクロマチンが凝縮し、その形態は核膜周辺に半円形あるいは三日月状に凝縮することが多いことが哺乳類において示されている(Itoh *et al.*, 1991; Ogasawara *et al.*, 1993)。

実験4では、IBDV感染によりF囊の変性壊死(ネクローシス)を引き起こし、その組織変化を観察し、GC誘導性のアポトーシスと比較した。その結果、Dexでは髄質部のリンパ細胞が主に減少したのに対して、IBDV感染ではリンパ濾胞の髄質部と皮質部の区別なくリンパ細胞が死滅・減少した。また、IBDV感染ではリンパ濾胞内での炎症が顕著でマクロファージによる死滅リンパ細胞の貪食形態が明確であった。一方、Dexでは組織内の炎症はほとんどなく、細胞の小型化あるいは核の凝縮による死滅・消失で隣接細胞との間隙の拡大が特徴的であった。さらに、IBDV感染ではDexにおいて見られた核の凝縮を伴うリンパ細胞の死滅形態は多くはなかった。以上のことから、GC誘導性のF囊の萎縮はネクローシスとは異なる細胞死滅形態をたどることが明らかとなった。また、ネクローシスとアポトーシスではその組織変化や細胞の形態変化に明確な違いがあることが確認された。

小 括

ニワトリヒナにグルココルチコイド (GC) としてデキサメタゾン (Dex) を投与し、ファブリシウス嚢 (F嚢) の組織変化を調べた。その結果、Dexの投与によりF嚢は萎縮し、リンパ濾胞は退行性変化を示すとともに、濾胞内のリンパ細胞は死滅して減数した。また、リンパ細胞はリンパ濾胞内の皮質部よりも髓質部で顕著に減少し、アポトーシスに特有な細胞の萎縮や核の凝縮が多数観察され、隣接との細胞間の間隙が拡大した。さらに、SEMで詳細に観察したところ、Dexにより髓質部では細網細胞系も消失しリンパ細胞間の結合が切れているとともに、アポトーシスに特有な三日月状のクロマチンの凝縮像が観察された。

一方、IBDV感染で変性壊死を引き起こしたF嚢では、リンパ細胞は皮質や髓質の区別なくびまん性に死滅しており、マクロファージの貪食も観察され、組織全般に炎症が認められた。また、Dexで多く見られた核の凝縮を伴う死滅細胞はほとんど観察されなかった。

以上のことから、GC投与によるF嚢の萎縮にはネクローシスとは違うアポトーシスによるリンパ細胞の死滅機構が関与していることが示唆された。また、リンパ濾胞髓質部の未成熟なリンパ細胞は皮質部の成熟リンパ細胞と比較しGCに対する感受性が高く、GC誘導性のアポトーシスの発現がより顕著であることが推察された。

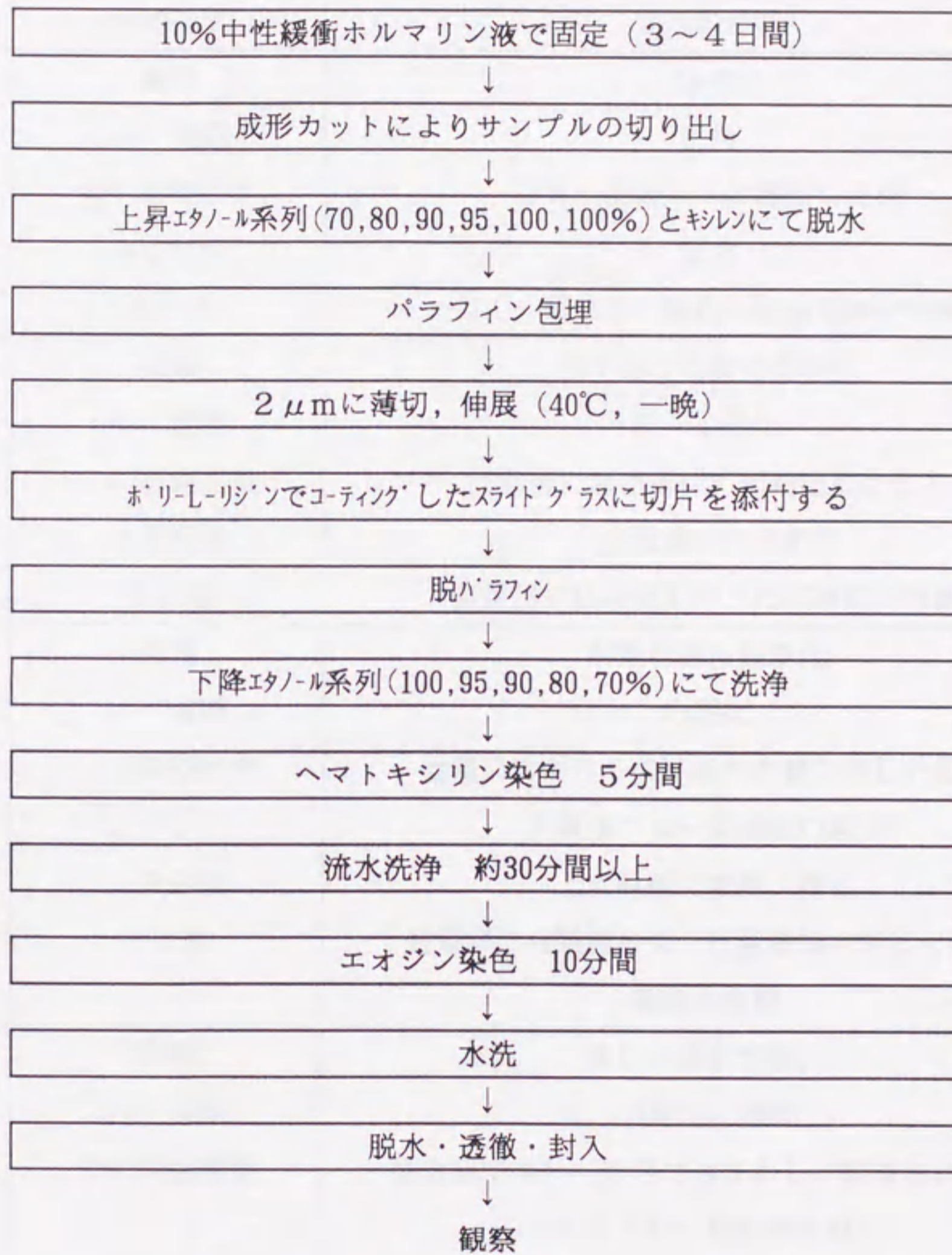


図1. HE標本の作成手順

表1. F囊の萎縮における組織変化の判定基準

判定	判定要素	変化の特徴
±	概観 リンパ濾胞 リンパ細胞密度 上皮組織 その他	正常 正常 皮質・髄質ともに緻密に充満 正常 ごく一部にリンパ細胞の凝縮死滅が観察
+	概観 リンパ濾胞 リンパ細胞密度 上皮組織 その他	やや退行性変化を示す 若干小型化 髄質部におけるリンパ細胞密度の低下 上皮組織はやや肥厚 髄質部に核凝縮を伴う死滅細胞が増加
++	概観 リンパ濾胞 リンパ細胞密度 上皮組織 その他	明確な退行性変化 小型化 髄質部におけるリンパ細胞密度の著しい低下 皮質部のリンパ細胞数の減少 上皮組織は肥厚・褶曲 髄質部に核凝縮を伴う死滅細胞が著しく増加 嚢胞の散発
+++	概観 リンパ濾胞 リンパ細胞密度 上皮組織 その他	著しい退行性変化 小型化・萎縮 髄質部ではリンパ細胞はわずかしか観察されない 皮質部のリンパ細胞数の減少 上皮組織は著しい肥厚・褶曲 皮質・髄質部に核凝縮を伴う死滅細胞が増加 嚢胞の多発, 上皮性基底膜の消失

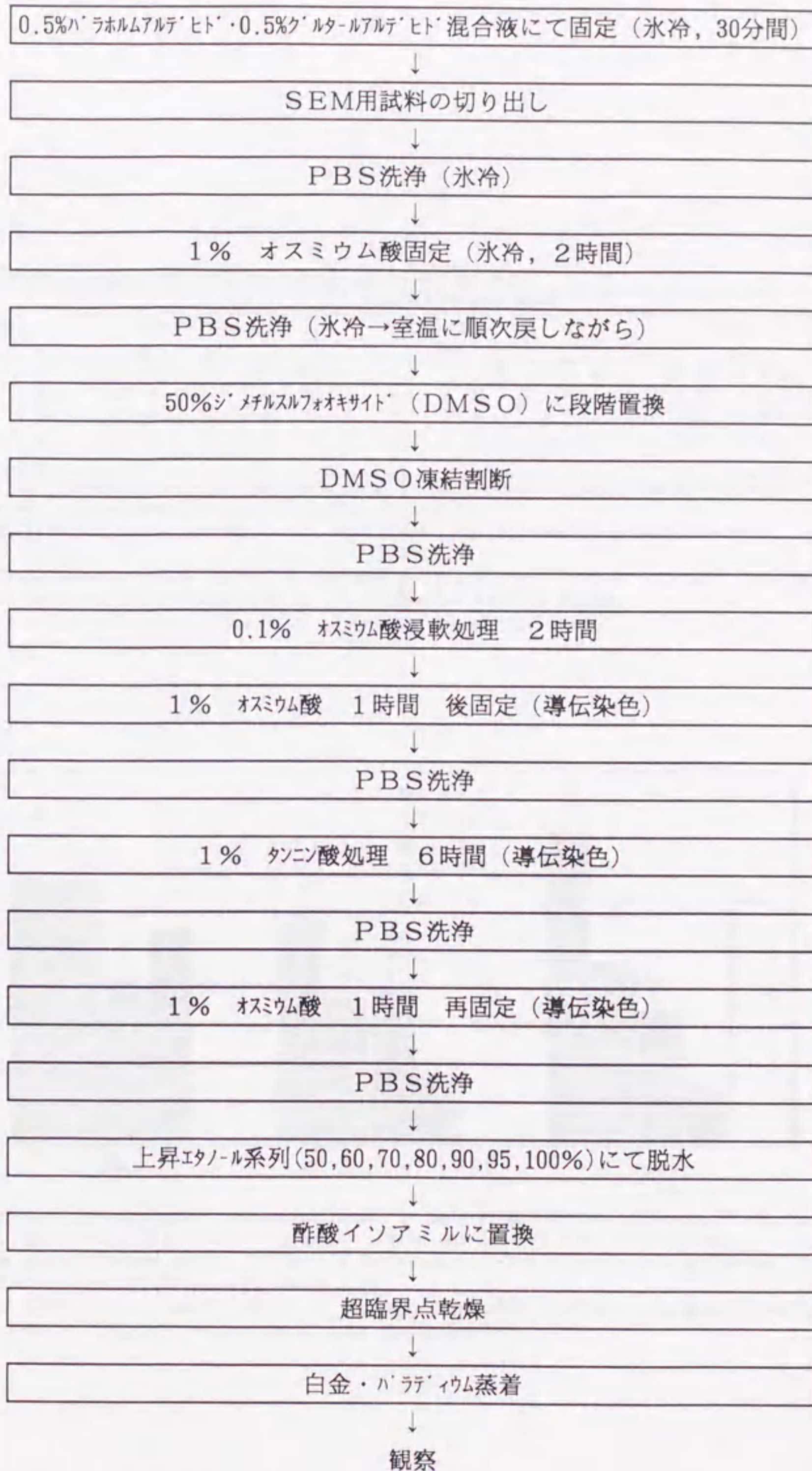


図2. SEMによる観察のための試料作成手順

Table 2. Effects of glucocorticoids on bursal weight in the chick.

experimental group	(n)	time after treatment								
		24hrs.		48hrs.			72hrs.			
		(g)			(g)			(g)		
B-2mg ⁴⁾	3	1.7 ± 0.1 ¹⁾	c ²⁾	AB ³⁾	1.4 ± 0.3	b	A	2.0 ± 0.1	d	B
B-10mg ⁴⁾	3	1.6 ± 0.1	bc	B	0.9 ± 0.1	ab	A	1.3 ± 0.2	c	AB
Dex-2mg ⁵⁾	3	1.1 ± 0.2	a	A	1.0 ± 0.1	b	A	0.8 ± 0.1	b	A
Dex-10mg ⁵⁾	3	1.2 ± 0.1	ab	B	0.4 ± 0.1	a	A	0.3 ± 0.1	a	A
carrier ⁶⁾	3							1.6 ± 0.1	cd	

- 1) Values of each experimental group were subjected to analysis of variance and differences between means were assessed by Duncan's multiple range test.
- 2) Means with different small letters in the same hours after treatment are significantly different ($p < 0.05$).
- 3) Means with different capital letters in the same group are significantly different ($p < 0.05$).
- 4) Birds were treated with corticosterone at 2 or 10mg per kg body weight.
- 5) Birds were treated with dexamethasone at 2 or 10mg per kg body weight.
- 6) Birds were treated with corn oil.

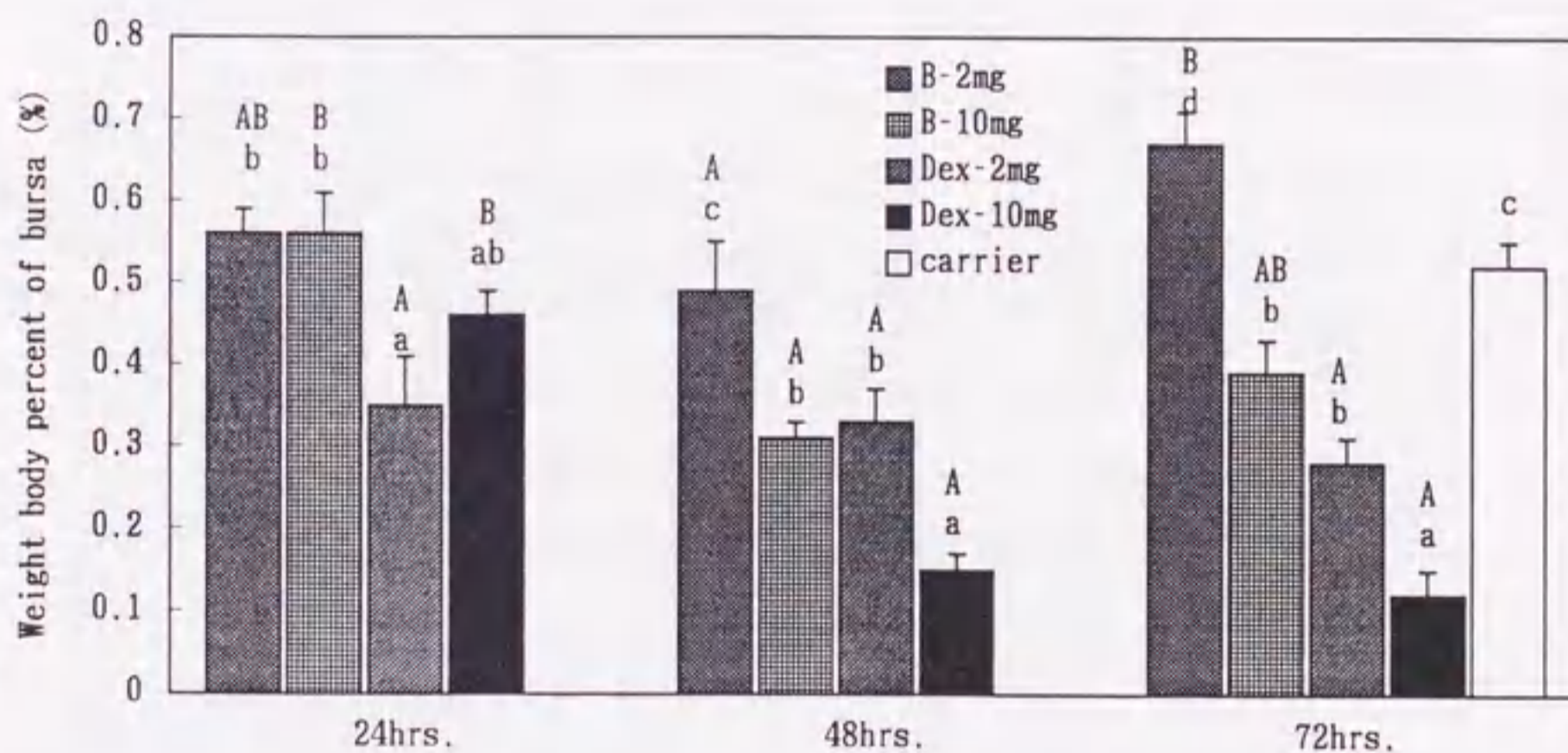


Fig 3. Effects of corticosterone and dexamethasone on body weight percent of bursa in the chick. Each column and vertical line represents a mean and SE of 3 birds, respectively. Means with different capital letters in the same group are significantly different by Duncan's new multiple range test ($p < 0.05$). Means with different small letters in the same hours after treatment are significantly different by Duncan's new multiple range test ($p < 0.05$).

Table.3 Morphological changes of bursa
of Fabricius in experiment 1.

experimental group	time after treatment		
	24hrs.	48hrs.	72hrs.
B-2mg ¹⁾	+	+	+
B-10mg ¹⁾	+	+	++
Dex-2mg ²⁾	+	+	++
Dex-10mg ²⁾	+	++	+++
carrier ³⁾			±

1) Birds were treated with 2 or 10mg of corticosterone per kg body weight.

2) Birds were treated with 2 or 10mg of dexamethasone per kg body weight.

3) Birds were treated with corn oil.

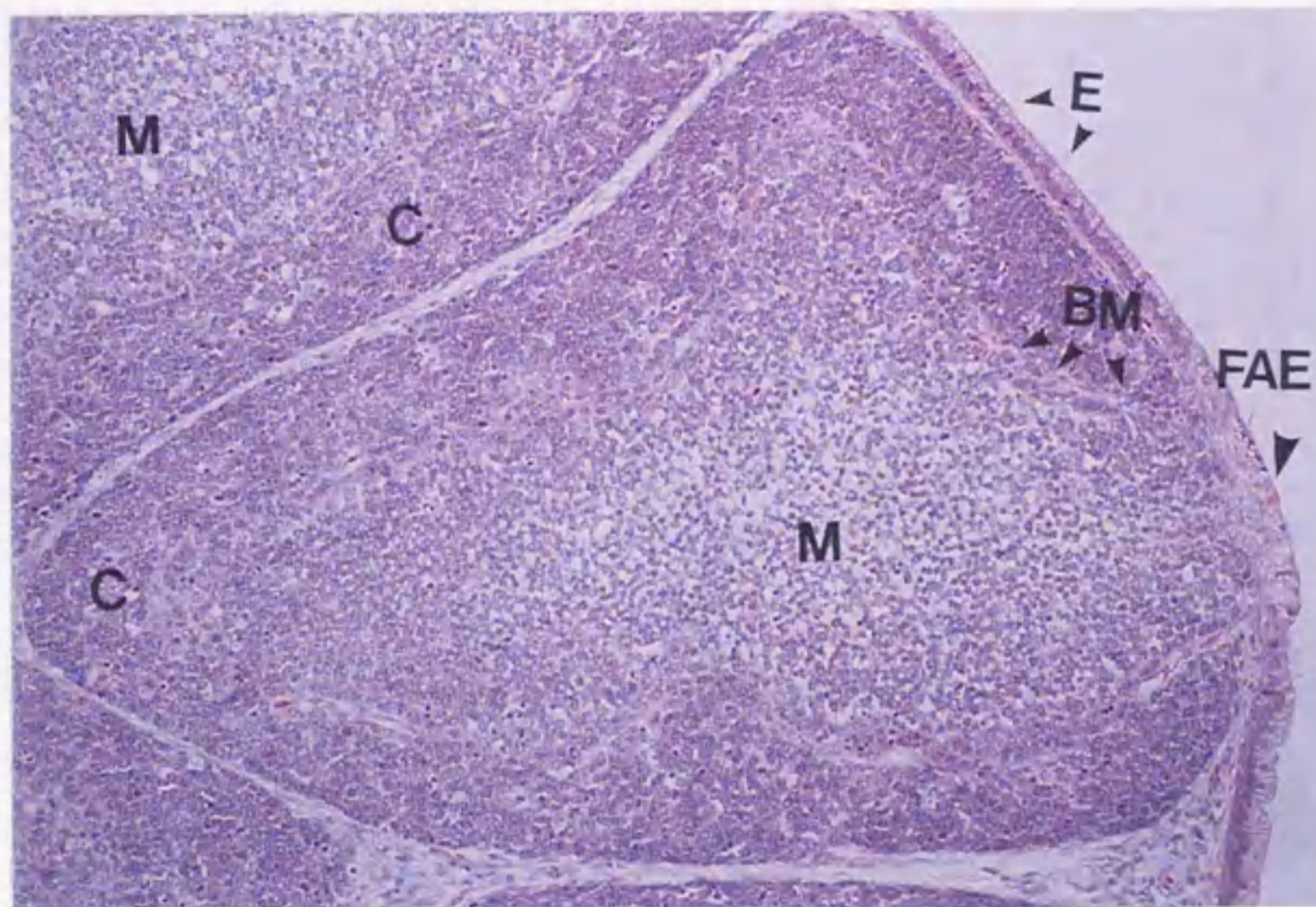
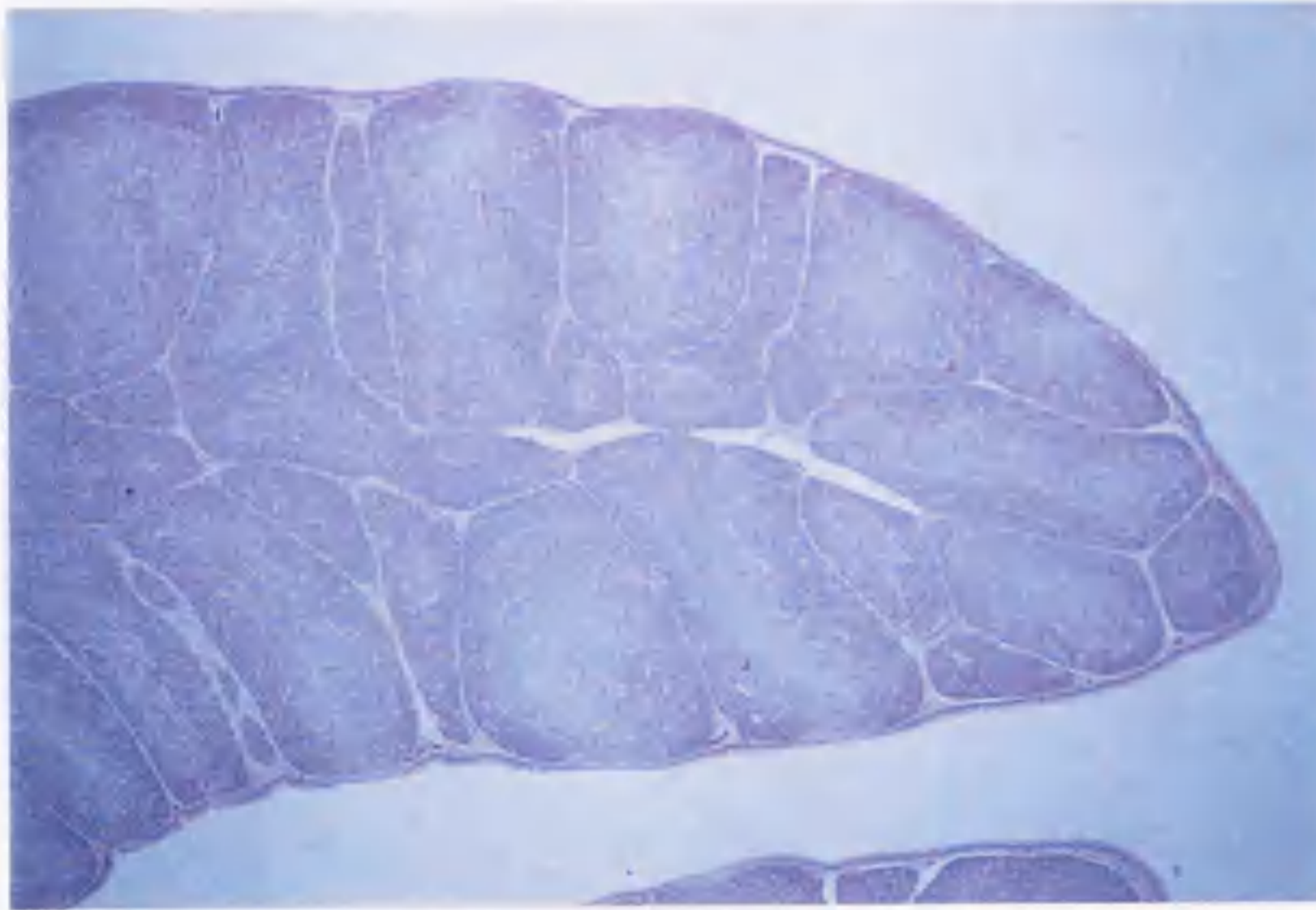


Fig.4. Morphology of plica (upper photograph, $\times 40$) and lymphoid follicle (below photograph, $\times 200$) in the bursa of Fabricius of chick 72 hours after treatment with corn oil . HE stain. M: Medulla, C: Cortex, FAE: Follicle Associated Epithelium, BM: Basement Membrane, E:Epithelium

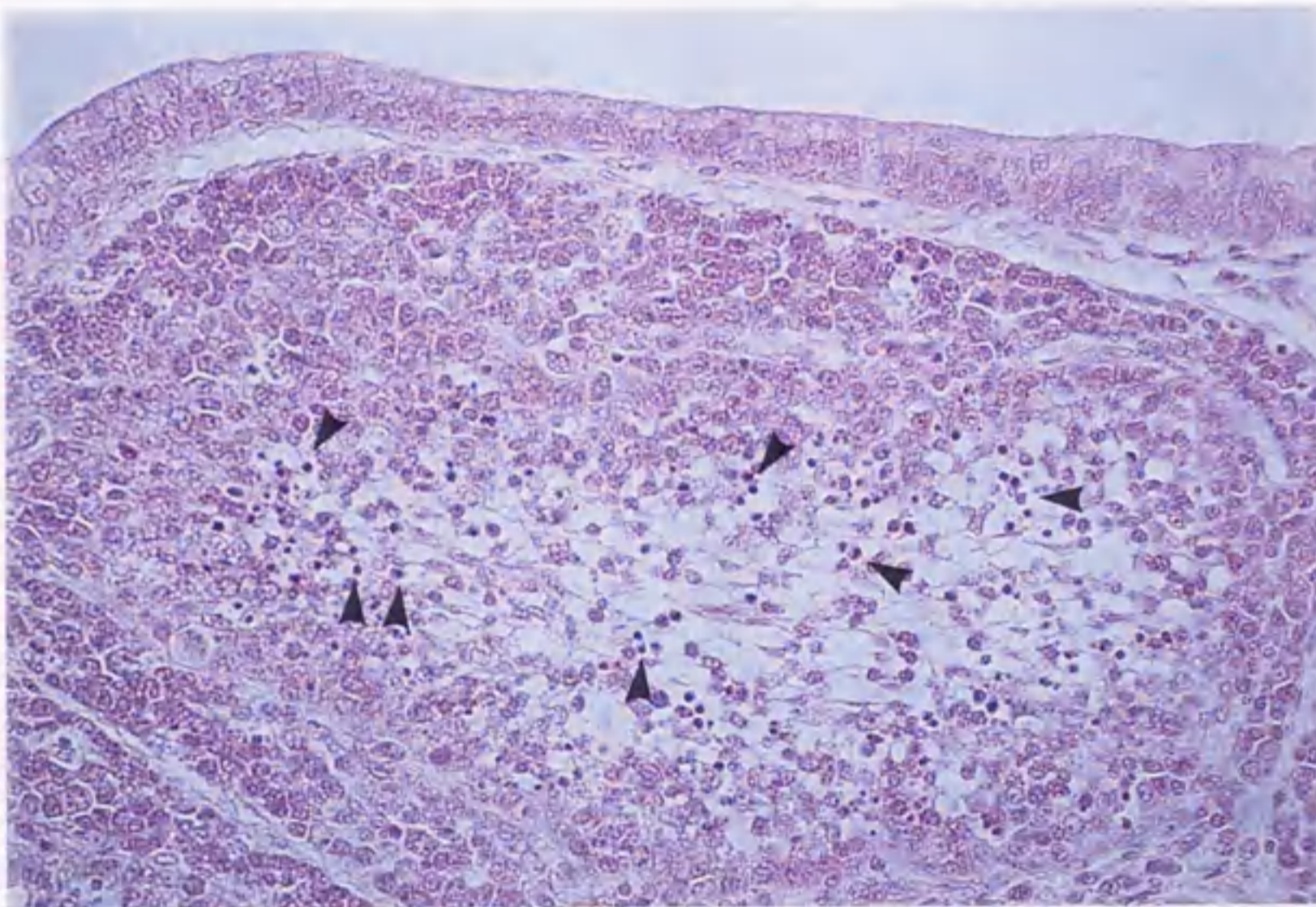
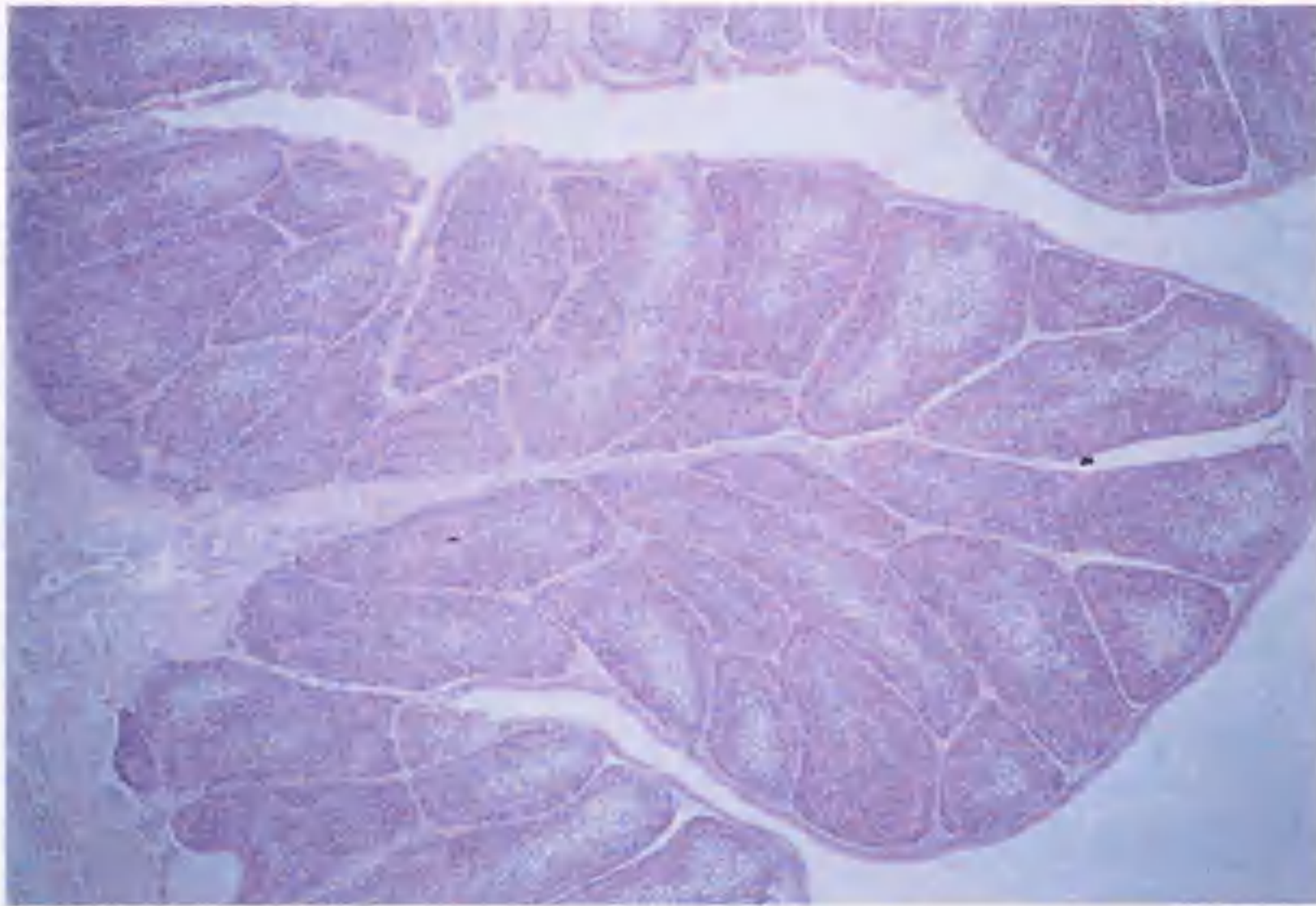


Fig.5. Morphology of plica (upper photograph, $\times 40$) and lymphoid follicle (below photograph, $\times 400$) in the bursa of Fabricius of chick 24 hours after treatment with corticosterone (10mg/kgB.W.). HE stain. arrow heads : nucleus condensation.

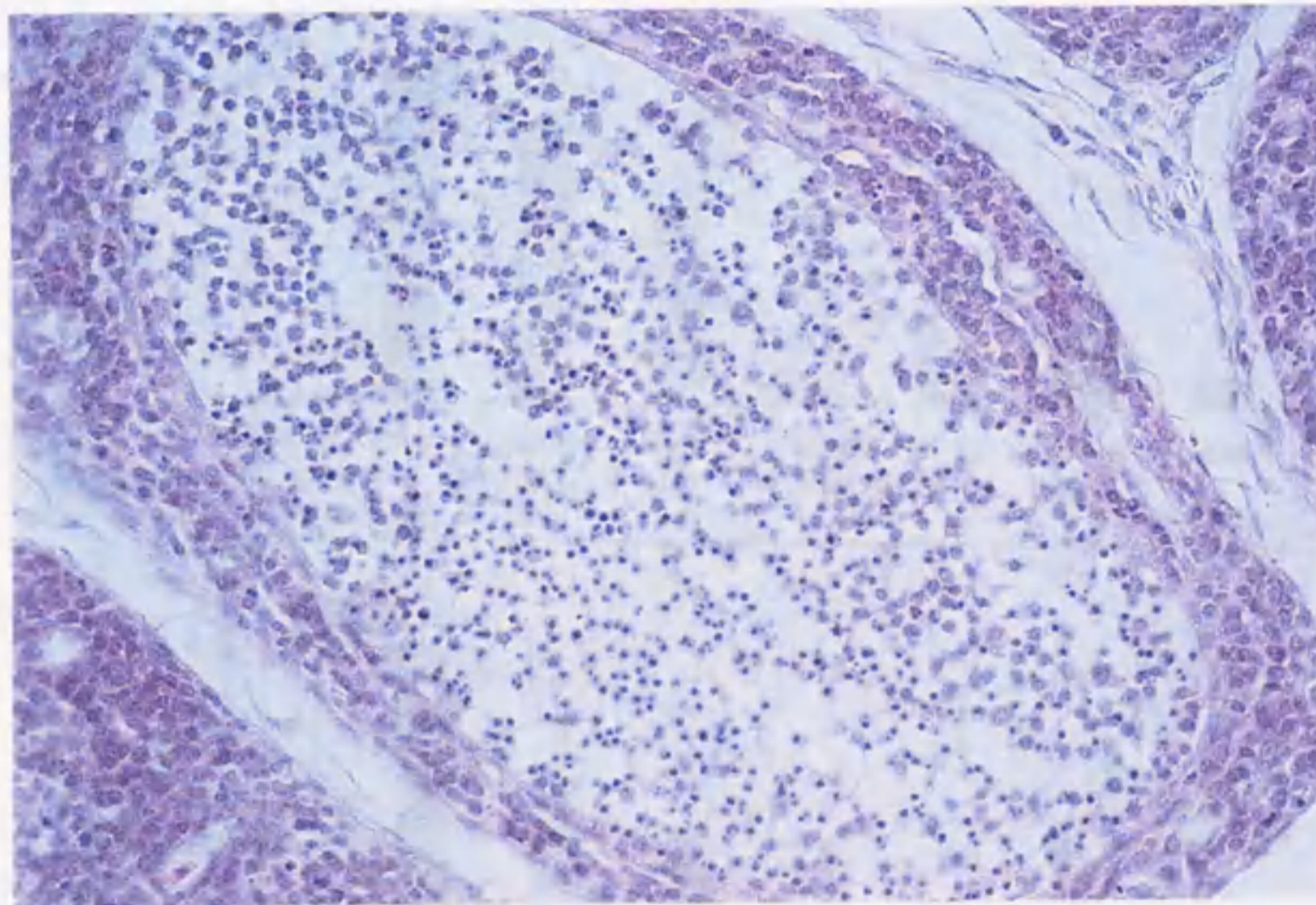
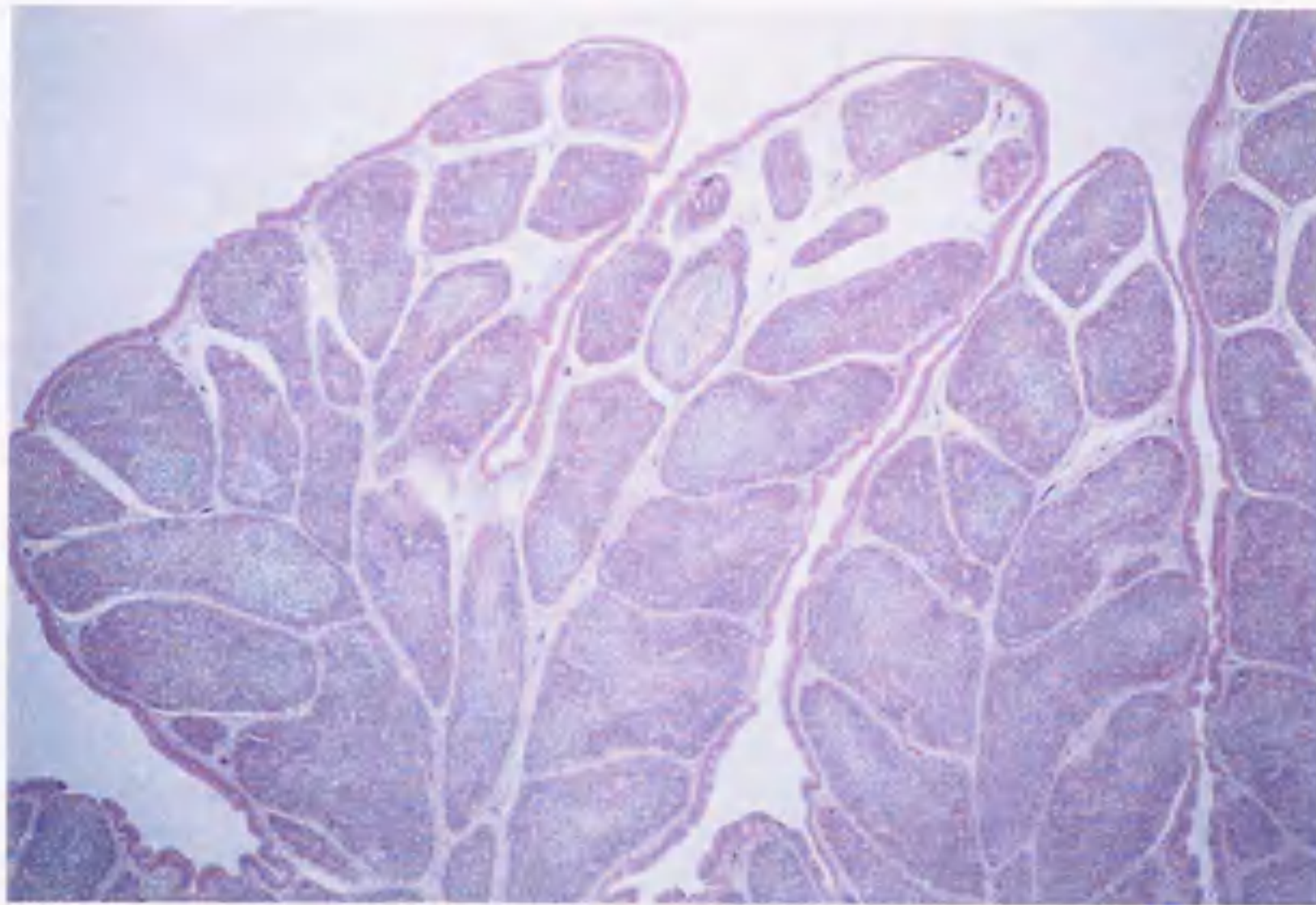


Fig.6. Morphology of plica (upper photograph, $\times 40$) and lymphoid follicle (below photograph, $\times 400$) in the bursa of Fabricius of chick 48 hours after treatment with dexamethasone (10mg/kgB.W.). HE stain.

Table 4. Effects of dexamethasone on morphological changes of bursa of Fabricius.

time after treatment	Morphological changes
0hrs.	±
2hrs.	±
4hrs.	±
6hrs.	+
12hrs.	+
24hrs.	+
48hrs.	++
72hrs.	+++
control ¹⁾	±

1) Control is 72 hours after treatment with carrier (corn oil).

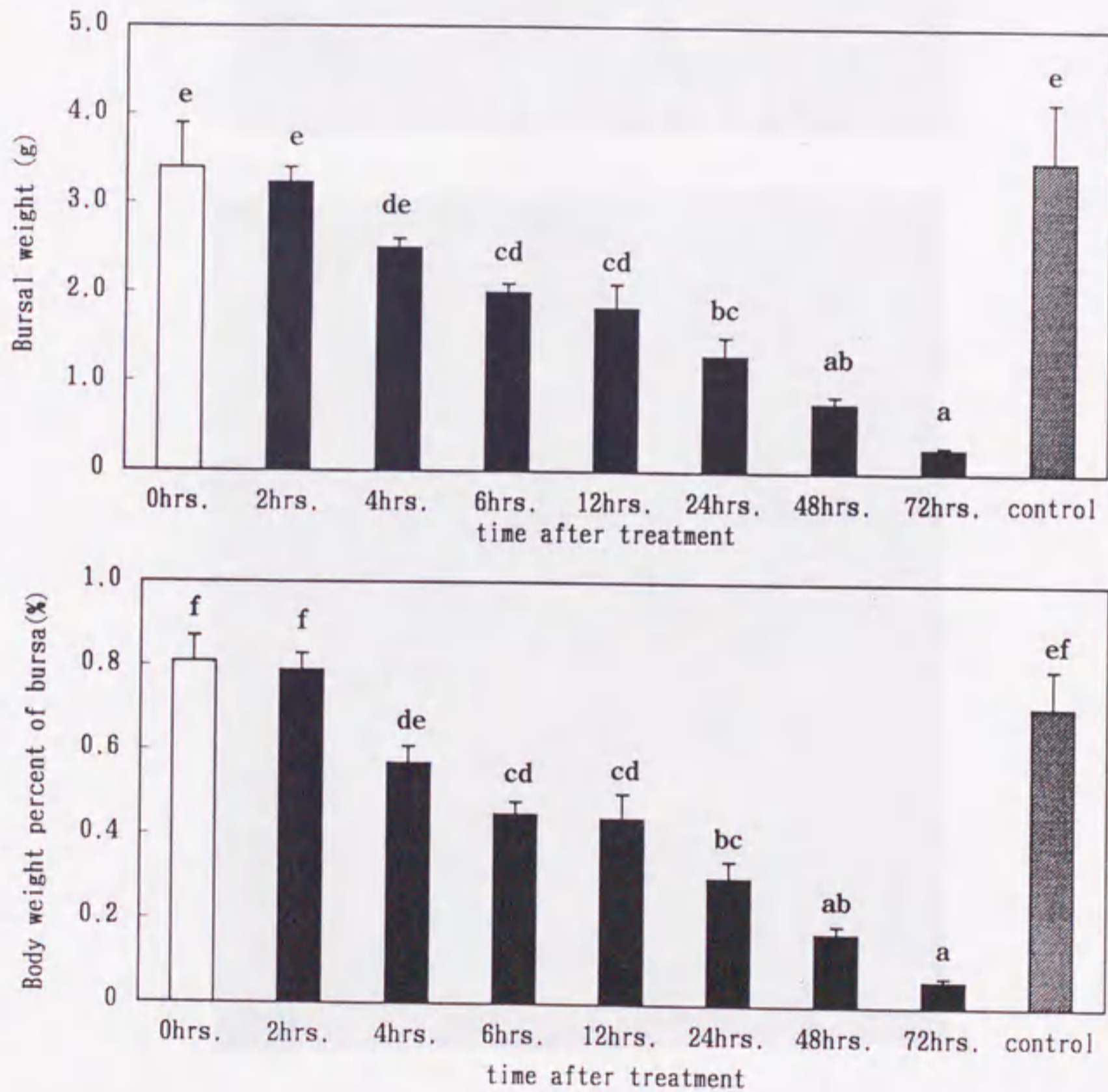


Fig.7 Effects of dexamethasone (10mg/kg) on wet weight of bursa and body weight percent of bursa in the chicken. Each column and vertical line represents a mean and SE of 3 birds, respectively. Means with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

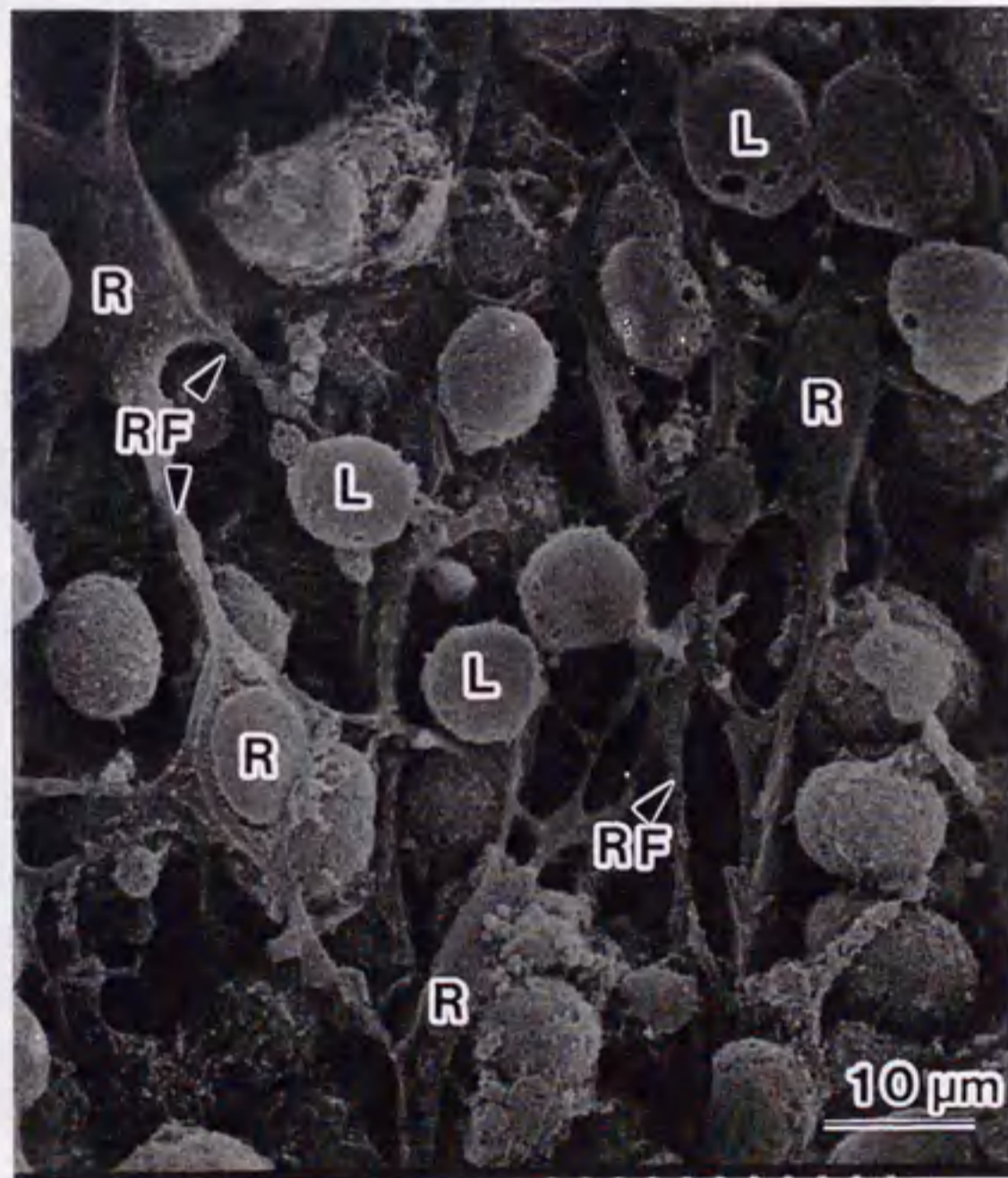


Fig.8. Morphology of lymphoid follicle (upper photograph, $\times 250$) and intrafollicular microstructure (below photograph, $\times 2,500$) of the bursa of Fabricius of 12-day-old chicken. R: Reticulocyte, RF: Reticular Fiber, L:Lymphocyte. (SEM micrograph).

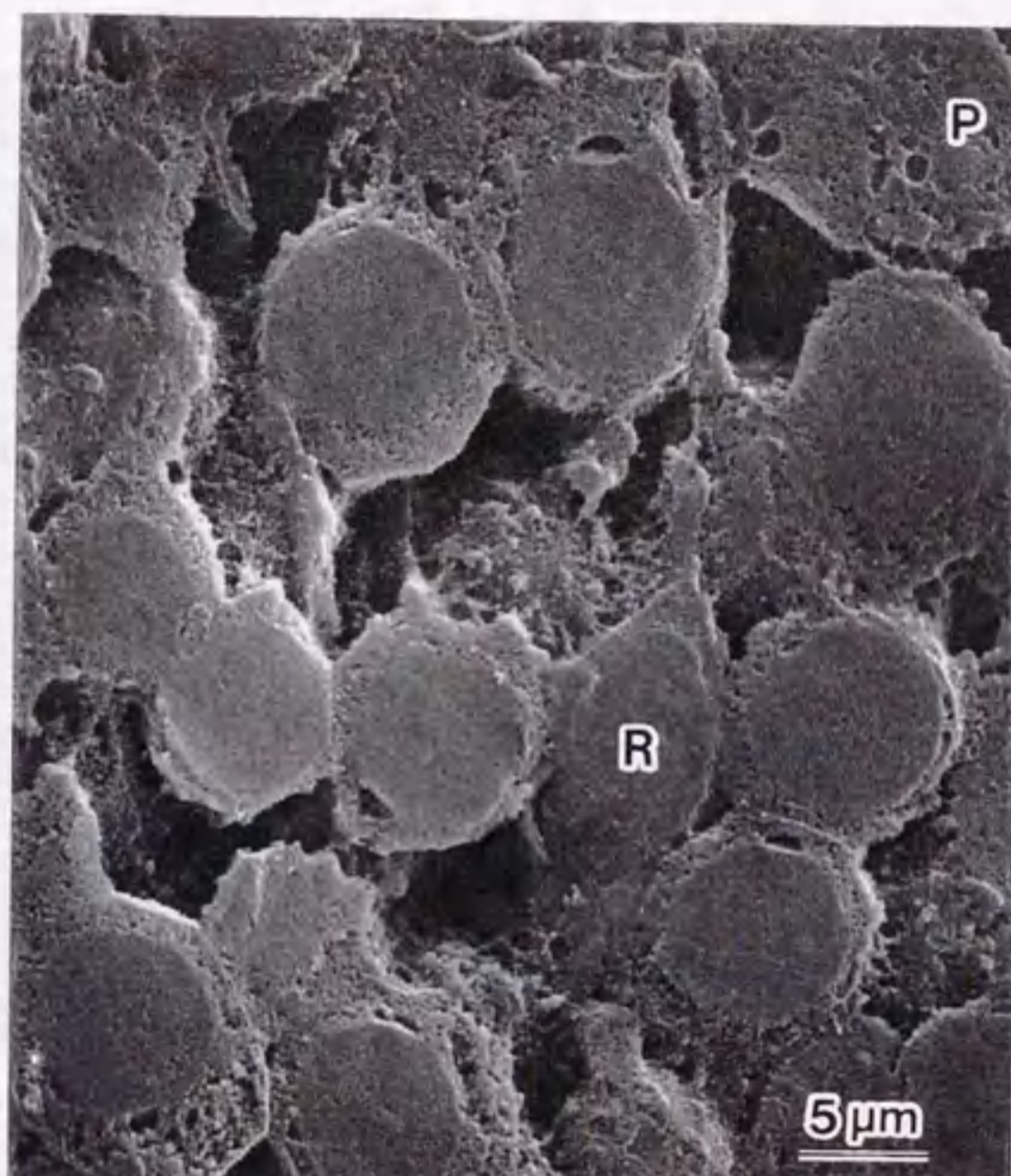


Fig.9. Intrafollicular microstructure of the bursa of Fabricius of 28-day-old chicken treated with corn oil (upper photograph, $\times 5,000$) and dexamethasone (below photograph, $\times 5,000$). SEM micrograph. arrow : chromatin condensation, arrow heads : nucleus condensation, R: Reticulocyte, P: Plasma Cell

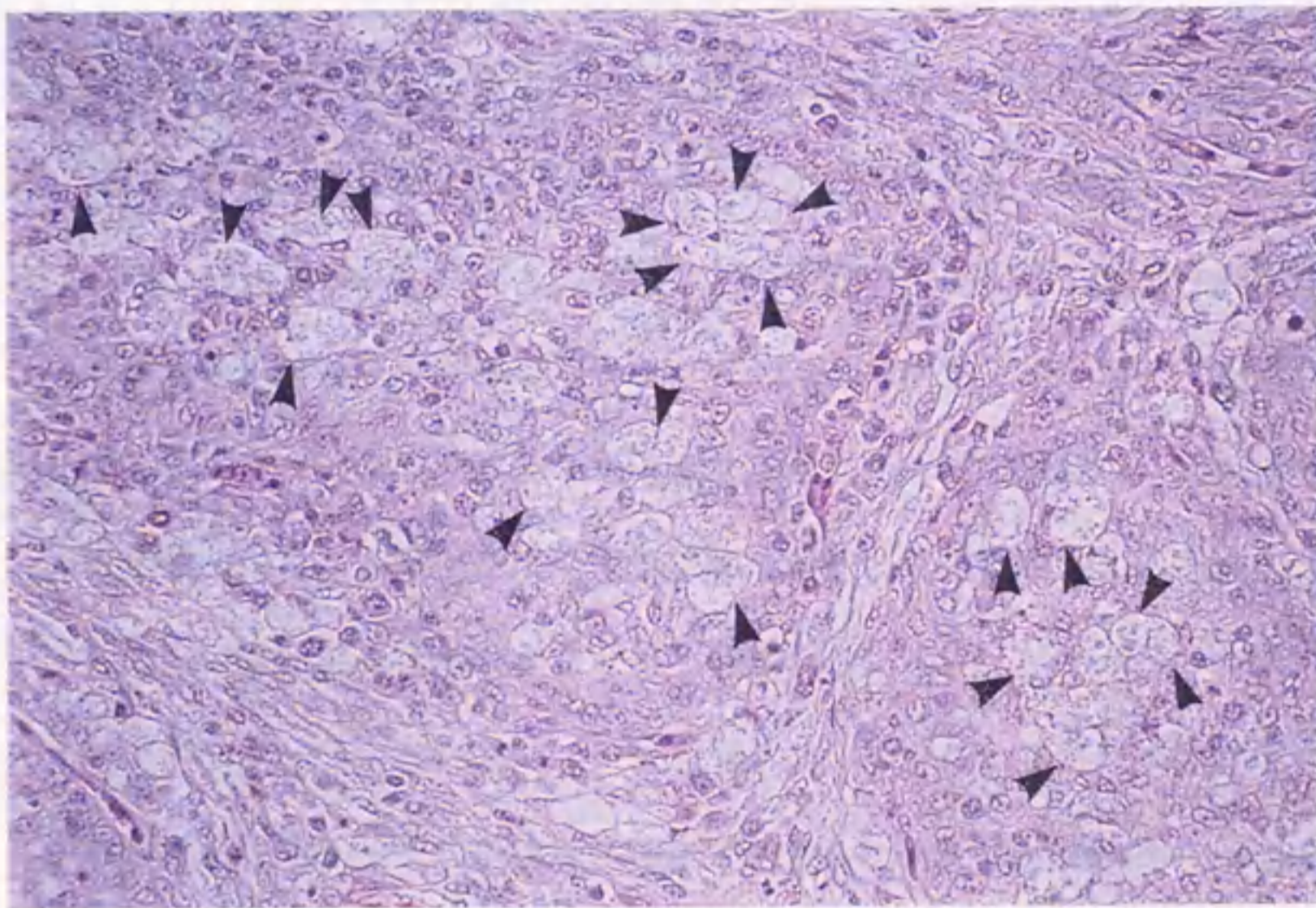
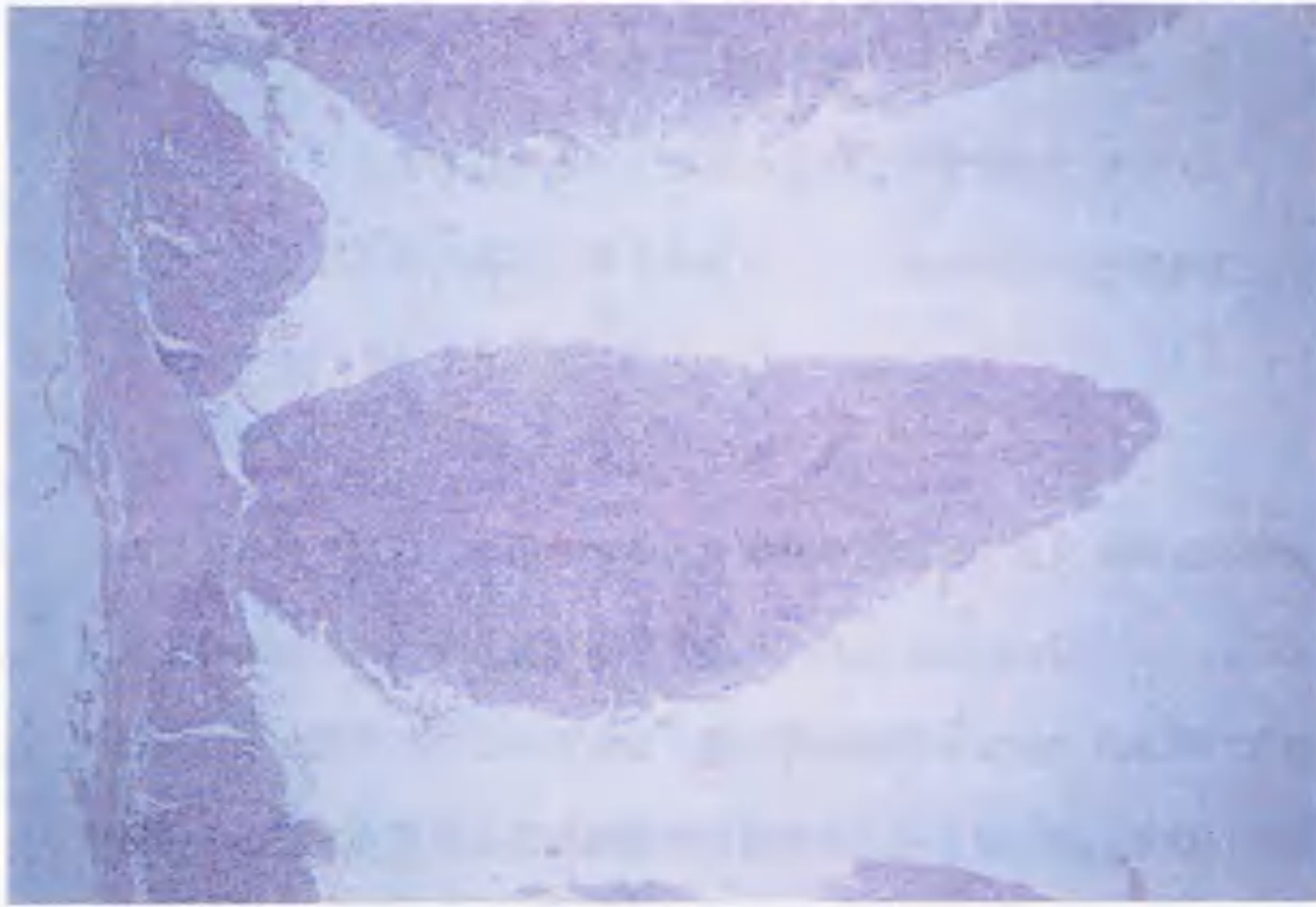


Fig.10. Morphology of plica (upper photograph, $\times 40$) and lymphoid follicle (below photograph, $\times 400$) in the bursa of Fabricius of chick 6 days after oral inoculation with infectious bursal disease virus (IBDV). HE stain. arrow heads : Macrophage.

第2章

F囊におけるグルココルチコイド誘導性のアポトーシスの発現に関する生化学的・免疫組織化学的検討

緒論

ニワトリヒナにGCを投与すると、胸腺や脾臓とともに鳥類の体液性免疫の構築に重要な役割を果たすF囊が萎縮する (Dieter and Breitenbach, 1970; Gross *et al.*, 1980)。第1章では、このようなF囊の萎縮過程を組織学的に調べた結果、核凝縮や細胞の小型化を呈する死滅細胞の増加が明らかとなった。また、IBDV感染による変性壊死とは異なり、GCではF囊の退行性変化の過程において炎症反応は認められず、細胞の小型化や細胞数の減少より隣接の細胞との間隙の拡大が認められた。これらのことから、GCの作用で引き起こされるF囊の萎縮は、ネクローシスとは形態的に異なるアポトーシスによるリンパ細胞の死滅に起因することが示唆された。

Wyllie (1980)は、ラットの胸腺リンパ細胞におけるGC誘導性のアポトーシスの発現過程において、細胞核内のクロマチン繊維が約180塩基対を単位としたオリゴヌクレオソームに断片化されることを示した。この現象は、電気泳動によって解析するとアガロースゲル上で梯子状の泳動像として観察されるため、ラダーパターンあるいはラダーストラクチャーと呼ばれる。これは、アポトーシスの発現過程でエンドヌクレアーゼによってDNAがヌクレオソーム単位に切断された結果生じるもので、アポトーシスを検証する上での重要な生化学的指標の一つである (Wyllie, 1980; Wyllie *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1992)。したがって、GCによるF囊の萎縮過程においてアポトーシスの発現を証明するには、その死滅形態の組織学的な特徴を明らかにすることに加えて、DNAラダーの発現を検証する必要がある。

近年、このようなアポトーシスを発現した細胞には比較的多量のDNA断片が局在することを利用して、組織切片上においてアポトーシスの発現を免疫酵素化学的

に検出する方法が開発された (Wijsman *et al.*, 1993)。すなわち、ターミナルデオキシヌクレオチド転移酵素によりアポトーシス発現細胞に局在するDNA断片群の3'-OH末端にジゴキシゲニン化ヌクレオチドを導入し、酵素標識抗ジゴキシゲニン抗体を介して特異的にDNA断片群を染色することにより、アポトーシスの発現とその発現部位を検出する方法である。このようなDNAの断片化を利用し免疫組織化学的に、アポトーシスの発現形態や発現部位の特徴をより詳細に調べることも重要である。

そこで本実験では、GC誘導性のF囊の萎縮過程において、リンパ細胞の核DNAをアガロースゲル電気泳動法によって解析し、DNAラダーの発現を調べるとともに、その経時変化について検討した。また、DNAの断片化現象を利用しアポトーシスの発現細胞を免疫組織化学的に検出する手法を用いて、GC誘導性のF囊の萎縮に対するアポトーシスの関与とその発現部位と形態的特徴に関して検討を加えた。

材料および方法

実験5. GC投与がF囊の核DNAに及ぼす影響 (Dex投与2~72時間の検討)

<供試鶏および実験計画>

本実験では35日齢の白色レグホーン種雄ヒナを供試した。コーンオイルに懸濁したDexを、ヒナの体重1kg当たり10mgとなるように、頸部皮下にそれぞれの体重に合わせて約300 μ lずつ注射した。Dex投与直後ならびに投与2, 4, 6, 12, 24, 48および72時間目に、3羽ずつのヒナを断頭と殺後、直ちにF囊を採取し、液体窒素内で解析時まで保存した。

<DNAの抽出>

F囊リンパ細胞からのDNAはフェノール抽出した。まず、0.01Mトリス-塩酸・0.01MEDTAバッファー(pH 8.0, 和光純薬株)中にて、F囊組織約1gを氷冷中にて均質化

(ヒジネット)後, 10% SDS (和光純薬株) 溶液を加え振とうした。さらに, 蛋白質分解酵素プロテイナーゼ K (Boehringer Mannheim) を加え, 60°C で 4 時間, 蛋白分解処理を行った。次いで, フェノールとクロロホルムにより試料中の蛋白質を除去し, これに約 1/10 量の 4 M 酢酸ナトリウム (ナカテック株) 溶液を加えた後に, 冷エタノールにより DNA を析出させ, -80°C 下で析出・沈殿を促進した。続いて, 1500 × g で 10 分間遠心分離し, 上清を除去し, 70% エタノールにて 2 回洗浄した。真空乾燥後, 0.01 M トリス塩酸・1 mM EDTA バッファー (TE バッファー-pH 7.5, 和光純薬株) にて DNA を溶解した。この試料液に, RNase A を加え, 37°C で 3 時間, RNA を完全に消化・分解した。このあと, 再度, フェノール・クロロホルム法により試料中の蛋白質を除去し, 前述と同様の方法で DNA を抽出後, TE バッファーに溶解し, 泳動用の DNA 試料とした。

試料中の DNA 量を 260nm 吸光度法により測定し, DNA 20 μg 相当量を採取し, 電気泳動により解析した。

<アガロースゲル電気泳動>

90 mM トリス・酢酸・1 mM EDTA バッファー (和光純薬株) 中にて, イチウムブロマイド (和光純薬株) を加えた 1.8% アガロースゲルより, 電圧 60 V, 4°C で 3 時間, 電気泳動を行った。また, DNA 試料と同時に DNA マーカー (Maker 4, 株ニッポンジーン) も泳動した。

電気泳動終了後, UV トランスイルミネータ (フナコシ TL-33) 上で紫外線 (365 nm) 照射下で泳動状態を観察した。

実験 6. GC 投与が F 嚢の核 DNA に及ぼす影響 (Dex 投与 4 時間までの検討)

本実験では 21 日齢の白色レグホーン種雄ヒナを供試した。オリーブオイルに懸濁した Dex を, ヒナの体重 1 kg 当たり 10 mg となるように, それぞれの体重に合わせて約 200 μl ずつ頸部皮下に注射した。Dex 投与直後ならびに投与 0.5, 1, 2 および 4 時間目に, 3 羽ずつのヒナを断頭と殺後, 直ちに F 嚢を採取し, 上記と同様の方法により DNA を解析した。

実験7. GC誘導性またはIBDV壊死性のF囊の萎縮に関する免疫組織化学的検討

<供試鶏および実験計画>

本実験では、30日齢の白色レグホーン種雄ヒナを供試した。オリーブ油に懸濁したDexを、体重1kg当たり10mgとなるように、頸部皮下に注射した(Dex区)。また、Dex区とほぼ同容量のオリーブ油を注射したキャリアー区と非投与の対照区を設けた。Dexを投与後1, 2, 4, 24ならびに48時間目に、各実験区から3羽ずつのヒナをランダムに選び出し体重測定後断頭と殺し、F囊を採取した。F囊の湿重量を測定した後、直ちに10%中性ホルマリン緩衝液により固定した。

一方、30日齢の雄ヒナに対して実験4と同様の方法によりIBDVを経口接種し、接種6日目において5羽のヒナを断頭と殺した後、F囊を採取し、直ちに10%中性ホルマリン緩衝液により固定した。

<アポトーシス発現細胞に対する免疫組織化学的方法(Apop-Tag法)>

F囊の薄切標本を第1章と同様の方法により作成した。アポトーシスの発現細胞を検出するための免疫組織化学的手法に関する概要を図11に示した。薄切したパラフィン標本より、パラフィンを除去した後に、プロテナーゼKにより抗原の暴出処理を行い、次いで、2%過酸化水素水中にて内因性ペルオキシダーゼを処理した。続いて、モイストチャンバー(加湿、乾燥防止)内で37℃で1時間、ターミナルデオキシヌクレオチド転移酵素(TdT酵素)によりジゴキシゲニンの付加反応を行った。反応停止処理後、同じくモイストチャンバー内において37℃で30分間、ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を反応させた。以上の方法において、TdT酵素によるジゴキシゲニンの付加処理から酵素標識抗体の処理は、アポプ・タグキット(Apop-Tag, Oncor)を使用した。その後、0.05%DAB(3,3'-ジアミノベンジジン, 和光純薬(株))により発色反応を行ない、1%メチルグリーン染色液(和光純薬(株))で後染色し透徹・封入後、光学顕微鏡下で観察した。免疫組織化学的手法による判定基準は、リンパ濾胞内のごく一部のリンパ細胞に陽性が認められるものを±

とした。また、陽性を示したF囊組織については、リンパ濾胞内のリンパ細胞数に占める陽性細胞数の比率により、1～20%の陽性率を+、20～50%を++および50%以上の陽性率を示すものを+++として判定した。

結 果

実験5. GC投与がF囊の核DNAに及ぼす影響 (Dex投与2～72時間の検討)

35日齢の白色レグホーン種雄ヒナに、体重1kg当たり10mgのDexを投与し、投与直後ならびに2, 4, 6, 12, 24, 48および72時間後に採取したF囊から抽出したDNAを、アガロースゲル電気泳動にて分析した結果を図12に示した。

投与直後に採取したF囊のDNAは0.2および0.4kbの位置に薄いバンドが認められた。投与2時間後のものでは、前記の2本に加えて0.6, 0.8, 1.0および1.2kbの位置に明瞭な梯子状のバンドが観察された。それ以降、投与4, 6ならびに12時間後では、梯子状の6本のバンドが時間の経過とともにより明瞭になった。一方、投与24時間以降では逆に経時的に梯子状のバンドは薄くなった。

実験6. GC投与がF囊の核DNAに及ぼす影響 (Dex投与4時間以内の検討)

21日齢の白色レグホーン種雄ヒナに、体重1kg当たり10mgのDexを投与し、投与直後ならびに0.5, 1, 2および4時間後に採取したF囊から抽出したDNAを、アガロースゲル電気泳動にて分析した結果を図13に示した。

投与直後に採取したF囊のDNAは0.2, 0.4および0.6kbの位置に3本のごく薄いバンドが認められた。投与0.5時間後のものでは、前記の3本のバンドに加えて0.8kbの位置にも薄いバンドが観察されるとともに、梯子状のバンドが濃くなった。それ以降、投与1, 2ならびに4時間後では、前記の4本のバンドに加えて1.0および1.2kbの位置にも明瞭なバンドが認められるようになり、梯子状の6本のバンドが時間の経過とともにより明瞭になった。

実験7. GC誘導性のF囊の萎縮に関する免疫組織化学的検討

30日齢の白色レグホーン種雄ヒナに、体重1kg当たり10mgのDexを投与し、1, 2,

4, 24ならびに48時間後に採取したF囊を免疫組織化学的にアポトーシスの発現細胞を検索した結果を表6に示した。また, キャリアーのコーンオイルあるいはDex投与1時間後に採取したF囊の免疫組織化学像を, それぞれ図14の上図および下図に示した。Dexの投与によりアポトーシスの発現を示す陽性細胞が髄質部において徐々に増加し, 投与1時間後では+, 投与24時間後では++, さらに48時間後では+++と判定された。Dexを投与してから24時間目の免疫組織化学像を図15に示した。F囊の萎縮に伴い各リンパ濾胞が小型化した。また, 一部のリンパ濾胞内には囊胞が認められるが, 囊胞内部では陽性細胞が比較的多かった。Dex投与48時間後のF囊を図16に示したが, 髄質部の陽性細胞を詳細に観察すると, リンパ細胞の核周囲部においてCの字状の強い染色性が観察された。また, Dexにより退行性変化がかなり進んだF囊ではリンパ濾胞の周囲部では, マクロファージ内において貪食された死滅リンパ細胞の細胞核が不定形に凝集した形態での強い染色性が一部に認められた。一方, キャリアー投与あるいは非投与のヒナのF囊においても, 陽性反応を示すリンパ細胞が少数認められた(図14上図)。

IBDVを接種し変性壊死を起こしたF囊では, マクロファージ内に貪食された多数の死滅リンパ細胞の細胞核が不定形に凝集した形態で強い染色性が認められた(図17)。また, Dex投与により認められたCの字状の染色性を示す細胞はほとんど観察されなかった。

考 察

アポトーシスの特徴的な生化学的変化として, ヌクレオソーム単位での核DNAの断片化が起こることが明らかにされており(Wyllie, 1980; Wyllie *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1992), このことはアポトーシスの発現を検証するための重要な生化学的指標の一つである。そこで, 本章ではまずこの点について調べた結果, Dexを投与したヒナのF囊より抽出したDNAでは, アガロースゲル電気泳動上でラダーパターンが確認された。このことから, ニワトリヒナのF囊リンパ細胞におい

ても核DNAが断片化していることが示され、GCによりアポトーシスが発現していることが生化学的にも検証された。

実験5では、Dex投与2～72時間におけるF囊リンパ細胞のDNAラダーパターンの変化を調べたところ、投与2時間目にはすでに明確なDNAラダーが確認された。また、実験6ではDexの投与4時間目までについて調べた結果、投与1時間目にはDNAラダーが確認された。これらのことから、F囊のリンパ細胞ではDex投与1時間以内にアポトーシスの発現に必要な細胞内での生化学的变化が起こっているものと推察された。また、実験5におけるDNAラダーはDex投与12時間目まで濃くなり、24時間以降では薄くなった。この点については、Compton *et al.* (1990)の報告とほぼ同様の結果を得た。第1章ではGCにより髄質部のGC感受性リンパ細胞数が著しく死滅・減少することが明らかとなっている。したがって、GC投与後の一定の時間の経過にともないアポトーシス発現細胞の総数が減少するために、DNAラダーが薄くなっていくものと考えた。

DNAラダーは、約200bpを単位とする整数倍の位置にそれぞれのバンドが観察された。アポトーシスの発現過程では、活性化されたエンドヌクラーゼの作用によりDNAのヌクレオソーム単位での断片化が起こる (Wyllie, 1980; Wyllie *et al.*, 1984; Cohen, 1991; Shiokawa *et al.*, 1994)。図18に示したように、活性化されたエンドヌクラーゼは、核DNAにおけるヌクレオソーム間のリンカーとよばれる結合部位に作用し切断が起こるため、泳動像が約200塩基対の整数倍の梯子状のバンドとして観察される。また、この断片化はアポトーシスの発現後、一定の時間まで経時的にヌクレオソーム単量体、2量体といった短い断片が増加する。本研究では、GC投与12時間目をピークにDNAの断片化が急速に進んだものと言える。

続いて、実験9ではアポトーシスの発現過程で発生するDNAの断片群を免疫組織化学的に検出する方法により、GC誘導性のアポトーシスの発現部位と発現形態を調べた。図14～16に示したように、Dexの投与でアポトーシスの発現を示

す陽性細胞が髓質部を中心に増加した。このことは、第1章における結果と合わせて、髓質部の未成熟なリンパ細胞はGCに対する感受性が高く、アポトーシスの発現がより顕著であること示すものと言える。また、陽性細胞を詳細に観察すると、核周囲部において特徴的なCの字状の強い染色性が観察された。正常な細胞ではクロマチンは網状構造をなし核内全体を満たしているが、アポトーシス発現細胞ではクロマチンが凝縮し、その形態は核膜周辺に三日月状に凝縮することが透過型電子顕微鏡で観察されているが(Itoh *et al.*, 1991; Ogasawara *et al.*, 1993)、本実験では免疫組織化学的手法を用いることにより、光学顕微鏡レベルでアポトーシスに特徴的なクロマチンの凝縮形態をとらえることができた。このような細胞核内のクロマチンのCの字状の凝縮は、哺乳類や鳥類を問わずアポトーシスを発現する細胞における普遍的な形態変化の特徴であると考えた。

アポトーシスの発現を示す陽性細胞の増加は、Dex投与1時間目にはすでに観察された。このことは、DNAラダーがDex投与1時間目には観察されることと一致しており、GCの作用により1時間以内にはアポトーシスが発現していることが示された。一方、第1章で示したように、F嚢における組織レベルでのアポトーシスによる形態変化が明確に認められたのはDex投与6時間目以降であった。これらのことからF嚢リンパ細胞では、GCの作用により速やかにアポトーシスの発現に必要な生理化学的变化が生じていることが推定され、それによって核内のクロマチンの断片化が起こると同時にクロマチンが凝縮するものと思われた。それに引き続いて、細胞核が凝縮するとともに細胞自体も小型化し死滅していくものと考えられた。

鳥類にのみ存在するF嚢は、B細胞中枢とよばれるように、B細胞の造成、分化および成熟が行われるリンパ器官である(Glick, 1956; Ekino, 1993)。F嚢は嚢導管を介して総排泄口に開口しており、そこから糞便に由来する比較的大きな粒子を嚢腔内に吸い込むことができる(Naukkarinen and Sorvari, 1982; 浴野, 1994)。こう

いった外界からの様々な粒子は、濾胞関連上皮よりリンパ濾胞髄質部に取り込まれ、さらに消化・分解され、この抗原刺激を受けてB細胞が分化・成熟する。これによって、それぞれの個体の生息する環境に最も適したB細胞レパートリーが確立され、体液性免疫の構築が図られる(Ekino, 1993)。このような、B細胞の分化・成熟の過程では、自己を認識するB細胞や免疫抗体を産生しない非機能的なB細胞が排除されるが、一連の不要なBリンパ細胞の排除にはアポトーシスによる細胞死滅機構が重要な役割を果たしていることがマウスなどで明らかにされている(鏗田, 1993)。一方、ニワトリヒナのF囊においてもB細胞の分化・成熟過程で同細胞の増殖と死滅が繰り返されており、他の臓器に比べてアポトーシスが高率に発現していることが示唆されている(Neiman *et al.*, 1991; Motyka and Reynolds, 1991)。本研究において、Dex投与直後にきわめて薄いDNAラダーが見られたことや、Dex非投与のヒナのF囊リンパ濾胞においてごく一部に免疫組織学的な陽性細胞が認められたことは、B細胞の分化・成熟に関係したアポトーシスの発現を反映している可能性が示唆された。

IBDV感染の免疫組織像を図17に示したが、DNA断片の存在を示す陽性部位は観察されたが、その形態はマクロファージ内に貪食された死滅リンパ細胞の核断片が不定形に強く染色されており、GCによるアポトーシスに特徴的なCの字状の染色性はほとんど見られなかった。壊死細胞の核DNAはランダムに分解され、電気泳動像はスメアー状になるといわれている(田沼, 1994)。これらのことは、本研究におけるIBDV感染の免疫組織化学像は、DNAのランダムな分解を反映したものであると考えられた。以上のことから、ネクローシスによるリンパ細胞の死滅とアポトーシスによる死滅形態には明確な相違があることが明らかとなった。

小 括

ニワトリヒナにGCとしてDexを投与し、F囊におけるリンパ細胞の核DNAをアガロースゲル電気泳動により調べた。その結果、DNAラダーが観察され、G

C誘導性のF囊の萎縮過程でアポトーシスが発現していることが生化学的に検証された。DNAラダーは、Dexの投与1時間目には観察され、投与12時間目まで経時的に明瞭となった。そして、24時間以降はアポトーシスの発現細胞数が少なくなることにより起因して、DNAラダーが薄くなった。

続いて、アポトーシスで発現するDNA断片を免疫組織化学的に検出する方法により、GC誘導性のアポトーシスの発現部位と発現形態を検討した。その結果、リンパ濾胞髄質部でアポトーシスの発現を示す陽性細胞が増加した。このことは、髄質部の未成熟なリンパ細胞はGCに対する感受性が高く、アポトーシスの発現がより顕著であることを示唆するものである。

また、髄質部の陽性細胞を詳細に観察すると、核周囲部にCの字状の強い染色性が認められた。このような染色像は、IBDV感染による変性壊死を引き起こしたF囊組織では認められず、ネクローシスとアポトーシスによるF囊リンパ細胞の死滅形態や死滅機構には明確な相違があることが明らかとなった。

Dexの投与1時間目には免疫組織化学的な陽性リンパ細胞が観察された。この結果はDNAラダーの結果と一致し、GCの作用により1時間以内にアポトーシスが発現していることを示すものと言える。また、Dex投与直後においてきわめて薄いDNAラダーが見られたことや正常なF囊においても免疫組織化学的な陽性細胞がごく一部に認められたことは、B細胞の分化・成熟に関係するアポトーシスの発現を反映していると推察された。

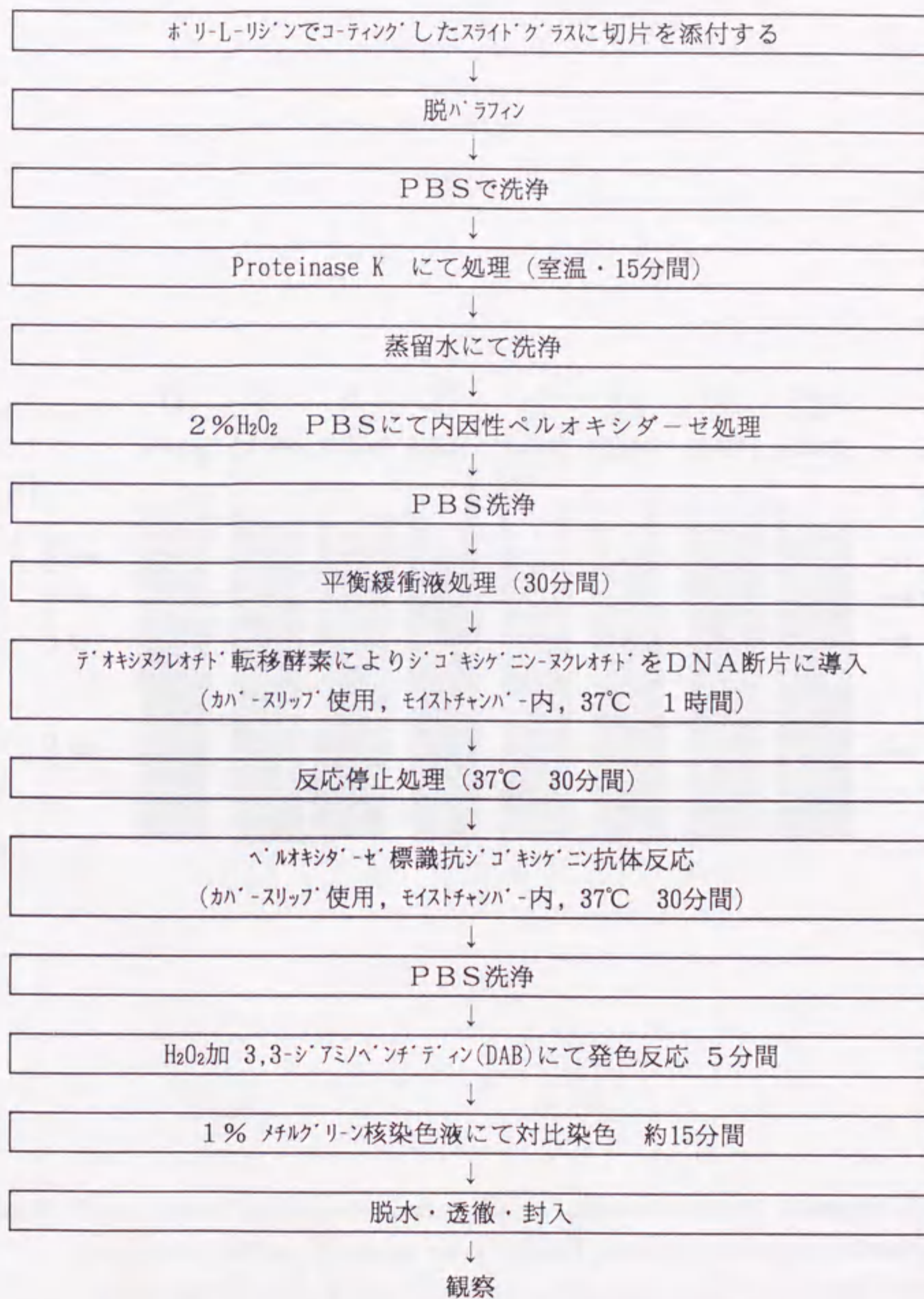


図11. 免疫組織化学的方法によるアポトーシス発現部位の検出手順 (Apop Tag法)

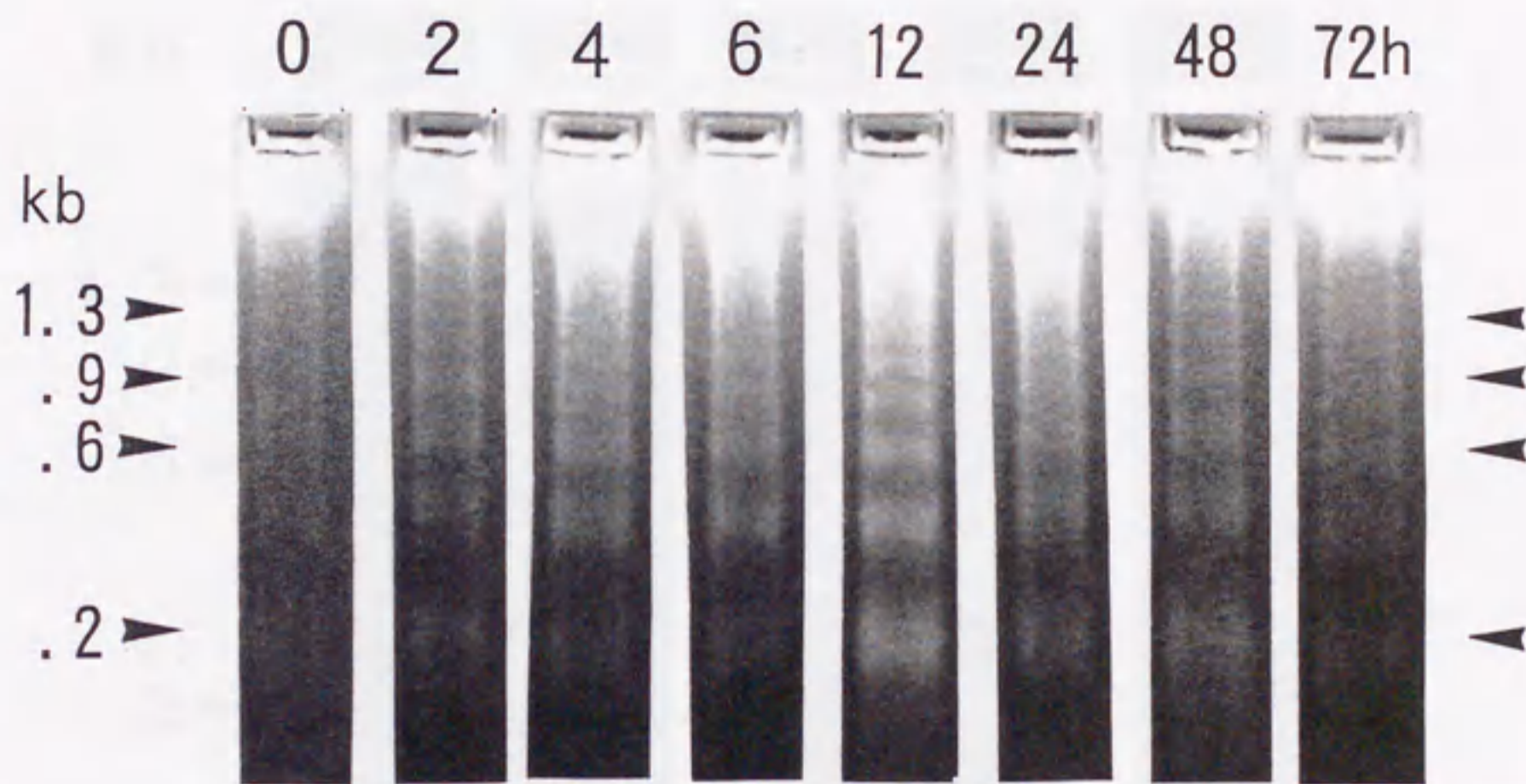


Fig.12 Time course of glucocorticoid-mediated internucleosomal cleavage of bursal lymphocyte DNA. Chickens were treated with dexametasone(10mg/kg body weight) and killed 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 or 72h afterward. Bursal lymphocyte DNA was isolated and analyzed by 1.8% agarose gel electrophoresis (60V, 3h). The DNA concentration of all sample was adjusted 200 μ g per mL (20 μ g of DNA per lane).

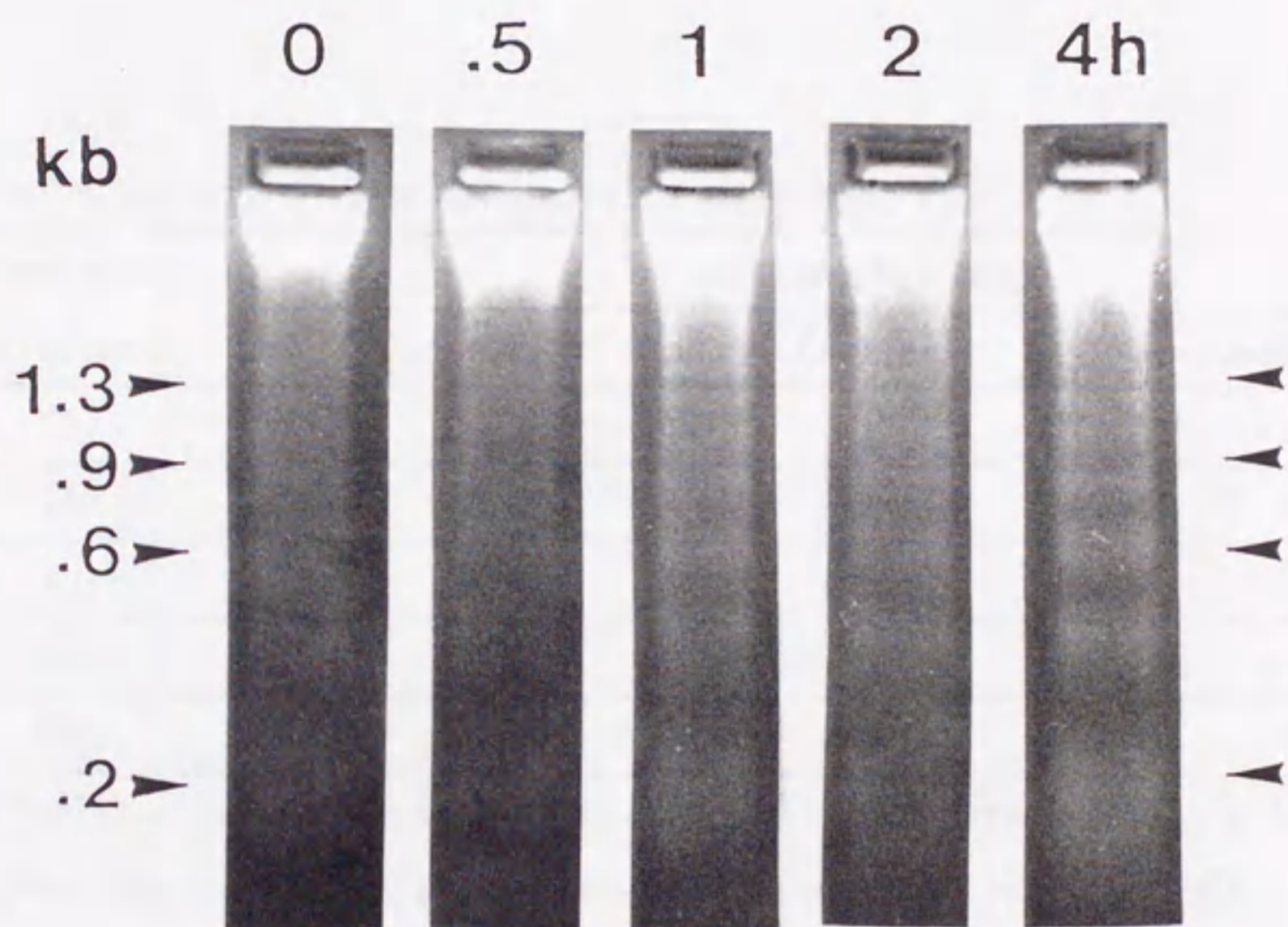


Fig.13 Time course of glucocorticoid-mediated internucleosomal cleavage of bursal lymphocyte DNA. Chickens were treated with dexametasone(10mg/kg body weight) and killed 0, 0.5, 1, 2 or 4h afterward. Bursal lymphocyte DNA was isolated and analyzed by 1.8% agarose gel electrophoresis (60V, 3h). The DNA concentration of all sample was adjusted 200 μ g per mL (20 μ g of DNA per lane).

Table. 6 Immunohistochemical score in experiment 7.

time after treatment	experimental group		
	Control	Carrier	Dexamethasone
1hr.	±	±	+
2hr.	±	±	+
4hr.	±	±	+
24hr.	±	±	++
48hr.	±	±	+++

± : Positive lymphocyte were observed slightly in bursal follicle (<1%)

+ : Positive lymphocyte were observed in bursal follicle (1-20%).

++ : Positive lymphocyte were observed appreciably in bursal follicle(20-50%)

+++ : Positive lymphocyte were observed much in bursal follicle (>50%)

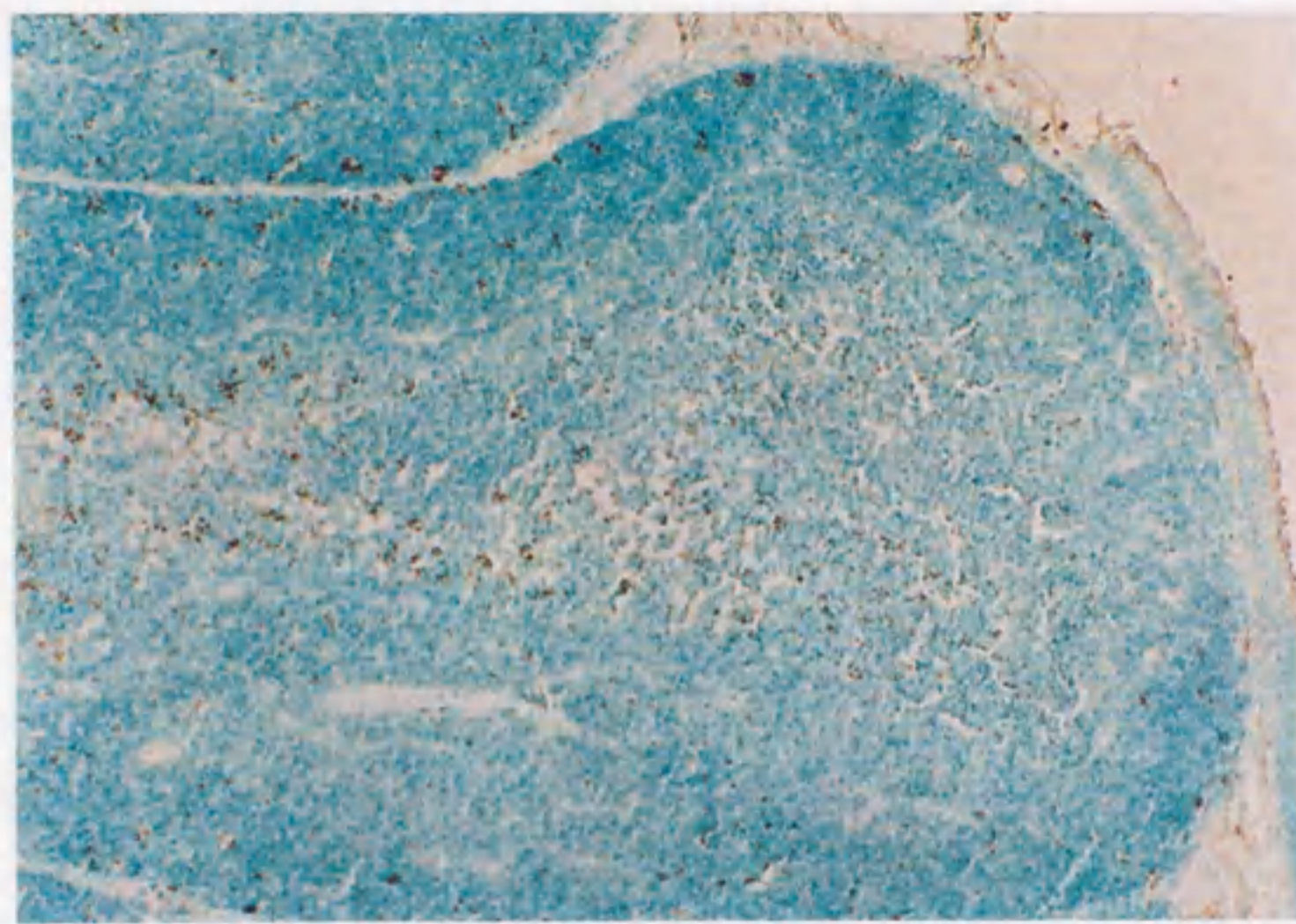
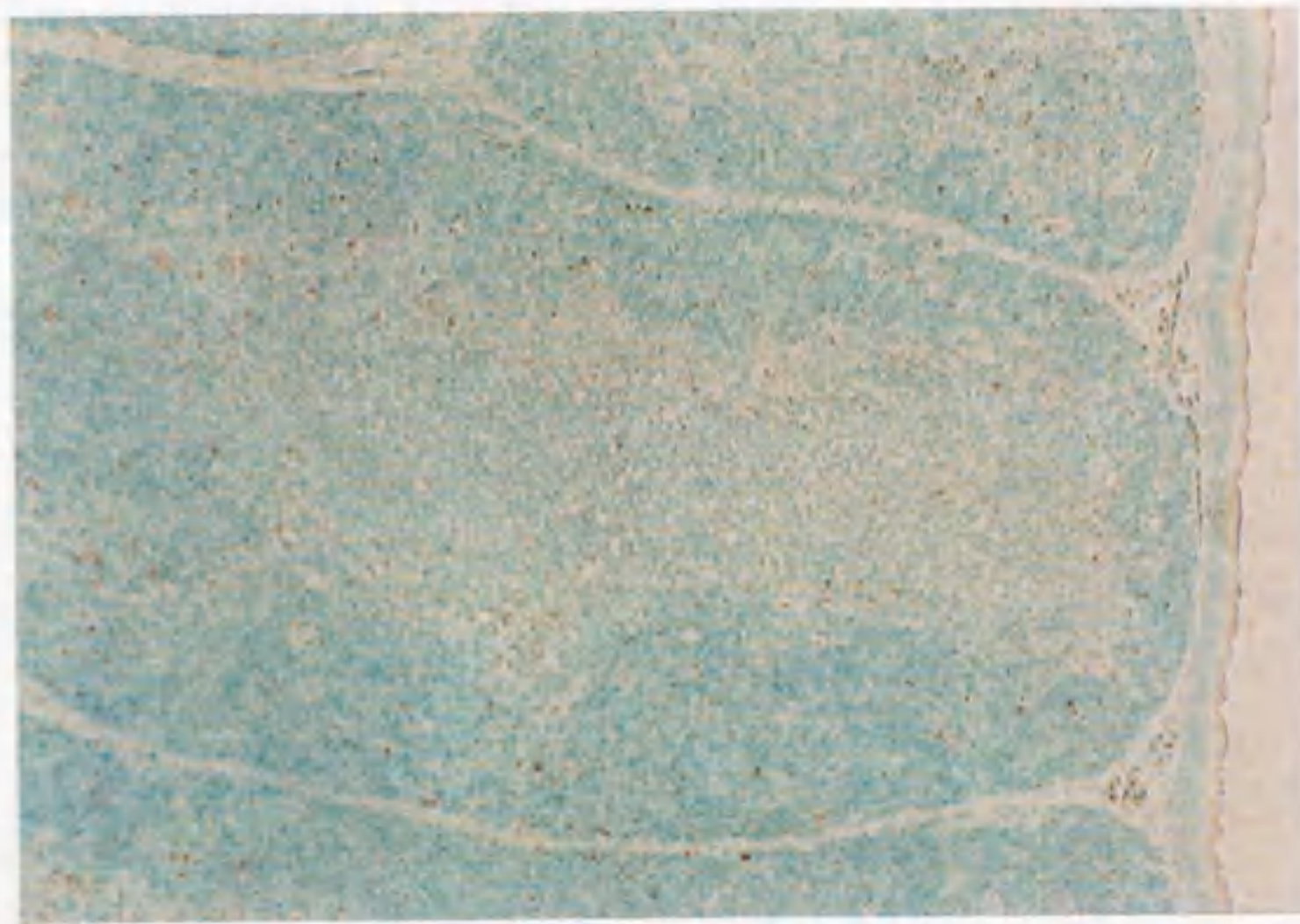


Fig.14. Section of bursal follicle immunostained for DNA fragments in the chick 1 hour after treatment with corn oil (upper photograph, $\times 200$) and dexamethasone (below photograph, $\times 200$).

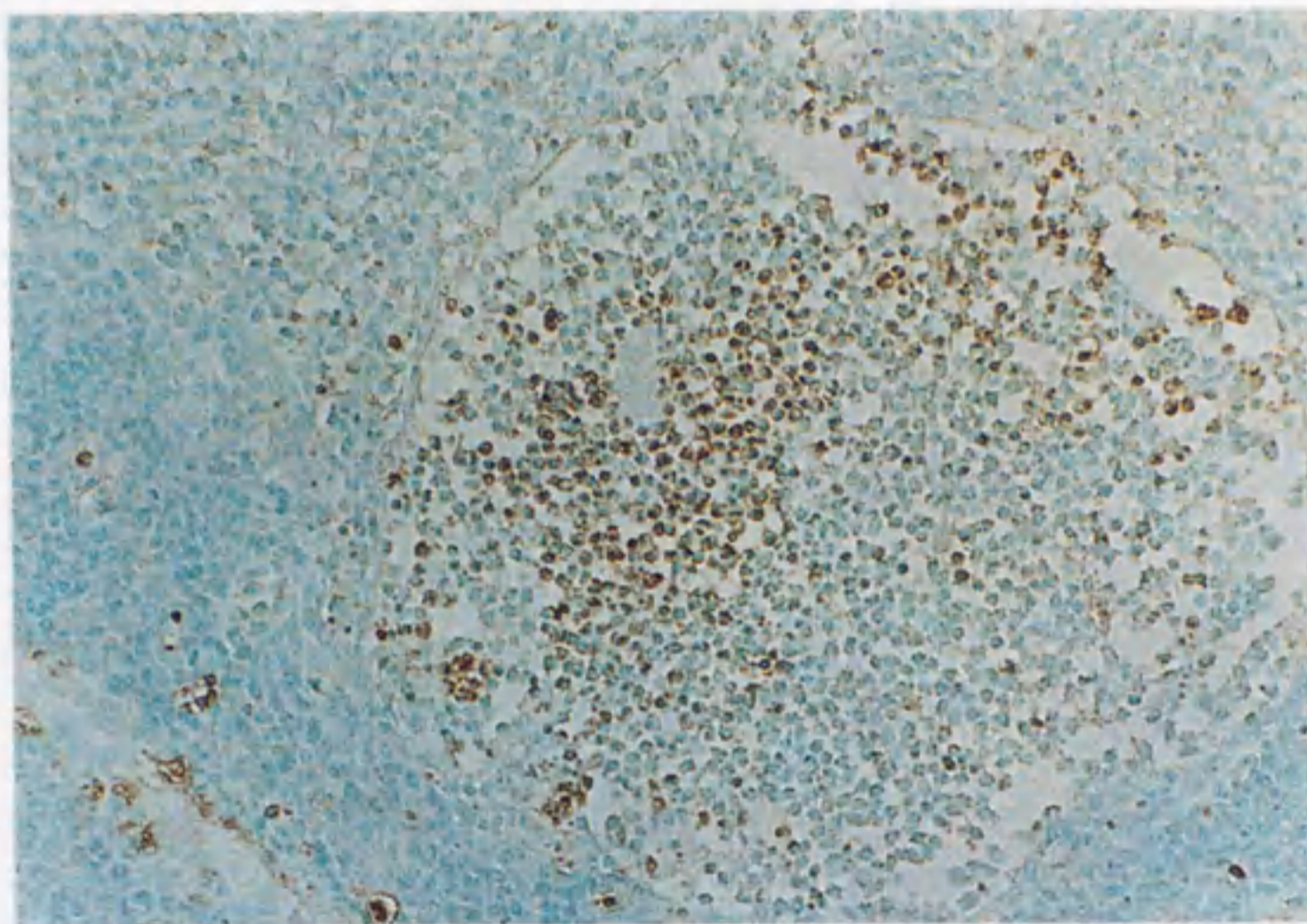
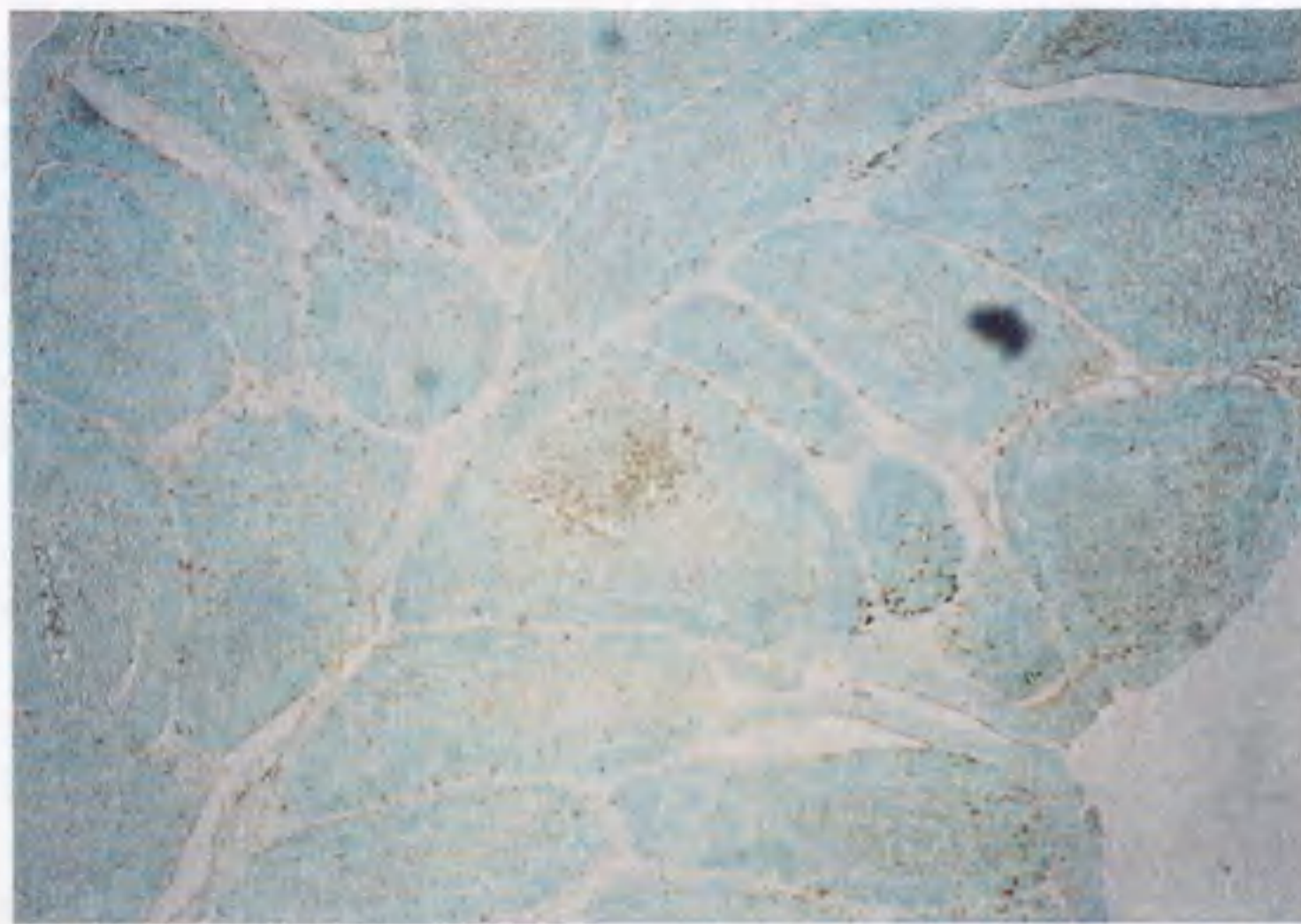


Fig.15. Section of bursal follicle immunostained for DNA fragments in the chick 24 hours after treatment with dexamethasone (upper photograph, $\times 40$; below photograph, $\times 400$).

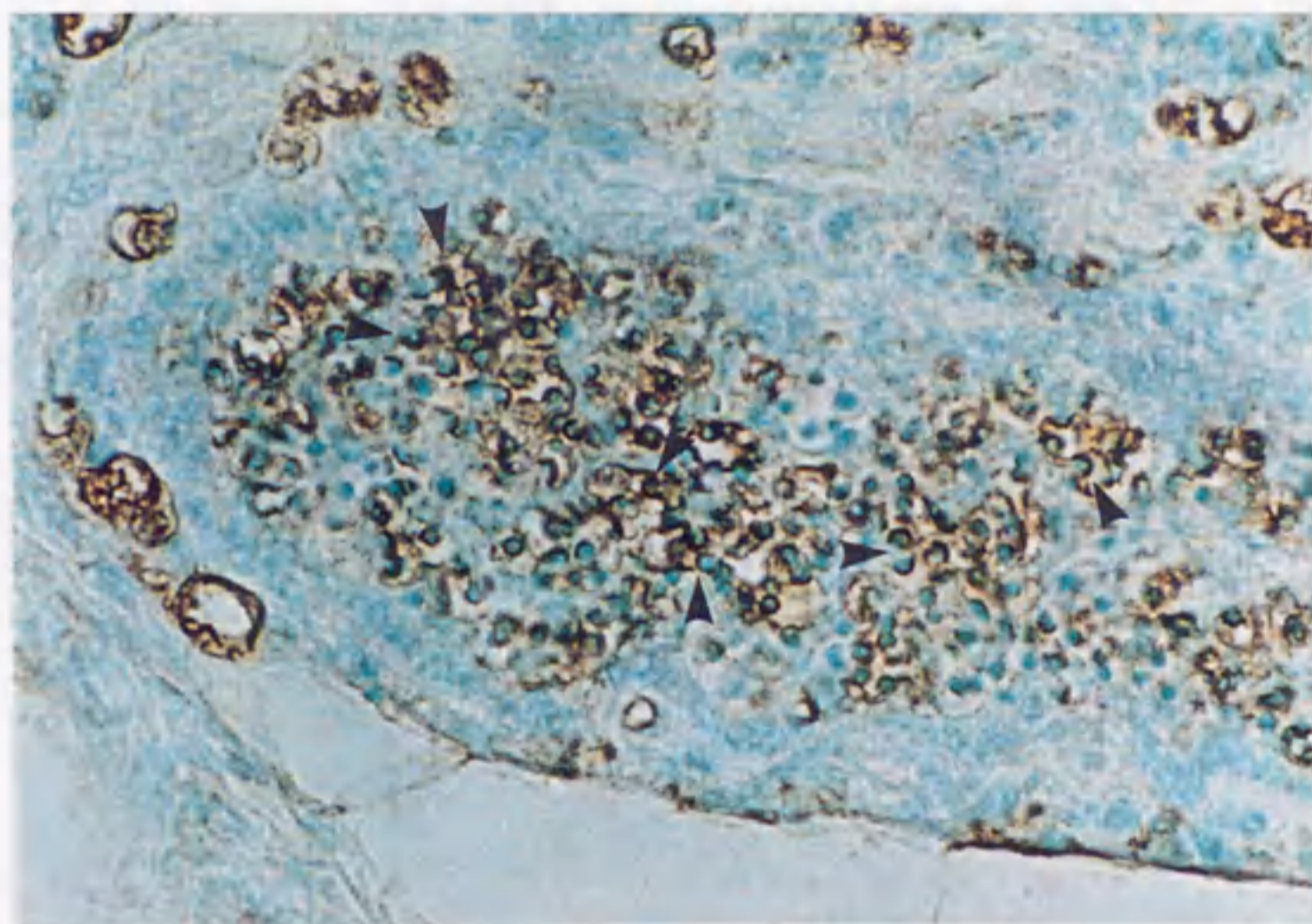
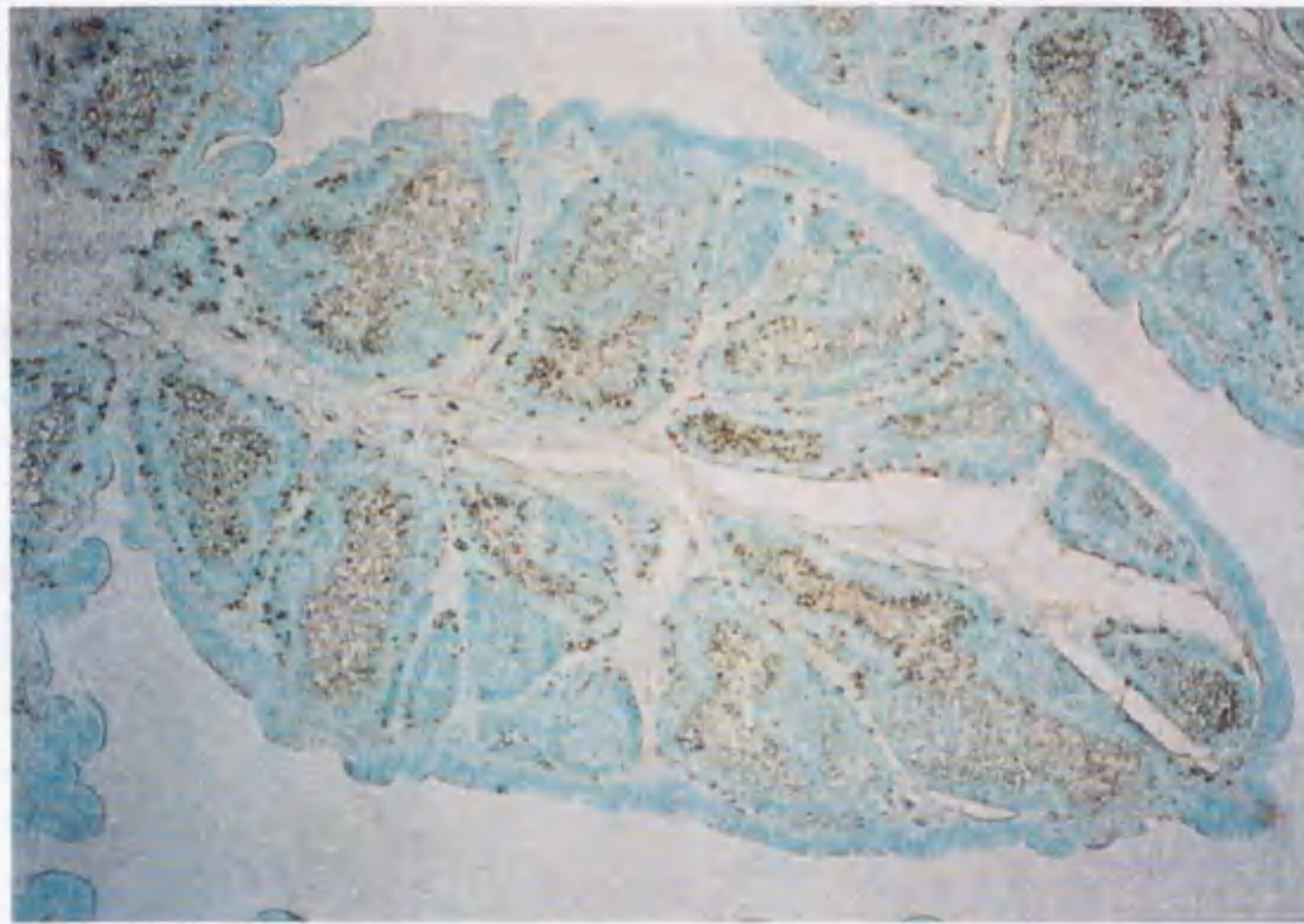


Fig.16. Section of bursal follicle immunostained for DNA fragments in the chick 48 hours after treatment with dexamethasone (upper photograph, $\times 40$; below photograph, $\times 600$). arrow heads: C-Shape chromatin condensation.

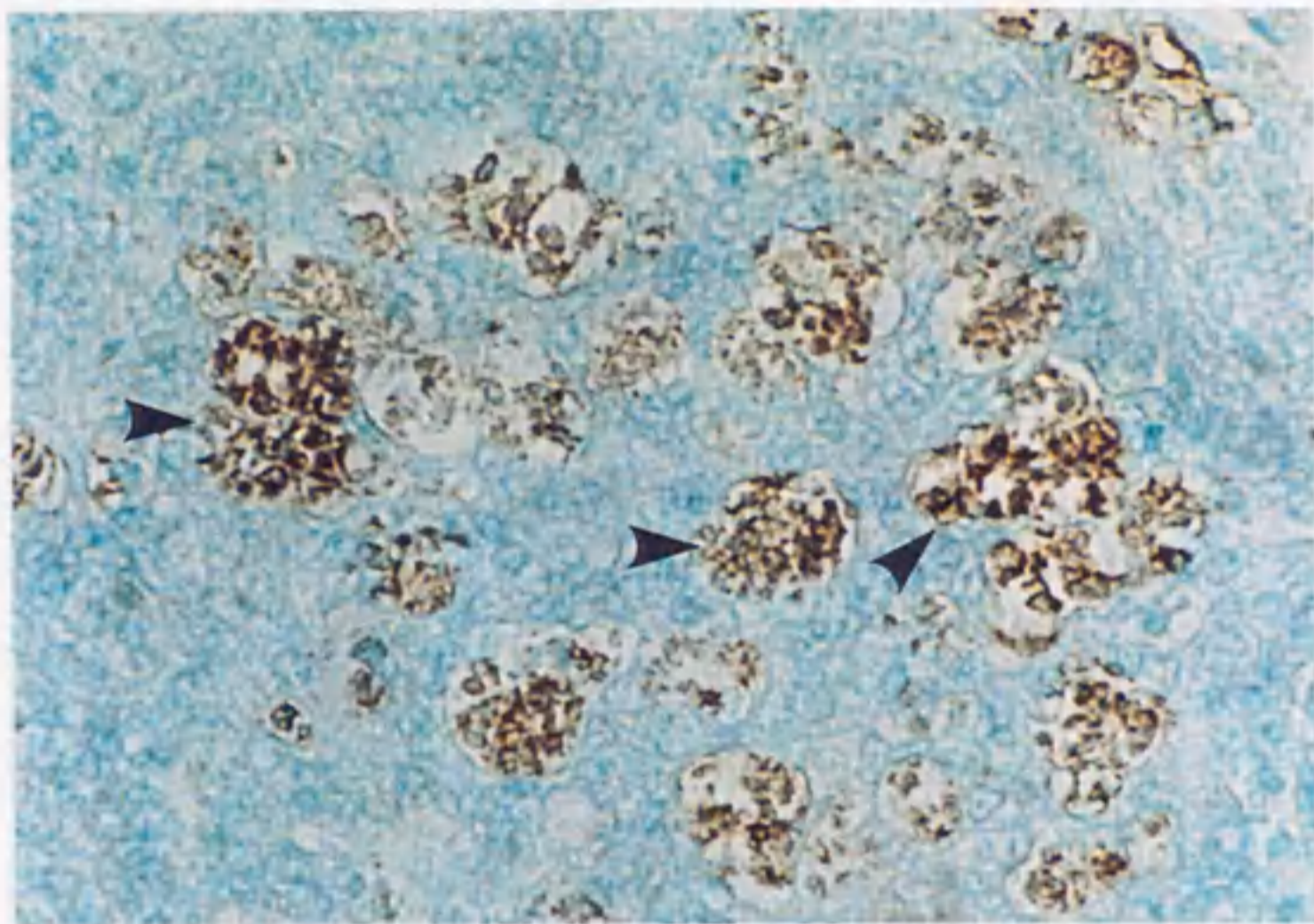
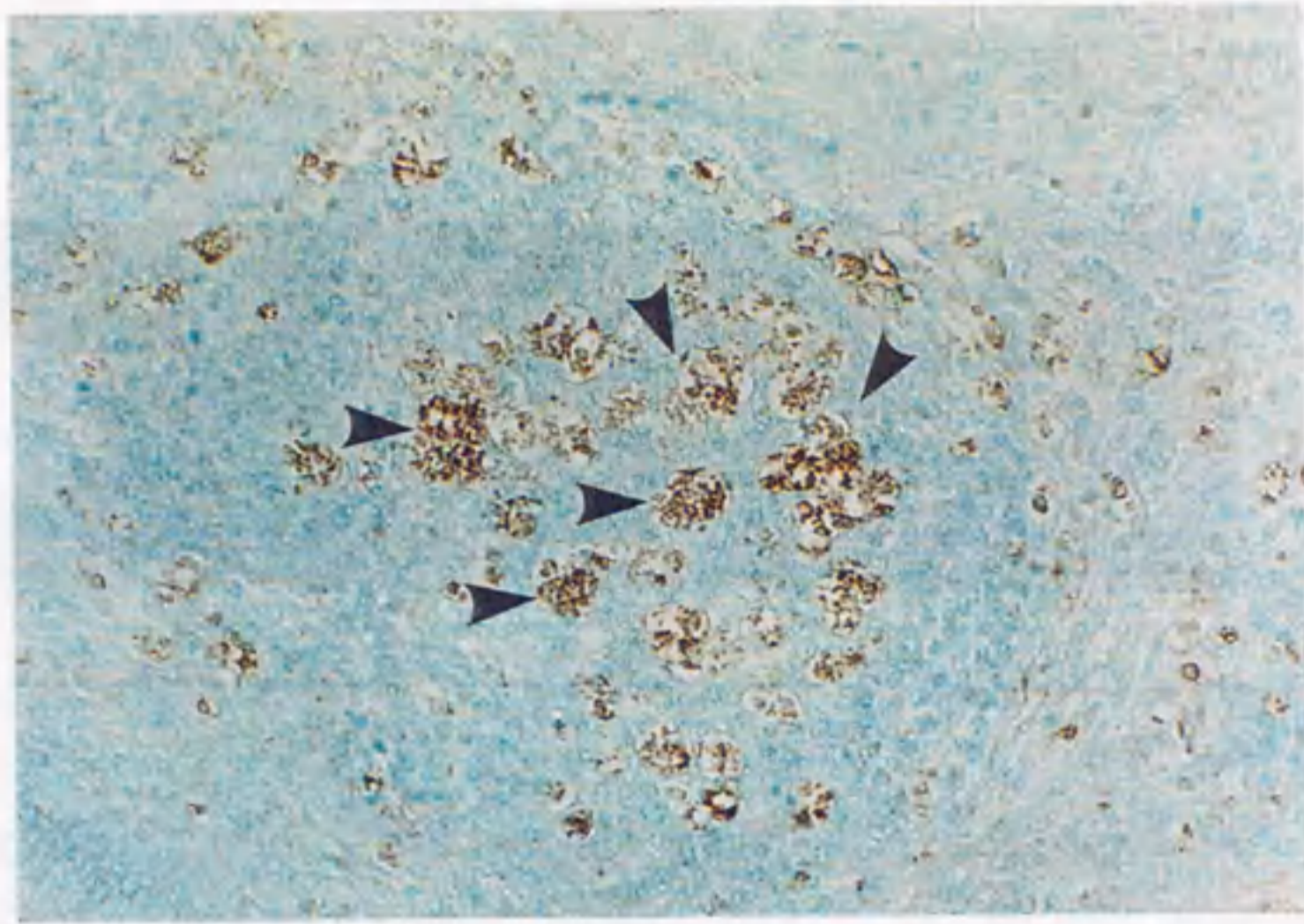


Fig.17. Section of bursal follicle immunostained for DNA fragments in the chick 6 days after oral inoculation with infectious bursal disease virus (upper photograph, $\times 400$; below photograph, $\times 600$). arrow heads: random chromatin condensation in the macrophage.

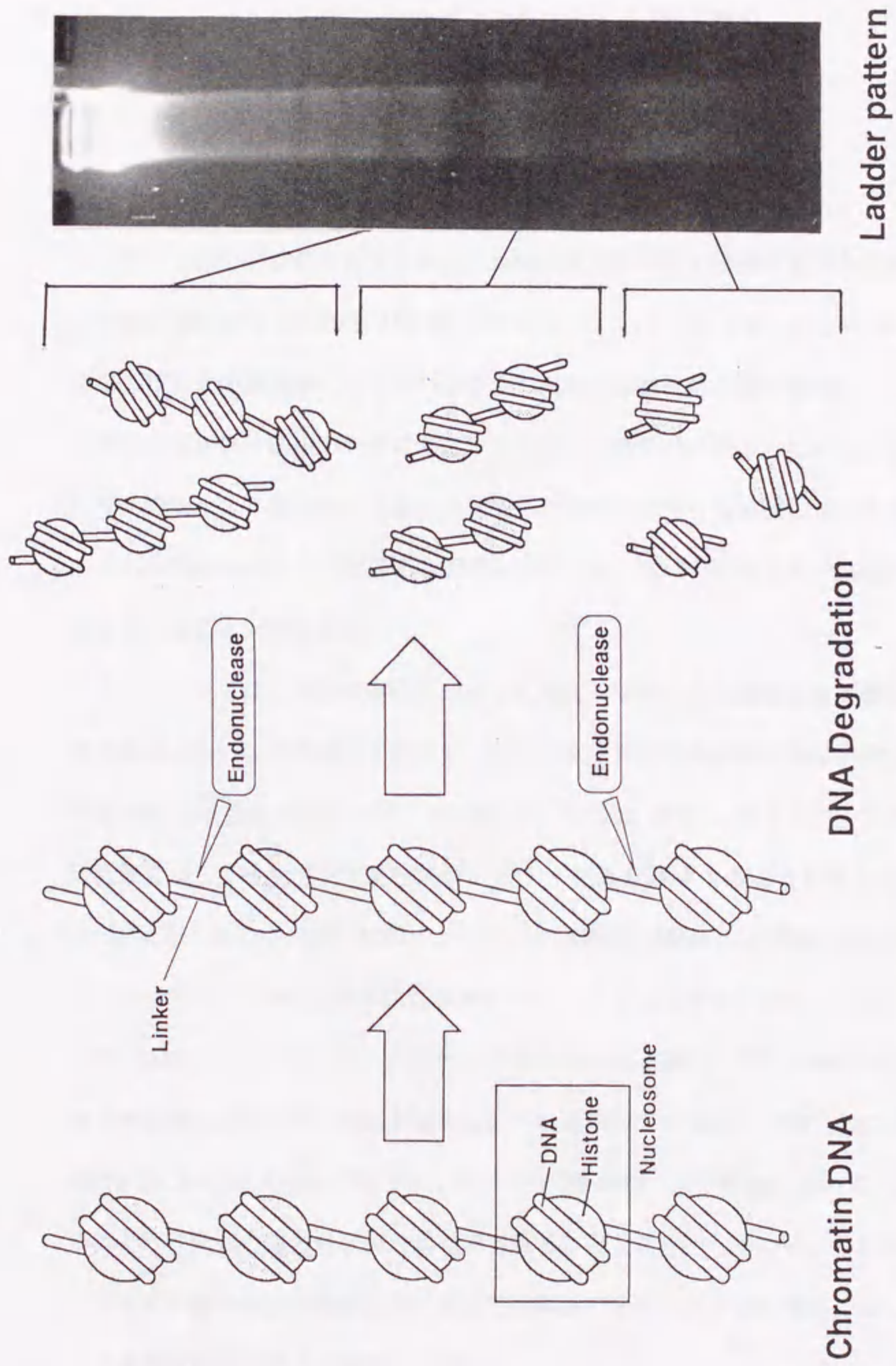


Fig. 18. Diagrammatic representation of DNA degradation.

第3章

F囊におけるグルコルチコイド誘導性の アポトーシス関連蛋白質

緒 論

ニワトリヒナにGCを投与すると、鳥類の体液性免疫の構築に重要な役割を果たすF囊が萎縮する (Dieter and Breitenbach, 1970; Gross *et al.*, 1980)。本研究では第1章および第2章でGCの作用により引き起こされるF囊の萎縮が、アポトーシスによるリンパ細胞の死滅に起因することを組織学的に明らかにするとともに、DNAの断片化を確かめることによって生化学的な面からも検証した。また、F囊リンパ細胞におけるGC誘導性のアポトーシスは、GCの投与により比較的速やかに発現することを明らかにした。

アポトーシスは、特定の遺伝子によって高度に制御される細胞死滅機構であり、その発現あるいは進行過程において、新たに合成される蛋白質の関与が示唆されている (Sellins and Cohen, 1987; Yamada and Ohyama, 1988)。ラットやマウスなどの哺乳類では、*c-myc*やp53蛋白質がアポトーシスを誘導することが示されている (Evan *et al.*, 1992; 口野, 1993)。一方、ヒト濾胞性B細胞リンパ腫から発見された*bcl-2*の遺伝子産物である蛋白質はアポトーシスの抑制因子として知られており (Vaux *et al.*, 1988; Hockenbery *et al.*, 1990)、アポトーシスと関わりの深い免疫系や神経系などの組織において高い発現が認められている (Negrini *et al.*, 1987; 辻本, 1993)。また、Voris and Young (1981)は、ラットの培養胸腺リンパ細胞において、GCの作用により6種類の蛋白質が新たに誘導されることを見い出している。したがって、ニワトリF囊のリンパ細胞におけるGC誘導性のアポトーシスの発現に対しても、その関連蛋白質の存在が推定される。

アポトーシスによる神経細胞の死滅が原因となるアルツハイマー病などの神経疾患では、その病変部の神経原繊維変化(neurofibrillary tangles)を構成するPHT (paired helical filament)に、ストレス蛋白の一種であるユビキチンが認められている(Mori *et al.*, 1987; Lowe *et al.*, 1988)。また、Delic *et al.* (1993)は、低レベル放射線の照射で誘起されるヒト培養リンパ細胞のアポトーシスの発現過程でユビキチンのmRNAが増加することを明らかにしている。さらに、Phillips and Platt (1994)は、甲状腺ホルモンの作用により退縮過程にあるオタマジャクシの尾部ではユビキチン含量が顕著に増加し、ユビキチンがアポトーシスの発現あるいは進行に重要な役割を果たすことを示唆した。これらのことからユビキチンは、様々な生物における種々の細胞のアポトーシスに関与している可能性があると考えられる。

本実験では、GCの投与により萎縮過程にあるF囊の蛋白質量の変化を電気泳動により調べた。また、GC投与後のF囊より抽出したmRNAをウサギ網状赤血球ライセート系により翻訳させ、得られた蛋白質を電気泳動により解析した。これらにより、F囊におけるGC誘導性のアポトーシスに対する関連蛋白質の関与について検討を加えた。さらに、GC投与後のF囊リンパ細胞におけるユビキチンレベルについても調査した。

材料および方法

実験8. GC誘導性の萎縮過程のF囊における蛋白質のSDS-PAGEによる解析

<供試鶏および実験計画>

本実験では35日齢の白色レグホーン種雄ヒナを供試した。コーンオイルに懸濁したDexを、ヒナの体重1kg当たり10mgとなるように、頸部皮下にそれぞれの体重に合わせて約300 μ lずつ注射した。Dex投与直後ならびに投与2, 4, 6, 8, 12, 24, 48および72時間目に、3羽ずつのヒナを断頭と殺後、直ちにF囊を採取し、液体窒素内で解析時まで保存した。

<蛋白質の抽出・調整>

以下の操作はいずれも氷温下で行った。約0.2gのF囊組織に滅菌水(0.6ml)を加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズを行った。その後、 $30,700\times g$ で30分間遠心分離し、上清を採取し粗試料とした。

得られた粗試料は、280nm吸光度法により蛋白質濃度を測定後、濃度調整を行った。各試料より蛋白質 $200\mu g$ 相当量を分取し、これに4%SDSトリス塩酸バッファー(0.125M Tris-HCl:pH6.8;カライスク株)を加え、約 100°C で5分間煮沸・加熱し氷冷したものを泳動用試料とした。

<SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動, SDS-PAGE>

分析用のゲルは今井(1987)の方法に準じて作成した。なお、分離用には12.5%ポリアクリルアミドゲルを使用した。各泳動用試料より蛋白質 $200\mu g$ 相当量を分取し、常温下において15mAで約3時間の電気泳動を行った。その後、分離ゲルをクマシーブリリアントブルー(カライスク株)で染色し、10%酢酸加メタノール液にて脱色を行い、バンドを観察した。

実験9. GC投与後のF囊リンパ細胞におけるmRNAの翻訳蛋白質の解析

<供試鶏および実験計画>

本実験では21日齢の白色レグホーン種雄ヒナを供試した。コーンオイルに懸濁したDexを、ヒナの体重1kg当たり10mgとなるように、頸部皮下に約 $200\mu l$ 注射した。また、対照区としてコーンオイルをほぼ同量注射した。Dex投与1時間後に、各5羽ずつのヒナを断頭と殺後、直ちにF囊を採取し、液体窒素内で解析時まで保存した。

<T(Total)RNAの抽出・調整>

F囊組織1gにISOGEN(ニッポンジーン株)を加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズを行った。その後、クロロホルムを加え約30秒間強振した。次いで、 4°C 下で $12,000\times g$ にて15分間遠心分離し、水層を分取した。これに、イソプロパノー

ル（キシダ化学株）を加え約10分間静置し、4℃で12,000×gにて10分間遠心分離し、上清を除去した。沈殿物を風乾させ、0.1%Diethyl Pyrocarbonate（DEPC溶解液，ナカライスケ株）に溶解し、TRNA試料とした。

<TRNAの調整状態の確認>

TRNA試料中のRNAの純度を、260nm：280nmによる吸光度より求めた。ここでの比が約2：1であればDNAのコンタミネーションの少ない純度の高いRNAが得られたと考えられた。このような試料を選択し、260nmの吸光度からRNA濃度を算出した。試料よりTRNAの10μg相当量を分取し、ホルムアルデヒド（ナカライスケ株）とホルムアルデヒド（和光純薬株）を加え、65℃で5分間処理し、氷水にて急冷し、RNAの2次構造の破壊処理を行った。この試料とサイズマーカーを、1%ホルムアルデヒド・7カゴロ-スカルにて4℃下において60Vで1時間、電気泳動を行い、UVトランスイルミネーター上で泳動像を観察した。通常、全RNAの80～85%はr(ribosome)RNAである。各TRNAのホルムアルデヒド・7カゴロ-スカル電気泳動において、28Sおよび18SのrRNAのバンドがそれぞれおよそ4.8kbおよび1.9kbの位置に確認されれば、それはあまり分解されていないTRNA試料であると考えられ、以降のmRNA抽出に用いる試料とした。一方、これらのバンドが確認されない試料は、RNAの分解が進んでいると判断し、mRNA抽出には用いなかった。

<オリゴ(dT)セルロ-スカルムによるmRNAの抽出>

TRNA試料からのmRNAの抽出には、mRNA Separator Kit(CLONTECH)を使用した。すなわち、TRNA試料から2mg相当量を分取し、2M酢酸ナトリウム溶液と冷エタノールを加え-80℃下で1時間RNAの析出・沈殿を促し、遠心分離した後上清を除去し沈殿を風乾した。これに1mlのDEPC溶解液を加え65℃の温湯中で3分間振とうしRNAを溶解した後、直ちに氷水にて急冷しRNAの2次構造の破壊処理を行った。そして、前処理を行ったオリゴ(dT)セルロ-スカルムに試料をのせ、冷却遠心分離により高塩濃度バッファーあるいは低塩濃度バッファーにてt(transfer)RNAやrR

NAを洗浄除去し、最後に溶出バッファーにてpoly (A) RNAを回収し、mRNA試料とした。

<mRNAの調整状態の確認>

TRNA解析の場合と同様の方法により、1%ホルムアルデヒド・アガロースゲル電気泳動を行い、mRNA試料の調整状態を確認した。すなわち、28Sおよび18S rRNAに相当する4.8kbおよび1.9kbのバンドが明瞭であれば、そのmRNA試料にはrRNAが混入していると言える。この場合はRNA量の多い試料については再精製を行い、少ないものについては、TRNA試料から再抽出した。一方、rRNAバンドがなく、mRNAが1~5 kb付近に認められるもののみをmRNA試料とした。

<mRNAの翻訳>

mRNAの1 μg相当量を分取し、2 M酢酸ナトリウム溶液と冷エタノールを加え-80°C下で1時間RNAの析出・沈殿を促し、遠心分離した後上清を除去し沈殿を風乾した。これに1 mlのDEPC溶解液を加え65°Cの温湯中で3分間振とうしRNAを溶解した後、直ちに氷水にて急冷した。

これに20 μlのウサギ網状赤血球ライセート（和光純薬株）と4.5 μl（約45 μCi）のL-[³⁵S]-メチオニン（ICN Biomedicals Inc.）を加え30°Cで1時間培養し、mRNAの翻訳を行った。この際に蛋白質の翻訳系が正常に機能しているかを判定するための対照として、タバコモザイクウイルスRNA（和光純薬株）も同時に翻訳処理を行った。翻訳終了後、反応液にSDSバッファーを加え泳動用の試料とした。

<SDS-PAGEならびにオートラジオグラフィ>

SDS-PAGEは、実験8と同様の方法で行った。泳動終了後、ゲルを十分に洗浄し、40°Cで3時間真空乾燥を行った。乾燥したゲルをOHPフィルム（富士フィルム株）にて3日間、オートラジオグラフィを行い、バイオイメージングアナライザー（富士フィルム株）でバンドの解析を行った。

実験10. GC誘導性のF囊のアポトーシスにおけるユビキチンの関与

<供試鶏および実験計画>

本実験では35日齢の白色レグホーン種雌ヒナを供試した。コーンオイルに懸濁したDexを、ヒナの体重1kg当たり10mgとなるように、頸部皮下にそれぞれの体重に合わせて約300 μ lずつ注射した。また、同量のコーンオイルを投与したキャリアー投与区と非投与区も設定した。投与24ならびに48時間目に、10羽ずつのヒナを断頭と殺後直ちにF囊を採取し、解析時まで液体窒素内で保存した。

また、続いて42日齢の白色レグホーン種雌ヒナを供試し、コーンオイルに懸濁したDexを、ヒナの体重1kg当たり10mgとなるように、頸部皮下にそれぞれの体重に合わせて約400 μ lずつ注射した。Dex投与直後ならびに投与1, 2, 4, 6, 12および24時間目に、5羽ずつのヒナを断頭と殺後直ちにF囊を採取し、解析時まで液体窒素内で保存した。

<ユビキチンの抽出と測定>

F囊組織100mgに1/15MPBS（和光純薬株）を加え、氷冷下にてテフロンホモジナイザーにてホモジナイズを行った。その後、70°Cで30分間加熱処理し、5,000 \times gで30分間遠心分離し、上清を採取し粗試料とした。

得られた粗試料を1/15MPBS1%ウサギ γ グロブリン（Sigma Chemical Co.）にて100倍希釈し、測定用の試料とした。ユビキチンの測定はPhillips and Platt(1994)に準じて2抗体法による蛍光免疫測定法により行った。蛍光免疫測定法には、蛍光色素標識ユビキチン（Sigma Chemical Co.）と第1抗体としてウサギ由来抗ユビキチン抗体（Sigma Chemical Co.）を使用し、BoundとFreeの分離には第2抗体としてヤギ由来抗ウサギIgG抗体（Sigma Chemical Co.）を使用した。Bound分画の蛍光強度を、励起波長460nm、蛍光波長515nmにて測定し、標準直線より測定用試料のユビキチン濃度を求めた。また、各試料の蛋白質濃度をLowry法により測定し、各試料のユビキチン量は蛋白質当量として示した。

結 果

実験8. GC誘導性の萎縮過程のF囊における蛋白質のSDS-PAGEによる解析

35日齢のヒナにDexを投与し、投与直後ならびに投与2, 4, 6, 8, 12, 24, 48および72時間目のF囊から抽出した蛋白質を、SDS-PAGEにより分析した結果を図19に示した。また、投与直後とDex投与72時間目の泳動像を拡大したものを図20に示した。

投与直後では明確に認められる分子量約88,000, 31,000, 26,000, 25,000および19,000の5本のバンドは投与72時間後では薄くなっていた。また、投与直前にはほとんど認められない分子量約80,000, 67,000および28,000の3本のバンドは投与72時間後では濃くなっていた。

実験9. GC投与後のF囊リンパ細胞におけるmRNAの翻訳蛋白質の解析

21日齢のヒナにDexを投与し、投与1時間後に採取したF囊より抽出したmRNAを、L-[³⁵S]-メチオニンを含むウサギ網状赤血球ライセートの翻訳系にて合成した蛋白質をSDS-PAGEにより分析し、オートラジオグラフィを行った結果を図21に示した。また、図21における対照区のレーンCとDex投与のレーン5については拡大して図22に示した。

コントロールとして使用したタバコモザイクウイルス (TMV) のmRNAより翻訳された試料では、11本のバンドが示す蛋白質が認められた。また、mRNAの代わりに滅菌水 (W) を翻訳系に加えたものでは、いずれのバンドも認められなかった。Dex投与のレーン1~5では、6~10本のバンドが認められた。

対照区のレーンCとDex投与のレーン5の比較では、対照区で認められるがDex区では認められないバンド (○) が2本 (分子量; 約85,000および20,000) 存在した。また、対照区では濃いDex区では薄いバンドが3本 (分子量; 約50,000, 37,000および30,000) 確認された (図22)。

実験10. GC誘導性のF囊のアポトーシスにおけるユビキチンの関与

35日齢のヒナにDexあるいはキャリアーのコーンオイルを投与し、24および48時間にF囊を採取し、それらのユビキチン含量を測定した結果を図23に示した。投与24および48時間後のDex投与区のユビキチン量は、非投与区あるいはキャリアー投与区と比較して少なく、その差は統計的に有意であった($p < 0.01$)。また、Dex投与区において24時間後と48時間後のユビキチン量を比較すると、48時間後の値が減少しており、その差は有意であった($p < 0.05$)。キャリアー投与区と非投与区では大きな差は認められなかった。

42日齢のヒナにDexを投与し、投与直後ならびに投与1, 2, 4, 6, 12および24時間後のユビキチン含量を測定した結果を図24に示した。ユビキチン量は投与2時間目をピークとして経時的に増加し、その4時間以後は時間の経過に伴い減少した。投与2時間後の値は、投与直後の値との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。一方、24時間後の値は投与直後と比較すると有意に低かった ($p < 0.05$)。

考 察

実験8では、F囊におけるDex誘導性のアポトーシスに対する蛋白質の関与についてSDS-PAGEにより調べた。その結果、分子量約88,000, 31,000, 26,000, 25,000および19,000の5種類の蛋白質はDexにより減少することが確認された。

Hengartner *et al.* (1992)は、線虫では*ced-9* 遺伝子が発生過程におけるアポトーシスを抑制していることを示した。また、ヒト濾胞性B細胞リンパ腫から発見された*bcl-2* の遺伝子産物はアポトーシスの抑制因子として知られ (Vaux *et al.*, 1988; Hockenbery *et al.*, 1990), 比較的広範な組織において発現がみられるが、特にアポトーシスと関わりの深い免疫系ならびに神経系などの組織において高い発現が認められている (Negrini *et al.*, 1987; 辻本, 1993)。この*bcl-2*は、分子量26,000の蛋白質であるが、ニワトリではB細胞の分化・成熟が盛んな若齢のヒナのF囊において高い発現が認められ成長に伴い低下する (Eguchi *et al.*, 1992)。本実験におい

て減少した分子量約26,000の蛋白質は、この *bcl-2* であるとも考えられたが、その確定までには至らず今後の検討課題である。しかし、分子量約88,000, 31,000, 26,000, 25,000および19,000の5種類の蛋白質の中には、アポトーシスを抑制する作用を有するものが含まれている可能性があるかと推察された。

一方、分子量約80,000, 67,000および28,000の3種類の蛋白質は、*Dex*の投与により増加した。これらの蛋白質の中には、アポトーシスの発現あるいは進行を促進する作用を有するものが含まれている可能性があるかと推察された。また、前述したようなアポトーシスの抑制蛋白質の減少あるいは消失により発現するアポトーシスの誘導遺伝子の産物であるとも推察される。しかしながら、実験9におけるmRNAレベルでの解析では、GCの作用により新生あるいは増加する蛋白質は見いだされなかったことを考え合わせると、これらの蛋白質は細胞内に貯留していた蛋白質や構造蛋白質などとも考えられるため、アポトーシスの発現に関与する可能性は低いものと推定された。

第2章の結果から、GC誘導性のF囊リンパ細胞のアポトーシスは、GC投与1時間以内に速やかに発現し始めていることが認められた。そこで、実験9では、*Dex*投与1時間後に採取したF囊からmRNAを抽出し、これをもとに翻訳させた蛋白質をSDS-PAGE電気泳動により解析した。その結果、分子量約85,000および20,000の2種類の蛋白質が、*Dex*の投与により消失した。また、分子量約50,000, 37,000および30,000の3種類の蛋白質は、*Dex*投与で減少した。これらの蛋白質は正常なリンパ細胞では比較的強い発現を示す遺伝子産物であり、*Dex*の直接的あるいは間接的な作用でそれらの遺伝子の働きが抑制あるいは停止せしめられ、それによってアポトーシスが発現するものと推定された。したがって、これらの蛋白質の中には、アポトーシスを抑制する働きを持つものがある可能性が示唆された。以上のように本実験では、mRNAレベルでの解析において、アポトーシスの発現過程で減少あるいは消失する蛋白質は比較的多く観察されるの対して、増加または

新生した蛋白質はほとんど認められなかった。

一方、ストレス蛋白質の一種であるユビキチンは、アポトーシスの発現過程においてその量が増加することが報告されており (Phillips and Platt, 1994; Delic *et al.*, 1993), アポトーシスに密接な関与があるとされる蛋白質の一つである。そこで、実験10ではDex投与後のF囊のユビキチン量を蛍光免疫測定法により分析した。その結果、Dex投与2時間目をピークに増加し、その後、経時的な減少を示した。

Phillips and Platt(1994)は、オタマジャクシの尾部を器官培養し、甲状腺ホルモンで誘導されるアポトーシスによる退縮過程において、ユビキチン含量が2~7倍に増加することを報告している。本研究では、Dex投与後に約10~20%のユビキチン量の増加は認められてたものの、前述のような顕著なものではなかった。ニワトリヒナのF囊は、B細胞の発達段階で同細胞の増殖と死滅が繰り返され、アポトーシスの発現頻度が比較的高い器官である (Neiman *et al.*, 1991; Motyka and Reynolds, 1991)。一方、オタマジャクシの尾部は、変態で退縮するまでは成長に伴い細胞の増殖が主で、アポトーシスの発現頻度は高くはないと思われる (Phillips and Platt, 1994)。したがって、アポトーシスの発現過程におけるユビキチンに対する細胞の反応性や合成状態が細胞の種類などに影響されることは容易に推測される。また、大山ら(1988)は、低レベル放射線で誘導されるラットの胸腺リンパ細胞のアポトーシスにおいて、生体への照射では胸腺におけるアポトーシス小体の形成が認められるが、試験管内の胸腺リンパ細胞への照射ではそれが認められないことを報告しており、実験系の違いによりアポトーシスの発現形態が異なることを示唆している。アポトーシスの発現あるいは進行過程におけるユビキチン量の増加割合は、細胞の種類や *in vivo* や *in vitro* などの実験系などが影響する可能性もあると考えられた。

Delic *et al.* (1993)は、ヒト培養リンパ細胞に対する低レベルγ線の照射により誘

導されるアポトーシスにおいてユビキチンのmRNAが増加するとともに、アポトーシス発現細胞の核内タンパク質にユビキチンが多数結合していることを示した上で、このことがアポトーシスの発現過程で起こる核DNAの断片化に重要な役割を果たすことを示唆した。本実験において認められたDex投与後のユビキチン量の増加は、アポトーシスの発現過程で起こるDNAの断片化に関与するものと考えられた。

Dexの投与で一旦増加したユビキチンは、時間の経過とともに減少した。このことは、髄質部におけるGC感受性の未成熟なリンパ細胞のアポトーシスによる死滅により、その細胞数が減少していくことに起因するものと考えられた。一方、ユビキチンは、細胞内の異常蛋白質の除去・分解システムや半減期の短い多くのタンパク質の分解システムなどに関与しており、細胞内の恒常性の維持機能に重要な役割を果たしている(Bachmair and Varshavsky, 1989; Hershko, 1988)。したがって、ユビキチン量の減少によってリンパ細胞内の恒常性の維持機能が低下し、細胞の死滅が助長される可能性のあることも推察された。

小 括

Dex投与後のF囊の蛋白質を経時的にSDS-PAGEにより検索した。その結果、分子量約88,000, 31,000, 26,000, 25,000および19,000の5種類の蛋白質はDexにより減少することが確認され、これらの蛋白質の中にはアポトーシスを抑制する作用を持つものがある可能性が推察された。一方、分子量約80,000, 67,000および28,000の3種類の蛋白質は、Dexの投与により増加した。これらの蛋白質は、アポトーシスを誘発する作用あるいはアポトーシスの抑制蛋白質の減少あるいは消失により発現したアポトーシスの誘導遺伝子の産物であることが推察された。

次に、Dex投与1時間目に採取したF囊からmRNAを抽出し、これをもとに翻訳させた蛋白質をSDS-PAGE電気泳動により解析した。その結果、分子量約85,000および20,000の2種類の蛋白質が、Dexの投与により消失した。また、分子量約

50,000, 37,000および30,000の3種類の蛋白質は, Dex投与で減少した。これらの蛋白質はアポトーシスを抑制する働きを持つ可能性があるかと推察された。

Dex投与後のF囊のユビキチン量の経時的推移を蛍光免疫測定法により分析した。その結果, Dexの投与でユビキチンは一旦増加し, その後, 時間の経過とともに減少した。Dex投与による一過性のユビキチン量の増加は, アポトーシスの発現過程で起こるDNAの断片化に関与するものと考えられた。また, その後のユビキチン量の減少はアポトーシスによるリンパ細胞の死滅・減数に起因するものと考えられたが, 細胞内におけるユビキチンの機能を勘案すると, ユビキチン量の減少によってリンパ細胞内の恒常性の維持機能が低下し, アポトーシスによる細胞の死滅が助長される可能性のあることも推察された。

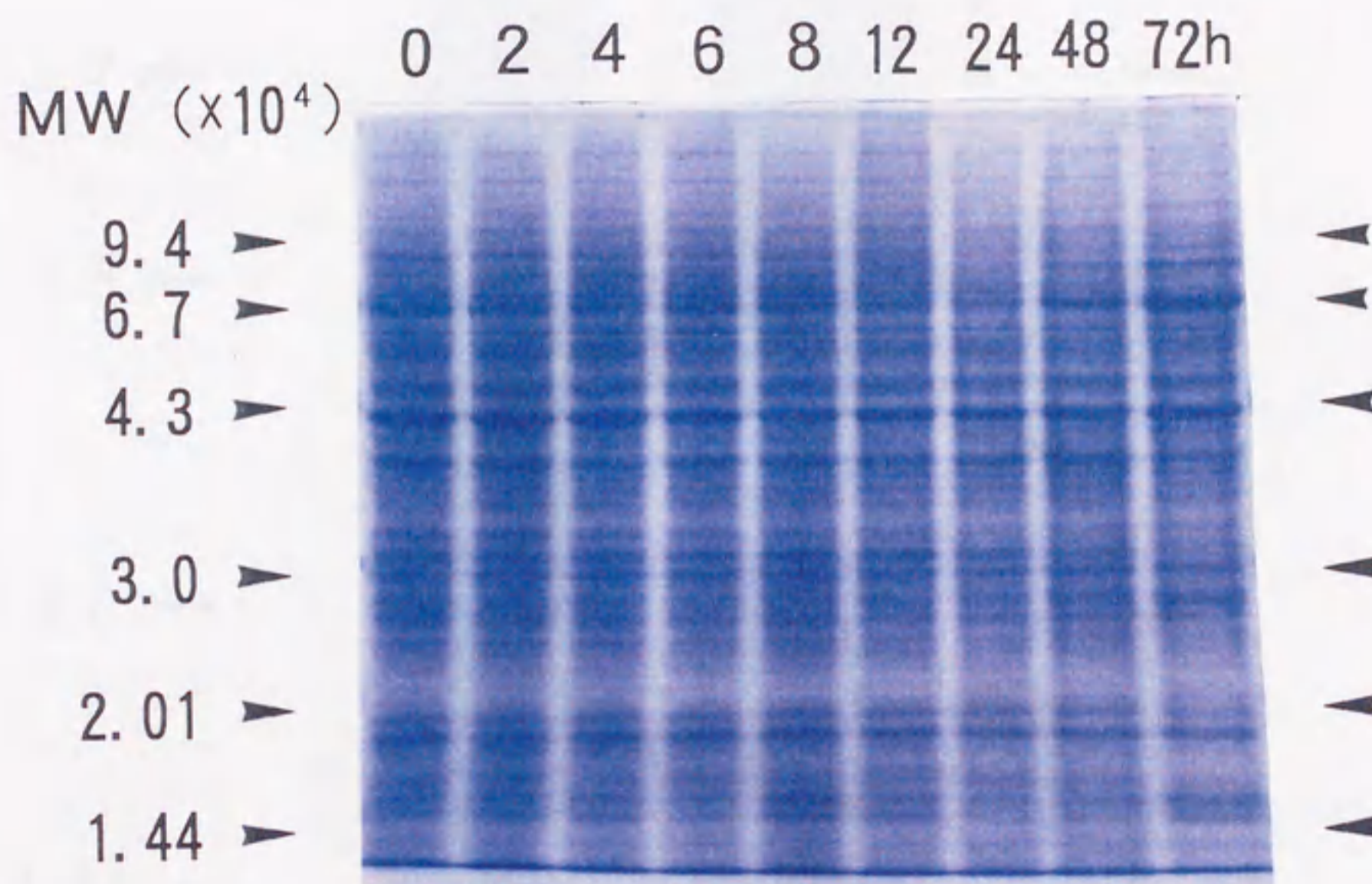


Fig.19 Time-dependent changes in SDS-polyacrylamide gel separations of bursal protein. Chickens were treated with dexametasone(10mg/kg body weight) and killed 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 or 72h afterward. Bursal protein was isolated and analyzed by 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15mA, 4h). CBB stain.

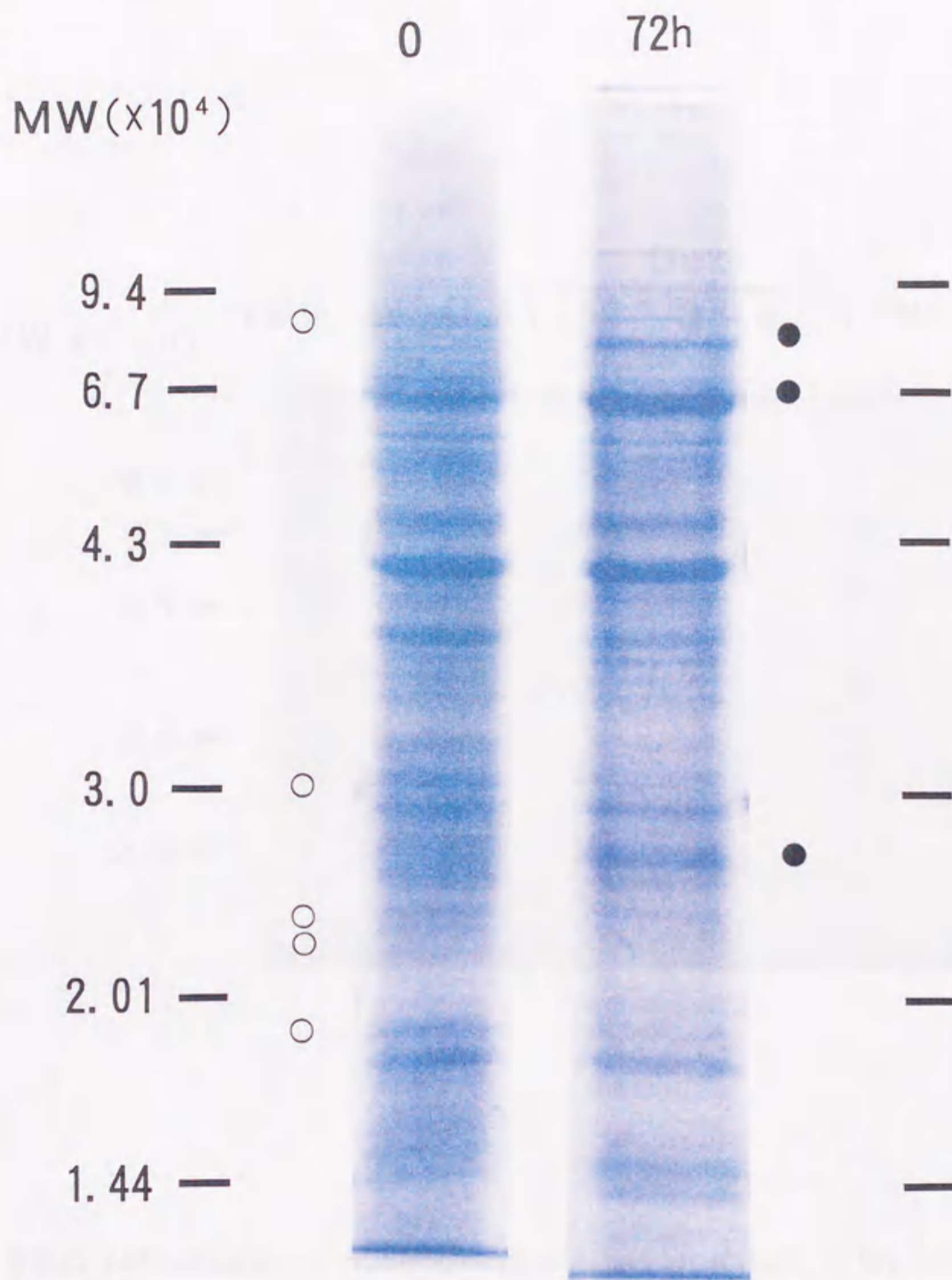


Fig.20 Close-up of SDS-polyacrylamide gel separations of bursal protein. Chickens were treated with dexametasone(10mg/kg body weight).

Lane 0 : 0h after treatment, Lane 72h: 72h after treatment.

○ : detected clearly in lane 0 and faintly in lane 72h.

● : detected faintly in lane 0 and clearly in lane 72h.

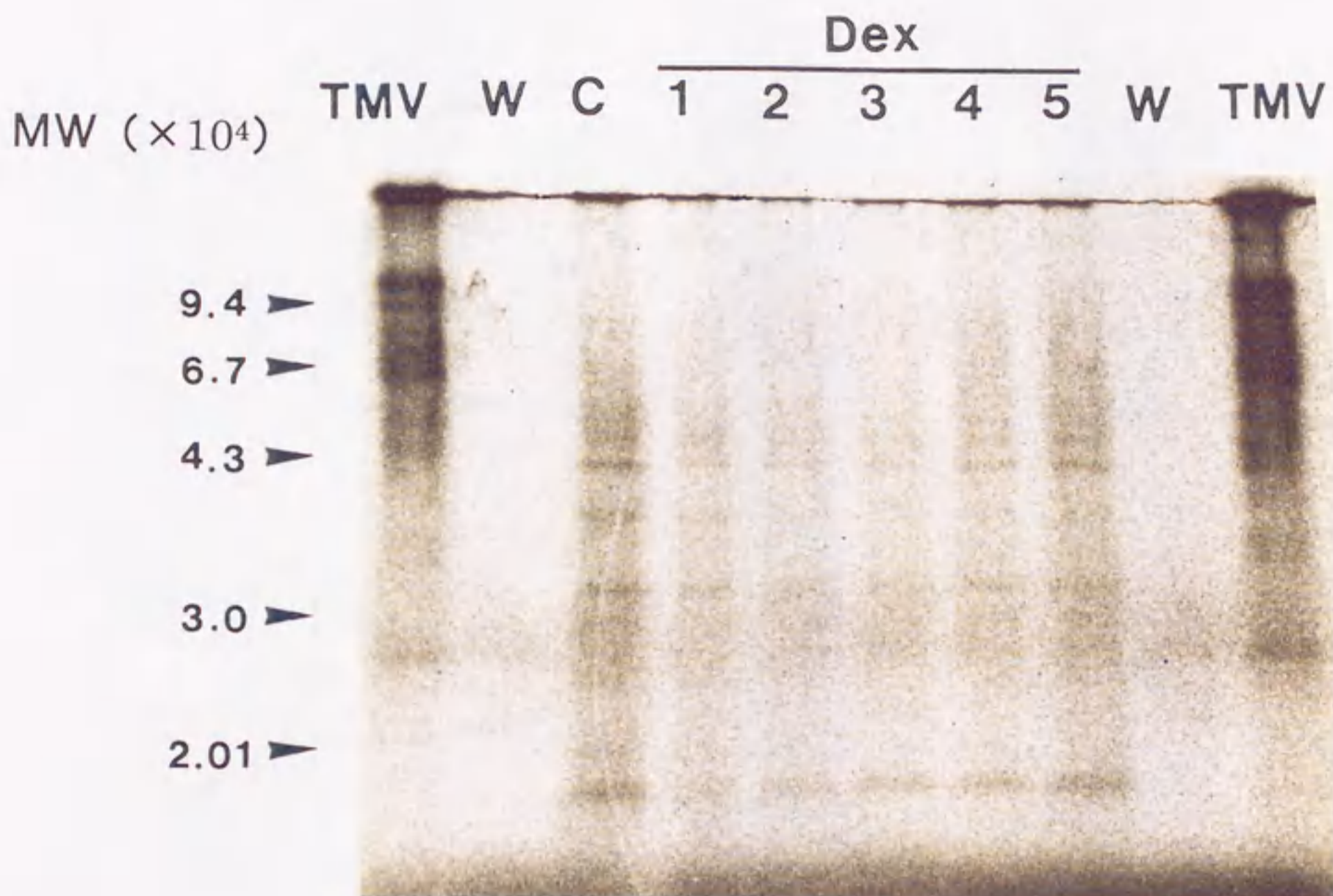


Fig.21 Autoradiogram of SDS-polyacrylamide gel separations of the protein translated from bursal lymphocyte mRNA using rabbit reticulocyte lysate system with ^{35}S -Met. Chickens were treated with dexametasone(10mg/kg body weight) and killed 1h later. The protein was analyzed by 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15mA, 18h). TMV : Protein translated from mRNA of tobacco mosaic virus , W : water, Dex 1-5 : Protein translated from bursal lymphocyte mRNA from the birds treated with dexamethasone. C : Protein translated from bursal lymphocyte mRNA from the bird not treated.

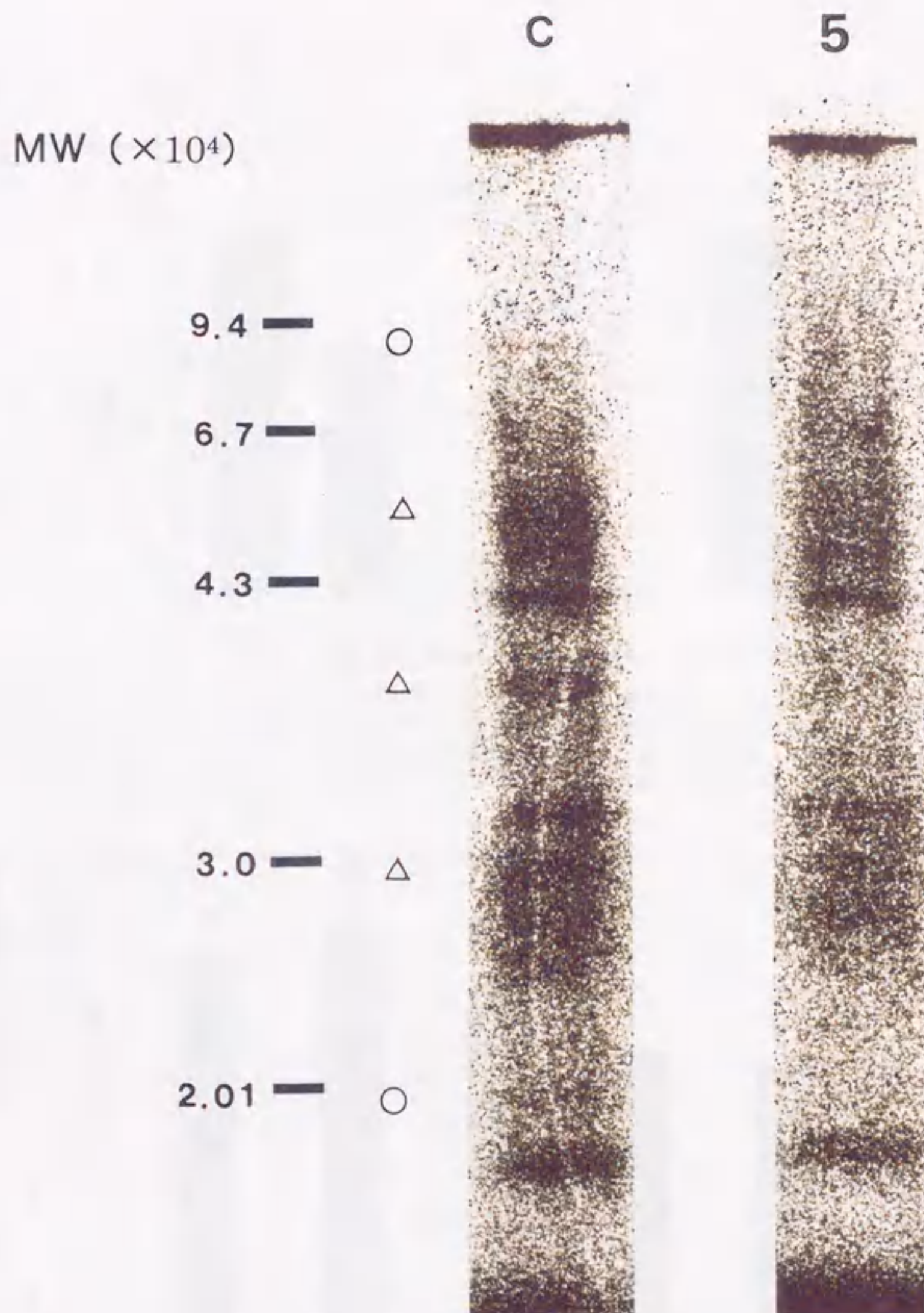


Fig.22 Close-up of autoradiograms of Lane C and 5 in figure 21.

Lane C : Protein translated from bursal lymphocyte mRNA from the bird not treated.

Lane 5 : Protein translated from bursal lymphocyte mRNA from the birds treated with dexamethasone .

○ : detected in lane C and nondetected in lane 5.

△ : detected in Lane C and faintly detected in Lane 5.

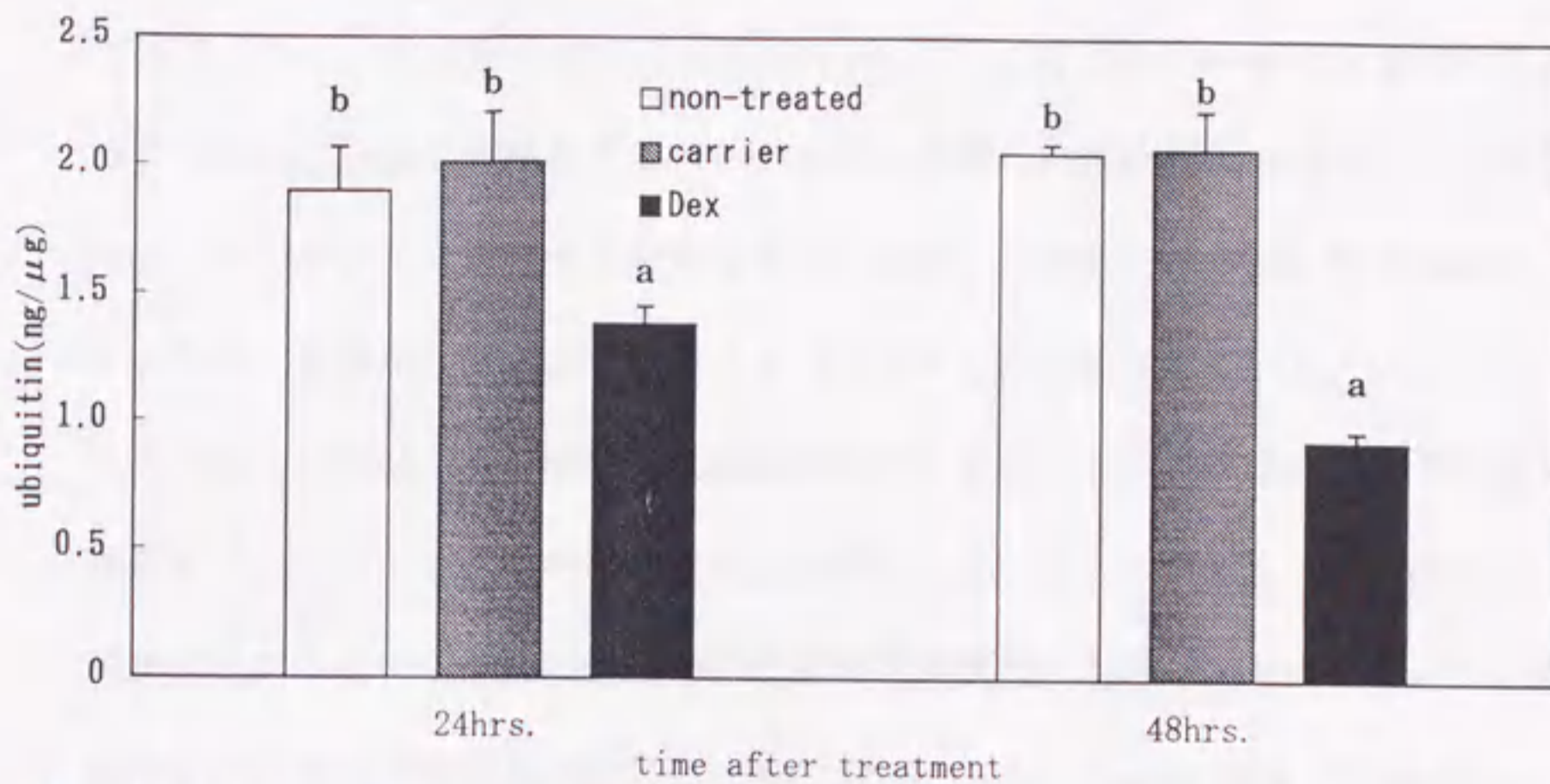


Fig 23. Bursal ubiquitin level in the chicken of dexamethasone, carrier and non-treated group. Data is expressed in terms of protein equivalent in each test specimen. Each column and vertical line represent a mean and SE of 5 birds, respectively. Means with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

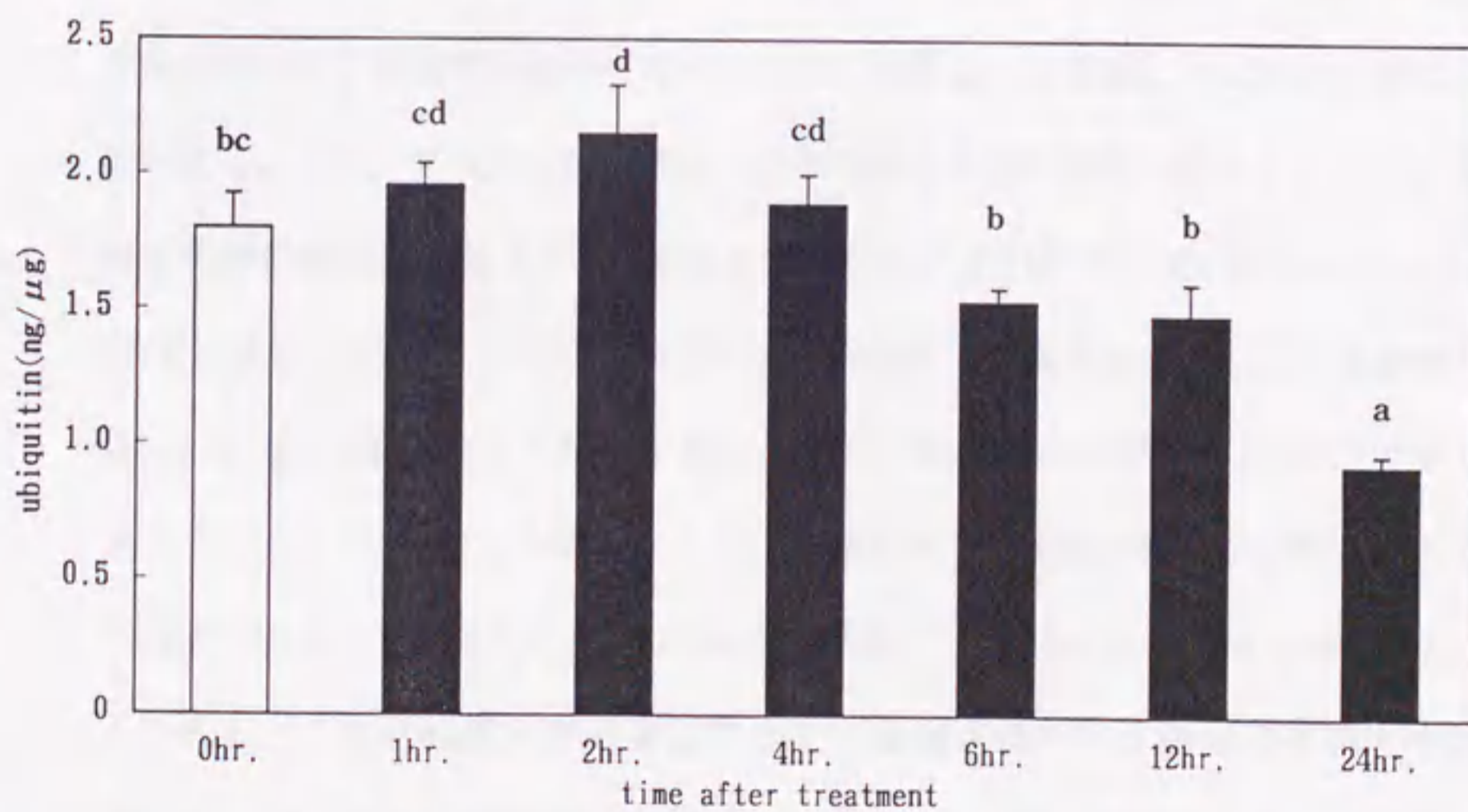


Fig 24. Effects of dexamethasone on bursal ubiquitin level in the chicken after treatment of dexamethasone (10mg/kg body weight). Data is expressed in terms of protein equivalent in each test specimen. Each column and vertical line represent a mean and SE of 5 birds, respectively. Means with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

論 議

多細胞生物の細胞は、細胞分裂により増殖・分化し、様々な機能を果たしているだけでなく、自らを死滅させる機能も持っている。Kerr *et al.* (1972)が、このような能動的な細胞の死滅をアポトーシスという新しい生体制御機構として提唱して以来、アポトーシスに関する研究は急速に進展し、現在では細胞の死滅機構がアポトーシスと従来から知られていたネクローシスとに大別されている。

ネクローシスは、主に病理的な細胞損傷が引き金となり、細胞内の恒常性調節の不全によって生ずる受動的な細胞死滅機構である。一方、アポトーシスは特定の誘発刺激に対する感受性細胞の能動的な細胞死滅機構であり、両者には数々の形態学的ならびに生化学的な違いがある (Kerr *et al.*, 1972; Cohen, 1991; Thompson *et al.*, 1992)。たとえばネクローシスでは、細胞質内のミトコンドリアの膨潤とともに細胞自体が膨化し、その後、細胞膜が崩壊することによって細胞が死滅するが、この過程で流出する細胞内容物のために白血球が集属し、組織変化として炎症反応が認められる。一方、アポトーシスでは、核の凝縮とともに細胞が縮小し、死滅した細胞は隣接の細胞に貪食され、炎症像は呈さないと言われている (Thompson *et al.*, 1992)。また、ネクローシスでは核DNAが無作為に分解され、このような細胞の核DNAを電気泳動法により解析するとスメア-状になるが (田沼, 1994)、アポトーシスでは核DNAがヌクレオソーム単位に断片化し、電気泳動上では梯子状のラダーパターンとして観察される (Wyllie, 1980; Wyllie, 1984; Thompson *et al.*, 1992)。

アポトーシスは細胞内在の遺伝子により制御されている細胞死滅機構であり (Kerr *et al.*, 1972; Cohen, 1991; Thompson *et al.*, 1992)、アポトーシスの発現あるいは進行の過程では、それに関与する遺伝子産物として新たに合成される蛋白質の関与が示されている (Sellins and Cohen, 1987; Yamada and Ohyama, 1988)。以上に述べてきたようなアポトーシスに関する研究の多くは、哺乳類であるラットやマウ

スなどを中心にした研究がほとんどであるが、鳥類における研究はまだ緒についた段階である。

さて、ニワトリヒナにストレスが加わると、胸腺やF囊などのリンパ器官の発達が妨げられ(Newcomer and Connally, 1960; Glick, 1964), このことにより抗病性が低下し、生存率が低下したり、疾病が容易に発生しやすくなり生産性が低下する事態を招く。このようなストレスによるリンパ器官の発達抑制には、副腎皮質から分泌されるGCの作用が関係する。ニワトリヒナに対してBを投与すると、胸腺や脾臓などのリンパ器官が萎縮する(Davison *et al.*, 1983a; Davison *et al.*, 1983b; Gross and Siegel, 1983; Gross *et al.*, 1980)。また、BやコルチゾンなどのGCをニワトリヒナへ投与すると、B細胞の産生に重要な役割を果たしているF囊が萎縮することが示されている(Dieter and Breitenbach, 1970; Gross *et al.*, 1980; Davison *et al.*, 1983a; Compton *et al.*, 1990)。これらのようにストレスによる抗病性の低下には、GCの作用が関係してことがわかるが、これによって家禽産業の生産性に多大な損失を招いている。したがって、このようなGCの作用によるリンパ器官への影響に関するメカニズムを解明することは、家禽産業上も意義深いことである。そこで本研究では、ニワトリのF囊を実験モデルにして、GC誘導性のアポトーシスの発現形態を調べるとともに、その現象について生理化学的に検討を加え、家禽のリンパ細胞におけるGC誘導性のアポトーシスに関するメカニズムの一端を解明しようとした。

ニワトリヒナにGCを投与するとF囊が萎縮する現象は知られていたが(Dieter and Breitenbach, 1970; Gross *et al.*, 1980; Davison *et al.*, 1983a), これに対するアポトーシスの関与について組織学的に検討した研究はない。前述のようにアポトーシスによる細胞の死滅形態はネクローシスとは種々の相違があることが哺乳類において示されている(Kerr *et al.*, 1972; Cohen, 1991; Thompson *et al.*, 1992)。本研究では、まずF囊におけるGC誘導性のリンパ細胞のアポトーシスに関して組織学的

に検討した。その結果、GCとしてDexを投与したニワトリヒナのF囊のリンパ濾胞では、細胞核が凝縮したリンパ細胞が経時的に増加するとともに、リンパ細胞が死滅・減少し、リンパ濾胞内では隣接の細胞との間隙の拡大が認められた。これらのことはラットやマウスで認められているアポトーシスの形態変化の特徴と一致し (Kerr *et al.*, 1972; Cohen, 1991; Thompson *et al.*, 1992), GCの作用によりF囊リンパ細胞においてアポトーシスが発現していることが示唆された。

第1章の図5ならびに図6に示したように、GCの作用によるリンパ細胞の死滅・減少は、リンパ濾胞皮質部よりも髄質部で明らかに顕著であり、この両部位のリンパ細胞間にはGCに対する反応性に明らかな違いのあることがわかった。第2章においても、アポトーシスの発現細胞を免疫組織化学的に検出する手法を用いて検討した結果、リンパ濾胞髄質部においてアポトーシスの発現を示す陽性リンパ細胞が多く観察された。F囊のリンパ濾胞髄質部には、未成熟なリンパ細胞が多く存在するのに対して (Naukkarinen and Sorvari, 1982), 皮質部では成熟したリンパ細胞が大多数を占めると言われている (Clawson *et al.*, 1967; 佐藤, 1971; Frazier, 1974)。これらのことから、未成熟なリンパ細胞は成熟したリンパ細胞と比較してGCに対する感受性が高いことが推定され、GC誘導性のアポトーシスの発現が髄質部でより顕著であったと考えられた。

一方、IBDVを経口感染させF囊にネクロシスを引き起こした場合の、組織変化を観察したところ、GCでは主に髄質部のリンパ細胞が減少したのに対して、IBDV感染ではリンパ濾胞の髄質部と皮質部の区別なくリンパ細胞が死滅・減少した。また、IBDV感染ではリンパ濾胞内での炎症が顕著でマクロファージによる死滅リンパ細胞の貪食形態が明確であった。一方、GCでは組織内の炎症はほとんど認められなかった。さらに、IBDV感染ではGCにおいて見られた核の凝縮を伴うリンパ細胞の死滅形態はほとんどなかった。以上のことから、GC誘導性のF囊の萎縮はIBDV感染のようなリンパ組織の変性壊死の形態をたどるものではないことが明確となり、

ニワトリのリンパ組織においてもネクローシスとアポトーシスではその組織変化や細胞の死滅形態に明確な違いがあることが明らかとなった。

GC誘導性のF囊リンパ細胞の死滅形態をSEMで観察した結果、リンパ細胞間の結合が疎化し、細胞表面も平滑化していた。また、核凝縮を伴う細胞の縮小も観察された。これらは哺乳類において見られるアポトーシスの細胞レベルにおける形態変化の特徴と一致した(Yamada and Ohyama, 1981)。また、リンパ細胞核内のクロマチンがほぼ三日月状に凝縮している様子も捉えられた。さらに、免疫組織化学的検討では、GCの作用によりアポトーシスを発現を示す陽性リンパ細胞の核周辺部にCの字状の強い染色性が観察された。ヒトのリンパ細胞では、抗Fas抗体あるいはHIVにより誘導されるアポトーシスにおいて、細胞核内のクロマチンが核膜周辺に半円形あるいは三日月状に凝縮するケースが多いことが示されている(Itoh *et al.*, 1991; Ogasawara *et al.*, 1993)。このように本研究で認められたような特徴的なクロマチンの凝縮形態は、アポトーシスの発現過程で一定の普遍性を持つ細胞形態の変化であると考えられる。一方、IBDV感染のネクローシスを起こしたF囊の免疫組織化学的検討では、死滅したリンパ細胞がマクロファージに貪食され、核断片が不定形な染色性を示し、この点でもネクローシスとアポトーシスでは明らかな相違があり、光学顕微鏡レベルにおいても免疫組織化学的にクロマチンの凝縮形態の違いによって、細胞レベルで容易にネクローシスとアポトーシスが区別できうることがわかった。

アポトーシスにおける特徴的な生化学変化として核DNAの断片化が示されている(Wyllie 1980; Wyllie *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1992)。本研究においても、GCを投与したヒナのF囊より抽出したDNAでは、アガロースゲル電気泳動上でラダーパターンが確認された。このことから、ニワトリヒナのF囊リンパ細胞においても核DNAが断片化していることが示され、生化学的にもGCによってアポトーシスが発現していることが検証された。本研究におけるDNAラダーは、GCの

投与1時間目にはすでに確認された。また、免疫組織化学的な検索においてもGC投与1時間目にはアポトーシスの発現を示す陽性細胞の増加が認められた。以上のことから、F嚢リンパ細胞におけるGC誘導性のアポトーシスは、GCの作用により比較的速やかに発現していることがわかる。

アポトーシスの発現過程では、エンドヌクレアーゼが活性化され、ヌレオソーム間のリンカー部位に作用し、DNAがヌレオソーム単位で切断される(Cohen, 1991; Shiokawa *et al.*, 1994)。また、この断片化はアポトーシスの発現後、一定の時間まで経時的にヌレオソーム単量体、2量体といった短い断片が増加するが、本研究では、GC投与12時間目をピークにDNAの断片化が急激に進んだものと言える。その後、GC投与24時間以降では、DNAラダーのバンドは薄くなった。これと同様の結果をCompton *et al.* (1990)も報告している。本研究の第1章で示したように、GC投与によりリンパ濾胞髄質部のGC感受性リンパ細胞が急速に死滅・減少した。また、リンパ細胞の死滅・減少が著しい髄質部では空胞様構造の嚢胞も観察された。これらのことから、GCの投与24時間以降ではアポトーシスの発現細胞数が減少するために、DNAラダーが薄くなったものと考えられる。以上のことは、DNAの断片化がアポトーシスにおける初期段階で起こる生理化学的現象であることを示唆している。また、リンパ細胞内ではGCの作用によって速やかにアポトーシスの発現に必要な生理化学的変化が生じていることが推定された。一方、F嚢の組織レベルで明確にアポトーシスが確認されたのはGC投与6時間目以降であり、その後、核凝縮を示すリンパ細胞が増加し、リンパ濾胞の髄質部を中心に細胞数が急速に減少した。

以上のことを考え合わせると、F嚢ではリンパ濾胞髄質部の未成熟なリンパ細胞を中心に、GCの作用により速やかにアポトーシスの発現に必要な生理化学的変化が生じていることが推定され、それによって核DNAの断片化が起こるとともにクロマチンが凝縮する。それに引き続いて、細胞核が凝縮するとともに細胞自体も

縮小し死滅していくものと考えられた。そして、リンパ濾胞では死滅したリンパ細胞が隣接の細胞などに貪食・排除されリンパ細胞が減少し、F 嚢が萎縮するものと考えられた。

続いて本研究では、このようなF 嚢リンパ細胞のGC誘導性のアポトーシスに対する蛋白質の関与について検討を加えた。ニワトリヒナにGCとしてDexを投与し、その後、F 嚢より蛋白質を抽出しSDS-PAGEにより解析した。その結果、分子量約88,000, 31,000, 26,000, 25,000および19,000の5種類の蛋白質はDexにより減少することが確認された。Hengartner *et al.* (1992) は、線虫の発生過程において *ced-9* 遺伝子が不活化されるとアポトーシスによる細胞の死滅が促進されることから、この遺伝子がアポトーシスの発現を抑制していることを示した。また、ヒト濾胞性B細胞リンパ腫から発見された *bcl-2* の遺伝子産物はアポトーシスの抑制因子として知られ (Vaux *et al.*, 1988; Hockenbery *et al.*, 1990), アポトーシスと関わりの深い免疫系や神経系などの組織において高い発現が認められる (Negrini *et al.*, 1987; 辻本, 1993)。この *bcl-2* は、分子量26,000の蛋白質であるが、ニワトリではB細胞の分化・成熟が盛んである若齢ヒナのF 嚢において高い発現が認められ、成長に伴いその発現が低下することが示されている (Eguchi *et al.*, 1992)。本研究で減少した分子量約26,000の蛋白質は、この *bcl-2* であるとも考えられたが、その同定までには至らなかったため、今後の検討課題である。また、分子量約88,000, 31,000, 26,000, 25,000および19,000の5種類の蛋白質の中には、アポトーシスを抑制する作用を有するものが含まれている可能性が推定された。

先に示したような組織学的な検討結果あるいはDNAの断片化が認められる時間的な背景から、アポトーシスの発現に必要な生理化学的变化はGC投与1時間以内には生じている可能性が高いことが推定された。また、Voris and Young (1981) は、GCの作用で新たに合成されるラットの培養胸腺リンパ細胞の蛋白質は非常に少ないとしながらも、GCの作用により30分後には6種類の蛋白質の新生を確認してい

る。そこで、本研究では、Dex投与1時間後に採取したF囊からmRNAを抽出し、これをもとに翻訳された蛋白質をSDS-PAGEにより解析した。その結果、分子量約85,000および20,000の2種類の蛋白質が、Dexの投与により消失した。また、分子量約50,000, 37,000および30,000の3種類の蛋白質は、Dex投与で減少した。これらの蛋白質は正常なリンパ細胞では比較的強い発現を示す遺伝子の産物で、Dexの直接的あるいは間接的な作用でそれらの遺伝子の働きが抑制あるいは停止せしめられたものであり、その結果としてアポトーシスが発現することが推定された。したがって、これらの蛋白質の中には、アポトーシスを抑制する働きを持つものがある可能性が示唆された。一方、GCの作用で新生あるいは増加する蛋白質は確認されなかった。以上のように、mRNAレベルでの解析では、アポトーシスの発現過程において減少あるいは消失する蛋白質は比較的多く観察されるのに対して、増加または新生が認められた蛋白質はなかった。

F囊から抽出した蛋白質の解析では、GCの作用によって分子量約80,000, 67,000および28,000の3種類の蛋白質の増加が観察された。しかしながらmRNAレベルでの解析ではマクロなレベルでの蛋白質の増加・新生は認められなかったことから、これらの3種類の蛋白質は細胞内に貯留していた蛋白質あるいは細胞死滅の過程で発生する構造蛋白質などの可能性が高く、アポトーシスの発現や進行に関与している可能性は低いものと推定された。

ストレス蛋白質の一種であるユビキチンは、アポトーシスの発現過程においてその量が増加することが報告されており(Phillips and Platt, 1994; Delic *et al.*, 1993), アポトーシスに密接な関与があるとされる蛋白質の一つである。そこで、本研究ではこの点についても検討を加えた。ニワトリヒナに対してGCとしてDexを投与し、F囊のユビキチン量を蛍光免疫測定法により測定した。その結果、F囊のユビキチン量はDex投与2時間目をピークに増加し、その後経時的な減少を示した。Delic *et al.* (1993) は、ヒト培養リンパ細胞に対する低レベル γ 線の照射に

より誘導されるアポトーシスにおいてユビキチンのmRNAが増加するとともに、アポトーシス発現細胞の核内タンパク質にユビキチンが多数結合していることを示した上で、このことがアポトーシスの発現過程で起こる核DNAの断片化に重要な役割を果たすことを示唆した。本実験において認められたDex投与後のユビキチン量の増加についても、アポトーシスの発現過程で起こるDNAの断片化に関与していることが推定された。一方、GCの作用で一旦増加したユビキチンは、その後は時間の経過とともに減少した。このことは、髄質部におけるGC感受性の未成熟なリンパ細胞のアポトーシスによる死滅によって、その細胞数が減少することに起因するものと考えられた。ユビキチンは、細胞内の異常蛋白質の除去・分解システムや半減期の短い多くのタンパク質の分解システムなどに関与しており、細胞内の恒常性の維持機能に重要な役割を果たしている (Bachmair and Varshavsky, 1989; Hershko, 1988)。したがって、ユビキチン量の減少は、リンパ細胞内の恒常性の維持機能の低下をもたらし、アポトーシスによる細胞の死滅を助長する可能性のあることも推察された。

以上を示してきたことから、ニワトリにおけるGC誘導性のF囊リンパ細胞のアポトーシスによる細胞死滅機構に関して以下のように考える。まず、F囊ではGCに対して感受性の高いリンパ濾胞髄質部の未成熟なリンパ細胞を中心に、GCの作用によりアポトーシスの発現に必要な細胞内の生理化学的变化が速やかに生じるものと思われる。おそらく、この細胞内の生理化学的变化では、アポトーシスの発現を抑制する種々の蛋白質の減少や消失が重要な要因となりうる。また、これと時を隔てず細胞内ではストレス蛋白質の一種であるユビキチンが増加し、このことが引き金となりエンドヌクレアーゼが活性化され、その作用により核DNAの断片化が起こる。核DNAの断片化に伴い細胞核内ではアポトーシスの特徴であるCの字状にクロマチンが凝縮し、これに引き続いて細胞核が凝縮するとともにリンパ細胞が小型化し死滅していくが、この段階になると細胞内の恒常性の維持機能に重要な役

割を果たすユビキチンレベルの低下が、細胞の死滅を助長するものと推察された。

本研究では、F 囊リンパ細胞のGC 誘導性のアポトーシスに対する蛋白質の関与についても検討したが、アポトーシスの発現過程で新たに合成されたりあるいは増加する蛋白質はきわめて少ないことが明らかとなった。その一方で、アポトーシスの発現過程で減少あるいは消失する蛋白質が比較的多く見いだされたが、*bcl-2* に代表されるようにアポトーシスの発現には、その抑制蛋白質が重要な役割を担っているものと考えられる。高度に分化し専門化している多細胞生物の細胞は、すべからく死に収束する運命にあると言えるが、本研究でもその存在が推定されたように、アポトーシスによる死への誘導を抑制する蛋白質の作用によって、生が保証されていると言えるのかもしれない。

ニワトリに対してグルココルチコイド (GC) を投与すると、胸腺や脾臓などとともにファブリシウス嚢 (F嚢) が萎縮する。このようなGCの作用による胸腺などのリンパ器官の萎縮には、アポトーシスが関与することがラットやマウスなどの哺乳類においてはよく調べられているが、鳥類における研究はほとんど進展していない。そこで本研究では、ニワトリのF嚢を実験モデルにして、GC誘導性のアポトーシスの発現形態を調べるとともに、その発現過程について生理化学的に検討を加え、家禽のリンパ細胞におけるGC誘導性のアポトーシスに関するメカニズムの一端について解明しようとした。

本研究では、まずF嚢におけるGC誘導性のリンパ細胞のアポトーシスに関して組織学的に検討した。その結果、GCとしてDexを投与したニワトリヒナのF嚢のリンパ濾胞では、細胞核の凝縮を呈するリンパ細胞が経時的に増加するとともに、リンパ細胞が死滅・減少し、組織像としては隣接の細胞との間隙の拡大が認められた。これらのことはラットやマウスなどの哺乳類のリンパ細胞において認められているアポトーシスの形態変化の特徴と一致し、GCの作用によりF嚢リンパ細胞においてアポトーシスが発現していることが示唆された。また、未成熟なリンパ細胞は成熟したリンパ細胞と比較してGCに対する感受性が高いことが推定され、GC誘導性のアポトーシスの発現が髄質部でより顕著であったと考えられた。

また、IBDVを経口感染させF嚢にネクローシスを引き起こした場合のF嚢組織を観察に加えて、免疫組織化学的な手法により比較検討した。その結果、GCの誘導性のアポトーシスでは、主に髄質部のリンパ細胞が減少したのに対して、IBDV感染ではリンパ濾胞の髄質部と皮質部の区別なくリンパ細胞が死滅した。また、IBDV感染によるネクローシスではリンパ濾胞内での炎症が顕著でマクロファージによる死滅リンパ細胞の貪食形態が明確であった。一方、GCでは組織内の炎症はほとん

どなく、細胞の小型化あるいは核の凝縮を呈する細胞の死滅形態が特徴的であった。さらに、IBDV感染ではGCにおいて見られた核の凝縮を伴うリンパ細胞の死滅形態はほとんどなかった。以上のことから、GC誘導性のF囊の萎縮は、IBDV感染のようなリンパ組織の変性壊死の形態をたどるものではないことが明確となり、ニワトリのリンパ組織においてもネクローシスとアポトーシスではその組織変化や細胞の形態変化に明確な違いがあることが明らかとなった。また、GCの作用によりアポトーシスの発現を示す陽性リンパ細胞では、核周辺部にCの字状の強い染色性が観察された。一方、IBDV感染のネクローシスを起こしたF囊の免疫組織化学的検討では、死滅したリンパ細胞がマクロファージに貪食され、核断片が不定形な染色性を示し、この点でもネクローシスとアポトーシスでは明確な相違があることが明らかとなった。

次に、GCを投与したヒナのF囊より抽出したDNAをアガロースゲル電気泳動により解析したところDNAラダーが確認された。このことから、ニワトリヒナのF囊リンパ細胞においても核DNAが断片化していることが示され、生化学的にもGCによってアポトーシスが発現することが検証された。本研究におけるDNAラダーは、GCの投与1時間目にはすでに確認された。また、免疫組織化学的な検索においてもGC投与1時間目にはアポトーシスの発現を示す陽性細胞の増加が認められた。以上のことから、F囊リンパ細胞におけるGC誘導性のアポトーシスは、GCの作用により比較的速やかに発現することがわかった。

さらに、このようなF囊リンパ細胞のGC誘導性のアポトーシスに対する蛋白質の関与について検討を加えた。その結果、分子量約88,000, 31,000, 26,000, 25,000および19,000の5種類の蛋白質はGCにより減少することが確認された。また、mRNAレベルでの解析では、分子量約85,000および20,000の蛋白質が、GCの作用で消失し、分子量約50,000, 37,000および30,000の蛋白質が減少した。したがって、これらの中にはアポトーシスの抑制作用を有するものが含まれている可能

性があると推定された。

一方、F囊から抽出した蛋白質の解析では、GCの作用によって分子量約80,000, 67,000および28,000の3種類の蛋白質の増加が観察された。しかしながらmRNAレベルでの解析ではマクロなレベルでの蛋白質の増加・新生はなかったことから、これらの3種類の蛋白質はmRNAを介さず、細胞内に貯留していた蛋白質あるいは細胞死滅の過程で発生する構造蛋白質などの可能性が高く、アポトーシスに關与している可能性は低いものと推定された。以上のように、アポトーシスの発現過程において減少あるいは消失する蛋白質は比較的多く観察されるの対して、増加または新生が認められた蛋白質はほとんどなかった。

F囊ではGCの作用でユビキチンレベルが一旦増加し、時間の経過とともに減少した。ユビキチンレベルの増加は、核DNAの断片化に關与しているものと推定された。また、その後のユビキチンレベルの減少はアポトーシスによるリンパ細胞の死滅・減数に起因するものと考えられたが、一方ではリンパ細胞内の恒常性の維持機能が低下し、細胞の死滅を助長する可能性のあることも推察された。

以上のことから、F囊ではGCに対して感受性の高いリンパ濾胞髄質部の未成熟なリンパ細胞を中心に、GCの作用によりアポトーシスの発現に必要な細胞内の生理化学的变化が速やかに生じるものと思われる。おそらく、この細胞内の生理化学的变化では、アポトーシスの発現を抑制する種々の蛋白質の減少や消失が重要な要因となりうる。また、これと時を隔てず細胞内ではストレス蛋白質の一種であるユビキチンが増加し、このことが引き金となりエンドヌクレアーゼが活性化され、その作用により核DNAの断片化が起こる。核DNAの断片化に伴い細胞核内ではアポトーシスに特有なCの字状にクロマチンが凝縮し、これに引き続いて細胞核が凝縮するとともにリンパ細胞が小型化し死滅するが、この段階になると細胞内の恒常性の維持機能に重要な役割を果たすユビキチンが減少し、このことも細胞の死滅を助長するものと推察された。

謝 辞

筆を置くにあたり，本研究の遂行と論文の作成に際し，長い間に渡って親身になりご指導とご助言を賜りました，岐阜大学農学部教授 中村孝雄博士 ならびに同助教授 土井 守博士に対し，心より感謝の意を表します。

また，本論文の審査にあたり種々有益なご指導を賜りました，
岐阜大学農学部教授 木村正雄博士，
静岡大学農学部教授 森 誠 博士 ならびに
信州大学農学部教授 太田克明博士 に心より御礼を申し上げます。

本研究の遂行にあたり，有益なご指導を賜りました，岐阜大学農学部 岩澤 淳博士に感謝の意を表します。

本研究を進める上で，日々大変お世話になりました，共同研究者の木村典靖君，中森千尋さん，吉田咲佳映さん，日高のり子さんに心より御礼を申し上げます。

本研究の組織学的な実験を行う上で，ご助言とご協力を賜りました，全農家畜衛生研究所 小野雅章氏に心より感謝の意を表します。

さらに，本研究の遂行にあたり，多面でご配慮とご理解を賜りました，全農飼料畜産中央研究所 執行文昭所長ならびに全農家畜衛生研究所 堀 周作所長および坂野哲也室長に謝意を表します。

最後に，本研究の遂行と論文の作成にあたり，日々多大なご協力とご配慮を賜りました，全農飼料畜産中央研究所 赤山照也室長をはじめとする職場の上司ならびに皆様に対し，心より御礼を申し上げます。

1997年2月7日

神谷 誠治

文 献

- Bachmair A and A. Varshavsky (1989) The degradation signal in a short-lived protein. Cell, 56 : 1019-1032
- Birrenkott G.P. and M.E. Wiggins (1984) Determination of dexamethasone and corticosterone half-lives in male broilers. Poult. Sci., 63, 1064-1068
- Chang T.S., B.Glick and A.R.Winter(1955) The significance of the bursa of Fabricius of chickens in antibody production. Poult. Sci.,34,1187
- Chau V.,J.W.Tobias,A.Bechmaire,Marriott D.,D.J.Ecker,D.K.Gonda and A. Varshavsky (1989) A mulitiubiquitin chain is confined to specifies lysine in a targeted short-lived protein.Science,243,1576-1583
- Clarke A.R., C.A. Pudie, D.J. Harrison, C.C. Morris, M.L. Hooper and A.H. Wyllie(1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. Nature,362,849-852
- Clawson C.C., M.D. Cooper and R.A. Good (1967) Lymphocyte fine structure in the bursa of Fabricius, the thymus, and germinal centers. Lab. Invest. 16, 407-421
- Cohen J.J. (1991) Programmed cell death in the immune system. Adv. Immunol., 50, 55-85
- Compton M.M.,P.S. Gibbs and L.R. Jhonson (1990) Glucocorticoid activation of deoxyribonucleic acid degradation in bursal lymphocytes. Poult. Sci., 69 , 1292-1298
- Davison T.F.,J.G.Rowell and J.Rea(1983a) Effects of dietary corticosterone on peripheral blood lymphocyte and granulocyte populations in immature domestic fowl. Res. Vet. Sci., 34, 236-239
- Davison T.F.,J.G.Rowell and J.Rea(1983b) Effects of dietary corticosterone on the growth and metabolism of immature *Gallus domesticus*. Gen. Comp. Endocr., 50, 463-468
- Delic J, M. Morange and H. Magdelenat (1993) Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte γ -irradiation-induced apoptosis. Mol. Cel. Biol., 13 , 4875-4883
- Dieter M.P. and R.P.Breitenbach(1970) A comparison of the lmypholitic effects of corticosterone and testosterone propionate in immature cockerels. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133, 357-364
- Eguchi Y., D.L. Ewert and Y. Tsujimoto (1992) Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene : expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal organs in adult and embryo. Nuc. Acid Res., 20, 4187-4192

- Ekino S. (1993) Role of environmental antigens in B cell proliferation in the bursa of Fabricius at neonatal stage. *Eur. J. Immunol.*, 23:772-775
- 浴野成生(1994) 情報収集をする鶏の免疫機構, ふおーなす, 14, 1-6
- Ellis R.E., J. Yuan and H.R. Horvitz (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7, 663-698
- Evan G.L., A.H. Wyllie, C.S. Gilbert, T.D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C.M. Waters, L.Z. Pen and D.C. Hancock (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69, 119-128
- Finley D., B. Bartel and A. Varshavsky (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, 338, 394-401
- Finley D and V. Chau (1991) Ubiquitination. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 17, 25-69
- Freeman B.M. (1971) Stress and the domestic fowl : a physiological Appraisal. *Wor. Poult. Sci. J.*, 27, 263-275
- Frazier J.A. (1974) The ultrastructure of the lymphoid follicles of the chick bursa of Fabricius. *Acta. Anat.*, 88, 385-397
- Gavilanes JG, G. Gonzalez-de-Buitrago, R. Perez-Castells and R. Rodriguez (1982) Isolation, characterization and amino acid sequence of a ubiquitin-like protein from insect eggs. *J. Biol. Chem.*, 257 10267-10270
- Glick B. (1956) The bursa of Fabricius and antibody production in the domestic fowl. *Poult. Sci.*, 35, 224-226
- Glick B. (1960) The effects of bovine growth hormone, deoxycorticosterone, and cortisone on the weight of the bursa of Fabricius, adrenal glands, heart, and body weight of young chickens. *Poult. Sci.*, 39, 1527-1533
- Glick B. (1964) The Thymus in Immunobiology. 343-358, Hoeber Med. Div. Harper and Row, N.Y.
- Glick B. (1967) Antibody and gland studies in cortisone and ACTH-injected birds. *J. Immunol.*, 98, 1076-1084
- Glick B. (1984) Interrelation of the avian immune and neuroendocrine systems. *J. Exp. Zool.*, 232, 671-682
- Goldstein G.M., M. Shield, U. Hammerling, E.A. Byose, D.H. Schlesinger and H.D. Naill (1975) Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 11-15
- Gross W.B., P.B. Siegel and R.T. Dubose (1980) Some effects of feeding corticosterone to chickens. *Poult. Sci.*, 59, 516-522

- Gross W.B. and H.S.Siegel(1983) Evaluation of the heterophil / lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Disease*,27,9792-979
- Hengartner M.O.,R.E.Ellis and H.R.Horvitz(1992) *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature*,356,494-499
- Hershko A.(1988) Ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Biol. Chem.*, 263, 15237-15240
- Hockenbery D.M.,G.Nunez,C.Milliman,R.D.Shreiber and S.J.Korsmeyer(1990) *Bcl-2* is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348,3 34-336
- 一井昭五(1980) 糖質コルチコイドの生理作用とレセプター機構. *医学のあゆみ*, 115,594-598
- 今井利夫, 口野嘉幸, 平井久丸, 桜林郁之介(1987) Westernブロット法に用いる試薬とその調整, 「実験操作ブロット法」, 221-226, ソトサイエンス社, 東京
- Itoh N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto and S.Nagata (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen *Fas* can mediate apoptosis. *Cell*, 66, 233-243
- Kerr J.F., A.H.Wyllie and A.R.Currie(1972) Apoptosis:a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Brit.J.Cancer*,26,239-257
- 小池達郎(1992) プログラム細胞死(神経細胞を中心に). *化学と生物*, 30, 380-384
- 小林信之, 中西義信(1993) HIV感染細胞におけるアポトーシス. *実験医学*,11,2329-2335
- 小林忠義(1968) 「胸腺」中枢性リンパ組織, ファブリシウス囊. , 医学書院, 58-65
- 小原雄治(1995) 線虫 *C. elegans* の細胞死の遺伝カスケード. アポトーシスの分子医学(羊土社) 26-36
- 近藤康博, 田辺 昭, 佐藤孝二(1986) ファブリシウス囊と胸腺リンパ球構成に対するシクロホスファミドと酢酸コルチゾンの効果—標識抗原と s I g による解析—. *家禽会誌*, 23, 227-234
- 口野嘉幸(1993) *myc* 遺伝子の発現とアポトーシス. *実験医学*,11,2364-2368
- Lauzon R.J., C.W.Patton and I.L.Wissman(1993) A morphological and immunohistochemical study of programmed cell death in *Botryllus schlosseri* (Tunicata, Ascidiacea). *Cell Tissue Res.*, 272, 115-127
- Lowe J.,Blanchard A.,Morrell K.,Lennox G.,Reynolds L.,Billett M.,Landon M., Mayer R.J.(1988) Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man,including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle and Mallory bodies in alcoholic liver disease. *Journal of Pathology*, 155, 9-15

- Lowe S., E.M. Schmitt, S.W. Smith, B.A. Osborne and T. Jacks (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, 362, 847-849
- 松田治男 (1990) ニワトリの免疫機構. 体液性免疫系における研究の進歩. *獣医学*, 117-132
- Meyaad L., S.A. Otto, R.R. Jonker, M.J. Mijster, R.P. Keet and F. Miedema (1992) Programmed cell death of T cell in HIV-1 infection. *Science*, 257, 217-219
- Mori H., J. Kondo and Y. Ihara (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*, 235, 1641-1644
- Motyka B. and J.D. Reynolds (1991) Apoptosis is associated with the extensive B cell death in the sheep ileal Peyer's patch and the chicken bursa of Fabricius : a possible role in B cell selection. *Eur. J. Immunol.*, 21, 1951-1958
- Nakamura T. and Y. Tanabe (1973) *In vitro* corticosteroidogenesis by the adrenal gland of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 21, 99-107
- Naukkarinen A. and T.E. Sorvari (1982) Morphological and histochemical characterization of the medullary cells in the bursal follicles of the chicken. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Acad Sect. C.*, 90, 193-199
- Neiman P.E., S.J. Thomas and G. Loring (1991) Induction of apoptosis during normal and neoplastic B-cell development in the bursa of Fabricius. *Proc. Natr. Acad. Sci. USA*, 88, 5857-5861
- Newcomer W.S. and J.D. Connally (1960) The bursa of Fabricius as an indicator of chronic stress in immature chickens. *Endocrinology*, 67, 264-266
- Negrini M., E. Silini, C. Kozak, Y. Tsujimoto and C.M. Croce (1987) Molecular analysis of mbcl-2: Structure and expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell*, 49, 455-463
- Nunez G. and M. Clarke (1994) The Bcl-2 family of proteins: regulator of cell death and survival. *Trends in Cell Biology*, 4, 399-403
- 大山ハルミ (1989) プログラム細胞死の分子機構. *細胞*, 21, 125-128
- Ogasawara J., R.W. Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda and S. Nagata (1993) Lethal effects of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364, 806-809
- Pan H. and Griep A.E. (1994) Altered cell cycle regulation in the lens of HPV-16 E6 or E7 transgenic mice. : Implications for tumor suppressor gene function in development. *Genes. Dev.*, 8, 1285-1299
- Phillips M.E. and J.E. Platt (1994) The use of ubiquitin as a marker of thyroxine-induced apoptosis in cultured *Rana catesbeiana* tail tips. *Gen. Comp. Endocr.*, 95, 409-415

- Rechsteiner M.(1991) Natural substrates on the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell*, 66, 615-618
- 佐藤孝二(1971) ファブリシウス嚢をめぐる諸問題. *日畜会報*, 42,153-161
- Sandor T., J. Lamoureux and A. Lanthier.(1963) Adrenocortical function in birds : in vitro biosynthesis of radioactive corticosteroid from pregnenolone-7-H³ and progesterone-4-C¹⁴ by adrenal glands of the domestic duck(*Anas platyrhynchos*) and the chicken(*Gallus domesticus*). *Endocrinology*, 73, 629-636
- Sellins K.S. and J.J.Cohen(1987) Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.*, 139, 3199-3206
- Siegel P.B.,W.B.Gross and E.A.Dunnington(1989) Effects of dietary corticosterone in young leghorn and meat-type cockerels. *Br.Poult.Sci.*,30,185-192
- Shiokawa D., H. Ohyama, T. Yamada, T. Takahashi and S. Tanuma(1994) Identification of an endonuclease responsible for apoptosis in rat thymocytes. *Eur. J. Biochem.*, 266, 18580-18585
- 杉村 誠(1979) 家禽リンパ組織の形態と機能. *日本獣医学会誌*, 32, 186-193
- Smith C.A., G. T. Williams, R. Kingston, E. J. Jenkinson and J. J. T. Owen (1989) Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, 337, 181-184
- 高木知道(1970) ファブリシウス嚢. その発生生物学的問題点. *動物学雑誌*,79,191-198
- 高島明彦, 小池達郎(1993) 発生における神経細胞の神経細胞死とその機構. *実験医学*, 11, 43-48
- 多田隈卓史, 木崎治俊(1993) T細胞レパトリーの形成とアポトーシス. *実験医学*, 11, 2287-2292
- 田中敬一(1995) 「医学・生物学領域の捜査電子顕微鏡技術」, 63-80, 講談社サイエンティフィック, 東京
- 田中啓二, 田村具博(1993) 蛋白質分解システム. *蛋白質 核酸 酵素*,38,1075-1088
- 田沼靖一(1994) 「アポトーシス」, 15-18, 東京大学出版会, 東京
- Thompson H.J., R.Strange and P.J.Schedin (1992) Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, 1, 597-602
- Tone S.,S.Tanaka,Y.Minatogawa and R.Kido(1994) DNA fragmentation during the programmed cell death in the chick limb buds. *Exp.Cell.Res.*,215,234-236
- 辻本賀英(1993) bcl-2 によるアポトーシスの回避. *実験医学*, 11, 2360-2363
- 鏑田武志(1993) Bリンパ球の選択とアポトーシス. *実験医学*, 11, 2281-2286
- Vaux D.L.,S.Cory and J.M.Adams(1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cell. *Nature*,335,440-442

- Voris B.P. and D.A. Young (1981) Glucocorticoid-induced proteins in rat thymus cells. *J. Biol. Chem.*, 256, 11319-11329
- Williams G.T.(1991) Programmed cell death : Apoptosis and Oncogenesis. *Cell*,65,1097-1098
- Wijsman J.H.,R.R.Jonker,R.Keijzer,C.J.H.van DE Velde,C.J.Cornelisse and J.H.van Dierendonck(1993)A new method to detect apoptosis in paraffin section ;in situ end-labeling of fragmented DNA.*J. Histochem. Cytochem.*, 41:7-12
- Wu X. and Levine A.J.(1994) p53 and E2F1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl.*
- Wyllie A.H.(1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284:555-556
- Wyllie A.H., R.G. Morris, A.L. Smith and D. Dunlop (1984) Chromatin cleavage in apoptosis : association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Path.*, 142 , 67-77
- 山田純三, 杉村誠と工藤規雄(1973) ニワトリのファブリシウス囊の重量および組織学的生後変化. 帯広畜産大学報., 8,21-44
- Yamada T. and H.Ohyama(1981) Disappearance of microvilli accompanying radiation-induced interphase death of rat thymocytes. *Scanning Electron Microscopy.*, 4, 55-60
- Yamada T. and H.Ohyama(1988) Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed(apoptosis). *Int.J.Radiat.Biol.*,53,65-75
- Yonish-Rouach E., D.Resnitzky,J.Lotem,L.Sachs,A.Kimchi and M.Oren(1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6.*Nature*,352,345-347
- 吉里勝利(1993) 両生類の変態におけるアポトーシスのメカニズム. 実験医学,11,30-35

Contribution of Ubiquitin to Glucocorticoid-Induced Apoptosis in the Bursa of Fabricius

Seiji KAMIYA, Osamu DOI¹⁾, Fumio NAKAMASU²⁾,
Teruya AKAYAMA²⁾ and Takao NAKAMURA¹⁾

The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University,
Gifu-shi 501-11

¹⁾ Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu-shi 501-11

²⁾ JA Zen-Noh Central Research Institute for Feed and Livestock,
Tsukuba-shi 300-33

(Received April 5, 1996)

Abstract The contributions of ubiquitin, which has a regulatory role in the degradation of essential or abnormal intracellular proteins, to glucocorticoid (GL)-induced apoptosis in lymphocytes in the bursa of Fabricius in the chicken were studied. A single injection of five-week-old chickens with dexamethasone resulted in significant decreases ($p < 0.01$) in the levels of bursal ubiquitin 24 and 48 h later. In a second experiment, in which ubiquitin levels were monitored over the first 24 h after injection, ubiquitin showed a significant increase ($p < 0.05$) 2 h after injection and thereafter decreased with time. The level of bursal ubiquitin at 24 h was significantly lower ($p < 0.05$) than the initial level. It is suggested that 1) the transient increase in the levels of ubiquitin might be involved in DNA fragmentation, which may be one of the key events in the early phase of GL-induced apoptosis in bursal lymphocytes, and 2) the subsequent decrease in bursal ubiquitin might be reflected in the decline of lymphocyte viability in the bursa of Fabricius.

Anim. Sci. Technol. (Jpn.) 68 (1) : 13-17, 1997

Key words : Glucocorticoid, Dexamethasone, Apoptosis, Bursa of Fabricius ubiquitin

Administration of glucocorticoid (GL) to chickens causes a rapid involution of lymphoid tissues such as the thymus and bursa of Fabricius^{2,3,5)}. These lymphoinvolutions are accompanied by lymphocyte cell death^{2,3,9)}. It has been reported that apoptosis is an important determinant in such GL-induced involution of lymphoid tissues in the rat¹⁴⁾. We reported that the DNA isolated from bursal lymphocytes of birds administered with GL generated a ladder structure of oligonucleosomal DNA (DNA ladder) by analysis of agarose gel electrophoresis⁸⁾ and an increase in apoptotic cells was found immunohisto-

chemically in the bursal tissues obtained from birds administered with GL⁹⁾. These findings indicate that the extensive apoptosis that is responsible for involution of the bursa of Fabricius is induced by GL.

Several proteins are newly synthesized and increase in the expression of apoptosis¹⁰⁾. Ubiquitin is a highly conserved 8.6-kD protein in eukaryotic cells, with complete amino acid homology between insects and humans⁶⁾. This protein is associated with the events of apoptosis^{4,10-12)} and appears to attach to several essential and abnormal intracellular proteins and to mark them for proteolysis by non-

lysosomal protein degradation pathways during apoptosis^{1,7}.

In domestic fowls, little is known about the mechanism of apoptosis that is responsible for the involution induced by GL in lymphoid tissues. In order to better understand the contribution of ubiquitin in GL-induced apoptosis, we investigated the time course of changes in ubiquitin in lymphocytes in the bursa of Fabricius in the chicken after administration of dexamethasone.

Materials and Methods

Two experiments were undertaken in this research. In experiment 1, to evaluate the effects of exogenously-administered GL or a vehicle on ubiquitin levels in the bursa of Fabricius in the chicken, 5-week-old chickens were randomly assigned to three groups. One group was injected subcutaneously with 1 mg per 100 g body weight of dexamethasone (Dex) suspended in corn oil, one group was injected with a vehicle control (Vehicle) and the third group was not injected (Control). Ten birds from each experimental group were sacrificed by decapitation 24 and 48 hours later. Bursal tissues were removed and immediately preserved at -80°C until analysis.

In experiment 2, to examine the time course of the effects of GL on ubiquitin levels in the bursa, 6-week-old chickens were administered with dexamethasone as described above. Five birds were killed 1, 2, 4, 6, 12 and 24 hours later. Bursal tissues were removed and preserved as described above.

The bursal tissue was homogenized in phosphate buffer using a Potter-type Teflon homogenizer. The homogenate obtained was centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatant was removed and used for analysis. The protein content in the specimens was determined by Lowry's method. The content of ubiquitin was determined by the fluorescence-immunoassay method of Phillips and Platt¹². The anti-ubiquitin anti-

body used was obtained from Sigma Chemical Co. (U.S.A.) Fluorescence was measured at $\text{Ex} = 460 \text{ nm}$ and $\text{Em} = 515 \text{ nm}$. The ubiquitin content of each test specimen was expressed in terms of the protein equivalent.

Statistical significance was determined using Duncan's new multiple range test and Student's *t*-test.

Results

Table 1 shows the weight of the bursa of Fabricius as percentage of body weight in the three treatment groups (dexamethasone (Dex), Vehicle, Control). The mean bursa weight of the Dex group was significantly ($p < 0.05$) smaller than those of the Vehicle and Control groups at both 24 and 48 h after treatment. The mean level of bursal ubiquitin in the Dex group was significantly ($p < 0.01$) lower than those in the Vehicle and Control groups at 24 and 48 h (Fig. 1). There were no significant differences between the levels of bursal ubiquitin in the Vehicle and Control groups. Within the Dex groups, the level of bursal ubiquitin at 48 h after injection was significantly ($p < 0.05$) lower than that at 24 h post-treatment.

The time course change in the effect of dexamethasone on the levels of bursal ubiquitin is shown in Fig. 2. The levels of bursal ubiquitin initially rose and reached a

Table 1. Effect of dexamethasone (Dex) administration on the weight of the bursa of Fabricius

	%	
	24 h after treatment	48 h after treatment
Dex	0.33 ± 0.03^a	0.16 ± 0.02^a
Vehicle	0.82 ± 0.06^b	0.63 ± 0.07^b
Control	0.69 ± 0.03^b	0.84 ± 0.15^b

All data was expressed as percentage of body weight.

Mean \pm S.E.M. of 10 birds.

^{a,b}; Within each column, different letters indicate significant differences by Duncan's new multiple range test ($p < 0.05$).

Contribution of Ubiquitin to Bursal Apoptosis

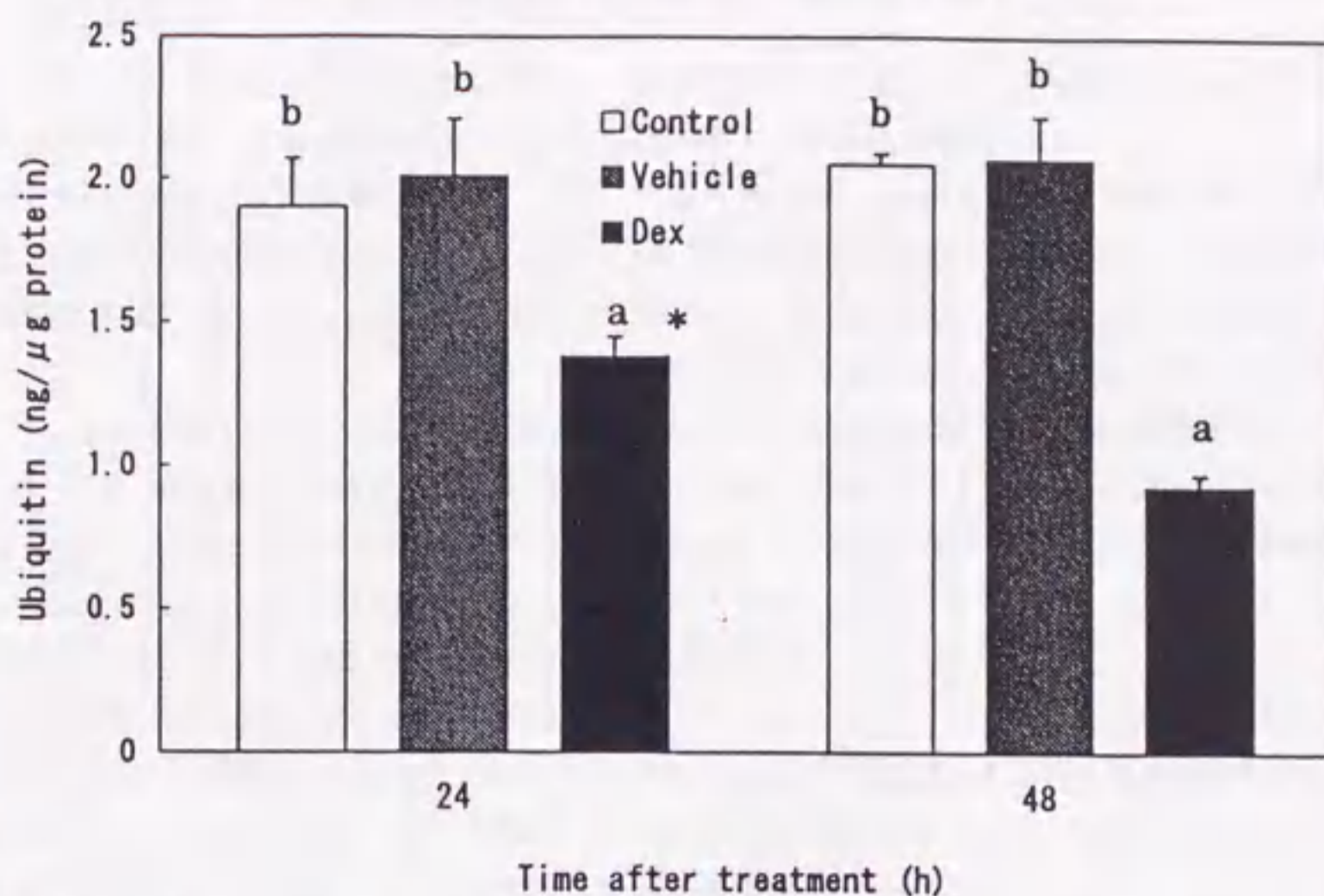


Fig. 1. Ubiquitin contents of the bursa of Fabricius in chickens in the dexamethasone (Dex), Vehicle and Control groups. Each column and vertical line represent a mean of 10 birds and S.E.M, respectively. Means with different letters are significantly different ($p < 0.01$). Asterisk shows significant differences within each group between 24 and 48 h after treatment by Student's t-test ($p < 0.05$).

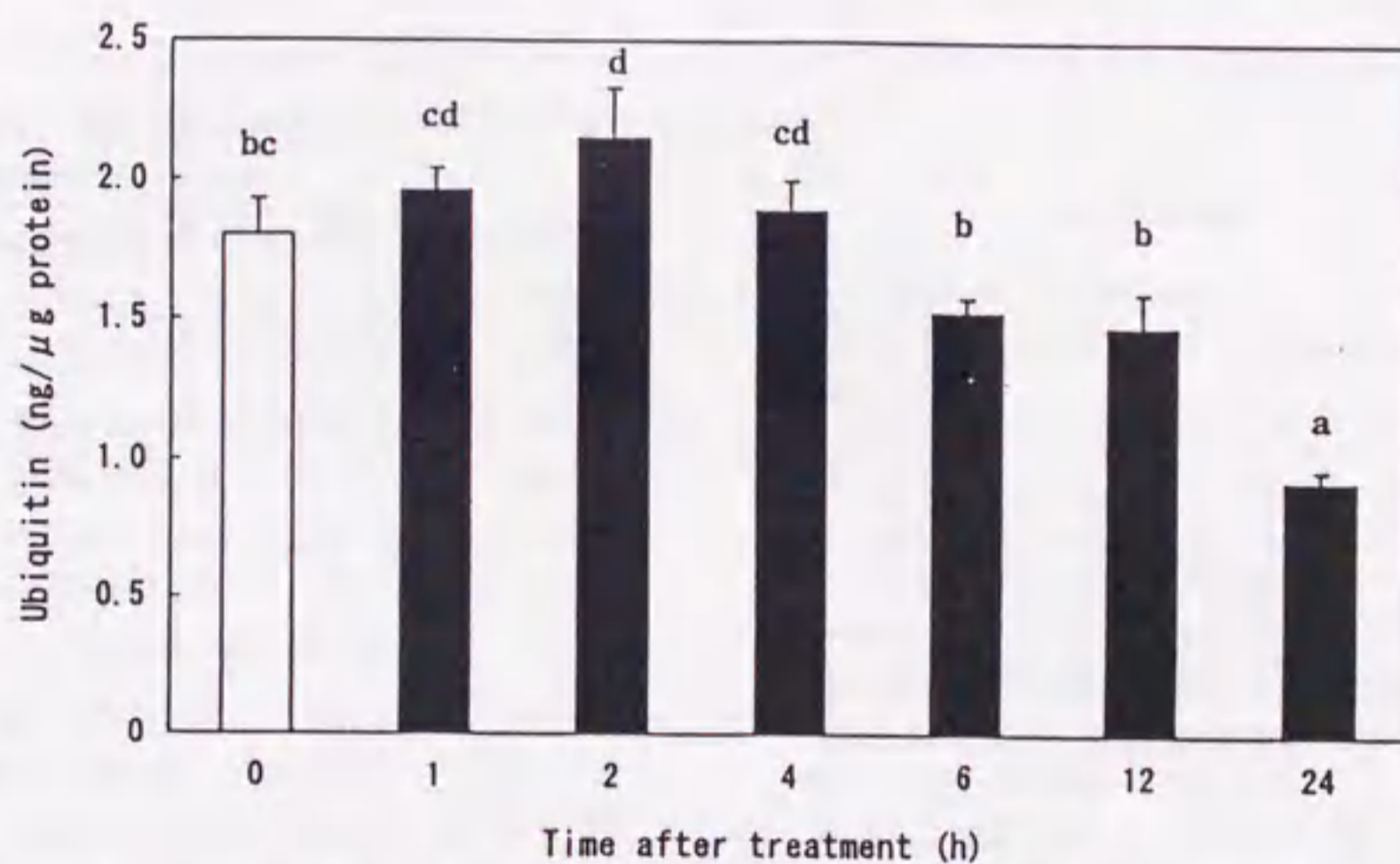


Fig. 2. Ubiquitin contents of the bursa in chickens before and after treatment with dexamethasone. Each column and vertical line represent a mean of 4 to 5 birds and S.E.M, respectively. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

maximum 2 h after treatment and thereafter declined. The value at 2 h was significantly higher than the initial level, and the value at 24 h was significantly lower than the initial level ($p < 0.05$ for both).

Discussion

A single injection of the GL caused a rapid involution of bursal tissues as shown in Table 1. This lymphoinvolution is known to be ac-

accompanied by specific cell death, based on the chromatin condensation and the reduction in cell size, and the extensive degradation of nucleosomal DNA, and therefore this form of GL-induced lymphocytolysis is caused by apoptosis^{2,8,9}.

Dexamethasone caused a clear decrease in bursal ubiquitin at 24 h after injection and a further decline at 48 h. None of these effects was found in the Vehicle and Control groups. Delic *et al.*⁴ demonstrated that the ubiquitin mRNA level in cultured human lymphocytes increased during the early phase of apoptosis induced by low-level γ -irradiation. In addition, Phillips and Platt¹² reported an increase in the ubiquitin content in cultured tadpole tails during apoptosis induced by thyroxine. Because the results shown in Fig. 1 were not consistent with these findings, we investigated the time course of the effect of GL on bursal ubiquitin levels. As shown in Fig. 2, the bursal ubiquitin levels increased transiently in a few hours after dexamethasone administration and thereafter decreased.

Delic *et al.*⁴ suggested that the increase in the ubiquitin mRNA level and the high ubiquitination of nuclear proteins during the early phase of apoptosis is involved in DNA fragmentation, which is one of the key events of apoptosis. In our previous study, DNA ladders were detected in the bursa in the chicken within 2 h after treatment with GL⁸. This finding was confirmed by Compton *et al.*². Therefore the transient increase in bursal ubiquitin found in the present study might be involved in DNA fragmentation and thus apoptosis. Phillips and Platt¹² reported approximately 2 to 7-fold increases in the levels of ubiquitin in cultured tadpole tail tips during apoptosis. However, such large increases in ubiquitin were not found in this study. Because apoptosis may occur more frequently in bursal tissue than in tadpole tails, the smaller change in ubiquitin levels during apoptosis in the bursa than in tadpole tails might be due to

differences in the way apoptosis occurs in these different cells.

Ubiquitin makes an important contribution to the rapid breakdown of intracellular short-lived normal proteins and abnormal proteins by non-lysosomal proteolytic pathways for maintaining to the homeostasis in live cell^{1,7}. The decrease in levels of bursal ubiquitin observed in this study might be reflected in the decline of lymphocyte viability in the bursa of Fabricius.

We conclude that ubiquitin makes an important contribution to the expression of GL-induced apoptosis in bursal lymphocytes in the chicken.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. J.A. RAYMOND for advice in preparing this manuscript. This study was supported by a grant-in-aid (No. 05660325) for scientific research from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan.

References

- 1) Bachmair A, Varshavsky A. The degradation signal in a short-lived protein. *Cell*, 56 : 1019-1032. 1989.
- 2) Compton MM, Gibbs PS, Jhonson LR. Glucocorticoid activation of deoxy-ribonucleic acid degradation in bursal lymphocytes. *Poult. Sci.*, 69 : 1292-1298. 1990.
- 3) Compton MM, Jhonson LR, Gibbs PS. Activation of thymocyte deoxyribonucleic acid degradation by endogenous glucocorticoids. *Poult. Sci.*, 70 : 521-529. 1991.
- 4) Delic J, Morange M, Magdelenat H. Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte γ -irradiation-induced apoptosis. *Mol. Cel. Biol.*, 13 : 4875-4883. 1993.
- 5) Dieter MP, Breitenbach RP. A comparison of the lympholytic effects of corticosterone and testosterone propionate in immature cockerels. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133 : 357-364. 1970.
- 6) Gavilanes JG, Gonzalez-de-Buitrago G, Perez-Castells R, Rodriguez R. Isolation, characterization and amino acid sequence of a ubiquitin

- like protein from insect eggs. *J. Biol. Chem.*, 257 : 10267-10270, 1982.
- 7) Hershko A. Ubiquitin-mediated protein degradation *J. Biol. Chem.*, 263 : 15237-15240, 1988.
- 8) Hidaka H, Nakamori C, Kamiya S, Iwasawa A, Doi O, Nakamura T. Apoptosis of bursal lymphocytes induced by steroid hormones. *Proc. Jap. Soc. Comp. Endocrinol.*, 9 : 35, 1994.
- 9) Kamiya S, Ono M, Doi O, Nakamura T. Immunohistochemical study on apoptosis induced by glucocorticoid in the chicken bursa of Fabricius. *Jpn. Poult. Sci.*, 33 : 366-370, 1996.
- 10) Lauzon RJ, Patton CW, Wissman IL. A morphological and immuno-histochemical study of programmed cell death in *Botryllus schlosseri* (Tunicata, Ascidiacea). *Cell Tissue Res.*, 272 : 115-127, 1993.
- 11) Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ. Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease as well as Rosenthal fibers in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle and Mallory bodies in alcoholic liver disease. *J. Pathol.*, 155 : 9-15, 1988.
- 12) Phillips ME, Platt JE. The use of ubiquitin as a marker of thyroxine-induced apoptosis in cultured *Rana catesbeiana* tail tips. *Gen. Comp. Endocr.*, 95 : 409-415, 1994.
- 13) Sellins KS, Cohen JJ. Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.*, 139 : 3199-3206, 1987.
- 14) Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284 : 555-556, 1980.

ファブリシウス嚢におけるグルココルチコイド誘導性の アポトーシスに対するユビキチンの関与

神谷誠治・土井 守¹⁾・仲舛文男²⁾・赤山照也²⁾・中村孝雄¹⁾

岐阜大学連合農学研究科, 岐阜市 501-11

¹⁾ 岐阜大学農学部, 岐阜市 501-11

²⁾ JA 全農 飼料畜産中央研究所, つくば市 300-33

グルココルチコイド (GL) を投与したニワトリヒナのファブリシウス嚢 (F嚢) におけるユビキチン含量を調べ, F嚢リンパ細胞における GL 誘導性のアポトーシスに対するユビキチンの関与について検討した. デキサメタゾン (Dex) 投与 24 時間ならびに 48 時間後の F嚢のユビキチン含量を調べた結果, Dex 投与区の値は, 非投与区またはベークル投与区より少なく, その差は統計的に有意 ($p < 0.01$) であった. また, 非投与区とベークル投与区との間にはほとんど差はなかった. さらに, Dex 投与前および投与後 1, 2, 4, 6, 12, 24 時間目に採取した F嚢のユビキチン量を調べた結果, 投与 1, 2 時間目ではユビキチン量は増加し, 2 時間目は投与前よりも有意に ($p < 0.05$) 多い値であった. その後は経時的に減少し, 投与 24 時間目の値は投与前の値より有意に ($p < 0.05$) 少なかった. GL 投与 1, 2 時間目のユビキチン量の一時的な増加は, アポトーシスの発現過程における核 DNA の断片化に関与していると考えられた. また, その後の F嚢のユビキチン量の減少は, リンパ細胞の生存率の低下を反映したものであると思われる.

日畜会報, 68 (1) : 13-17, 1997

ニワトリヒナのファブリシウス嚢におけるグルココルチコイド
誘導性のアポトーシスに関する免疫組織化学的検討

神谷誠治, 小野雅章, 土井 守, 中村孝雄

**Immunohistochemical Study on Apoptosis Induced
by Glucocorticoid in the Chicken
Bursa of Fabricius**

Seiji KAMIYA, Masaaki ONO, Osamu DOI and Takao NAKAMURA

日本家禽学会誌 第33巻 第6号 1996年11月

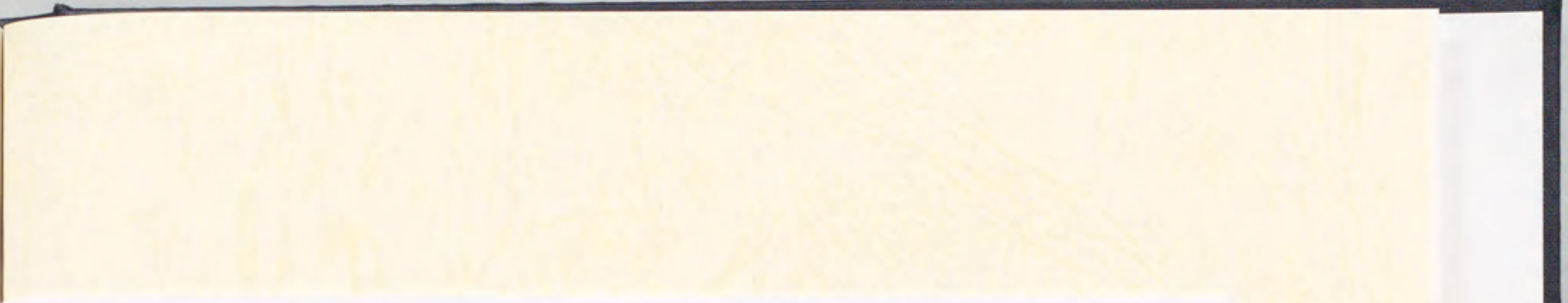
366頁~370頁

Reprinted from

JAPANESE POULTRY SCIENCE

Vol. 33, No. 6, November, 1996

pp. 366~370



[The text in this section is extremely faint and illegible due to the quality of the scan. It appears to be a dense block of text, possibly a list or a series of entries.]



ニワトリヒナのファブリシウス嚢におけるグルココルチコイド誘導性のアポトーシスに関する免疫組織化学的検討

神谷誠治¹⁾、小野雅章²⁾、土井 守³⁾、中村孝雄³⁾

¹⁾岐阜大学連合農学研究科、岐阜市柳戸1-1

²⁾JA 全農家畜衛生研究所佐倉市大蛇町7

³⁾岐阜大学農学部、岐阜市柳戸1-1

ニワトリヒナにグルココルチコイド (GL) としてデキサメタゾン (Dex) を投与し、ファブリシウス嚢 (F 嚢) の形態変化について組織学的に検索した。また、免疫組織化学的手法によりアポトーシス発現細胞を検出することにより、F 嚢リンパ細胞における GL 誘導性のアポトーシスの発現について検討した。

その結果、Dex の投与により F 嚢は萎縮するとともに、リンパ濾胞は退行性変化を示し、濾胞内のリンパ細胞は死滅して減数した。また、リンパ細胞はリンパ濾胞内の皮質部よりも髄質部で顕著に減少し、アポトーシスに特有な細胞の萎縮や核の凝縮が多数観察された。さらに免疫組織化学的検索では、Dex の投与によりリンパ濾胞の髄質部を中心にアポトーシスの発現を示す陽性細胞が経時的に増加するとともに、核周囲部に C の字状の強い染色性を示す細胞が多数観察された。

以上のことから、GL 投与による F 嚢の萎縮にはアポトーシスによるリンパ細胞の死滅機構が関与していることが明らかとなった。また、リンパ濾胞髄質部の未成熟なリンパ細胞は皮質部の成熟リンパ細胞と比較し GL に対する感受性が高く、GL 誘導性のアポトーシスの発現がより顕著であることが推察された。

(家禽会誌, 33: 366-370, 1996)

キーワード: ファブリシウス嚢, リンパ細胞, デキサメタゾン, アポトーシス, グルココルチコイド

緒 言

ニワトリヒナにグルココルチコイド (GL) を投与すると、胸腺や脾臓と同時に、鳥類の体液性免疫の構築に重要な役割を果たす F 嚢が萎縮することが示されている (DIETER and BREITENBACH, 1970; GROSS *et al.*, 1980)。哺乳類であるラットでは、このような GL の作用によるリンパ器官の萎縮には、アポトーシスという細胞死滅機構が関与し、その特有の形態変化として、細胞核内のクロマチンが凝縮すると同時に細胞自体が縮小することなどが示されている (WYLLIE *et al.*, 1980)。一方、鳥類では GL の投与による F 嚢の萎縮過程を組織学的に検索した例は少なく (GLICK, 1967)、さらに GL 誘導性の F 嚢の萎縮に対するアポトーシスの関与について組織学的に検討した研究報告はほとんどない。

アポトーシスは生物の発生過程における形態形成や神経細胞のネットワークの構築、あるいは免疫細胞の分化や成熟化など様々な生命現象に関与している (井川と橋本, 1993)。また、アポトーシスの発現過程では細胞内の

1996年2月14日受付

核 DNA が約 180 塩基対を単位としたオリゴヌクレオソームに断片化される (WYLLIE *et al.*, 1980)。従って、アポトーシスの発現細胞には比較的多くの DNA 断片が局在することから、このことを利用し組織切片上においてアポトーシスの発現を免疫酵素化学的に検出する方法が開発されてきた (WJISMAN *et al.*, 1993)。すなわち、ターミナルデオキシヌクレオチド転移酵素によりアポトーシス発現細胞に局在する DNA 断片群の 3'-OH 末端にジゴキシゲニン化ヌクレオチドを導入し、酵素標識抗ジゴキシゲニン抗体を介して特異的に DNA 断片群を染色し、アポトーシスの発現部位を検出する方法である。

そこで本研究では、GL の投与により引き起こされるニワトリヒナの F 嚢の萎縮形態を組織学的に調べるとともに、前述した免疫組織化学的手法を用いて、GL 誘導性の F 嚢の萎縮に対するアポトーシスの関与とその発現部位や形態的特徴などについて検討した。

材料および方法

雄ニワトリ初生ヒナを、30 日齢まで電熱式バッテリーケージにて飼育した。点灯管理は、餌付け日のみ 24 時間

点灯とし、以降実験の終了時まで 12L:12D とした。また、飼料ならびに水は自由に摂取させた。30 日齢にて個体重量を各々測定し、1羽約 400 g (395~405 g) のヒナを 45 羽供試した。

オリーブ油に懸濁した Dex を、体重 100 g 当り 1 mg となるようにヒナの頸部皮下に注射した (Dex 区)。また、Dex 区とほぼ同容量のオリーブ油を注射したキャリアー区と何物も投与しない非投与区を設定した。Dex あるいはオリーブ油を投与後 1, 2, 4, 24, 48 時間目に、各実験区から 3 羽ずつのヒナをランダムに選び出し、断頭屠殺後に F 囊を摘出し、湿重量を測定した後、直ちに 10% 中性ホルマリン緩衝液により固定した。

ホルマリン固定後は、常法によりパラフィン包埋後 2 μ m に薄切し、組織切片を 0.1% ボリー-L-リジンをコーティングしたスライドガラスに添付した。脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) し、透徹・封入後、光学顕微鏡下で観察した。

免疫組織化学的手法によりアポトーシスの発現細胞を検出するために、脱パラフィン後 2% 過酸化水素水中にて内因性ペルオキシダーゼを処理し、ターミナルデオキシヌクレオチド転移酵素 (TdT 酵素) によりジゴキシゲニンの付加反応を行い、次にペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を反応させた (オンコア社製アポブ・タグキット)。その後、0.05% DAB により発色反応を行ない、メチルグリーンで後染色し透徹・封入後、光学顕微鏡下で観察した。

結 果

各実験区の F 囊重量を表 1 に示した。Dex 区では経時的に F 囊重量が減少し、投与後 48 時間では半分以下となった。一方、非投与区とキャリアー区との間の F 囊

重量には差がなかった。しかし、発育に伴い F 囊重量は増加傾向を示した。

組織学的な検索結果においては、Dex 区の F 囊は、投与後 1 時間および 2 時間ではリンパ濾胞髄質部および皮質部は多数のリンパ細胞で満たされており、対照区ならびにキャリアー区と比較して顕著な形態変化は認められなかった。しかし、投与後 4 時間以降から Dex 区の F 囊は、退行性変化を示しはじめ、上皮細胞層の褶曲が認められた。また、リンパ濾胞の髄質部からリンパ細胞数が減少しはじめるとともに、細胞の縮小や核の凝縮を呈したリンパ細胞が増加した。Dex 投与後 24 時間および 48 時間においては上皮細胞層の褶曲が進行し、これにより上皮細胞層が肥厚した。また、細胞の縮小や核の凝縮を呈したリンパ細胞が著しく増加し、リンパ濾胞髄質部ではさらにリンパ細胞が減少し、空胞様の構造である囊胞が観察された (図 1)。リンパ濾胞髄質部に続き、皮質部においても経時的にリンパ細胞が減少していった。

免疫組織化学的手法によりアポトーシスの発現を検索した結果、Dex 区では投与後 2 時間より陽性反応を示すリンパ細胞がリンパ濾胞の髄質部において徐々に増加し、投与後 24 時間あるいは 48 時間ではリンパ濾胞髄質部や囊胞内部に散在するリンパ細胞に陽性反応が多く検出された (図 2)。また、これらのリンパ細胞の核周囲部では C の字状の強い染色性が多数観察された (図 3)。一方、非投与区またはキャリアー区の F 囊におけるリンパ濾胞においても、陽性反応を示すリンパ細胞が少数認められた (図 4)。

考 察

従来、細胞死といえばネクローシスを思い浮かべることが多かったが、最近になって、新しい概念としてアポ

表 1. 各実験区におけるヒナのファブリシウス囊の湿重量

Table 1. Wet weight of bursa of Fabricius from the chick in each experimental group

	(n)	非投与区 non-treated group	キャリアー区 carrier group	Dex 区 dexamethasone group
1 hours ¹⁾	3	2.10 \pm 0.10 a ²⁾	2.10 \pm 0.23 a	2.07 \pm 0.26 a
2 hours	3	2.00 \pm 0.06 a	2.00 \pm 0.32 a	2.10 \pm 0.12 a
4 hours	3	2.20 \pm 0.06 a	2.03 \pm 0.13 a	1.97 \pm 0.15 a
24 hours	3	2.30 \pm 0.20 a	2.37 \pm 0.24 a	1.43 \pm 0.07 b
48 hours	3	2.40 \pm 0.15 a	2.33 \pm 0.20 a	0.63 \pm 0.03 c

¹⁾ 投与後の経過時間

¹⁾ Time after treatment

²⁾ 同一実験区内の異符号間にダンカンの多重検定により有意差あり (P < 0.05).

²⁾ Means (\pm S.E.) with different letters in the same group are significantly different by Duncan's new multiple range test (P < 0.05).

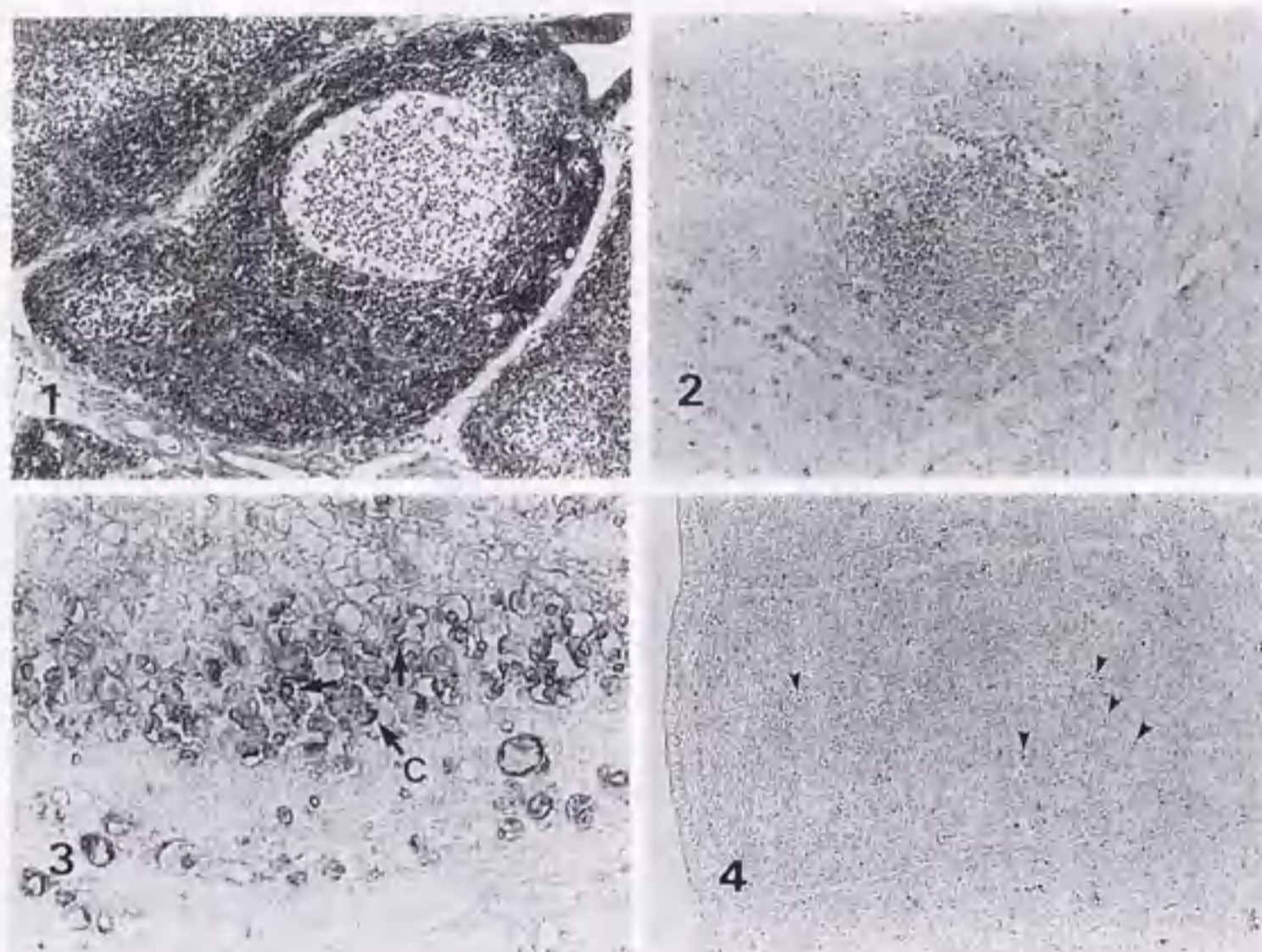


図 1. デキサメタゾン投与24時間後のヒナのファブリシウス嚢のリンパ濾胞の組織像 (HE, $\times 200$)

Fig. 1. Morphology of lymphoid follicle in the bursa of Fabricius in the chick 24 hours after treatment with dexamethasone. (HE, $\times 200$)

図 2. デキサメタゾン投与24時間後のヒナのファブリシウス嚢のリンパ濾胞における DNA 断片に対する免疫組織化学像 ($\times 200$)

Fig. 2. Section of bursal follicle immunostained for DNA fragments in the chick 24 hours after treatment with dexamethasone. ($\times 200$)

図 3. デキサメタゾン投与24時間後のヒナのファブリシウス嚢のリンパ濾胞における DNA 断片に対する免疫組織化学像。C:Cの字状のクロマチン凝縮部 ($\times 400$)

Fig. 3. Section of bursal follicle immunostained for DNA fragments in the chick 24 hours after treatment with dexamethasone. C:C shape chromatin condensation. ($\times 400$)

図 4. 非投与区のヒナのファブリシウス嚢のリンパ濾胞における DNA 断片に対する免疫組織化学像。矢印は陽性リンパ細胞を示す。 ($\times 200$)

Fig. 4. Section of bursal follicle immunostained for DNA fragments in the non-treated chick. Some positive lymphocytes were observed (arrow heads). ($\times 200$)

トーンシスという細胞死滅機構が認識され、細胞死は以上の2つに大別されるようになった。主に病理的な要因により発生するネクロシスは、細胞膜の変性ととも細胞の膨潤ならびに核やミトコンドリアの膨化などの形態変化を特徴とする受動的な細胞死滅機構である。一方、アポトーシスは特定の誘発刺激に対する感受性細胞の能動的な細胞死滅機構であり、特有の形態変化として核が凝縮すると同時に細胞自体が縮小し、組織内では隣接細胞との間隙が大きくなるなど、ネクロシスとは明らか

に異なる組織像を示す (KERR *et al.*, 1972; WYLLIE *et al.*, 1980)。本研究では、ニワトリヒナに Dex を投与し F 嚢の萎縮形態を光学顕微鏡下で観察した結果、リンパ濾胞髄質部を中心にリンパ細胞数の減少や隣接の細胞との間隙の拡大あるいは核の凝縮が観察された。これは、ラットの胸腺において認められる GL 誘導性のアポトーシスと同様の形態変化であり (KERR *et al.*, 1972; WYLLIE *et al.*, 1980)、ニワトリにおける GL 誘導性の F 嚢の萎縮過程においてアポトーシスによるリンパ細胞の死滅機構が発

現して
組織化
の萎縮
胞の数
性の F
明らか
Com
の F 嚢
GL 誘導
ことを
いる。
DNA の
投与 2 日
す結果
ポトー
を示し
金とな
が死滅
本研
のアポ
縮は、
佐藤 (1
造成が
の対
述べて
成熟し
いこと
髄質部
免疫
スの発
の字状
胞では
いるが
し、そ
縮する
ような
これま
研究で
微鏡下
た。
解化
激によ
ティブ
た B 細
図られ
ローン

現していることを示しているものといえる。一方、免疫組織化学的手法による検索では、GL の投与による F 囊の萎縮に伴い、アポトーシスの発現を示す陽性リンパ細胞の数が経時的に増加した。このことから、GL 誘導性の F 囊の萎縮にアポトーシスが関与していることが明らかとなった。

COMPTON *et al.* (1990) は、Dex 投与後のニワトリヒナの F 囊においてリンパ細胞の DNA の断片化を示し、GL 誘導性の F 囊の萎縮にアポトーシスが関与していることを報告しており、本研究結果と一致する見解を得ている。この中で彼らは、Dex 投与 2 時間後にはすでに DNA の断片化を確認している。本研究においても、Dex 投与 2 時間後には免疫組織化学的に DNA の断片化を示す結果を得た。これらのことは、F 囊リンパ細胞ではアポトーシスが GL 投与後に比較的速やかに発現することを示している。また、このような DNA の断片化が引き金となり細胞の生存機能が低下することで、リンパ細胞が死滅・消失し、F 囊が萎縮するものと考えられた。

本研究では、F 囊のリンパ細胞内における GL 誘導性のアポトーシスによるリンパ細胞の死滅・消失や核の凝縮は、皮質部に比較して髄質部において顕著であった。佐藤 (1970) は、リンパ細胞の髄質部ではリンパ細胞の造成が行われていて未成熟なリンパ細胞が多数存在するのに対し、皮質部では成熟したリンパ細胞が存在すると述べている。これらのことから、未成熟なリンパ細胞は成熟したリンパ細胞と比較して GL に対する感受性が高いことが推定され、GL 誘導性のアポトーシスの発現が髄質部でより顕著であったと考えられた。

免疫組織化学的検討の中で、GL 誘導性のアポトーシスの発現を示す陽性リンパ細胞の核周囲部において、C の字状の強い染色像が比較的多く観察された。正常な細胞ではクロマチンは網状構造をなし核内全体を満たしているが、アポトーシス発現細胞ではクロマチンが凝縮し、その形態は核膜周辺に半月状あるいはヘム型状に凝縮することが多い (Itoh *et al.*, 1991; 田沼, 1994)。このようなアポトーシスに特有のクロマチンの凝縮形態は、これまで透過型電子顕微鏡により確認されてきたが、本研究では免疫組織化学的手法を用いることにより光学顕微鏡下で、このような形態変化をとらえることができた。

孵化後のヒナの F 囊では、外界由来の特異的な抗原刺激により B 細胞クローンの選択的増殖すなわちポジティブセレクションが行われ、ヒナの生息環境に適合した B 細胞レパートリーが確立され、体液性免疫の構築が図られる (EKINO, 1993)。また、自己を認識する禁止クローンや免疫抗体を産生しないなどの非機能的クローンは

ネガティブセレクションにより除去される。これらの細胞選択機構により分化・成熟化した機能的な B リンパ細胞は生体の体液性免疫を担うことになるが、一連の B リンパ細胞の分化・成熟過程では不要な B リンパ細胞の除去にアポトーシスが重要な役割を果たしていると考えられている (鏗田, 1993)。以上のことから、本研究で GL 非投与ヒナの F 囊に陽性リンパ細胞が少数観察されたことは、B リンパ細胞の分化・成熟過程へのアポトーシスの関与を示唆するものであると考えられた。

引用文献

- COMPTON, M.M., P.S. GIBBS and L.R. JOHNSON (1990) Glucocorticoid activation of deoxy-ribonucleic acid degradation in bursal lymphocytes. *Poultry Science*, **69**: 1292-1298.
- DIETER, M.P. and R.P. BREITENBACH (1970) A comparison of the lympholytic effects of corticosterone and testosterone propionate in immature cockerels. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **133**, 357-364.
- EKINO, S. (1993) Role of environmental antigens in B cell proliferation in the bursa of Fabricius at neonatal stage. *European Journal of Immunology*, **23**: 772-775.
- GLICK, B. (1967) Antibody and gland studies in cortisone and ACTH-injected birds. *Journal of Immunology*, **98**, 1076-1084.
- GROSS, W.B., P.B. SIEGEL and R.T. DUBOSE (1980) Some effects of feeding corticosterone to chickens. *Poultry Science*, **59**, 516-522.
- 井川洋二・橋本嘉幸 (1993) アポトーシス：概観と最近の研究動向。「アポトーシス—細胞死の機構」。実験医学増刊, **11**, 2243-2246。
- Itoh, N., S. YONEHARA, A. ISHII, M. YONEHARA, S. MIZUSHIMA, M. SAMESHIMA, A. HASE, Y. SETO and S. NAGATA (1991) The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, **66**: 23-243.
- KERR, J.F.R., A.H. WYLLIE and A.R. CURRIE (1972) Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, **26**, 239-257.
- 佐藤孝二 (1970) フェブリッシュウス囊をめぐる諸問題。日本畜産学会報, **42**: 153-161。
- 田沼靖一 (1994) アポトーシスの特徴。「アポトーシス細胞の生と死」。12-17 頁, 東京大学出版会, 東京。
- 鏗田武志 (1993) B リンパ球の選択とアポトーシス。「アポトーシス—細胞死の機構」。実験医学, **11**, 2281-2286。
- WILSMAN, J.H., R.R. JONKER, R. KELJZER, C.J.H. van DE VELDE, C.J. CORNELISSE and J.H. van DIERENDONCK (1993) A new method to detect apoptosis in paraffin

section ; in situ end-labeling of fragmented DNA. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41 : 7-12.

WYLLIE, A.H., J.F.R. KERR and A.R. CURRIE (1980) Cell death : The significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251-306.

Immunohistochemical Study on Apoptosis Induced by Glucocorticoid in the Chicken Bursa of Fabricius

Seiji KAMIYA¹⁾, Masaaki ONO²⁾, Osamu DOI³⁾ and Takao NAKAMURA³⁾

¹⁾The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Gifu-Shi, 501-11

²⁾Zen-Nho Institute of Animal Health, 7 Ohja-Machi, Sakura-Shi, Chiba, 285

³⁾Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu-Shi, 501-11

Sequential morphological changes and immunohistochemical investigation of apoptosis in the bursa of Fabricius in the immature chicks with a single injection of dexamethasone as a glucocorticoid were studied.

Dexamethasone treatment resulted in bursal atrophy and reduction of the number of bursal lymphocytes, and these reductions were more markedly in the medulla than in the cortex. The reduction in cell size and a condensation of chromatin were found. Immunohistochemically apoptic positive cells were increased after treatment and characteristic C-Shape signals were found around the nucleus in the apoptic positive cells.

These results suggested that the bursal atrophy by treatment of exogenous glucocorticoid is associated with apoptosis, and that the immature lymphocytes in the medulla of follicle are more sensitive to glucocorticoid than the mature one in the cortex.

(Jpn. Poult. Sci., 33 : 366-370, 1996)

Key words : bursa of Fabricius, lymphocyte, dexamethasone, apoptosis, glucocorticoid



卒論製本
ヤマザキ
☎(03) 3958-1681

1996年 9月26日

神谷 誠治 殿(社) 日本畜産学会
編集委員長

謹啓

時下益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

さて、ご投稿頂きました論文No.4406は、日本畜産学会報に掲載されることが決定しましたが、審査員からの指摘により訂正箇所がございます。訂正の上、訂正した原稿1部、そのフロッピーディスク、審査員からの審査用紙、~~訂正した箇所を記入した用紙(書式自由)~~を同封しお送りください。

フロッピーディスクに関しては投稿の手引き(10. 審査終了後の扱い)に従ってください。また、送付の際には破損事故を防ぐためフロッピーディスク用の封筒もしくは、フロッピーディスクを保護材で保護してください。またフロッピーディスクのラベルには原稿番号も忘れずにご記入ください。

お送り頂いたフロッピーディスクは、お返し致しませんのでお手元にバックアップコピーを保存してください。

なお、掲載される巻と号は、著者校正時にお知らせ致します。

敬具

Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

