

学位論文

ニワトリ盲腸における絨毛円柱上皮細胞および
M細胞の動態に関する研究

1998年

山口大学大学院連合獣医学研究科基礎獣医学専攻

竹内崇師

目次

総緒	1
第1章 ニワトリ盲腸における絨毛円柱上皮細胞とM細胞の 増殖部位と細胞動態	3
小緒	4
材料と方法	5
1. 動物	5
2. コルヒチン投与による腸管上皮細胞の分裂部位の定量 組織学的観察	5
1) 盲腸一般粘膜における分裂上皮細胞の計測	5
2) 盲腸扁桃における分裂上皮細胞の計測	5
3. PCNA陽性粘膜上皮細胞の定量組織学的および免疫組織学 的観察法	6
4. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞の 動態の観察法	6
1) 盲腸各部位におけるBrdU陽性上皮細胞の計測	7
2) 盲腸各部位における腸絨毛の高さの計測	7
3) M細胞のレクチンによる同定法	7

結果	7
1. 盲腸における粘膜上皮細胞の分裂部位	7
2. 盲腸におけるPCNA陽性粘膜上皮細胞の分布	8
3. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞の動態	8
考察	9
小括	12
第2章 ニワトリ盲腸における絨毛円柱上皮細胞と濾胞被蓋上皮細胞のアポトーシス	13
小緒	14
材料と方法	15
1. 動物	15
2. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞のアポトーシス像の光学顕微鏡的観察法	15
3. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞のDNA断片化の検出法	15
4. 盲腸粘膜における上皮内リンパ球のサブポピュレーションの検出法	16

結果	17
1. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞の アポトーシス像	17
2. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞の DNA断片化	17
3. 盲腸粘膜における上皮内リンパ球のサブポピュレー ション	17
考察	18
小括	21
総括	22
謝辞	24
参考文献	25
付図および付図説明	33

総 緒

動物の消化器、呼吸器および泌尿生殖器等の粘膜上皮は直接外界と接する部位であり、中でも消化器は栄養物質を摂取するという機能的な性質上、消化管粘膜上皮は常に多くの外来物質に暴露されている。また外来物質に加えて、消化管内には多種多様の常在細菌が定住している。これらの様々な要因の侵襲を回避するために、消化管粘膜では特異的および非特異的な生体防御機構が形成されている。

哺乳類における特異的な防御機構として消化管には消化管付属リンパ組織(GALT)に属する多数の発達したリンパ組織が存在しており、分泌型IgAを主体とした液性免疫応答がおこなわれている(33)。消化管内の抗原はパイエル板等の濾胞被蓋上皮に存在するM細胞と呼ばれる抗原を摂取するために特殊化した上皮細胞を介して取り込まれ(17)、樹状細胞等によって抗原提示がおこなわれる。最終的に産生される特異的な分泌型IgA(33)は抗原が腸管から吸収されることを抑制している。ニワトリの回腸パイエル板や盲腸の盲腸扁桃の濾胞被蓋上皮にもM細胞が存在しており(6, 8, 11, 17)、同様の機能をおこなっていることが期待されるが、その機能についてはほとんど解明されていない。

もう一方の非特異的な防御機構として消化管壁の活発な運動によって内容物が常に攪拌され、微生物等の接着が抑制されるとともに有害物質の排除がなされることがあげられる。さらに消化管粘膜を覆う厚い粘液層が抗原の侵襲を物理的に防ぐとともに、細菌膜を融解するリゾチーム、細菌の鉄代謝を阻害するラクトフェリンおよび界面活性作用を持つ胆汁酸等が粘液層内に存在することによって細菌の侵襲を防いでいる(39)。また消化管上皮細胞の活発な細胞交代も細菌等の接着ないしは侵入した上皮細胞の排除に貢献している。

哺乳類腸管の絨毛円柱上皮細胞の細胞動態に関する研究は、古くはトリチウムチミジンを用いて齧歯類でおこなわれており、その後腫瘍に関連して数多くなされた。また哺乳類類では、M細胞の細胞動態に関しても少数ではあるが報告がなされてる。しかしながら、鳥類ではニワトリの初生雛および幼雛で絨毛円柱上皮細胞の細胞動態に関する研究がなされたものの(20, 38, 45)、成ニワトリの腸管における絨毛円柱上皮細胞やM細胞の増殖部位や細胞動態に関してはまったく解明されていない。

一方、哺乳類消化管の上皮内には多数の上皮内リンパ球(IEL)が存在しており、その大半はCD3⁺CD4⁺CD8⁺T細胞である(29)。また哺乳類のT細胞ではT細胞レセプターが

$\alpha\beta$ 型と $\gamma\delta$ 型に分けられ、通常の免疫応答をおこなうT細胞のほとんどが $\alpha\beta$ 型T細胞であるのに対して、腸管上皮内には $\gamma\delta$ 型T細胞が多数存在する(10, 29)。 $\gamma\delta$ 型IELの機能については不明な点が多いが、一つの可能性として粘膜上皮細胞を排除して上皮の再生を促進し、恒常性を維持する機能が考えられている(21)。ニワトリでも $\gamma\delta$ 型T細胞が消化管の上皮内に多く見られることが報告されているが(29, 30, 49)、消化管の上皮細胞の消失に対する $\gamma\delta$ 型IELの関与の有無に関しては明らかにされていない。

他方、ニワトリの盲腸は、尿管より排泄した尿酸を総排泄腔から大腸系の逆蠕動によって取り込み、盲腸内の尿酸依存性の常在細菌叢によって揮発性脂肪酸やアンモニア等に分解して吸収するという特殊な働きがおこなわれている場所であることから(9)、他の部位の腸管とは異なる生態防御機構が発達していることが想定される。事実、盲腸底にある盲腸扁桃はニワトリの消化管において最大のリンパ器官である。

そこでニワトリ消化管の生体防御機構を解明するための一環として、盲腸の一般粘膜における絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮のM細胞の増殖部位、細胞寿命、消失部位、消失様式および消失に関与する要因を明らかにすることを企図した。

第1章

ニワトリ盲腸における絨毛円柱上皮細胞とM細胞の 増殖部位と細胞動態

小 緒

哺乳類において腸管の絨毛円柱上皮細胞の増殖部位および細胞動態に関する研究は主に齧歯類でおこなわれており、絨毛円柱上皮細胞の増殖部位は小腸では腸陰窩の中央部に(15, 32, 36, 37), また大腸では腸陰窩の下部に位置し(4, 13, 14, 37), 細胞寿命は小腸および大腸ともにそれぞれ3日から4日とされている(13, 16)。

一方、哺乳類の腸管粘膜に存在するリンパ小節を覆う濾胞被蓋上皮におけるM細胞の細胞動態に関しては、腸陰窩で分裂した未分化な上皮細胞が分裂後24時間で未熟なM細胞として濾胞被蓋上皮に出現したという報告がマウスの回腸パイエル板でなされている(12)。

哺乳類におけるM細胞の細胞起源に関しては二つの仮説が提唱されている。一つは濾胞被蓋上皮内の成熟微絨毛上皮細胞からM細胞が分化してくるという説であり(7, 41, 42, 43, 44), もう一つは腸陰窩に存在する未分化上皮細胞が直接M細胞へ分化するという説である(12, 17, 23, 24)。現在のところ腸陰窩の未分化上皮細胞に由来する説が有力と考えられているが、これについては未だ証明されていない。

他方、ニワトリの腸管粘膜の上皮細胞の細胞動態については初生雛および幼雛の腸管でトリチウムチミジンを用いておこなわれた報告があるのみであり(20, 38, 45), 成ニワトリの腸管における上皮細胞の増殖部位および細胞動態に関しては明らかにされてきていない。また、ニワトリの腸管粘膜のリンパ小節上のM細胞に関しては、その存在が哺乳類と同様にGALTにおいて確認されているが(6, 8, 11, 27), その細胞起源や細胞動態に関しては一切明らかにされていない。

そこで本章では、成ニワトリの盲腸一般粘膜における絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃の濾胞被蓋上皮におけるM細胞の増殖部位および細胞動態を解明することを目的とした。

材料と方法

1. 動物

当研究室で継代の白色レグホン品種成ニワトリ(雌雄, 6ヶ月齢以上)35羽を使用した。材料採取については3月から6月を中心におこなった。自由飲水及び自由採食の条件下でニワトリを飼育した。

2. コルヒチン投与による腸管上皮細胞の分裂部位の定量組織学的観察

ニワトリ5羽の腹腔内にコルヒチン(和光純薬工業株式会社, 日本)1.7mg/kgを投与し, 投与後1時間でペントバルビタールナトリウム麻酔下での放血殺をした。材料採取の時間は正午付近となるようにした。盲腸扁桃を含む盲腸底および盲腸尖を採取し, 10%ホルマリンによる固定後, 常法にしたがってパラフィン包埋した。続いて4 μ m厚の連続縦断切片を作製し, ヘマトキシリンエオジン染色をおこなった。

コルヒチンによって細胞分裂を中期で阻止された上皮細胞(以下分裂上皮細胞)の腸陰窩における位置は以下に述べる方法に従ってビデオマイクロメーターVM-31(オリンパス光学工業株式会社, 日本)で計測し, その分布を求めた。結果の統計学的な検定法には Student t検定を用い, 有意水準を5%以内とした。

1) 盲腸一般粘膜における分裂上皮細胞の計測

盲腸一般粘膜における分裂上皮細胞の計測には, 盲腸各部位について1例当たり20個の腸陰窩を用いた。

腸陰窩における各分裂上皮細胞の位置については, 腸陰窩底部の上皮細胞の核の位置を起点として腸陰窩開口部の上皮細胞の核の位置を100%とした。分裂上皮細胞数の分布を求める際には, 腸陰窩の中心が縦断されているものを任意に抽出し, 腸陰窩の全長に対する各10%区間内の分裂上皮細胞数の平均値を求めた。

2) 盲腸扁桃における分裂上皮細胞の計測

盲腸扁桃における分裂上皮細胞の分布の計測には, 1例につき1個の腸陰窩を対象として計測した。計測法は一般粘膜における場合と同様であるが, 扁桃にのみ存在する

長い腸陰窩については連続切片を重ね合わせながら、腸陰窩全長における分裂上皮細胞の分布を計測した。

3. PCNA陽性粘膜上皮細胞の定量組織学的および免疫組織学的観察法

5羽のニワトリを用いて、盲腸扁桃を含む盲腸底、盲腸底から盲腸体への移行部、および盲腸尖をそれぞれ採取し、70%エタノールにて4°Cの条件下で24時間固定した。続いて組織片をパラフィン包埋し、常法に従って4 μ m厚の切片を作製した後、酵素抗体PAP法にて上皮細胞内の proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を検出した。以下その方法を簡単に述べる。

切片内の内因性ペルオキシターゼ反応を除去するために、脱パラフィン後、切片を99%メタノールと0.1%H₂O₂にそれぞれ30分間浸漬した。続いて1%正常ヤギ血清と室温で1時間反応させた後、500倍に希釈した抗PCNAマウスモノクローナル抗体 (Oncogene science社, 米国)と4°Cで18時間反応させた。その後、切片を100倍に希釈した抗マウスIgG+IgMヤギ血清 (American Qualex社, 米国)と2時間、4°Cで反応させ、さらに100倍に希釈した抗マウスPAP (和光純薬工業株式会社, 日本)と1時間、室温で反応させた。最後に0.03%H₂O₂加3, 3' ジアミノベンチジン (DAB) と反応させ、メチルグリーンで対比染色をおこなった。

PCNAを有する上皮細胞(以下PCNA陽性上皮細胞)の定量については分裂上皮細胞と同様の方法でおこなった。

4. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞の動態の観察法

50mg/kgのbromodeoxyuridine (BrdU) (Sigma社, 米国)を25羽のニワトリに腹腔内投与し、投与後1, 2, 3, 4, および5日後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で正午近くに放血殺にて安楽死させた。盲腸底、盲腸底から盲腸体への移行部および盲腸尖を採取し、70%エタノールにて4°Cの条件下で24時間浸漬固定した。常法に従って4 μ m厚のパラフィン切片を作製した。

脱パラフィン後、60°C, 1NのHClに4分間浸漬した。組織中の内因性ペルオキシターゼ反応を除去するために、切片を99%メタノールと0.1%H₂O₂にそれぞれ30分間浸漬した。続いて1%正常ヤギ血清と1時間反応させた後、100倍に希釈した抗BrdUマウスモノクローナル抗体 (SANBIO BV社, オランダ)と4°Cで18時間反応させた。

1) 盲腸各部位におけるBrdU陽性上皮細胞の計測

各例について盲腸各部位の腸絨毛10個を用い、経時的に腸絨毛におけるBrdU陽性上皮細胞集団の先頭の上皮細胞の核の位置を計測した。

BrdU陽性上皮細胞群の先頭細胞の位置については、腸陰窩底部の上皮細胞の核の位置を起点として腸絨毛先端の上皮細胞の核の位置を100%として求めた。また、分裂上皮細胞数の平均値は腸陰窩の全長に対する各10%区間内にある細胞数の平均値を求めた。

2) 盲腸各部位における腸絨毛の高さの計測

盲腸各部位につき腸絨毛10個を用いて計測し、5例におけるその平均値を求めた。計測に用いた腸絨毛は腸絨毛の中心が縦断されているものを任意に抽出した。

3) M細胞のレクチンによる同定法

盲腸扁桃濾胞被蓋上皮内のM細胞を正確に同定するために、一般形態学的指標に加えて wheat germ-agglutinin (WGA) を用いた。以下にその方法を簡単に述べる。

酵素抗体PAP法の過程で、切片を2次血清と反応させた後、0.5mg/mlのビオチン化WGA(Sigma社、米国)と4℃で18時間反応させた。続いてストレプトアビジンとビオチン化したペルオキシターゼの複合体(Dako社、米国)と30分間、室温で反応させた後、DABと反応させた。

結果

1. 盲腸における粘膜上皮細胞の分裂部位

盲腸各部位における腸陰窩の深さの平均値は、盲腸底では $131.4 \pm 22.5 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, n=5), 盲腸底から盲腸体への移行部では $93.8 \pm 14.1 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, n=5), また盲腸尖では $113.1 \pm 8.8 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, n=5) であった。盲腸各部位における腸陰窩の深さは有意に異なった ($P < 0.01$)。

分裂上皮細胞は腸陰窩上皮の全長にみとめられたが、特に腸陰窩の中央部に集中してみとめられた(図1)。盲腸各部位の腸陰窩における分裂上皮細胞の分布の中心は盲腸底で $48.9 \pm 4.7\%$ (平均±標準偏差, n=5), 盲腸尖で $41.1 \pm 8.7\%$ (平均±標準偏差, n=5) であり(図3), 両者間には有意な差がみとめられなかった。

盲腸扁桃には長い型の腸陰窩と短い型の腸陰窩が存在し、その深さの平均値はそれぞれ $726.7 \pm 125.1 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, n=3) と $245.8 \pm 84.3 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, n=3) であった。両腸陰窩の長さの平均は、盲腸の他の部位と比較して有意に大きかった(P<0.01)。

分裂上皮細胞は、長い型の腸陰窩では陰窩の上部1/2に多くみとめられたのに対して、短い型の腸陰窩では腸陰窩の全長に均一に分布していた。分裂上皮細胞の分布の中心は、長い型の腸陰窩で $63.7 \pm 4.5\%$ (平均±標準偏差, n=3), 短い型の腸陰窩では $43.7 \pm 6.7\%$ (平均±標準偏差, n=3) であった(図4)。

2. 盲腸におけるPCNA陽性粘膜上皮細胞の分布

リンパ小節を含まない一般の粘膜では、PCNA陽性上皮細胞の数は腸陰窩の底部で最も多く、腸陰窩の開口部に向かうにつれて減少した。また腸陰窩の底部に位置する上皮細胞は抗PCNA抗体に対して強陽性を示したが、腸陰窩の開口部の上皮細胞は弱陽性であった(図2)。盲腸各部位におけるPCNA陽性上皮細胞の分布の中心は、盲腸底では $36.4 \pm 5.9\%$ (平均±標準偏差, n=5), 盲腸底から盲腸体への移行部では $37.3 \pm 1.7\%$ (平均±標準偏差, n=5), また盲腸尖では $33.9 \pm 3.2\%$ (平均±標準偏差, n=5) であった(図3, 8)。

盲腸扁桃における長い型の腸陰窩では、PCNA陽性上皮細胞は腸陰窩の上部1/2に多く分布した。しかしながら、短い型の腸陰窩では、PCNA陽性上皮細胞は次の2つの部位で特に多くみとめられた。一つは盲腸扁桃を除く盲腸各部位における腸陰窩での分布と同様に陰窩の底部であり、もう一つは長い型の腸陰窩と同様に腸陰窩の上部1/2であった。PCNA陽性上皮細胞の分布の中心は、長い型の腸陰窩では $54.2 \pm 5.7\%$ (平均±標準偏差, n=3), 短い型の腸陰窩では $44.4 \pm 1.8\%$ (平均±標準偏差, n=3) であった(図4, 8)。

3. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞の動態

盲腸における腸絨毛の高さは盲腸底から盲腸尖に向かうにつれて低下した。盲腸各部位における腸絨毛の高さの平均値は、盲腸底で $858.1 \pm 96.8 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, $n=5$)、盲腸底から盲腸体への移行部で $250.2 \pm 77.4 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, $n=5$)、また盲腸尖では $103.4 \pm 16.8 \mu\text{m}$ (平均±標準偏差, $n=5$) であった。盲腸底から盲腸尖に向かうにつれて腸絨毛の高さは有意に低くなった ($P < 0.01$)。

BrdU投与後1日で、BrdU陽性上皮細胞群の先頭は腸絨毛の基部に移動した(図5)。BrdU陽性上皮細胞群は次第に腸絨毛先端へと移動したが、BrdU投与後3日以降、上皮細胞の移動速度は投与後1日および2日と比較して増加した。またBrdU陽性上皮細胞の大半は盲腸底および盲腸底から盲腸体への移行部ではBrdU投与後5日で、盲腸尖では投与後4日ですでに腸絨毛の先端から消失していた。このことから盲腸各部位における絨毛円柱上皮細胞の細胞寿命は盲腸底および盲腸底から盲腸体への移行部では4日、そして盲腸尖では3日であった(図6)。

盲腸扁桃濾胞被蓋上皮では、微絨毛上皮細胞の管腔面がWGAに対して陽性を示したのに対して、M細胞の管腔面は陰性を示した(図7)。濾胞被蓋上皮におけるBrdU陽性上皮細胞はBrdU投与後1日で濾胞被蓋上皮に存在する腸陰窩の開口部付近にみとめられた。以後これらの上皮細胞は濾胞被蓋上皮の全体に広がったが、BrdU投与後5日ではそのほとんどが濾胞被蓋上皮から消失していた。BrdUを取り込んだM細胞は腸陰窩の上皮内ではみられなかったが、BrdU投与後1日には腸陰窩の開口部付近にみとめられ、投与後5日では濾胞被蓋上皮から消失した(図7)。このことからM細胞の細胞寿命は4日以内であることが示唆された。

以上の結果を図8にまとめた。

考察

腸管上皮細胞の増殖部位は、マウスおよびラットの小腸では主に腸陰窩の中央部に(4, 15, 32, 36, 37)、大腸では腸陰窩の下部1/2に位置する(4, 13, 14, 37)。今回の実験結果から、ニワトリの盲腸底および盲腸尖における分裂上皮細胞の分布は、両者ともに齧歯類の小腸における上皮細胞の増殖部位に類似したが、盲腸尖では盲腸底よりも腸陰窩の下部に分裂上皮細胞が集中し、齧歯類の大腸に近い分布を示した。す

なわち、ニワトリ盲腸粘膜には齧歯類と同様の典型的な腸絨毛が存在するが、腸絨毛の丈は盲腸近位から遠位に向かうにつれて次第に低くなる。盲腸尖では典型的な腸絨毛の形態はもはやみとめられなくなり(27)、粘膜の形態は齧歯類の小腸よりも大腸の粘膜に類似するようになる。このニワトリ盲腸と齧歯類の大腸の形態学的類似性と腸陰窩における分裂上皮細胞の位置との類似性との関連が考えられた。

マウスの小腸における腸陰窩は上皮細胞の幹細胞が存在する部位と上皮細胞が分裂をおこなう部位とに区別されることが以前から指摘されてきた。すなわち、マウスでは幹細胞の存在する部位は腸陰窩の底部付近に、上皮細胞が分裂をおこなう部位は腸陰窩の中央部付近に位置している(32, 36)。さらにマウスやラットの腸陰窩およびラット大腸の腸陰窩では、幹細胞の分裂周期は腸陰窩中央部の上皮細胞と比べると長いことが示唆されている(15, 32, 36, 37)。一方マウスの下行結腸ではトリチウムチミジン投与後1時間で、トリチウムチミジンを取り込んだ上皮細胞が腸陰窩の下部で多く検出されている(13, 14)。今回のニワトリ盲腸の腸陰窩における分裂上皮細胞の分布はマウスの小腸における所見と一致したが、PCNA陽性上皮細胞の分布はむしろマウスの大腸におけるトリチウムチミジン投与実験の所見(13, 14)と一致しており、マウスにおける結果とは異なった。そこで、ニワトリにおける分裂上皮細胞とPCNA陽性上皮細胞との分布の違いを解釈するために、ニワトリ盲腸の腸陰窩底部に存在する細胞分裂期の幹細胞が腸陰窩の中央部に移動してこの部位で分裂した後にも腸陰窩底部に戻るといった仮説が考えられた。

マウスの腸管における絨毛円柱上皮細胞の細胞寿命は、十二指腸では3.3日、空腸では3.4日、また下行結腸では3.0日から4.0日とされている(13, 16)。また孵化後7日および21日齢のニワトリの十二指腸では、絨毛円柱上皮細胞は72時間で腸絨毛先端に達する(38)。成ニワトリの盲腸では、絨毛円柱上皮細胞の細胞寿命は盲腸底および盲腸底から盲腸体への移行部では4日、また盲腸尖では3日であり、盲腸尖に向かうにしたがって短くなった。ラットの回腸では腸管粘膜上皮への腸内細菌の侵襲が上皮細胞の世代交代を亢進し(47)、無菌飼育下のマウスおよびラットの回腸やラットの結腸では、腸内細菌に暴露すると上皮細胞の細胞交代が明らかに速くなる(1, 3)。ニワトリの盲腸体から盲腸尖にかけては尿酸を総排泄腔から逆蠕動によって取り込み、揮発性脂肪酸とアンモニアに分解した後には吸収するという特殊な働きがおこなわれている部位であり、尿酸の分解は盲腸内に存在する尿酸依存性の特殊な常在細菌叢によってな

されている(9)。以上の理由から、盲腸絨毛円柱上皮細胞の細胞寿命は盲腸底から盲腸尖に向かうにつれて短くなると考えられた。

M細胞の起源に関しては、哺乳類では現在二つの仮説が提唱されている。一つは濾胞被蓋上皮の成熟した微絨毛上皮細胞がM細胞に分化するというものである。この仮説は、マウスの回腸パイエル板においてM細胞が濾胞被蓋上皮の上部では至る所にみとめられるのに対して濾胞被蓋上皮の腸陰窩にはM細胞が全く見られないこと(41, 42, 43, 44)、またトリチウムチミジン投与後3日目までトリチウムチミジンを取り込んだM細胞がまったくみとめられなかったこと(7)等の所見が根拠となっている。もう一つの説は腸陰窩に位置する未分化な上皮細胞がM細胞に直接分化するというものである(17)。これはウサギの回腸パイエル板や盲腸では、濾胞被蓋上皮の周辺部に見られるM細胞の大部分が腸陰窩のすぐ近くに位置すること(23, 24)、またマウスの回腸パイエル板では、トリチウムチミジン投与後24時間ですでにトリチウムチミジンを取り込んだM細胞が検出されたこと(12)等から導かれたものである。今回の研究ではBrdUを取り込んだM細胞がBrdU投与後24時間以内に腸陰窩開口部付近にみとめられており、ニワトリの盲腸扁桃では濾胞被蓋上皮のM細胞は腸陰窩の未分化上皮細胞に直接由来する可能性が示唆された。

マウスの回腸パイエル板でトリチウムチミジンを取り込んだ上皮細胞集団の先頭は回腸の腸絨毛でトリチウムチミジンを取り込んだ上皮細胞集団の先頭と同一時期に脱落し、またこれらの上皮細胞集団は同一時期に両部位からほとんど消失したことから、M細胞の細胞寿命は絨毛円柱上皮細胞と比較してそれほど長くないことが示唆されている(12)。今回の実験では、BrdUを取り込んだ微絨毛上皮細胞は絨毛円柱上皮細胞と同様にBrdU投与後5日で濾胞被蓋上皮からほぼ消失していたことから、ニワトリ盲腸扁桃におけるM細胞の細胞寿命は4日以内であることが示唆され、マウスの回腸パイエル板の場合と同様の結果が得られた。

小 括

成ニワトリの腸管における絨毛円柱上皮細胞およびM細胞の細胞増殖部位と細胞寿命に関してはまったく明らかにされていない。そこでコルヒチンの投与実験およびPCNAの免疫組織化学的検出をおこない、ニワトリ盲腸におけるM細胞を含めた上皮細胞の増殖部位を同定した。

分裂中の上皮細胞(分裂上皮細胞)は盲腸扁桃を除く盲腸全部位において腸陰窩の全長に分布したが、特に腸陰窩の中央部に多くみとめられた。盲腸各部位における分裂上皮細胞の分布の中心は、盲腸底および盲腸尖でそれぞれ腸陰窩の底部から48.9%と41.1%の位置であった。盲腸扁桃では、長い型の腸陰窩における分布の中心は腸陰窩の底部から63.7%、短い型の腸陰窩における分布の中心は43.7%の位置であった。

一方PCNA陽性上皮細胞は、盲腸扁桃を除く盲腸全部位において腸陰窩の底部に集中していた。盲腸各部位におけるPCNA陽性上皮細胞の分布の中心は、盲腸底で腸陰窩の底部から36.4%、盲腸底から盲腸体への移行部で37.3%、また盲腸尖で33.9%の位置であった。盲腸扁桃における長い型の腸陰窩では腸陰窩の底部から54.2%、短い型の腸陰窩では44.4%の位置であった。

BrdUに標識されたBrdU陽性上皮細胞は、盲腸底ではBrdU投与後1日で腸絨毛の基部に達していた。BrdU陽性上皮細胞集団の先頭は、盲腸底や盲腸底から盲腸体への移行部ではBrdU投与後4日で、また盲腸尖では投与後3日で腸絨毛先端から消失した。盲腸扁桃の濾胞被蓋上皮では、BrdU陽性微絨毛上皮細胞とM細胞はBrdU投与後1日で腸陰窩開口部付近にみとめられた。腸陰窩の上皮内にはBrdUを取り込んだM細胞はみとめられなかった。盲腸扁桃におけるBrdUを取り込んだ上皮細胞は、BrdU投与後5日で、そのほとんどが濾胞被蓋上皮から消失した。

以上の結果から、ニワトリ盲腸における絨毛円柱上皮細胞の増殖部位および細胞寿命が明らかになるとともに、盲腸扁桃濾胞被蓋上皮におけるM細胞は腸陰窩に存在する未分化な上皮細胞から1日でM細胞へと分化し、その細胞寿命は4日以内であることが示唆された。

第2章

ニワトリ盲腸における絨毛円柱上皮細胞と濾胞被蓋上皮細胞の アポトーシス

小 緒

哺乳類では腸管の絨毛円柱上皮細胞の消失過程は動物種によって異なる。すなわち、ラットやマウスの小腸では絨毛円柱上皮細胞のほとんどがアポトーシスを誘導された後に腸絨毛先端より管腔内へと脱落するが、モルモットやサルでは、上皮細胞の細胞質の上端部分のみが管腔内に脱落し、細胞体の大部分は上皮内ないしは粘膜固有層内に位置する大食細胞により大食される(21)。また、腸管粘膜の上皮内に存在するIELの大半はキラー/サブレッサーT細胞の細胞表面マーカーであるCD8に陽性を示し、大顆粒リンパ球の形態を示す(29)。近年、哺乳類の腸管では $\gamma\delta$ 型Tリンパ球が腸管上皮細胞のアポトーシスを誘導し、上皮細胞の細胞増殖を調節しているという仮説が提唱されている(21)。

一方、ニワトリの腸管では、成ニワトリの盲腸における上皮細胞の増殖部位および動態に関しては明らかにされたものの(48)、上皮細胞の消失様式およびこれに対するIELの関与については未だに解明されていない。そこで本章では腸管の絨毛円柱上皮細胞およびM細胞の消失部位および消失様式を明らかにするとともに、上皮細胞のアポトーシスの誘導とIELとの関係を解明することを目的とした。

材料と方法

1. 動物

当研究室で継代中の白色レグホン品種ニワトリ(雌雄, 5ヶ月齢以上)10羽を使用した。ニワトリの飼育に関しては人工灯を午前5時から午後9時の間照射し, 自由飲水および自由採食とした。また酵素抗体法で使用する抗体と腸管組織内の食餌性抗体との非特異的結合を避けるために, 飼料には動物性蛋白不含の配合飼料を用いた。

2. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞のアポトーシス像の光学顕微鏡的観察法

5羽のニワトリにペントバルビタールを静脈内投与し, 正午近くに麻酔下で放血殺した。盲腸扁桃を含む盲腸底, 盲腸底から盲腸体への移行部および盲腸尖を採取し, ブアン液で室温で24時間固定した。続いて常法に従って4 μ m厚のパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリンエオジン染色をおこなった。

3. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞のDNA断片化の検出法

上皮細胞のDNAの断片化の検出には, LiとDarzynkiewicz(31)による方法に準拠したが, ビオチン化UTPの代わりにBrdU結合UTP(BrdUTP)を用いて検出感度を高めた。以下にその方法を簡単に記す。

麻酔殺した5羽のニワトリから盲腸扁桃を含む盲腸底, 盲腸底から盲腸体への移行部および盲腸尖を採取し, これらを periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定液にて4 $^{\circ}$ Cで24時間固定をおこなった。BarthelとRaymond(5)の方法に従って組織片を液体窒素中で凍結させた後, コールドトームCM-501(サクラ精機株式会社, 日本)にて3 μ m厚の連続凍結切片を作製した。これらの切片をあらかじめ0.2% 3-aminopropyltriethoxysilane(信越化学工業株式会社, 日本)でコートしておいたスライドガラス上に載せて風乾した後, -20 $^{\circ}$ Cで保存した。

DNAの断片化の検出に際しては, ニワトリ1例につき4枚の切片を準備し(切片1, 2, 3, および4), 切片1, 2は切片3の陽性コントロールとして, また切片4は切片3の陰性コントロールとして用いた。前処理として各切片を200 μ g/mlのプロテアーゼK溶液

(Sigma社, 米国)に20分間, 37℃で浸漬した。続いて各切片を100%メタノールと0.1% H_2O_2 中にそれぞれ30分ずつ浸漬した後, 切片1, 2を80U/mlのDNaseI溶液(Boehringer mannheim社, 米国)で37℃で30分間処理した。次に terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)緩衝液(Boehringer mannheim社, 米国)に浸漬した後, 切片1, 3をBrdUTP溶液(4mlの蒸留水中に0.1nM BrdUTPを加えたもの; Sigma社, 米国)を加えた20 μ lのTdT反応緩衝液(Boehringer mannheim社, 米国)と90分間, 37℃で反応させた。続いて各切片を1%正常ウサギ血清と反応させた後, 100倍に希釈した抗BrdUマウスモノクローナル抗体(バイオサイエンス社, 日本)と18時間, 4℃で反応させた。さらに100倍に希釈した抗マウスIgGウサギ血清(Jackson社, 米国)と1時間, 室温で反応させた後, 100倍に希釈したマウス peroxidase-anti-peroxidase-complex (PAP) (生化学工業株式会社, 日本)と1時間, 室温で反応させた。最後にDABと反応させ, メチルグリーンで対比染色をおこなった。

4. 盲腸粘膜における上皮内リンパ球のサブポピュレーションの検出法

非特異反応を除去するために, 前項と同様の方法で作製した3 μ m厚の連続凍結切片をメタノールと0.3% H_2O_2 にそれぞれ浸漬し, 次いで1%正常ウサギ血清と反応させた。続いて切片をそれぞれ抗ニワトリTCR1, TCR2, TCR3 (それぞれ γ δ -TCR, TCR2のV β -1 α β -TCR, およびTCR2のV β -2 α β TCRを認識する), CD3, CD4, およびCD8マウスモノクローナル抗体(Southern Biotechnology Associates社, 米国)と4℃で18時間反応させた。各抗体の希釈はCD3を除いて50倍で, またCD3については100倍とした。さらに100倍に希釈した抗マウスIgGウサギ抗体(Jackson社, 米国)と1時間, 室温で反応させた後, 100倍に希釈したマウスPAP(生化学工業株式会社, 日本)と1時間, 室温で反応させた。最後に切片をDABと反応させた後, メチルグリーンで対比染色をおこなった。

結果

1. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞のアポトーシス像

典型的なアポトーシスの形態学的特徴を示す絨毛円柱上皮細胞および微絨毛上皮細胞とその脱落像は盲腸全部位において腸絨毛の先端部および盲腸扁桃における濾胞被蓋上皮の頂部にみとめられた(図9A)。これらの上皮細胞のアポトーシスは、細胞の小型化と核の小型化および染色質の凝集を特徴とした。希に核は断片化を示した。また、核の小型化、染色質の凝集および細胞質の濃縮と小型化を特徴とする上皮細胞の変化は主に腸絨毛と濾胞被蓋上皮の上部1/2に散在してみとめられた(図9B, C)。このような特徴を示す上皮細胞は多くの場合、腸絨毛基底部や濾胞被蓋上皮基底部の上皮細胞と比較して細長い形態を示した。盲腸全部位においてアポトーシスを示した上皮細胞の管腔内への脱落像が多くみとめられた。しかしながら、上皮内のマクロファージによる上皮細胞の貪食像は極めて稀にしかみとめられなかった。また、腸陰窩では少数の上皮細胞が上記のアポトーシスの形態を示した。

2. 絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞のDNA断片化

盲腸の全部位において、核のDNAが強い断片化を示す上皮細胞が腸絨毛の先端部に局在してみとめられた(図10A, B)。また弱いDNAの断片化を示す上皮細胞が腸絨毛の上部1/2から1/4にかけてみとめられ、それらの上皮細胞が示すDNAの断片化の程度は先端に向かうにつれて強くなった。腸陰窩ではDNAの断片化を示す上皮細胞はほとんど見られなかった。盲腸扁桃では核のDNAに断片化を示す上皮細胞は濾胞被蓋上皮の頂部付近にみとめられ、特に強い反応を示す微絨毛上皮細胞は濾胞被蓋上皮の側面から頂部に移行する部分に集中していた(図10C)。濾胞被蓋上皮の側面に主に分布しているM細胞にはDNAの断片化はまったくみとめられなかった。

3. 盲腸粘膜における上皮内リンパ球のサブポピュレーション

盲腸全部位の腸絨毛ではCD3⁺、CD8⁺およびTCR2⁺リンパ球が主に腸絨毛上部の上皮内に分布した(図11)。盲腸扁桃ではCD3⁺、CD8⁺およびTCR2⁺リンパ球は濾胞被蓋上皮上部

の上皮内に多数分布しており、特に濾胞被蓋上皮側面から頂部への移行部に集中してみとめられた(図12)。

CD4⁺リンパ球は盲腸全部位の腸絨毛上皮内で少数のみ散在性のみとめられた(図11D)。盲腸扁桃では多数のCD4⁺リンパ球が粘膜固有層内に密在し(図12D)、濾胞被蓋上皮では特に腸陰窩の開口部付近のM細胞が局在する領域で多く見られた。

TCR1⁺リンパ球は腸絨毛上皮および濾胞被蓋上皮の全部位で散在性に分布したが、その数はすべての部位でTCR2⁺リンパ球よりも少なかった(図11E, 12E)。

TCR3⁺リンパ球は盲腸全部位の上皮内においてほとんど見られなかった(図11F, 12F)。

また、盲腸全部位においてCD3⁺リンパ球の数はCD8⁺およびCD4⁺リンパ球の総数、またはすべてのTCR⁺リンパ球の総数にくらべて多かった。

考 察

本研究において、ニワトリ盲腸では形態学的に典型的なアポトーシスの特徴を示した上皮細胞は腸絨毛の先端および濾胞被蓋上皮の上部のみとめられるとともに、この部位に上皮細胞の脱落像がたびたびみとめられたのに対して、大食細胞によるアポトーシスを起こした上皮細胞の貪食像は極めて希であった。このことから、ニワトリの盲腸の絨毛円柱上皮細胞および濾胞被蓋上皮における微絨毛上皮細胞は、アポトーシスを誘導された後に腸絨毛の先端および濾胞被蓋上皮の頂部から管腔内に脱落することが示唆された。

また、ニワトリの盲腸の絨毛円柱上皮細胞は腸陰窩より腸絨毛先端に向けて移動する際にその速度を増すことが明らかにされている(48)。このことと、腸絨毛の先端部からさらに下方の上部でも、形態学的にアポトーシス像を呈した上皮細胞の脱落が観察されたことを考え合わせると、ニワトリ盲腸では上皮細胞の一部は腸絨毛の先端部に達する以前にアポトーシスを発現させられて上皮から脱落することが示唆された。

ヒトの小腸では、腸絨毛の上部で多数の絨毛円柱上皮細胞がDNAの断片化を示したにもかかわらず、腸絨毛先端部の少数の上皮細胞を除いてDNAの断片化を示した上皮細胞は形態学的にアポトーシスの特徴を示していなかったという報告がなされており(40)、同様の所見は今回の実験結果においてもみとめられた。アポトーシスを誘導さ

れた上皮細胞は、180-200bpのヌクレオソーム単位のDNAの断片化に先行して300あるいは50kbpのDNAの断片を形成する(35)。これらのことから、ニワトリ盲腸の各部位において腸絨毛および濾胞被蓋上皮でみとめられた上皮細胞におけるDNAの断片化に対する弱い反応は巨大なDNAの断片の形成を示していると考えられた。一方、マウスの小腸では、上皮細胞のアポトーシスは*bcl-2*遺伝子によって制御されていることから(2, 19, 25)、今回みとめられたDNAの断片化を示しているにも関わらず形態学的なアポトーシスの特徴を伴わない上皮細胞では、それ以降のアポトーシスにより生じる細胞の変化が*bcl-2*によって抑制されている可能性も考えられ、この点の解明については今後の研究を待ちたい。

ニワトリの盲腸扁桃では、M細胞は主に濾胞被蓋上皮の側面に分布している(28)。また盲腸扁桃における上皮細胞は濾胞被蓋上皮の側面から頂部に向かって移動する(48)。今回の実験では、盲腸扁桃における濾胞被蓋上皮の頂部の微絨毛上皮細胞はDNAの断片化に対する反応を示したのに対して、濾胞被蓋上皮の側面に位置するM細胞はDNAの断片化に対する反応をまったく示さなかった。これらのことから、ニワトリ盲腸扁桃におけるM細胞は濾胞被蓋上皮の側面から頂部に向かって移動してゆく過程において濾胞被蓋上皮の主な構成要素である微絨毛上皮細胞に形態を変化させることが考えられた。

腸管の上皮内には非常に多数のIELが存在している。IELの大半はCD8Tリンパ球であり、CD8Tリンパ球はTCRの形態によりさらに $\alpha\beta$ 型、あるいは $\gamma\delta$ 型Tリンパ球に区別される(29)。腸管の上皮内には多数の $\gamma\delta$ 型Tリンパ球がみとめられるが、上皮内における $\alpha\beta$ 型Tリンパ球と $\gamma\delta$ 型Tリンパ球との割合は動物種によって異なる(29, 30, 49)。ウシの空腸では、上皮内における $\gamma\delta$ 型Tリンパ球は腸絨毛先端部に特に多く、また $\gamma\delta$ 型Tリンパ球の大半は大顆粒リンパ球の形態を示している。これらのことから、ウシの腸管においては $\gamma\delta$ 型Tリンパ球が絨毛円柱上皮細胞のアポトーシスの誘導に関与していることが考えられている(46)。今回の実験では、ニワトリの盲腸上皮内にはCD3⁺、CD8⁺、およびTCR2⁺リンパ球が多数存在しており、これらの分布はDNAの断片化を示した上皮細胞の分布と類似していた。またTCR2⁺リンパ球はTCR1⁺リンパ球に比べて上皮内に多数みとめられた。これらのことから、ニワトリの盲腸ではCD3⁺、CD8⁺、およびTCR2⁺リンパ球が上皮細胞のアポトーシスの誘導に関与する可能性が示唆された。

マウスの腸管では腸内細菌の存在が $\alpha\beta$ 型IELの数を増加させるが、 $\gamma\delta$ 型IELの数にはほとんど影響を及ぼさない(26)。また齧歯類の腸管では腸内細菌の刺激により腸管の上皮細胞の細胞交代速度が増大する(1, 3)。一方、ニワトリの盲腸内に排泄された尿酸を揮発性脂肪酸とアンモニアに分解するという役割を担う特殊な常在細菌叢が存在する(9)。これらの事実は、ニワトリ盲腸においてTCR2⁺リンパ球が上皮細胞のアポトーシスの誘導に関与する可能性を支持している。

近年哺乳類の腸管における上皮細胞のアポトーシスの誘導にはパーフォリン(21, 22)およびFas/Fasリガンド(18, 34)が関与していることが示唆されている。ニワトリ盲腸における上皮細胞のアポトーシスの誘導に関しても哺乳類と同様にこれらの関与が考えられるが、上皮細胞のアポトーシス誘導機序に関しては今後の研究を待ちたい。

小括

ニワトリ盲腸における絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮細胞の消失様式について検討した。

その結果、強いDNAの断片化を伴ったアポトーシスを示す上皮細胞とその脱落が腸絨毛の先端でみとめられ、腸管腔内にも強いDNAの断片化を示す上皮細胞が多数観察された。また弱いDNAの断片化を示す上皮細胞は腸絨毛の上部でみとめられ、それらの脱落像がしばしば観察された。

盲腸扁桃ではDNAの断片化を伴ったアポトーシスを示す上皮細胞とその脱落が濾胞被蓋上皮の上部で観察されたが、M細胞にはアポトーシスの特徴的所見である細胞の小型化と核の小型化および染色質の凝集等がみとめられなかった。

IELのサブポピュレーションに関しては、 $CD3^+$ 、 $CD8^+$ および $TCR2^+$ リンパ球が腸絨毛および濾胞の上部に多数存在した。また $CD4^+$ リンパ球は上皮内では少なく、粘膜固有層内に多くみとめられた。 $TCR1^+$ リンパ球は $TCR2^+$ リンパ球に比較して少なく、 $TCR3^+$ リンパ球はほとんどみとめられなかった。

以上の結果より、ニワトリ盲腸粘膜の上皮細胞はアポトーシスを発現させられて脱落することが示唆されるとともに、このアポトーシスの発現には $CD3^+$ 、 $CD8^+$ および $TCR2^+$ リンパ球が関与することが推察された。またM細胞は細胞死に陥ることなく、微絨毛上皮細胞へ分化する可能性が示唆された。

総括

成ニワトリの腸管における絨毛円柱上皮細胞およびM細胞の細胞増殖部位と細胞寿命に関しては全く明かにされておらず、またこれらの上皮細胞の消失様式に関してもまったく解明されていない。そこで成ニワトリの盲腸を用いてコルヒチンの投与実験およびPCNAの検出をおこない、盲腸一般粘膜における絨毛円柱上皮細胞および盲腸扁桃濾胞被蓋上皮におけるM細胞の増殖部位を同定するとともに、BrdUを用いてこれらの上皮細胞の細胞動態の観察をおこなった。また、上皮細胞の消失部位を解明するためにDNAの断片化を示す上皮細胞を検出するとともに、上皮内リンパ球のサブポピュレーションを検出して上皮細胞のアポトーシスとリンパ球との関係について検討した。

その結果、コルヒチンにより分裂を阻止された分裂上皮細胞は、盲腸扁桃を除く盲腸各部位において腸陰窩の中央部に多数見られた。盲腸各部位における分裂上皮細胞の分布の中心は、盲腸底および盲腸尖でそれぞれ腸陰窩の底部から48.9%と41.1%の位置であった。盲腸扁桃では、長い型の腸陰窩における分布の中心は腸陰窩の底部から63.7%、短い型の腸陰窩では43.7%の位置であった。一方、PCNA陽性上皮細胞の分布は、盲腸扁桃を除く盲腸全部位において腸陰窩の底部に集中していた。

盲腸各部位におけるPCNA陽性上皮細胞の分布の中心は、盲腸底で腸陰窩の底部から36.4%、盲腸底から盲腸体への移行部で37.3%、また盲腸尖で33.9%の位置であった。盲腸扁桃における長い型の腸陰窩では腸陰窩の底部から54.2%、短い型の腸陰窩では44.4%の位置であった。

盲腸各部位においてBrdUを取り込んだ陽性上皮細胞群の先頭は、盲腸底および盲腸底から盲腸体への移行部ではBrdU投与後4日で、盲腸尖では投与後3日で腸絨毛先端から消失した。盲腸扁桃では、BrdUを取り込んだM細胞がBrdU投与後1日で腸陰窩開口部付近にみとめられた。さらにBrdUを取り込んだ上皮細胞はBrdU投与後5日で濾胞被蓋上皮からそのほとんどが消失した。

盲腸各部位において、強いDNAの断片化を伴いアポトーシスの形態学的特徴を示す上皮細胞とその脱落像が腸絨毛の先端でみとめられた。強いDNAの断片化を示す上皮細胞は腸管腔内にも多数見られた。また弱いDNAの断片化を示す上皮細胞が腸絨毛の上部でみとめられ、しばしばこれらの脱落像が観察された。しかしながら弱いDNAの断片化を示す上皮細胞の大半は形態学的なアポトーシスの特徴を示さなかった。盲腸

扁桃の濾胞被蓋上皮においても同様の所見が観察されたが、アポトーシスの特徴的所見を示すM細胞はみとめられなかった。

IELのサブポピュレーションに関しては、CD3⁺、CD8⁺およびTCR2⁺リンパ球が腸絨毛および濾胞被蓋上皮の上部に多数みとめられた。これらの分布はDNAの断片化を示した上皮細胞の分布と類似したが、他のサブポピュレーションと上皮細胞のアポトーシスとの位置的な関連性はみとめられなかった。

以上の結果から、ニワトリ盲腸の上皮細胞はアポトーシスを発現させられた後に管腔内へと脱落することが示唆されるとともに、このアポトーシスの発現にはCD3⁺、CD8⁺およびTCR2⁺リンパ球が関与することが推察された。またM細胞は腸陰窩に存在する未分化な上皮細胞から1日でM細胞へと分化し、またその細胞寿命は4日以内であることが示唆された。さらにM細胞は細胞死に陥ることなく微絨毛上皮細胞へと分化することが推察された。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究に終始適切なるご指導，ご助言を賜りました鳥取大学農学部獣医学科家畜解剖講座 上原正人 教授，北川 浩 助教授，今川智敬 助手に深謝致します。同様に，懇切なるご指導，ご助言を賜りました鹿児島大学農学部獣医学科家畜解剖学講座 西中川 駿 教授に深謝致します。また，動物性蛋白不含飼料をご分与下さいました西日本ジェイエイ畜産株式会社生産部長 宮原 白 氏，並びに終始御協力くださいました教室員各位に感謝致します。

参考文献

1. Abrams, G. D., Bauer, H. and Sprinz, H. 1963. Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Laborat. Invest.* 12: 355-364.
2. Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y. and Tsujimoto, Y. 1994. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 54: 2468-2471.
3. Alam, M., Midtvedt, T. and Uribe, A. 1994. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scand. J. Gastroenterol.* 29: 445-451.
4. Appleton, D. R., AL-Dewachi, H. S., Morley, A. R., Rodriguez, M. S. B., Sunter, J. P., Watson, A. J. and Wright, N. A. 1983. Autoradiographic investigations of cell proliferation in the small and large bowel of the mouse, and the jejunal response to some abnormal conditions. *Acta Histochem.* 27: 185-194.
5. Barthel, L. K. and Raymond, P. A. 1990. Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 38: 1383-1388.
6. Befus, A. D., Johnston, N., Leslie, G. A. and Bienenstock, J. 1980. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *J. Immunol.* 125: 2626-2632.

7. Bhalla, D. K. and Owen, R. L. 1982. Cell renewal and migration in lymphoid follicles of Peyer's patches and cecum—An autoradiographic study in mice. *Gastroenterology* 82: 232-242.
8. Bockman, D. E. and Cooper, M. D. 1973. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am. J. Anat.* 136: 455-478.
9. Braun, E. J. and Campbell, C. E. 1989. Uric acid decomposition in the lower gastrointestinal tract. *J. Exp. Zool* (Suppl. 3): 70-74.
10. Bucy, R. P., Chen, C. L., Cihak, J., Losch, U. and Cooper, M. D. 1998. Avian T cells expressing $\gamma \delta$ receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J. Immunol.* 141: 2200-2205.
11. Burns, R. B. 1982. Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Res. Vet. Sci.* 32: 359-367.
12. Bye, W. A., Allan, C. H. and Trier, J. S. 1984. Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 86: 789-801.
13. Chang, W. W. L. and Leblond, C. P. 1971. Renewal of the epithelium in the descending colon of the mouse. I. Presence of three cell populations: Vacuolated-columnar, mucous and argentaffin. *Am. J. Anat.* 131: 73-100.
14. Chang, W. W. L. and Nadler, N. J. 1975. Renewal of the epithelium in the descending colon of the mouse. IV. Cell population kinetics of vacuolated-columnar and mucous cells. *Am. J. Anat.* 144: 39-56.

15. Chen, W., Meinzer, H. P. and Sandblad, B. 1988. The growth and life of a monoclonal crypt. *Cell Tissue Kinet.* 21: 419-427.
16. Cheng, H. and Leblond, C. P. 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* 141: 461-480.
17. Gebert, A., Rothkotter, H. J. and Pabst, R. 1996. M cells in Peyer's patches of the intestine. *Int. Rev. Cytol.* 167: 91-159.
18. Gelfanov, V., Gelfanova, V., Lai, Y. G. and Liao, N.S. 1996. Activated $\alpha\beta$ -CD8⁺, but not $\alpha\alpha$ -CD8⁺, TCR- $\alpha\beta$ ⁺, murine intestinal intraepithelial lymphocytes can mediate perforin-based cytotoxicity, whereas both subsets are active in Fas-based cytotoxicity. *J. Immunol.* 156: 35-41.
19. Hockenbery, D. M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. and Korsmeyer, S. J. 1991. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 6961-6965.
20. Imondi, A. R. and Bird, F. H. 1965. The turnover of intestinal epithelium in the chick. *Poult. Sci.* 45: 142-146.
21. Iwanaga, T. 1995. The involvement of macrophages and lymphocytes in the apoptosis of enterocytes. *Arch. Histol. Cytol.* 58: 151-159.
22. Iwanaga, T., Han, H., Hoshi, O., Takahashi-Iwanaga, H. and Fujita, T. 1994. Perforin-containing lymphocytes and their ultrastructure in the intestinal mucosa with special reference to species difference between the guinea pig and rat. *Biomed. Res.* 15: 67-76.

23. Jepson, M. A. Clark, M. A. Simmons, N. L. and Hirst, B. H. 1993a. Epithelial M cells in the rabbit caecal lymphoid patch display distinctive surface characteristics. *Histochemistry* 100: 441-447.
24. Jepson, M. A., Simmons, N. L., Hirst, G. L. and Hirst, B. H. 1993b. Identification of M cells and their distribution in rabbit intestinal Peyer's patches and appendix. *Cell Tissue Res.* 273: 127-136.
25. Kamada, S., Shimono, A., Shinto, Y., Tsujimura, T., Takahasi, T., Noda, T., Kitamura, Y., Kondoh, H. and Tsujimoto, Y. 1995. Bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: Accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation and distorted small intestine. *Cancer Res.* 55: 354-359.
26. Kawaguchi, M., Nanno, M., Umesaki, Y., Matsumoto, S., Okada, Y., Cai, Z., Shimamura, T., Matsuoka, Y., Ohwaki, M. and Ishikawa, H. 1993. Cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in germ-free mice is strain dependent and determined by T cells expressing gamma delta T-cell antigen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 8591-8594.
27. Kitagawa, H., Imagawa, T. and Uehara, M. 1996. The apical caecal diverticulum of the chicken identified as a lymphoid organ. *J. Anat.* 189: 667-672.
28. Kitagawa, H., Hiratsuka, Y., Imagawa, T. and Uehara, M. 1998. Distribution of lymphoid tissue in the caecal mucosa of chickens. *J. Anat.* 192: 293-298.

29. Klein, J. R. and Mosley, R. L. Phenotypic and cytotoxic characteristics of intraepithelial lymphocytes. pp. 33-60.
In: *Mucosal Immunology: Intraepithelial Lymphocytes* (Kiyono, H. and McGhee, J.R. eds.), Raven Press, New York.
30. Kon-Ogura, T., Kon, Y., Onuma, M., Kondo, T., Hashimoto, Y. and Sugimura, M. 1992. Distribution of T cell subsets in chicken lymphoid tissues. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 59-66.
31. Li, X. and Darzynkiewicz, Z. 1995. Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif.* 28: 571-579.
32. Loeffler, M., Stein, R., Wichmann, H-E., Potten, C. S., Kaur, P. and Chwalinski, S. 1986. Intestinal cell proliferation. I. A comprehensive model of steady-state proliferation in the crypt. *Cell Tissue Kinet.* 19: 627-645.
33. Mesteckey, J. and McGhee, J. R. 1987. Immunoglobulin A (IgA): Molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* 40: 153.
34. Moller, P., Koretz, K., Leithauser, F., Bruderlein, S., Henn, E. C., Quentmeier, A. and Krammer, P. H. 1994. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int. J. Cancer* 57: 371-377.
35. Oberhammer, F., Wilson, J. W., Dive, C., Morris, I. D., Hickman, J. A., Wakeling, A. E., Walker, P. R. and Sikorska, M. 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and /or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal

fragmentation. *EMBO J.* 12: 3679-3684.

36. Potten, C. S. and Loeffler, M. 1987. A comprehensive model of the crypts of the small intestine of the mouse provides insight into the mechanisms of cell migration and the proliferation hierarchy. *J. Theor. Biol.* 127: 381-391.
37. Pozharisski, K. M., Krimashevski, V. F. and Gushchin, V. A. 1980. Study of kinetics of epithelial cell populations in normal tissues of the rat's intestines and in carcinogenesis. I. A comparison of enterocyte population kinetics in different segments of the small intestine and colon. *Exp. Pathol.* 18: 387-406.
38. Rodak, L. and Prochazka, Z. 1971. The rate of epithelial renewal in the duodenum of chickens during their early postembryonal development (an autoradiographic study). *Arch. Exp. Vet. Med.* 26: 361-367.
39. Russel, G. J. and Walker, W. A. 1990. Role of the intestinal mucosal barrier and antigen uptake. pp. 15. In: *Immunology and Immunopathology of the Liver and Gastrointestinal Tract* (eds. Targan, S. and Shanahan, F.), Igaku-shoin, New York.
40. Shibahara, T., Sato, N., Waguri, S., Iwanaga, T., Nakahara, A., Fukutomi, H. and Uchiyama, Y. 1995. The fate of effete epithelial cells at the villus tips of the human intestine. *Arch. Histol. Cytol.* 58: 205-219.
41. Sicinski, P., Rowinski, J., Warchol, J. B. and Bem, W. 1986. Morphometric evidence against lymphocyte-induced differentiation of M cells from absorptive cells in mouse Peyer's patches. *Gastroenterology* 90: 609-616.

42. Smith, M. W. and Peacock, M. A. 1980. "M" cell distribution in follicle-associated epithelium of mouse Peyer's patch. *Am. J. Anat.* 159: 167-175.
43. Smith, M. W. and Peacock, M. A. 1982. Lymphocyte induced formation of antigen transporting 'M' cells from fully differentiated mouse enterocytes. pp. 573-583. In: *Intestinal adaptation and its mechanisms* (Robinson, J. W. L. and Dowling, R. H. eds.), MTP Press, Lancaster.
44. Smith, M. W. and Peacock, M. A. 1992. Microvillus growth and M-cell formation in mouse Peyer's patch follicle-associated epithelial tissue. *Exp. Physiol.* 77: 389-392.
45. Spielvogel, A. M., Farley, R. D. and Norman, A. W. 1972. Studies on the mechanism of action of calciferol. V. Turnover time of chick intestinal epithelial cells in relation to the intestinal action of vitamin D. *Exp. Cell Res.* 74: 359-366.
46. Suzuki, Y., Mori, K. and Iwanaga, T. 1997. Intraepithelial $\gamma \delta$ T cells are closely associated with apoptotic enterocytes in the bovine intestine. *Arch. Histol. Cytol.* 60: 319-328.
47. Symons, L. A. K. 1965. Kinetics of the enterocytes, and morphology of villi and crypts in the jejunum of the rat infected by the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Gastroenterology* 49: 158-168.
48. Takeuchi, T., Kitagawa, H., Imagawa, T. and Uehara, M. 1998. Proliferation and cellular kinetics of villous epithelial cells and M cells in the chicken caecum. *J. Anat.* 193: 233-239.

49. Viney, J., MacDonald, T. T. and Spencer, J. 1990. Gamma/delta T cells in the gut epithelium. *Gut* 31: 841-844.

付図および付図説明



図 1: コルヒチン投与後の盲腸底における腸陰窩の縦断像。コルヒチンにより分裂を阻害された分裂上皮細胞 (矢印) とリンパ球 (矢頭) が見られる。

ヘマトキシリンエオジン染色 ×790

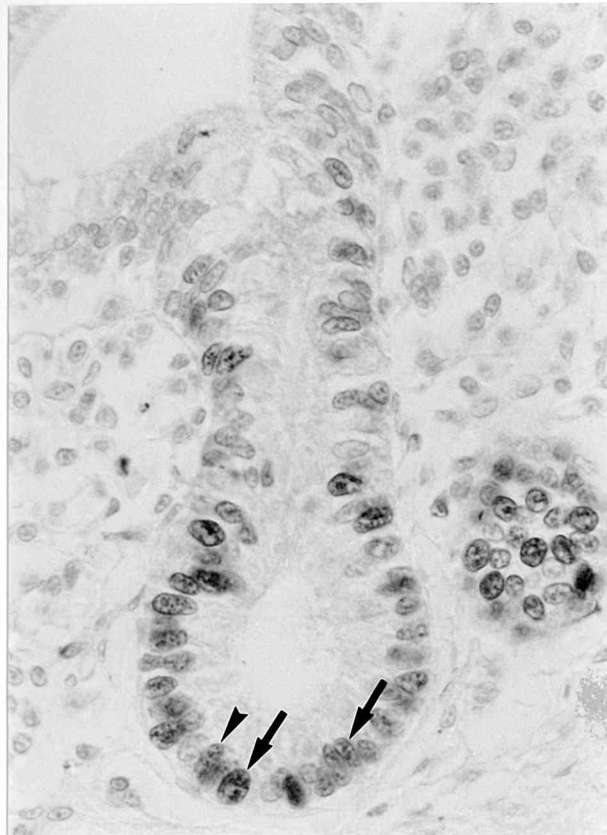


図 2: PCNAを検出した盲腸底における腸陰窩の縦断像。腸陰窩の底部に位置する上皮細胞は抗PCNAに対して強い陽性を示しているが(矢印), 腸陰窩の上方に位置する上皮細胞は弱い陽性を示している。腸陰窩の上皮内には抗PCNAに対して陽性を示すリンパ球も見られる(矢頭)。

対比染色 メチルグリーン染色 ×790

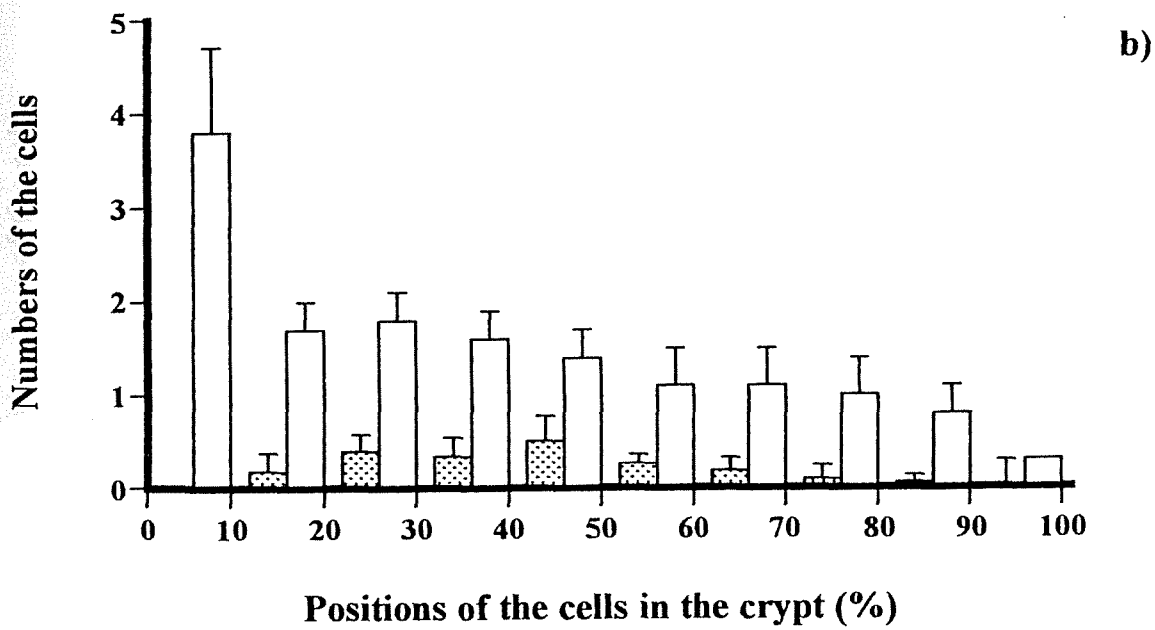
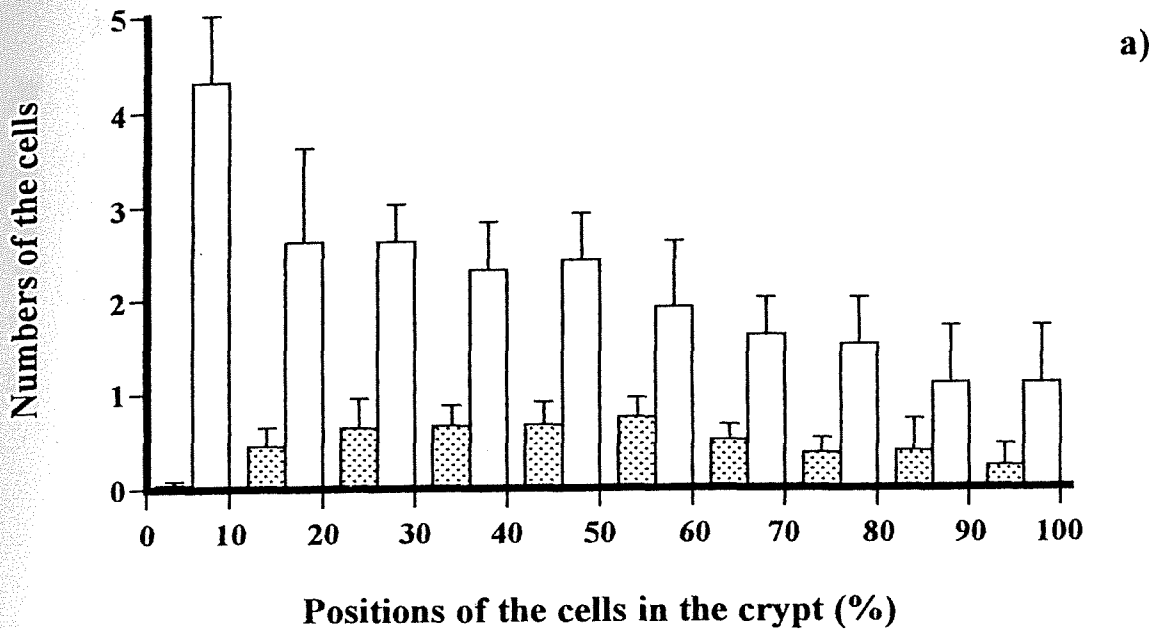


図 3: 盲腸底 (a) および盲腸尖 (b) の腸陰窩における分裂上皮細胞の分布 (■) と PCNA陽性上皮細胞の分布 (□)。腸陰窩における上皮細胞の位置は腸陰窩の底部を起点として百分率で表している。それぞれの点は腸陰窩の全長を100%とした時の各10%区間内における上皮細胞の分布の平均値を示す。

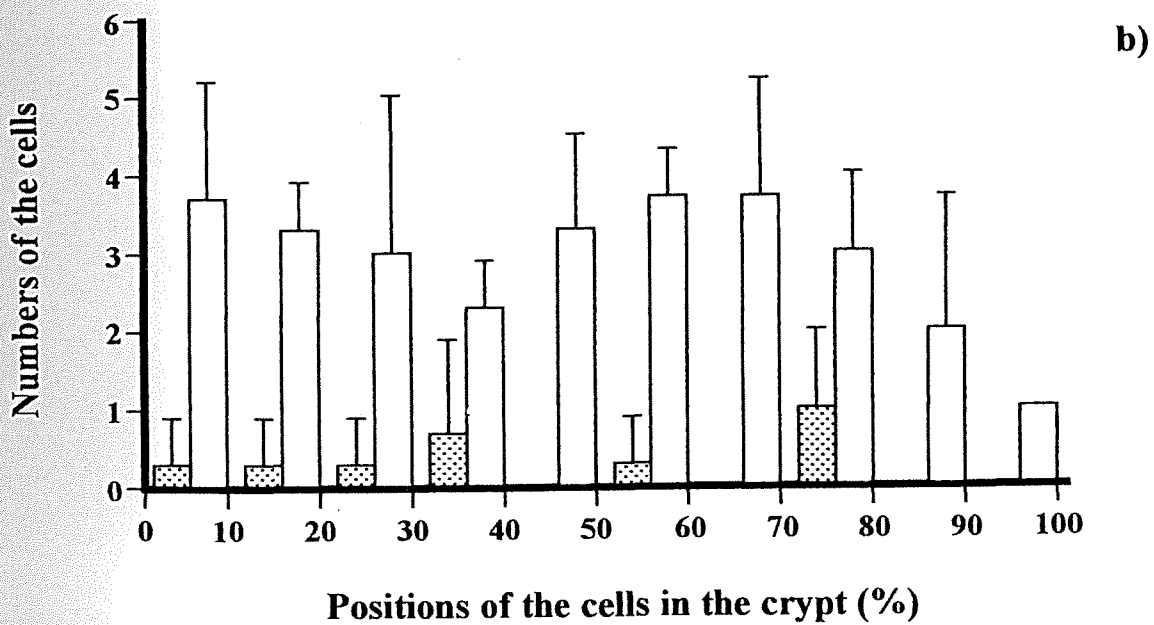
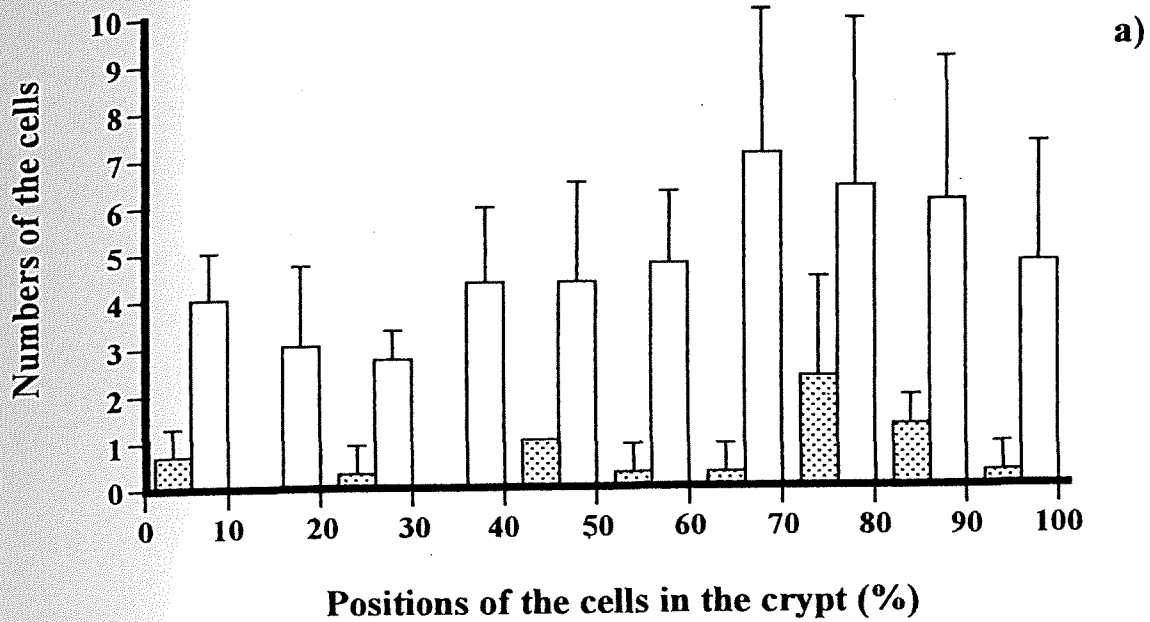


図 4: 盲腸扁桃の長い腸陰窩 (a) と短い腸陰窩 (b) における分裂上皮細胞の分布 (■) とPCNA陽性上皮細胞の分布 (□)。腸陰窩における上皮細胞の位置は腸陰窩の底部を起点として百分率で表している。それぞれの点は腸陰窩の全長を100%とした時の各10%区間内における上皮細胞の分布の平均値を示す。

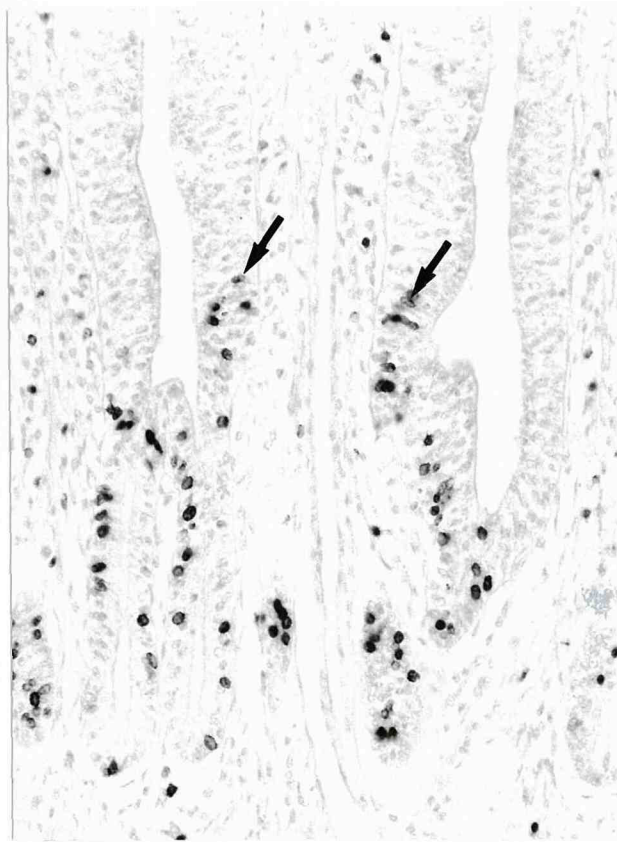


図 5: BrdU投与後1日の盲腸底の粘膜。BrdU陽性上皮細胞群の先頭が腸絨毛の基部に
みとめられる(矢印)。

対比染色 メチルグリーン染色 ×420

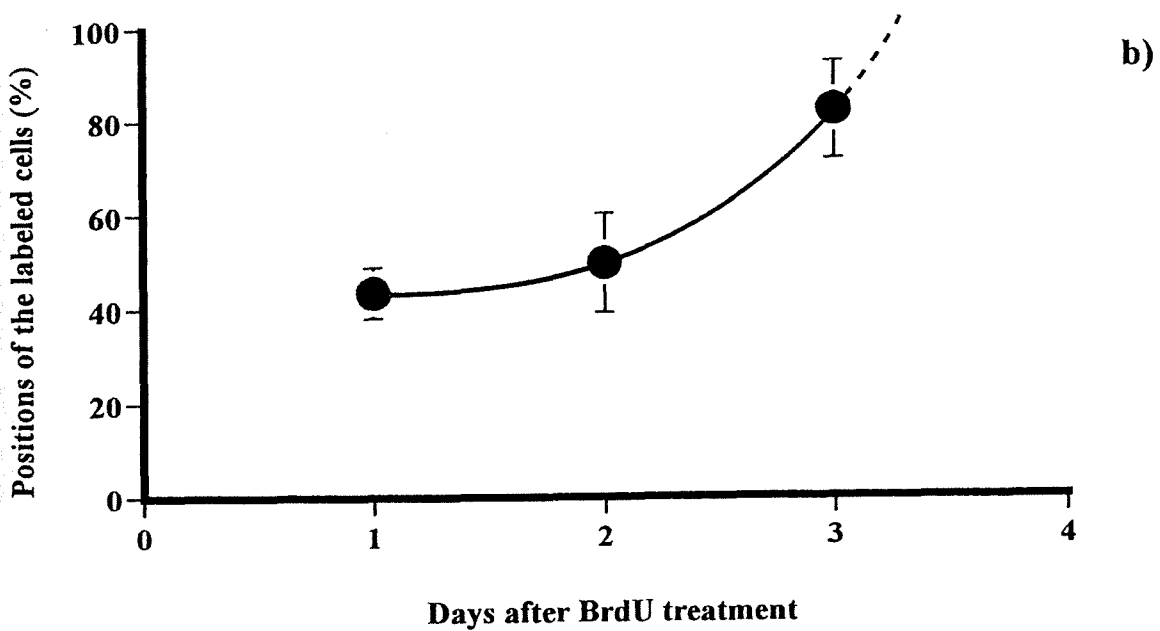
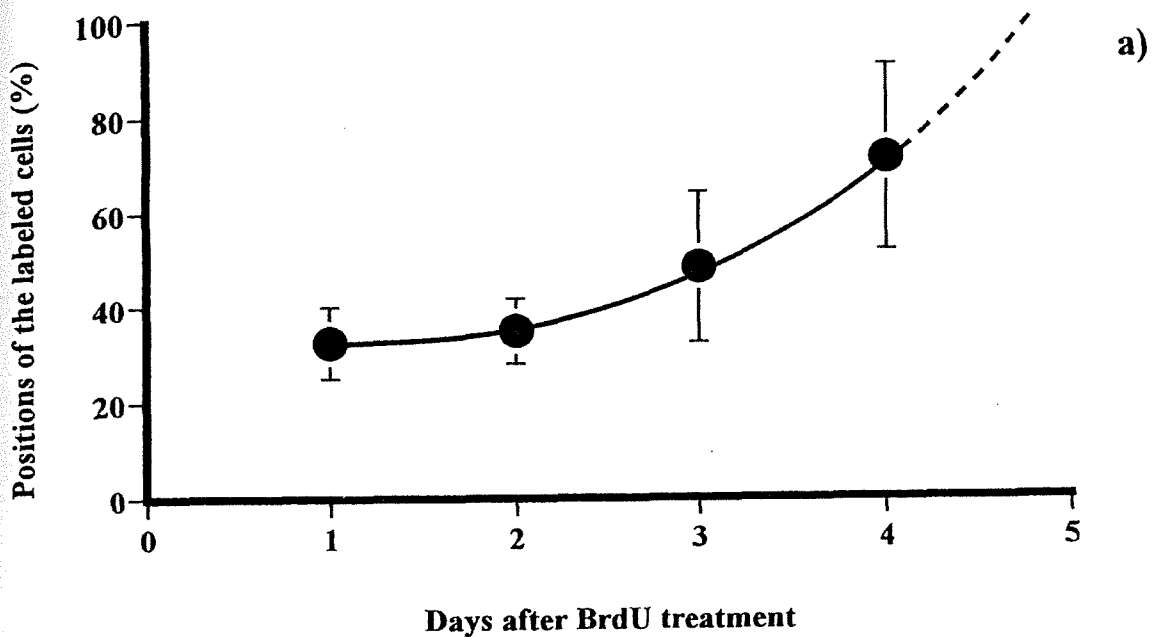


図 6: 盲腸底 (a) および盲腸尖 (b) におけるBrdU陽性上皮細胞の細胞動態。BrdU陽性上皮細胞の腸絨毛における位置を、腸陰窩の底部を起点として百分率で表している。それぞれの点はBrdUを投与後継時的に計測したBrdU陽性上皮細胞の分布の平均値を示す。

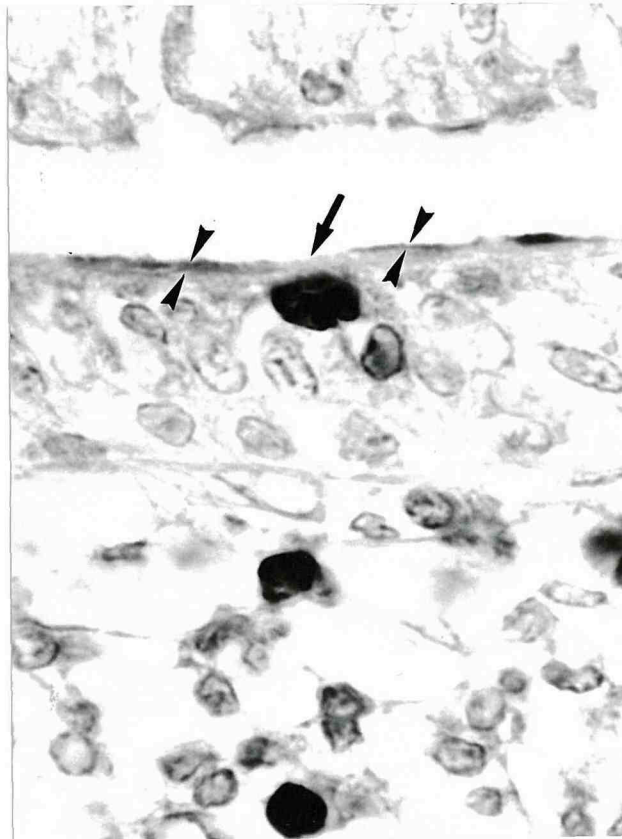


図 7: BrdU投与後1日の盲腸扁桃における微絨毛上皮細胞とM細胞。微絨毛上皮細胞はWGAに対して陽性を示しているが (矢頭) , M細胞はWGAに対して陰性を示している (矢印) 。

対比染色 メチルグリーン染色 ×420

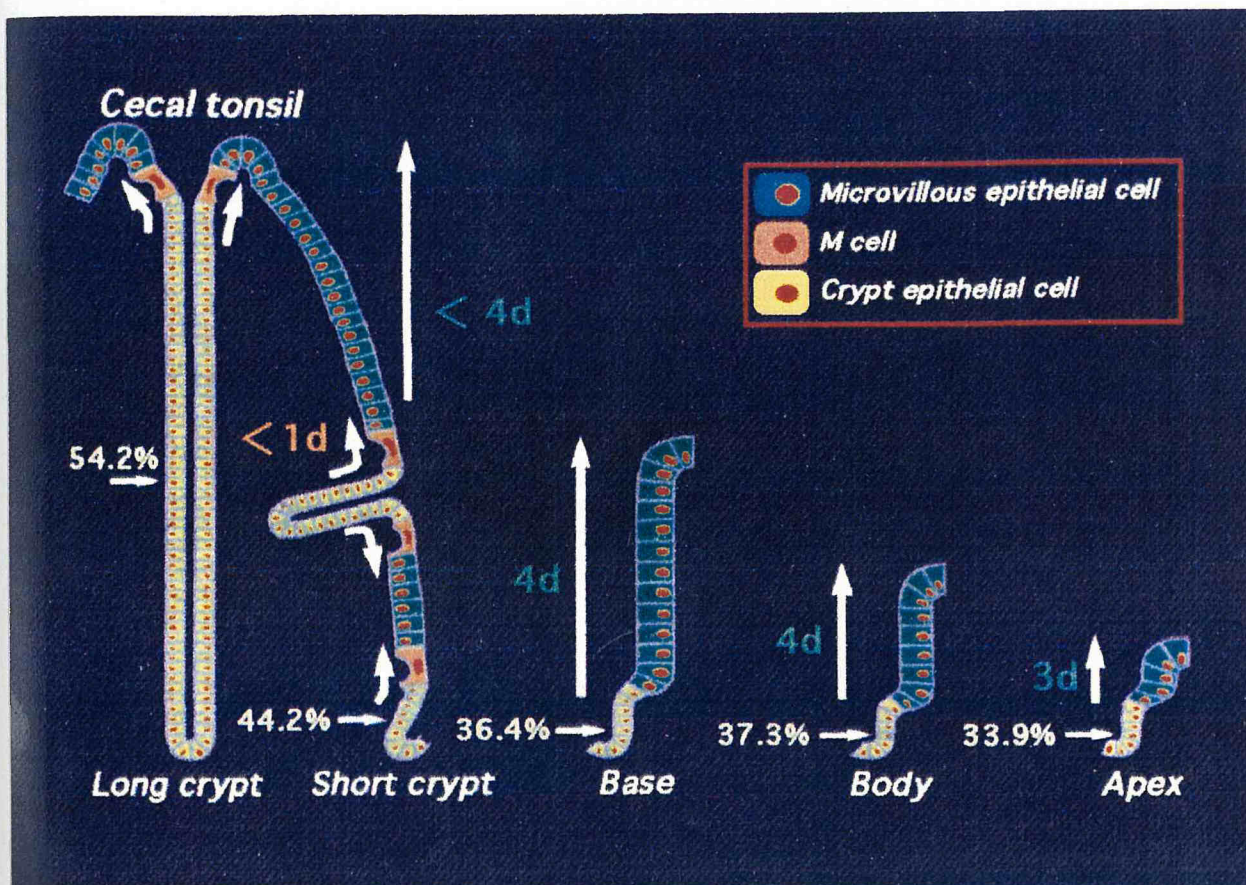


図 8: ニワトリ盲腸の上皮細胞の細胞動態。黄色い数字および小矢印は盲腸各部位の腸陰窩における上皮細胞の増殖部位の中心の位置を、緑の数字は上皮細胞の細胞寿命を示しており、大矢印は上皮細胞の移動する方向を示す。また盲腸扁桃におけるオレンジ色の数字は、腸陰窩で分裂したM細胞が濾胞被蓋上皮に出現するまでの時間を示す。

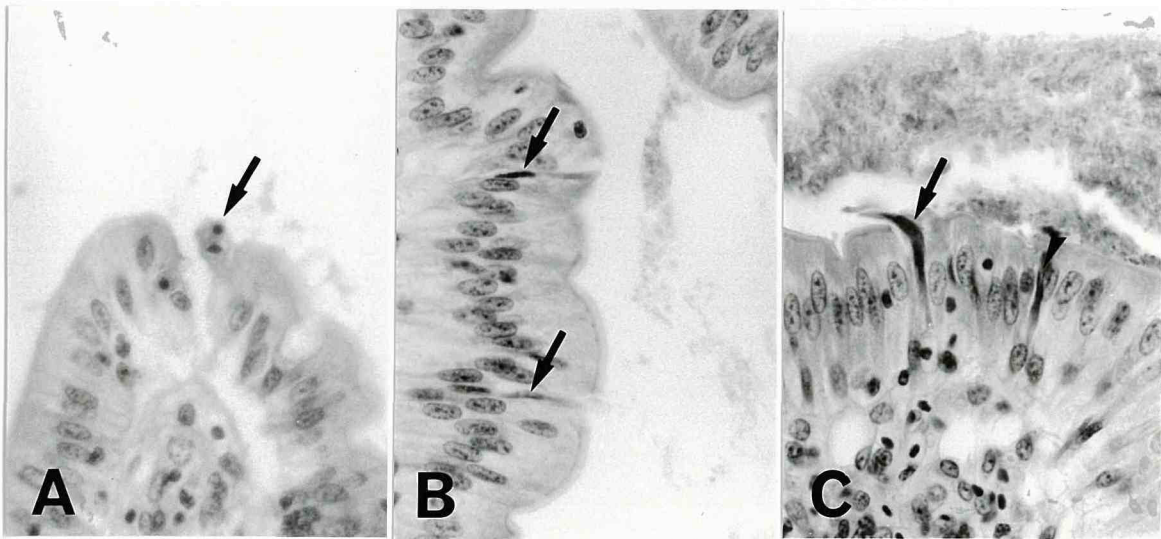


図 9: ニワトリ盲腸における上皮細胞のアポトーシス。(A)腸絨毛の先端。核の断片化を伴うアポトーシスを起こした上皮細胞が腸絨毛の先端から脱落する像がみとめられる(矢印)。(B)腸絨毛の上部。染色質の濃縮と細胞の縮小を示す細長い上皮細胞が腸絨毛の側面にみとめられる(矢印)。(C)濾胞被蓋上皮の上部。細長い濃縮した細胞体を有する上皮細胞が上皮内に見られ(矢印, 矢頭), 管腔内に脱落する像もみとめられる(矢印)。

ヘマトキシリンエオジン染色 ×600

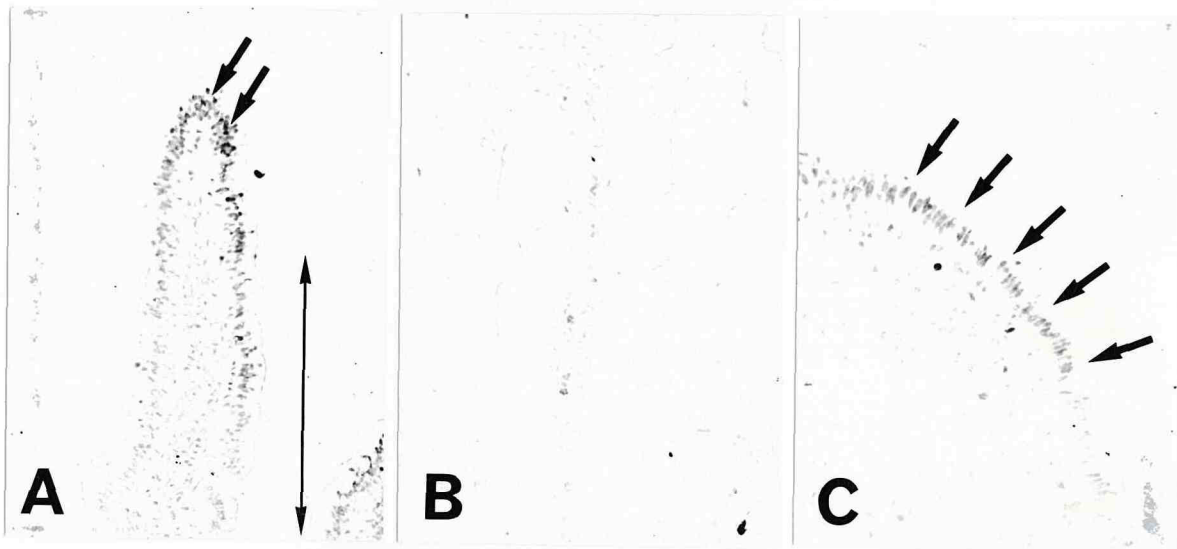


図 10: DNAの断片化を示す上皮細胞。(A) 腸絨毛の上部。強いDNAの断片化を示す上皮細胞が主に腸絨毛の先端付近にみとめられる(矢印)。腸絨毛の上部約1/2から1/4では弱いDNAの断片化を示す上皮細胞がみとめられる(矢印間)。(B) 腸絨毛の下部。DNAの断片化を示す上皮細胞はみとめられない。(C) 濾胞被蓋上皮の側面から頂部への移行部。強いDNAの断片化を示す上皮細胞が濾胞被蓋上皮の側面から頂部への移行部に集中している(矢印)。

対比染色 メチルグリーン染色 A: $\times 130$, B: $\times 130$, C: $\times 170$

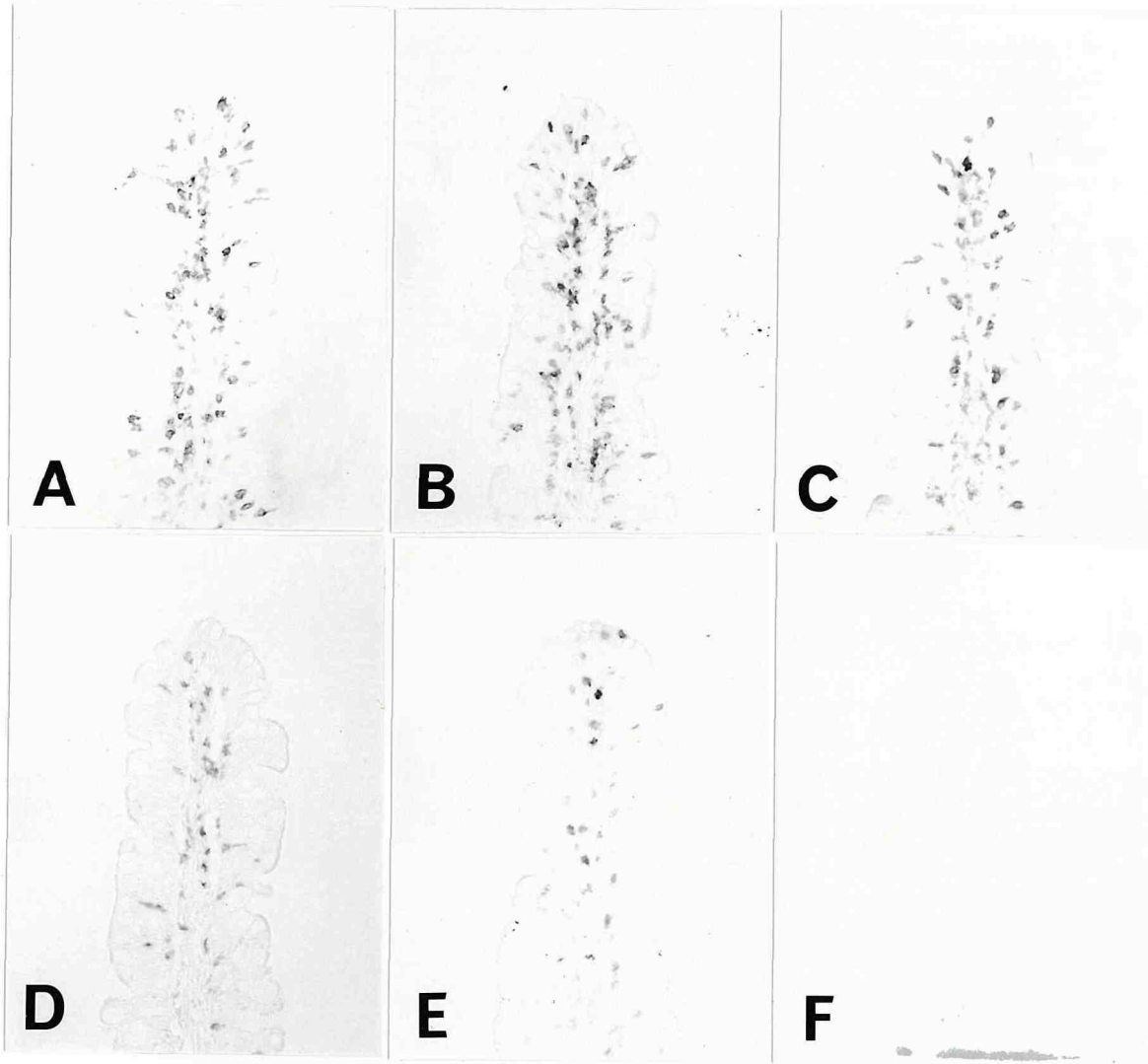


図 11: 同一の腸絨毛の上部におけるリンパ球のサブポピュレーション。(A)CD3⁺,
(B)CD8⁺, (C)TCR2⁺, (D)CD4⁺, (E)TCR1⁺および(F)TCR3⁺リンパ球。

対比染色 メチルグリーン染色 ×190

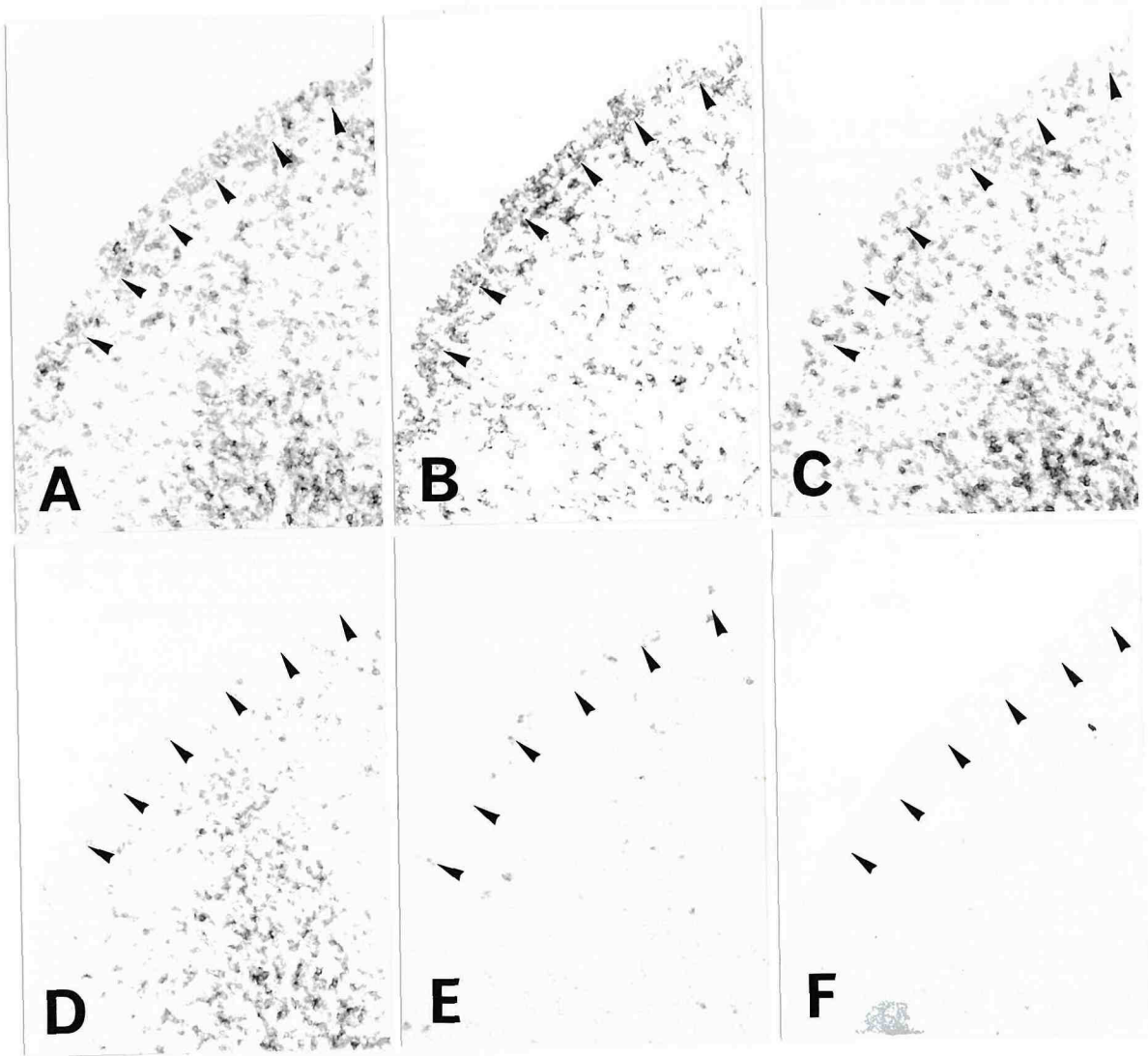


図 12: 同一の濾胞被蓋上皮の側面から頂部への移行部におけるリンパ球のサブ
 ポピュレーション。矢頭は上皮の基底膜を示す。(A) CD3⁺, (B) CD8⁺,
 (C) TCR2⁺, (D) CD4⁺, (E) TCR1⁺および(F) TCR3⁺リンパ球。

対比染色 メチルグリーン染色 ×140

END