

リンパ球における DNA-thymine の合成経路： オートラジオグラフィーによる研究

岡山大学医学部第一解剖学教室（主任：尾曾越文亮）

尾 曾 越 文 亮
植 木 絢 子
中 原 裕 子

〔昭和43年12月14日受稿〕

リンパ球には正常状態においても増殖能が強く、寿命の短いもの（胸腺リンパ球やリンパ節の芽中心細胞）と、正常状態では増殖能が弱く、寿命の長いもの（リンパ節における芽中心細胞以外の大多数のリンパ球）とが区別される。核 DNA への ^3H -thymidine (^3H -Tdr) のとりこみは、前者では後者におけるよりも著しく弱い。1~3) Lajtha¹⁾ によると、 ^{14}C や ^3H でラベルされた thymidine (Tdr) のとりこみは前者の型のリンパ球は弱く、後者の型のリンパ球では強いが、 ^{32}P のとりこみは逆に前者に強く、後者に弱いという。したがって、 ^{14}C や ^3H でラベルされた Tdr のとりこみの強さと、DNA 合成の強さとは必ずしも平行しないわけである。このことは、胸腺におけるリンパ球の分裂指数 (mitotic index) がリンパ節におけるよりも著しく高いことからみて明らかである (尾曾越1963⁴⁾、伊藤1959⁵⁾).

このように、DNA 合成の強さと Tdr のとりこみの強さが平行しないことは、まことに奇妙な現象であるが、これと関連して注目されるのは、胸腺では流血中にかなり大量に存在する deoxycytidine (Cdr) が deoxycytidine monophosphate (dCMP) deaminase と thymidylate (TMP) synthetase の存在によって DNA-thymine の合成に利用されるのに対して、リンパ節では上記の両酵素の活性が認められず、流血中の Cdr が DNA-thymine の合成に利用されないことが、杉野ら⁶⁾ によって明らかにされていることである。また、G. F. Maley と F. Maley (1959) によると、dCMP deaminase は成熟ラットでは胸腺と骨髄だけに活性が認められるにすぎないが、ラット胎仔やニワトリ胚、Novikoff 肝癌のように成長の速い組織ではあまねく高い活性をあらわすという。

われわれは、上述の諸事実に着目して、正常マウスの胸腺とリンパ節における ^3H -Tdr と ^3H -Cdr の

リンパ球へのとりこみを、オートラジオグラフィーによって追究し、胸腺リンパ球では DNA-thymine の合成に Cdr を利用するが、リンパ節リンパ球の大多数は利用しないことを立証した。

実験方法

1. In vivo 実験

実験方法：Db マウス（雄、生後3~6ヶ月、平均体重 25g）を3群に分け、第1群には specific activity が 5 Ci/mmmole の ^3H -thymidine (^3H -Tdr) を 200 $\mu\text{Ci}/\text{mouse}$ ($4 \times 10^{-8}\text{M}$)、第2群には specific activity が 500mCi/mmmole の ^3H -deoxycytidine を 400 $\mu\text{Ci}/\text{mouse}$ ($8 \times 10^{-7}\text{M}$)、第3群には ^3H -Tdr 200 $\mu\text{Ci}/\text{mouse}$ と cold deoxycytidine (Cdr) を 0.5 mg ($2 \times 10^{-6}\text{M}$) とをそれぞれ腹腔内に注射し、24時間後に胸腺と腸間膜根リンパ節をとり出した。使用した同位元素標識化合物は英国 Radiochemical Centre より購入したもの、cold deoxycytidine は米国 Worthington Biochemical Laboratory の製品で、以下の実験でも同じ標品を使用した。同一個体からとった胸腺とリンパ節を同一のスライドガラス上にならべて塗抹し、Carnoy 液で8分間固定、80%アルコールで数分間洗った後純アルコールで30分間脱脂、3時間の水洗の後 37°C 孵卵器で24時間以上乾燥した。

オートラジオグラフィー：サクラ NR-M2 乳剤を蒸留水で1:1に稀釈して 47°C に保ち、これに標本を浸して引上げ一晩乾かしてから、乾燥した箱に納めて冷暗所に保管した。 4°C で2~4週間露出した後、サクラ Konidol-X で5分間現像、富士 Fuji-fix で10分の定着の後、水洗してヘマトキシリン染色を行ない型の如く封入した。

標本の観察：強拡大 ($\times 600 \sim \times 1000$) のもとに Abbe 描画装置を用いて標本の一定区画内のすべ

での細胞を描画し、それぞれの核を標識している銀粒子数を核の輪廓内に記入した。この方法で、それぞれのプレパラートに塗抹された胸腺および腸間膜根リンパ節の細胞について、それぞれ1000個以上を観察した。この際、銀粒子数が4個以上のものを標識された細胞とみなした。

2. In vitro 実験

実験方法：Db マウス（雌，生後3～6ヶ月，平均体重25g）より無菌的に胸腺と腸間膜根リンパ節を摘出し，滅菌した少量の Locke 液中で被膜を破り，静かに振って細胞浮遊液を得た。被検動物を3群に分け，第1群より得た細胞浮遊液は specific activity が 5Ci/mmole の $^3\text{H-Tdr}$ を $1\mu\text{Ci/ml}$ ($2 \times 10^{-10}\text{M}$)，第2群より得た細胞浮遊液は specific activity が 500mCi/mmole の $^3\text{H-Cdr}$ を $1\mu\text{Ci/ml}$ ($2 \times 10^{-9}\text{M}$)，第3群より得たものは $^3\text{H-Tdr}$ を $1\mu\text{Ci/ml}$ と cold Cdr を 0.1mg/ml ($4 \times 10^{-7}\text{M}$) をそれぞれ含む Locke 液に加えて， 37°C で30分間の flash labeling を行なった。この際，細胞数が $10^8 \sim 10^{10}/\text{ml}$ となるように調整した。30分後，冷却してただちに Locke 液で2回洗い，同一個体から得た胸腺細胞とリンパ節細胞を同一スライドグラス上にならべて塗抹し，Carnoy 液で固定，前項で述べた実験におけると同様に標本を作製した。

オートラジオグラフィ：Kodack AR-10 フィルムを用いるストリッピング法によった。後の手技は前項の実験におけると同様である。

標本の観察：それぞれのプレパラートに塗抹された胸腺およびリンパ節細胞をそれぞれ500個以上調べた。検索の方法は既述の実験におけると同様である。

3. 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (5-FUdR) 投與実験

実験方法：Swiss マウス（雌，平均体重20g）を2群に分け，第1群には specific activity が 5Ci/mmole の $^3\text{H-Tdr}$ を $20\mu\text{Ci/mouse}$ ($4 \times 10^{-9}\text{M}$) のみを腹腔内に注射し，第2群には2mgの5-FUdRを腹腔内注射した後30分・60分・120分後に $^3\text{H-Tdr}$ を $20\mu\text{Ci/mouse}$ 腹腔内投与してから3時間後に胸腺と腸間膜根リンパ節をとり出して，既述の実験におけると同様に塗抹標本を作製した。5-FUdR はスイス Hoffmann La Roche の製品を使用した。

オートラジオグラフィおよび標本の検索：既述の実験におけると同様に行なった。

実験結果

1. In vivo 実験

Db マウスに $^3\text{H-Tdr}$ または $^3\text{H-Cdr}$ を投与した場合の胸腺および腸間膜根リンパ節内リンパ球の標識の度合は Table 1 に示す如くである。表にみられるように $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみによる細胞100個あたりの銀粒子の数は，リンパ節リンパ球に多く胸腺リンパ球にすくないが，細胞の標識される率は胸腺リンパ球のほうが高い。また，標識された細胞を比較すると細胞1個あたりの銀粒子の数はリンパ節リンパ球に多く，胸腺リンパ球にすくない。

他方， $^3\text{H-Cdr}$ のとりこみをみると Table 2 に示す如く，細胞100個あたりの銀粒子の数は胸腺リンパ球に多くリンパ節リンパ球にすくなく，著差が認められ，標識される率も胸腺リンパ球のほうが高いが標識された細胞1個あたりの銀粒子の数はリンパ節リンパ球のほうがやや高い。

流血中には $10\mu\text{g/ml}$ 程度の Cdr の存在が知られているが，さらに多量の cold Cdr を与えた場合，胸腺およびリンパ節リンパ球への $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみにどのような影響をおよぼすかを調べた。 $^3\text{H-Tdr}$

Table 1. Incorporation of $^3\text{H-thymidine}$ in vivo into lymphocytes of the thymus and mesenteric lymph node of adult Db mice 24 hours after a single intraperitoneal injection.

Differential cell and grain counts	No. 1		No. 2		No. 3		No. 4		No. 5		Mean \pm standard error	
	T*	L**	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L
Number of cells counted	1501	1210	1318	1148	1287	1005	1031	1063	1130	1118	—	—
Percent of cells labeled	9.7	6.4	11.5	7.1	18.1	18.9	12.3	8.2	16.4	12.4	13.6 \pm 1.6	10.5 \pm 2.3
Mean grain count	6.0	17.2	6.7	15.4	7.8	8.7	6.8	16.8	7.5	19.5	7.0 \pm 0.3	15.5 \pm 1.8
Maximum grain count	32	70	21	50	32	58	25	70	23	80	—	—
Grains per 100 cells	58	107	77	109	141	164	84	137	123	285	96.7 \pm 13.3	16.0 \pm 12.0

*T=Thymus

**L=Mesenteric lymph node

$^3\text{H-thymidine}$: 200 μCi /mouse

Table 2. Incorporation of ^3H -deoxycytidine in vivo into lymphocytes of the thymus and mesenteric lymph node of adult Db mice, 24 hours after a single intraperitoneal injection.

Differential cell and grain counts	No. 1		No. 2	
	T*	L**	T	L
Number of cells counted	1293	1106	1132	1106
Percent of cells labeled	15.7	9.7	22.5	5.5
Mean grain count	9.3	12.3	10.2	13.2
Maximum grain count	43	60	42	45
Grains per 100 cells	147	119	329	73

*T = Thymus **L = Mesenteric lymph node ^3H -deoxycytidine: $500\mu\text{Ci}/\text{mouse}$ Table 3. Effect of cold deoxycytidine on the incorporation of ^3H -thymidine in vivo into lymphocytes of the thymus and mesenteric lymph node of adult Db mice, 24 hours after the intraperitoneal injection.

Differential cell and grain counts	^3H -Tdr alone		^3H -Tdr + cold Cdr			
	T*	L**	No. 1		No. 2	
			T	L	T	L
Number of cells counted	—	—	1181	1145	792	518
Percent of cells labeled	13.6 ± 1.6	10.5 ± 2.3	2.7	6.8	6.1	6.8
Mean grain count	7.0 ± 0.3	15.5 ± 1.8	6.1	17.7	6.7	16.1
Maximum grain count	—	—	13	70	18	55
Grains per 100 cells	96.7 ± 13.3	16.0 ± 11.5	16.6	100	41	109

*T = Thymus **L = Mesenteric lymph node ^3H -thymidine: $200\mu\text{Ci}/\text{mouse}$ ($4 \times 10^{-8}\text{M}$)
cold deoxycytidine: $0.5\text{mg}/\text{mouse}$ ($2 \times 10^{-6}\text{M}$)

と同時に cold Cdr を投与した第3群における実験の結果は、Table 3 に示すとおりである。表にみられるように、 0.5mg の cold Cdr の投与によってリンパ節リンパ球への ^3H -Tdr のとりこみはほとんど影響されなかったが、胸腺リンパ球では著しい影響が認められ、細胞100個あたりの銀粒子の数が減少し、細胞の標識される率も低下した。

2. In vitro 実験

Db マウスの胸腺および腸間膜根リンパ節内リンパ球の flash label を行なって得た結果は Table 4 に示すとおりである。表にみられるように、 ^3H -Tdr を in vitro で単独投与すると、胸腺リンパ球へのとりこみは著しく高く、細胞100個あたりの銀粒子の数、細胞の標識率および標識された細胞1個あたりの銀粒子数などすべてリンパ節リンパ球におけるよりも高い値を示した。なお、リンパ節リンパ球は、in vivo 実験におけると同様に ^3H -Tdr の高いとりこみを示した。

他方、 ^3H -Cdr のとりこみは Table 4 に示す如く2種の細胞間で著しいちがいをみせ、胸腺リンパ球ではとりこみが高く、リンパ節細胞ではごくわずかにすぎなかった。

また、 ^3H -Tdr のとりこみに対する cold Cdr の影響をみると (Table 4 の右端)、 ^3H -Tdr の胸腺リンパ球へのとりこみは減少して in vivo 実験における結果に類似したとりこみの型を示した。これに対して、リンパ節リンパ球では ^3H -Tdr のとりこみは cold Cdr の添加によってほとんど影響をうけなかった。

3. 5-FUdR 投与実験

Swiss マウスに 5-FUdR を投与した後、一定の時間を経て ^3H -Tdr を腹腔内注射すると、Table 5 に示すように ^3H -Tdr のとりこみに対する 5-FUdR の影響は投与後60分で最も著明であった。また胸腺リンパ球とリンパ節リンパ球とを比較すると、胸腺リンパ球により強い影響がみられ、細胞100個あたり

Table 4. Incorporation of either ^3H -thymidine (^3H -Tdr) or ^3H -deoxycytidine (^3H -Cdr) in vitro into lymphocytes of the thymus and mesenteric lymph node of adult Db mice, with or without cold deoxycytidine (Cdr). (30 minutes after incubation.)

Differential cell and grain counts	^3H -Tdr alone				^3H -Cdr alone				^3H -Tdr + cold Cdr			
	No. 1		No. 2		No. 1		No. 2		No. 1		No. 2	
	T*	L**	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L
Number of cells counted	518	503	517	594	552	598	629	713	559	517	531	585
Percent of cells labeled	14.5	12.5	30.2	10.9	9.8	2.8	16.1	2.7	23.6	27.7	1.7	6.2
Mean grain count	18.6	13.1	22.8	13.6	25.3	9.2	24.9	15.8	6.0	10.0	5.0	21.4
Maximum grain count	60	60	90	50	60	27	60	35	26	60	7	80
Grain per 100 cells	269	164	689	148	248	26.4	400	42.2	141	276	8.5	132

* T = Thymus ** L = Mesenteric lymph node ^3H -Tdr: $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ($2 \times 10^{-10}\text{M}$)
 ^3H -Cdr: $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ($2 \times 10^{-9}\text{M}$) cold Cdr: $0.1\text{mg}/\text{ml}$ ($4 \times 10^{-7}\text{M}$)

Table 5. Effect of 5-fluoro-2'-deoxyuridine (5-FUdR) on the incorporation of ^3H -thymidine (^3H -Tdr) into lymphocytes of the thymus and mesenteric lymph node of adult Swiss mice.

Time after 5-FUdR (minutes)	Organ	Thymus				Mesenteric Lymph Node			
		Control	30	60	120	Control	30	60	120
Differential cell and grain counts									
Number of cells counted		709	702	793	924	723	1053	848	781
Percent of cells labeled		9.5	5.1	11.9	5.2	8.1	4.7	7.5	3.5
Mean grain count		10.3	20.8	27.6	7.8	33.8	38.5	49.1	49.3
Maximum grain count		27	103	150	20	75	94	150	80
Grains per 100 cells		97	106	328	41	274	181	368	173

5-FUdR: $2\text{mg}/\text{mouse}$ ^3H -Tdr: $20\mu\text{Ci}/\text{mouse}$, injected 3 hours before the examination.

の銀粒子数についてみると、5-FUdR の投与によって対照例の値の約3倍に増加した。

考 察

はじめに述べたように、オートラジオグラフィによって ^3H -Tdr のリンパ球へのとりこみを調べてみると、とりこみの様式に2つの型が区別される。尾曾越ら (1968)⁸⁾ は ^3H -Tdr で弱く標識されるリンパ球をA型、強く標識されるリンパ球をB型とし、A型としては胸腺リンパ球とリンパ節の芽中心細胞を、またB型としては芽中心細胞以外の大多数のリンパ節内リンパ球と、抗原と反応して活発に増殖する大型ピロニン好性芽細胞をあげている。Everett (1964)⁹⁾¹⁰⁾ は、A型のリンパ球は増殖能が強く寿命が短かいので short-lived lymphocytes、B型のリンパ球は正常状態では増殖能が弱く寿命が長いので long-lived lymphocytes と名付けている。

胸腺リンパ球とリンパ節リンパ球との間におけるこのような ^3H -Tdr のとりこみのちがいがどうして起るかについては、いろいろと論じられてきたが、松山ら (1960)¹¹⁾ はリンパ節リンパ球の分裂速度が胸腺リンパ球のそれより遅いためであろうと述べ、Everett と Tyler (1967)¹²⁾ は胸腺とリンパ節における血管構造のちがいに原因を求めている。また、Craddock (1960)¹³⁾ は細胞内の thymidine pool を問題とし、Lajtha (1960)¹⁴⁾ は胸腺リンパ球における DNA-thymine の合成には独自の経路があるのではないかと述べている。

本実験の結果はこの問題に対する明確な回答を与えるものである。すなわち、胸腺リンパ球は投与された ^3H -Tdr と ^3H -Cdr のどちらも利用し得るが、Cdr が流血中にかかなりの大量 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$ といわれている) に含まれている生体内では Cdr を利用する経路が優先して、 ^3H -Tdr の利用は比較的すくな

いことが、本実験の1と2によって立証された。しかし、Cdrの存在しない *in vitro* の条件下では、胸腺リンパ球もリンパ節リンパ球と同様に $^3\text{H-Tdr}$ を強くとりこむ。また、*in vitro* でも $^3\text{H-Tdr}$ と cold Cdr を同時に与えると、胸腺リンパ球による $^3\text{H-Tdr}$ の利用が著しく減少する。これに対して、リンパ節リンパ球は投与された $^3\text{H-Tdr}$ を多量に利用するが $^3\text{H-Cdr}$ の利用はわずかである。このことは、生体内でも *In vitro* の条件下でも同様であった。

上に述べたように、胸腺リンパ球とリンパ節リンパ球の間における $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみのちがいは、前者は流血中の Cdr を利用するのに対して後者は利用しないことによることが明らかにされた。したがって Cdr から DNA-thymine を合成する経路を遮断することによって、胸腺リンパ球をリンパ節リンパ球に変化せしめ得ることが予期される。そこで上述の経路において重要な役割を演ずる thymidylate (TMP) synthetase の活性を抑制する 5-FUdR を用いてこれを検討した結果、Cdr を利用する経路を遮断すると胸腺リンパ球における $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみが著しく増加することが、本実験の3によって立証された。

以上 DNA-thymine の合成経路が、胸腺リンパ球とリンパ節リンパ球とではちがうこと、そして 5-FUdR の投与によって胸腺リンパ球の DNA 合成様式をリンパ節リンパ球のそれに変えることが可能であることを述べたが、つぎにその生物学的意義についてすこし考察してみよう。

まず問題となるのは細胞の分化と DNA 合成との関係である。細胞の分化とは、Jacob と Monod (1963)¹⁴⁾ の定義にしたがえば「同一の genom を保持しながら、合成される蛋白質の pattern が異なってくること」である。リンパ球系や赤血球系の細胞について具体的にいうと、抗原や erythropoietin による刺激に感応する stem cell が抗体蛋白やヘモグロビンを合成する細胞に転化することが分化という現象である。従来はまだ特殊蛋白を合成しない stem cell における DNA 合成と、すでに特殊蛋白の合成を始めた、またはその準備の完了した細胞における DNA 合成とは、漠然と同じであると考えられてきたが、われわれの実験結果から、未分化の stem cell は DNA-thymine の合成に Cdr を利用し得るが分化の過程にあたる細胞は利用し得ないこと、かくして細胞の分化と DNA 合成の様式との間には密接な関係があることが推定される。しかも胸腺リンパ

球は免疫反応の主体をなすリンパ節内リンパ球の stem cell であろうという見解が、Miller (1961)¹⁵⁾、Good ら (1966)¹⁶⁾、Parrott ら (1966)¹⁷⁾、Miller と Mitchell (1967)¹⁸⁾、Mitchell と Miller (1968)¹⁹⁾ らの研究によって次第に固められつつあることはまことに興味深い、しかし、免疫担当細胞としてのリンパ球の stem cell に関しては、赤血球系細胞のそれと同様にまだ充分明らかにされていない。われわれの研究の結果は、この方向の究明における新しい指針として役立つことが期待される。

結 語

リンパ球には $^3\text{H-thymidine}$ ($^3\text{H-Tdr}$) の生体内投与によって、弱くラベルされるもの(胸腺リンパ球とリンパ節の芽中心細胞)と強くラベルされるもの(リンパ節における芽中心細胞以外の大多数のリンパ球)との2型が区別される。本研究は、 $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみの差が DNA-thymine の合成経路のちがいによることを、オートラジオグラフィを用いた実験によって明らかにしようとしたものである。

1. 生体内に投与した $^3\text{H-Tdr}$ は、リンパ節リンパ球には強くとりこまれるが、胸腺リンパ球におけるとりこみは著しく弱い。

2. 他の核酸前駆物質を含まない *in vitro* の条件下で $^3\text{H-Tdr}$ を投与すると、胸腺リンパ球における $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみは著しく強く、リンパ節リンパ球におけるとりこみを上廻る。

3. 生体内に投与した $^3\text{H-deoxycytidine}$ ($^3\text{H-Cdr}$) は、胸腺リンパ球には強くとりこまれるが、リンパ節リンパ球におけるとりこみは著しく弱い。これは他の核酸前駆物質を含まぬ *in vitro* の条件下でも同様である。

4. *In-vivo* 実験および *in-vitro* 実験のいずれにおいても、cold deoxycytidine の大量投与は胸腺リンパ球における $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみを著しく減少せしめるが、リンパ節リンパ球における $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみは大きな影響を受けない。

5. DNA 合成に関与する主要な酵素である thymidylate synthetase の抑制剤として知られている 5-FUdR の生体内投与によって、DNA-thymine の合成に流血中の deoxycytidine を利用する経路を遮断すると、胸腺リンパ球における $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみが著しく増強される。しかし、リンパ節リンパ球における $^3\text{H-Tdr}$ のとりこみは、5-FUdR の投与によって大きな影響を受けない。

文

献

- 1) Lajtha, L. G.: In: Ciba Foundation symposium on Haematopoiesis, edited by Wolstenholme, G. E. W. and O'connon, M. J. and A. Churchill LTD, London, 1960. P. 63.
- 2) Osogoe, B.: Turnover of the lymphocyte and the structure of lymph node. *Nippon Rinsho*, **22**, 2333—2341, 1964. (In Japanese.)
- 3) Cottier, H., Odartchenko, N., Feinendegen, L. E., and Bond, P.: Tritiated thymidine for in-vivo cytokinetic studies on lymphoreticular tissue. In: The thymus in immunobiology, edited by Good, R. A., and Gabrielson, A. E. 1964. Harper and Row, Publisher, New York. P. 332—340.
- 4) Osogoe, B.: Turnover of the lymphocyte population. Proceedings of the 16th Assembly of Japan Medical Congress. April 1963, Osaka. Vol. 1: 586—592. (In Japanese.)
- 5) Ito, H.: Quantitative studies on the Rate of Cell Production in the Thymolymphatic Organs. II. Estimation of the Daily Mitotic Activity in Young Adult Albino Rats. *Okajimas Fol. anat. jap.* **34**, 13—25, 1959.
- 6) Sugino, Y., Frenkel, E. P., and Potter, R. L.: Effect of X-radiation on DNA metabolism in various tissues of the rat. V. DNA metabolism in regenerating thymus. *Rad. Res.* **19**, 682—700, 1963.
- 7) Maley, G. F., and Maley, F.: Nucleotide inter-conversions in embryonic and neoplastic tissues. I. The conversion of deoxycytidylic acid to deoxyuridylic acid and thymidylic acid. *J. Biol. Chem.* **234**, 2975—2980, 1959.
- 8) Osogoe, B., Mihara, J., and Mori, K. J.: Kinetics of Lymphocyte Proliferation in the Immune Response. *Arch. histol. jap.* **27**, 57—62, 1966.
- 9) Everett, N. B., Caffrey, R. W., and Rieke, W. O.: Recirculation of lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **113**, 887—897, 1964.
- 10) Everett, N. B., Caffrey, R. W., and Rieke, W. O.: Radioautographic studies of the effect of irradiation on the long-lived lymphocytes of the rat. *Rad. Res.* **21**, 383—393, 1964.
- 11) Matsuyama, M., Wiadrowski, M. N., and Metcalf, D.: Autoradiographic analysis of lymphopoiesis and lymphocyte migration in mice bearing multiple thymus grafts. *J. Exp. Med.* **123**, 559—576, 1966.
- 12) Everett, N. B., and Tyler, R. W.: Lymphopoiesis in the thymus and other tissues: Functional implications. *Internat. Rev. Cytol.* **22**, 205—237, 1967.
- 13) Craddock, C. G.: In: A Ciba Foundation symposium on Haematopoiesis, edited by Wolstenholme, G. E. W., and O'connor, M. J. and A. Churchill LTD., London, 1960.
- 14) Jacob, F., and Monod, J.: In: *Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis*, edited by Locke, M. Acad. Press, New York, 1963. P. 30.
- 15) Miller, J. F. A. P.: Immunological function of the thymus. *Lancet* II: 748—749, 1961.
- 16) Good, R. A., Cooper, M. D., Peterson, R. D. A., Kellum, M. J., Sutherland, D. E. R., and Gabrielson, A. E.: The role of the thymus in immune process. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **135**, 451—478, 1966.
- 17) Parrott, D. M. V., de Sousa, M. A. B., and East, J.: Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.*, **123**, 191—204, 1966.
- 18) Miller, J. F. A. P., and Mitchell, G. F.: The thymus and the precursors of antigen reactive cells. *Nature* **216**, 659—663, 1967.
- 19) Mitchell, G. H., and Miller, J. F. A. P.: Immunological activity of thymus and thoracic-duct lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **59**, 296—303, 1968.

The Pathway of Synthesis of DNA-thymine in Lymphocytes: An Autoradiographic Study

By

Bunsuke OSOGOE, Ayako UEKI and Hir ko NAKAHARA

Ist Department of Anatomy, Okayama University Medical School
(Director: Prof. B. Osogoe)

It is well established that there are two types of lymphocytes. One of these is rapidly dividing and short-lived. The thymic lymphocytes and germinal-center cells of the lymphatic tissues belong to this type. The other is produced at a slow rate and has a long life span. With respect to the incorporation of ^3H -thymidine into DNA, the former type is characterized by weak labeling autoradiographically, in contrast to intense labeling in the latter type. Experiments in mice have demonstrated that the lymphocytes of the thymus are capable of synthesizing DNA-thymine endogeneously from deoxycytidine which is circulating in a considerable amount and hence to be weakly labeled with injected ^3H -thymidine. In contrast, the majority of lymphocytes of the lymph nodes were found to be incapable of synthesizing DNA-thymine endogeneously from deoxycytidine and hence to be intensely labeled with injected ^3H -thymidine. When the pathway of synthesis of DNA-thymine endogeneously from deoxycytidine was blocked by the administration of 5-fluoro-2'-deoxycytidine, the labeling intensity of the lymphocytes of the thymus with ^3H -thymidine was greatly increased. Experiments in vitro with or without adding cold deoxycytidine to the medium provided further evidence for the utilization of deoxycytidine for the synthesis of DNA-thymine in the lymphocytes of the thymus.
