

鶏脛骨軟骨異形成症におけるコラーゲンおよびグリコサミノグリカンの 局在に関する免疫組織化学的観察

池田 祥¹・山田宜永²・杉山稔恵²

¹新潟大学大学院自然科学研究科, 新潟市西区五十嵐二の町 8050 番地, 950-2101

²新潟大学農学部, 新潟市西区五十嵐二の町 8050 番地, 950-2101

ブロイラーの幼雛期における脚弱の原因として脛骨軟骨異形成症 (TD) があげられる。TD は、脛骨近位端の成長板に軟骨塊が蓄積して石灰化が阻害された結果、骨強度が低下し脚弱に至る。現在、飼料に Tetramethylthiuram disulfide (Thiram) を添加することによって人為的に TD を誘発し、TD 発症機構の解明が試みられているが、その発症機構は未だ明らかではない。そこで本研究では、TD 病変におけるコラーゲンとグリコサミノグリカンの局在について免疫組織化学的に観察し、脛骨近位端の成長板の変化を検討した。

TD を誘発するため Thiram 100 ppm を 8 日齢の雛に 2 日間給与した。その後、通常飼料で飼育し 20 日齢で脛骨近位端を採取し、パラフィン切片を作製し、組織化学的に観察した。

II 型、X 型コラーゲンの局在について免疫組織化学的に観察した結果、Thiram を無給与の対照区においては、これまで報告されているように II 型コラーゲンは増殖軟骨細胞層、X 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層で観察され、局在が明確に区別された。一方、Thiram 給与により誘発した TD 病変では X 型コラーゲンは対照区と同様に肥大軟骨細胞層で観察されたが、II 型コラーゲンは増殖軟骨細胞層に加え、病変部を含む肥大軟骨細胞層でも観察された。また、ケラタン硫酸、コンドロイチン-6-硫酸の免疫組織化学的観察では、対照区においてケラタン硫酸およびコンドロイチン-6-硫酸は肥大軟骨細胞層に局在が観察された。一方、TD 病変ではケラタン硫酸は病変部を含む広範囲の肥大軟骨細胞層で局在が観察され、コンドロイチン-6-硫酸は病変部では観察されず、肥大軟骨細胞層下部においてわずかに観察された。

以上のことから TD は成長板のコラーゲンならびにグリコサミノグリカンの分布の異常により、軟骨内骨化における軟骨細胞の分化と石灰化が抑制され発症するものと考えられる。

キーワード: 脛骨軟骨異形成症, 脚弱, コラーゲン, グリコサミノグリカン

緒 言

ニワトリの疾病のひとつとして、起立困難となる脚弱が知られている。脚弱に至る主たる原因として、脛骨近位端の軟骨内骨化不全による脛骨軟骨異形成症 (Tibial Dyschondroplasia: TD) が報告されている (Farquharson *et al.*, 1992; Cook, 2000)。TD は急速な成長を示すブロイラーの幼雛期で頻発し、七面鳥やアヒルなどにも発症する (Orth and Cook, 1994)。ブロイラーなどでは急速な体重増加に見合った骨の成長がみられず、軟骨内骨化の不均衡によって血管侵入が生じずに石灰化が阻害され、脛骨近位端の成長板に軟骨塊が蓄積し、発症すると考えられている (Stickens *et al.*, 2004; Raffetto and Khalil, 2008)。

成長板は、関節軟骨 (静止軟骨細胞層) 下の増殖軟骨細胞層、

肥大軟骨細胞層ならびに肥大軟骨細胞石灰化層の 3 つの層に分類され、各層の軟骨細胞は様々なホルモンやサイトカインの作用を受けて増殖・分化する (Stevens and Williams, 1999)。軟骨基質の大部分は水分からなり、その水分含量は約 75% に達する。残りは、主としてコラーゲンからなるタンパク質が 15%、プロテオグリカンが約 10% を占める。コラーゲンの大半は II 型コラーゲンであり、加えて X 型コラーゲン、I 型コラーゲン、IX 型コラーゲンおよび XI 型コラーゲンが少量存在する (Wardale and Duance, 1996)。これらのコラーゲンは骨端軟骨の成長板において特異的な局在を示し、軟骨内骨化における軟骨細胞の分化と石灰化に深く関与しており、II 型コラーゲンは関節軟骨と増殖軟骨細胞層に局在し、X 型コラーゲンは肥大軟骨細胞層に局在する (Phornphtkul and Gruppuso, 2009)。また、プロテオグリカンはコアタンパク質とグリコサミノグリカンが結合して形成されており、骨や軟骨における細胞の分化や石灰化を調整している。軟骨においては、ケラタン硫酸やコンドロイチン硫酸といったグリコサミノグリカンを構成要素にもつプロテオグリカンが豊富に含まれている (Funderburgh, 2000; Nakamura *et al.*, 2001; Lamoureux *et al.*, 2007)。TD 病変は、成長板において軟骨塊が残存するととも

2017 年 9 月 30 日受付, 2017 年 12 月 6 日受理

連絡者: 杉山稔恵

〒950-2181 新潟市西区五十嵐 8050 番地

Tel: 025-262-6666

Fax: 025-262-6666

E-mail: sugiyama@agr.niigata-u.ac.jp

に、肥大軟骨細胞層において石灰化が起こらないことが特徴である (Whitehead, 1995)。したがって、TD 発症には、コラーゲンやプロテオグリカンの局在に変化が生じることによって軟骨内骨化に影響を及ぼしていることが考えられる。

そこで、本研究では TD 病変部におけるコラーゲンならびにグリコサミノグリカンの局在について免疫組織化学的に観察し、正常なものと比較した。

材料と方法

(1) 供試動物

供試動物として、20羽の0日齢のプロイラー雄を用いた。その内、10羽はTD病変を観察するため、Rathらの方法(2007b)に従ってTDを誘発した。すなわち、生後0日齢より7日齢まで通常飼料(肥育前期飼料)で飼育した後、8日齢より2日間、Tetramethylthiuram disulfide (Thiram; Sigma, St. Louis) を100ppm (100mg/kg) 添加した飼料を給与した(Thiram 給与区)。その後、再び通常飼料を給与し、生後20日齢で脛骨近位端を採取した。また、残りの10羽は生後0日齢より20日齢まで通常飼料を給与し、対照とした。なお、本実験は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

(2) 材料採取ならびに組織切片の作製

採取した右脛骨近位端は、デンタルカッターにて縦断し、TD病変の有無をRathらの方法(2004)に従い調べた。また、縦断した脛骨近位端は、10%ホルマリン緩衝液(pH7.0)にて室温で約4日間浸漬固定した。その後、10%EDTA溶液(pH7.4)を用いて約10日間の脱灰を行なった。脱灰後、アルコール上昇系列にて脱水し、パラフィンに包埋した。パラフィン切片は、マイクロトームRM2135 (Leica, Wetzlar) を用いて5 μ mに作製した。

(3) Azan 染色、コラーゲンとグリコサミノグリカンの免疫組織化学的観察

組織学的に脛骨近位端の成長板を観察するために、作製したパラフィン切片をAzan染色によるコラーゲン線維の染色を施した。また、免疫組織化学法については、パラフィン切片を0.01Mリン酸緩衝液(PBS)にて洗浄し、コラーゲンの局在を観察する際は、ヒアルロニダーゼを含むPBS(68mg/ml)を用いて、37°C恒温下にて30分間の酵素処理を施した。その後、PBSにて洗浄し、非特異的反応を阻止するため、1%ヤギ正常血清を含むPBS(ブロッキング溶液)にて、室温で30分間反応させた。続いて、II型およびX型コラーゲン、グリコサミノグリカンのケラタン硫

酸ならびにコンドロイチン-6-硫酸に対する一次抗体をブロッキング溶液にて、それぞれ適切な濃度に希釈し、パラフィン切片に4°Cで一晩反応させた(表1)。PBSで洗浄後、ブロッキング溶液にて200倍希釈したビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体(Vector Laboratories, Inc, CA)またはビオチン化ヤギ抗マウスIgM抗体(Vector Laboratories, Inc.)を二次抗体として用いて、室温で30分間反応させた。最後に、PBSで洗浄後、パラフィン切片にアルカリフォスファターゼ標識アビジン・ビオチン複合体(Vector Laboratories, Inc.)を室温で30分間反応させ、PBSにて洗浄後、Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma-Aldrich)により目的とするコラーゲンおよびグリコサミノグリカンの局在を赤く発色させた。水溶性封入剤で封入し、光学顕微鏡にて組織像を観察した。なお、免疫組織化学的観察の陰性対照として一次抗体もしくは正常血清を用いた。また、各組織化学的観察における成長板の長さを画像解析ソフトウェアNIS-Elements (Nikon, Tokyo)にて計測した。計測値は、平均±標準誤差で示した。

(4) 統計処理

成長板の長さは統計解析ソフト JMP9 (SAS Institute Japan, Osaka) を用いて統計解析を行い、 $p < 0.05$ 値を示すものを有意な差があるものと判定した。

結 果

(1) 臨床症状

Thiram 給与区では、15日齢で起立および歩行が困難のものが観察され、20日齢で全てのプロイラーが跛行を呈し脚弱に陥っていた。一方、対照区では、試験期間を通じて起立ならびに歩行困難を示すものはみられなかった。

(2) Azan 染色による組織化学的観察

Azan 染色を施した結果、対照区の正常な成長板においては、増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層にわたる領域で淡青色にコラーゲン線維が染まり、血管と近接した肥大軟骨細胞層石灰化部は濃く青色に染まっていた。また、橙色を呈した細胞が成長板の肥大軟骨細胞層に点在していた(図1A)。Thiram 給与区では、軟骨塊を含む成長板において広範囲にわたってコラーゲン線維が淡く染まっており、肥大軟骨細胞層において橙色を呈した細胞はほとんど観察されなかった。(図1B)。また、対照区の肥大軟骨細胞層および病変部を拡大して観察した結果、対照区では、全ての軟骨小腔に軟骨細胞が存在しており、軟骨細胞が肥大し、軟骨小腔が拡張していた(図2A)。一方、病変部においても軟骨小腔

表 1. 一次抗体および希釈濃度

一次抗体	会社名	希釈濃度
Mouse monoclonal to collagen type II	Acris antibodies GmbH	250 倍
Mouse monoclonal to collagen type X	Santa Cruz Biotechnology	500 倍
Mouse monoclonal to keratan sulfate	生化学工業	200 倍
Mouse monoclonal to chondroitin-6-sulfate	生化学工業	200 倍

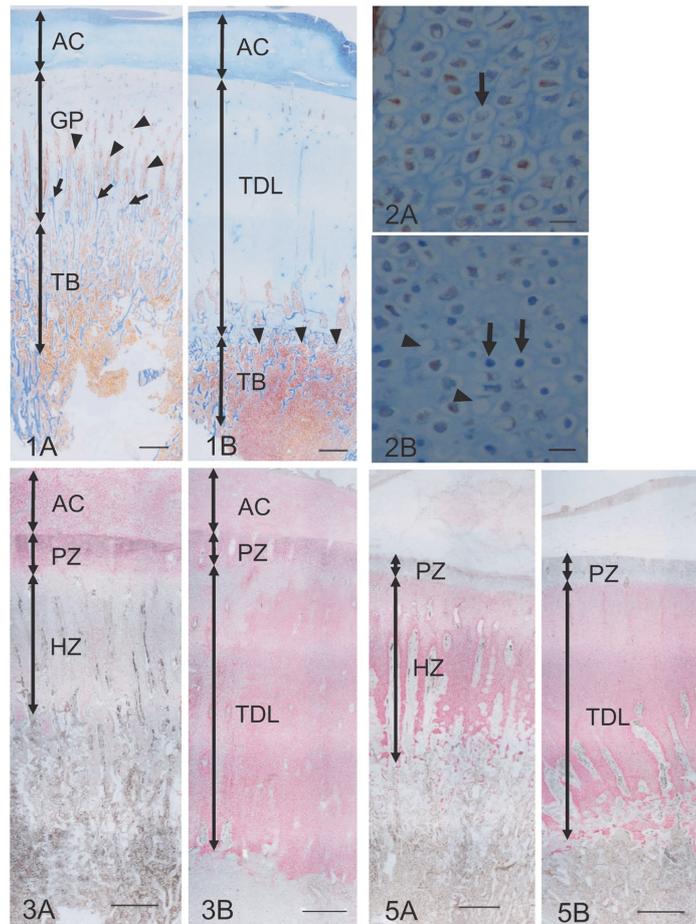


図 1. 脛骨近位端. Azan 染色. AC: 関節軟骨. GP: 成長板. TDL: TD 病変. TB: 海綿骨. Bar=1mm.
1A. 対照区.

成長板のコラーゲン線維が淡青色に染色され、血管に近接している肥大軟骨細胞層石灰化部位は濃い青色に染色された(矢印). また、橙色を呈した細胞を含む血管が成長板の深部にまで侵入していた(矢頭).

1B. Thiram 給与区.

病変部により成長板が肥厚しており、広範囲においてコラーゲン線維が淡い青色に染色されていた. 成長板への血管侵入はほとんどみられず、橙色を呈した細胞を含む血管は海綿骨周辺においてのみ染色が見られ(矢頭)、濃い青色に染色される肥大軟骨細胞層石灰化部は少なかった.

図 2. 肥大軟骨細胞層. Azan 染色. Bar=20 μ m.

2A. 対照区.

正常な肥大軟骨細胞層. 全ての軟骨小腔に軟骨細胞が存在し、軟骨細胞が肥大し軟骨小腔が拡大していた(矢印).

2B. Thiram 給与区.

TD 病変部における肥大軟骨細胞層. 対照区の肥大軟骨細胞層と同様に軟骨小腔の拡張がみられた. しかしながら、軟骨細胞の萎縮(矢印)や消失(矢頭)が多数みられた.

図 3. 脛骨近位端における II 型コラーゲンの局在. AC: 関節軟骨. PZ: 増殖軟骨細胞層. HZ: 肥大軟骨細胞層. TDL: TD 病変. Bar=1mm.

3A. 対照区.

II 型コラーゲンは、増殖軟骨細胞層(PZ)および関節軟骨(AC)に局在していた.

3B. Thiram 給与区.

TD 病変部を含む成長板で広範囲に渡り II 型コラーゲンの局在が観察された.

図 5. 脛骨近位端における X 型コラーゲンの局在. PZ: 増殖軟骨細胞層. HZ: 肥大軟骨細胞層. TDL: TD 病変. Bar=1mm.

5A. 対照区.

X 型コラーゲンの局在は、肥大軟骨細胞層のみで観察された.

5B. Thiram 給与区.

TD 病変部を含む肥大軟骨細胞層で広範囲に渡り X 型コラーゲンの局在が観察された.

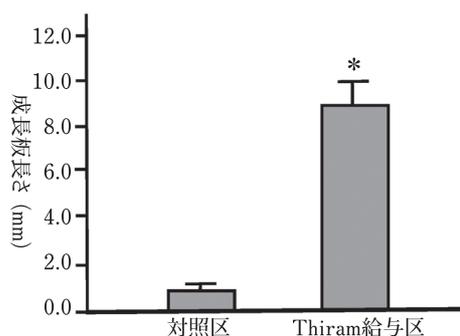


図 4. II型コラーゲンを含む成長板の長さ。平均±S.E. * $p < 0.05$ vs 対照区。

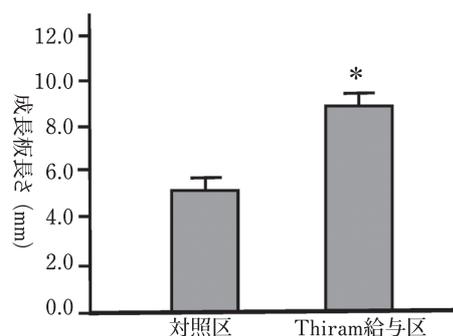


図 6. X型コラーゲンを含む成長板の長さ。平均±S.E. * $p < 0.05$ vs 対照区。

の拡張がみられたが、軟骨細胞の萎縮や消失が多数みられた (図 2B)。

(3) コラーゲンの免疫組織化学的観察

コラーゲンの局在は、アビジン・ビオチン複合体に標識したアルカリフォスファターゼによって形成された赤色のアゾ色素産物として観察された。II型コラーゲンは、対照区の脛骨近位端の成長板において、増殖軟骨細胞層の軟骨基質に観察された (図 3A)。一方、Thiram 給与区では、増殖軟骨細胞層に加え、軟骨塊を有する肥大軟骨細胞層にも観察され (図 3B)、対照区 (1.23 ± 0.07 mm) と比較してII型コラーゲンの局在は有意に拡大していた (9.38 ± 0.30 mm) (図 4)。また、X型コラーゲンは、正常な脛骨近位端の成長板において、肥大軟骨細胞層の軟骨基質で局在を示す赤色の免疫反応が観察された (図 5A)。Thiram 給与区の成長板では、対照区の成長板と同様に肥大軟骨細胞層で免疫反応を示す赤色が観察され (図 5B)、対照区 (5.27 ± 0.20 mm) と比較してX型コラーゲンの局在は有意に拡大していた (8.68 ± 0.33 mm) (図 6)。

(4) グリコサミノグリカンの免疫組織化学的観察

ケラタン硫酸とコンドロイチン-6-硫酸の局在は、アビジン・ビオチン複合体に標識したアルカリフォスファターゼによって形成された赤色のアゾ色素産物として観察された。ケラタン硫酸は、対照区の脛骨近位端の成長板において、肥大軟骨細胞層の軟骨基質に観察された (図 7A)。Thiram 給与区では、病変部である軟骨塊を含む広範囲の肥大軟骨細胞層で観察され (図 7B)、対照区と比較してケラタン硫酸の局在は拡大していた。また、正常な脛骨近位端の成長板におけるコンドロイチン-6-硫酸の局在は、ケラタン硫酸同様に肥大軟骨細胞層の軟骨基質で局在を示す赤色の免疫反応が観察された (図 8A)。一方、Thiram 給与区の脛骨近位端の成長板では、病変部である肥大軟骨細胞層上部において観察されず、肥大軟骨細胞層下部においてわずかに局在が免疫反応を示す赤色が観察され (図 8B)、対照区と比較してコンドロイチン-6-硫酸の局在は広範囲で減少していた。

考 察

本研究において、ブロイラーに Thiram 添加飼料を給与したところ、全ての個体に脛骨近位端に軟骨塊の残存がみられ、TD が

発症していた。このことは、これまでに報告 (Rath *et al.*, 2004; 2007a; 2007b) されているように、Thiram はブロイラーにおいて TD を効率的に誘発することが示された。

Azan 染色による組織化学的観察では、肥大軟骨細胞層は淡青色に染色され、肥大軟骨細胞層の石灰化部ならびに成長板下の海綿骨は濃青色に染色された。この染色性の違いは、軟骨基質の線維構造が異なっていることを示している。すなわち、肥大軟骨細胞層は細線維構造を示さずに散在したX型コラーゲンからなり、肥大軟骨細胞層石灰化部および海綿骨は軟骨から石灰化した骨に置換され、密な細線維構造を呈するI型コラーゲンからなっている。しかしながら、Thiram 給与区において淡青色に染色された部分が広範囲にみられたことから、X型コラーゲンを主とする肥大軟骨細胞層が拡大していることが考えられる。また、この領域において橙色を呈した細胞はみられなかったことから、血管の侵入はほとんどないものと考えられる。さらに対照区の肥大軟骨細胞層軟骨細胞の拡大と Thiram 給与区の病変部の拡大を比較したところ、ともに軟骨小腔の拡張がみられたが、Thiram 給与区の TD 病変では軟骨細胞の萎縮と消失が多数みられ、すでに細胞死に陥っているものと推測される。

TD 病変におけるコラーゲンの局在について免疫組織化学的に観察した結果、正常な成長板ではこれまでの報告通り、II型コラーゲンは増殖軟骨細胞層に局在し、X型コラーゲンは肥大軟骨細胞層に局在していた (Kirsch and Wuthier, 1994; Knopov *et al.*, 1997; Pines *et al.*, 1998)。しかしながら、TD においては、II型コラーゲンは増殖軟骨細胞層だけに留まらず、病変部の肥大軟骨細胞層においても局在していた。また、X型コラーゲンは肥大軟骨細胞層に局在していたが、TD の発症によりその局在は拡大していた。このことは、TD 病変においては肥大軟骨細胞層においてII型コラーゲンとX型コラーゲンが同時に存在していることを示しており、増殖軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層への軟骨基質の成熟が不十分であることが示唆される。同様の結果として、自然発症した TD およびビタミン D 欠乏によるくる病のニワトリでも *in situ hybridization* 法によりII型コラーゲンの mRNA の局在を観察した結果、TD 病変部の周囲の肥大軟骨細胞層においても発現がみられたという (Pines *et al.*, 1998; Ben-Bassat *et al.*, 1999)。一方で、TD について同様にII型コラーゲンの mRNA の発現を

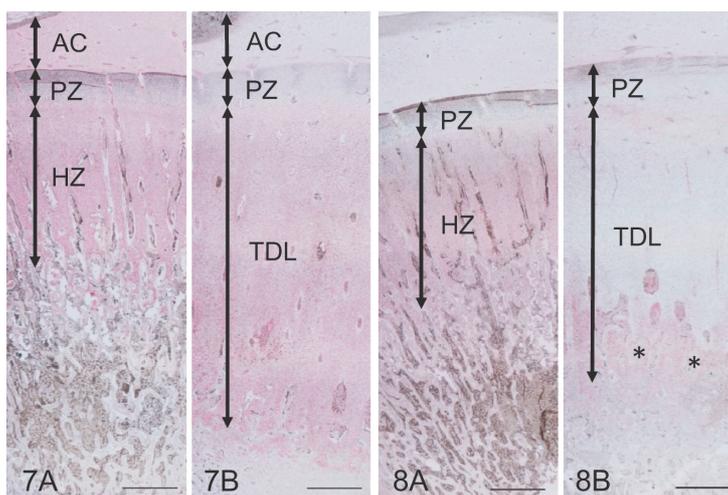


図 7. 脛骨近位端におけるケラタン硫酸の局在. AC: 関節軟骨. PZ: 増殖軟骨細胞層. HZ: 肥大軟骨細胞層. TDL: TD 病変. Bar=1 mm.

7A. 対照区.

ケラタン硫酸の局在は、肥大軟骨細胞層で観察された。

7B. Thiram 給与区.

増殖軟骨細胞層下部の TD 病変部を含む広範囲の肥大軟骨細胞層にケラタン硫酸の局在が観察された。

図 8. 脛骨近位端におけるコンドロイチン-6-硫酸の局在. PZ: 増殖軟骨細胞層. HZ: 肥大軟骨細胞層. TDL: TD 病変. Bar =1 mm.

8A. 対照区.

コンドロイチン-6-硫酸の局在は、ケラタン硫酸同様に肥大軟骨細胞層において観察された。

8B. Thiram 給与区.

TD 病変部を含む肥大軟骨細胞層上部においてその局在は観察されず、肥大軟骨細胞層下部でコンドロイチン-6-硫酸の局在 (*) がわずかに観察された。

検討したところ、正常と変わらず増殖軟骨細胞に発現していたとの報告もある (Hasky-Negev *et al.*, 2008)。

II型コラーゲンは、肥大軟骨細胞層においてマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)-13の分解作用を受け消失する (Sakakura, 2010)。したがって、TD 病変では肥大軟骨細胞層におけるMMP-13の発現が抑制されているものと推測された。実際、ゼラチンザイモグラフィを用いたMMP-13の検出やRT-PCRを用いたMMP-13のmRNAの発現においてTD 病変ではMMP-13が減少していることが示唆されている (Rath *et al.*, 1997; Velada *et al.*, 2011)。哺乳類でも、MMP-13ノックアウトマウスでは肥大軟骨細胞層が拡大し、TDと類似した組織像を示すことが明らかにされている (Inada *et al.*, 2004; Stickens *et al.*, 2004)。II型コラーゲンの分解産物は、軟骨細胞の増殖を抑制して、その後の分化を引き起こすことが知られている (Tchetina *et al.*, 2007)。これらのことから、TDは増殖軟骨細胞から肥大軟骨細胞への移行が行なわれたのにもかかわらず、II型コラーゲンの分解が起こらず、軟骨細胞の正常な肥大軟骨細胞への分化が阻害された結果生じたものと推測される。

軟骨基質の主要なグリコサミノグリカンであるケラタン硫酸およびコンドロイチン硫酸は、コアタンパク質と結合しアグリカン形成する (Kiani *et al.*, 2002)。アグリカンは、軟骨基質の主たるプロテオグリカンであり、軟骨の80%を占める水分を保有し、

ゲル化して体重負荷に対する耐性を付与している。加えて、無血管組織である軟骨において水分は軟骨細胞への唯一の血管からの栄養分や軟骨細胞分化調節因子の補給方法である (Sophia Fox *et al.*, 2009)。このアグリカンの機能にとって、コンドロイチン硫酸の存在はとりわけ重要であり、ヒトの軟骨ではコンドロイチン硫酸の減少に伴って軟骨の水分含量は減少し、変形性関節症を引き起こすことが示唆されている (Dudhia, 2005)。また、コンドロイチン硫酸は軟骨細胞のコラーゲン生成を促進し、軟骨細胞の肥大化を引き起こすことが示されており、コンドロイチン硫酸が軟骨細胞の分化を調節する (Stocum DL *et al.*, 1979)。本研究において、Thiram 給与の骨端軟骨病変部上部の肥大軟骨細胞層において、コンドロイチン硫酸の局在が欠如していた。このことは、TDではアグリカンが正常に機能せず、軟骨細胞が直接体重付加の影響を受けるとともに、栄養分や分化調節因子の不足により細胞死に至っているものと推測される。これらのことからグリコサミノグリカンの局在が変化することにより軟骨細胞の分化に影響を及ぼし、成長板における軟骨の各細胞層の構成に変化を生じさせたと考えられる。すなわち、TD 病変においては正常にグリコサミノグリカンの分布やその濃度が保たれないことによって、軟骨細胞が正常に分化せず、あるいは軟骨細胞の細胞死を誘導して軟骨内骨化の異常が生じていると推測される。

以上の結果から、TDを発症したプロイラーの脛骨近位端で

は、正常なものとは異なり、肥大軟骨細胞層においてII型コラーゲンならびにX型コラーゲンが混在しており、更にプロテオグリカンの主要な構成要素であるコンドロイチン硫酸の局在に異常が生じることにより、軟骨細胞の分化・成熟に影響を及ぼし、正常な軟骨内骨化が阻害されTDが発症するものと推測される。

引用文献

- Ben-Bassat S, Genina O, Lavelin I, Leach RM and Pines M. Parathyroid receptor gene expression by epiphyseal growth plates in rickets and tibial dyschondroplasia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 149 : 185-195. 1999.
- Cook ME. Skeletal deformities and their causes : Introduction. *Poultry Science*, 79 : 982-984. 2000.
- Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62 : 2241-2256. 2005
- Farquharson C, Whitehead C, Rennie S, Thorp B and Loveridge N. Cell proliferation and enzyme activities associated with the development of avian tibial dyschondroplasia : An in situ biochemical study. *Bone*, 13 : 59-67. 1992.
- Funderburgh JL. Keratan sulfate : Structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology*, 10 : 951-958. 2000.
- Hasky-Negev M, Simsa S, Tong A, Genina O and Monsonego Ornan E. Expression of matrix metalloproteinases during vascularization and ossification of normal and impaired avian growth plate. *Journal of Animal Science*, 86 : 1306-1315. 2008.
- Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MU, Miyaura C, Lopez-Otin C, Krane M. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 : 17192-17197. 2004.
- Kirsch T and Wuthier RE. Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *Journal of Biological Chemistry*, 269 : 11462-11469. 1994.
- Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ and Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Research*, 12 : 19-32. 2002.
- Knopov V, Hadash D, Hurwitz S, Leach RM and Pines M. Gene expression during cartilage differentiation in turkey tibial dyschondroplasia, evaluated by in situ hybridization. *Avian Diseases*, 41 : 62-72. 1997.
- Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D and Redini F. Proteoglycans : Key partners in bone cell biology. *BioEssays*, 29 : 758-771. 2007.
- Nakamura H, Hirata A, Tsuji T and Yamamoto T. Immunolocalization of keratan sulfate proteoglycan in rat calvaria. *Archives of Histology and Cytology*, 64 : 109-118. 2001.
- Orth MW and Cook ME. Avian tibial dyschondroplasia : A morphological and biochemical review of the growth plate lesion and its causes. *Veterinary Pathology*, 31 : 403-404. 1994.
- Phornphutkul C and Gruppuso PA. Disorders of the growth plate. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 16 : 430-434. 2009.
- Pines M, Knopov V, Genina O, Hurwitz S, Faerman A, Gerstenfeld LC and Leach RM. Development of avian tibial dyschondroplasia : Gene expression and protein synthesis. *Calcified Tissue International*, 63 : 521-527. 1998.
- Raffetto JD and Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 75 : 346-359. 2008.
- Rath NC, Huff WE, Balog JM, Bayyari GR and Reddy RP. Matrix metalloproteinase activities in avian tibial dyschondroplasia. *Poultry Science*, 76 : 501-505. 1997.
- Rath NC, Huff WE, Balog JM and Huff GR. Comparative efficacy of different dithiocarbamates to induce tibial dyschondroplasia in poultry. *Poultry Science*, 83 : 266-274. 2004.
- Rath NC, Huff WE, Huff GR and Kannan L. Induction of tibial dyschondroplasia by carbamate and thiocarbamate pesticides. *Avian Diseases*, 51 : 590-593. 2007a.
- Rath NC, Kannan L, Pillai PB, Huff WE, Huff GR, Horst RL and Emmert JL. Evaluation of the efficacy of vitamin D3 or its metabolites on thiram-induced tibial dyschondroplasia in chickens. *Research in Veterinary Science*, 83 : 244-250. 2007b.
- Sakakura Y. Role of matrix metalloproteinases in extracellular matrix disintegration of Meckel's cartilage in mice. *Journal of Oral Biosciences*, 52 : 143-149. 2010.
- Sophia Fox AJ, Bedi A and Rodeo SA. The basic science of articular cartilage : Structure, composition, and function. *Sports Health*, 1 : 461-468. 2009.
- Stevens DA and Williams GR. Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151 : 195-204. 1999.
- Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P and Werb Z. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*, 131 : 5883-5895. 2004.
- Stocum DL, Davis RM, Leger M and Conrad HE. Development of the tibiotarsus in the chick embryo : Biosynthetic activities of histologically distinct regions. *Embryology and Experimental Morphology*, 54 : 155-170. 1979.
- Tchetina EV, Kobayashi M, Yasuda T, Meijers T, Pidoux I and Poole AR. Chondrocyte hypertrophy can be induced by a cryptic sequence of type II collagen and is accompanied by the induction of MMP-13 and collagenase activity : Implications for development and arthritis. *Matrix Biology*, 26 : 247-258. 2007.
- Velada I, Capela-Silva F, Reis F, Pires E, Egas C, Rodrigues-Santos P and Barros MT. Expression of genes encoding extracellular matrix macromolecules and metalloproteinases in avian tibial dyschondroplasia. *Journal of Comparative Pathology*, 145 : 174-186. 2011.
- Wardale RJ and Duance VC. Collagen expression in chicken tibial dyschondroplasia. *Journal of Cell Science*, 109 : 1119-1131. 1996.
- Whitehead CC. The role of vitamin D metabolites in the prevention of tibial dyschondroplasia. *Animal Feed Science and Technology*, 53 : 205-210. 1995.

Immunohistochemical Localizations of Collagens and Glycosaminoglycans in Chicken Tibial Dyschondroplasia

Sho Ikeda¹, Takahisa Yamada² and Toshie Sugiyama²

¹ Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan

² Department Agrobiolology, Niigata University, 2-8050 Ikarashi, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan.

Leg weakness in broiler chickens is a skeletal disease associated with economic loss and an animal welfare problem. The disease is largely caused by tibial dyschondroplasia (TD), characterized by a residual uncalcified cartilage mass in the tibial epiphyseal growth plate. TD also decreases bone strength, consequently leading to bone weakness. The present study was conducted to clarify the localizations of collagens and glycosaminoglycans in TD, and to discuss the pathogenesis of TD. In the study, TD was artificially induced by the protocol of Rath *et al.* (2007). Specifically, 8-day-old broiler chicks were fed a 100 ppm tetramethylthiuram disulfide (Thiram)-containing diet only for 2 days, and the proximal ends of their tibiae were dissected after 10 days. Thereafter, the localizations of collagens and glycosaminoglycans in the epiphyseal growth plates were investigated immunohistochemically. In control chicks (without Thiram-feeding), type II collagen was localized in the proliferative zone of the epiphyseal growth plates, and type X collagen was observed in the hypertrophic zone, as previously reported. In contrast to the control chicks, typical TD lesions were observed in the growth plates of Thiram-fed chicks, and type II collagen was distributed in both the proliferative and hypertrophic zones. However, the localization of type X collagen in Thiram-fed chicks was the same as that in control chicks. Two glycosaminoglycans, keratan sulfate and chondroitin-6-sulfate, were localized in the hypertrophic zone in control chicks. In Thiram-fed chicks, chondroitin-6-sulfate was deficient in the hypertrophic zone of TD lesions, and a weak distribution of chondroitin-6-sulfate was only observed underneath the TD lesions. Keratan sulfate was widely observed in TD lesions, but its distribution was limited in the hypertrophic zone. The present results suggest that modified localizations of collagens and glycosaminoglycans can inhibit chondrocyte differentiation and maturation as well as endochondral ossification, and that TD lesions develop as a consequence.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 55 : J1-J7, 2018)

Key words : collagens, glycosaminoglycans, leg weakness, tibial dyschondroplasia