

マウス膵臓細胞と回腸上皮細胞の蛋白質合成のラジオオートグラフ的研究, 特に2核細胞について

昭和42年10月4日受付

信州大学医学部第一解剖学教室

(主任: 尾持昌次教授)

柴 田 治

A Radioautographic Study on the Protein Synthesis in the Pancreatic Acinar and the Ileum Epithelial Cells of Mice, with Special Reference to Binucleate Cells

Osamu SHIBATA

First Department of Anatomy, Shinshu University
(Director: Prof. Sh. Omochi)

多くの腺組織の細胞でしばしば観察される2核細胞は、1核細胞の無糸核分裂によって生じたもので、この出現は細胞機能の昂進と関係があることが Nagata 等^{①②}, Omochi^③により説明されている。2核細胞についてこのような意義づけがなされるまでには、2核細胞の観察し易い種々の腺組織^{④⑤}あるいは消化管上皮^{⑥⑦⑧}において、この事実は確められてきた。腺組織の細胞機能は分泌物の生成と排出であり、消化管上皮ではそれは多くの場合に消化された物質の吸収として示される。したがって、殊に消化腺のような組織細胞では、分泌物を形成している物質の合成が細胞機能のほとんどすべてと思われる。この様な観点から、最近では具体的に物質代謝の面より2核細胞の機能が検討されている。例えば、RNA代謝の鍵となるDNA、また主として蛋白質代謝と密接な関係をもつRNAについて、1核細胞と2核細胞におけるこれら核酸の代謝能が比較されている^{⑨⑩⑪⑫}。それによると、いずれの場合も2核細胞は1核細胞よりDNAあるいはRNAの合成能が大であった。

こゝには、生物体にとって必須成分である蛋白質の代謝が、細胞核の数とどのような関係にあるかを知るために行なった実験の結果を報告する。

材料と方法

体重15gのマウスの雄6匹を実験に用いた。これらのマウスは完全栄養の人工食を与えて飼育していたもので、実験前1週間は給餌時間を午前9時から10時までの1時間に制限したが、水は自由に与えた。実験当日にはこれらを3匹ずつ2群に分け、実験群1には³H-leucineを、実験群2には³H-tryptophaneを各1.5mcずつ、午前9時に各個体の腹腔内に注射し

た。各実験群で、1匹は実験当日には給餌せずに放射性アミノ酸を注射後1時間30分(午前10時30分)に殺した。残りの2匹は当日のみ午前9時30分から10時の間に通常のように給餌して、注射後1時間30分(食後では1時間、午前10時30分)と4時間30分(食後では4時間、午後1時30分)にそれぞれ1匹ずつを殺した。したがって各群3匹のうち2匹は殺した時間は同じであったが、一方は当日絶食させたものであり、他は通常と変わらずに食餌を与えていたものである。3匹目は食後4時間のものということになる。

各個体は電気ショックで麻酔後直ちに閉腹し、膵臓と回腸を取り出して細切してからRanvier 1/8アルコールに入れた。これ以後、細胞分離標本のラジオオートグラフをつくるまでの過程はNagata等の方法^⑬によった。ラジオオートグラフは浸漬法によってつくったが、写真乳剤としては、さくらラジオオートグラフ用乳剤NR-MIを用いた。露出は62日間行ない、SDX-1で20°C5分間現像後ヘマトキシリン・エオジンで細胞を染色した。分離標本をつくる際に組織の一部を10%ホルマリンで固定、パラフィン包埋して5μの切片とした。この切片についても同様にしてラジオオートグラフをつくり、分離標本を観察する際の参考とした。なお、切片標本もヘマトキシリン・エオジン染色である。

こうして得られた分離された細胞のラジオオートグラフで、各個体の膵臓と回腸について1核細胞と2核細胞を各々10個ずつ無作為にえらび、細胞に標識された銀粒子数を核と細胞質に分けて数えた。回腸の場合には絨毛と腸陰窩に区別して、それぞれの細胞10個ずつについて数えた。2核細胞も同様10個について数えたが、2核細胞は絨毛の細胞にのみ見られるから、

1核細胞と2核細胞を比較する場合には絨毛における1核細胞をその対象とした。こうして得られた計測値はすべて推計学的に処理をして比較した。

結 果

膵臓に関してえられた結果は Table 1, 3 と Fig.

1, 2 に示した。兩種アミノ酸共に、銀粒子数は絶食したマウスより給食したものにおいて少なくなり (Fig. 5, 6, 7), 殊に細胞質でその減少は著しかった。しかし、食後1時間から4時間の間の銀粒子数の変化は ^3H -tryptophane と ^3H -leucine とで全く逆となった。すなわち、 ^3H -tryptophane では、食後4時間

Table 1. Mean grain counts of the nucleus and the cytoplasm of 10 mononucleate and 10 binucleate cells in the pancreatic acinar cells of the mice injected with tritium labelled tryptophane.

experimental group	nuclearity			
	mononucleate		binucleate	
	nucleus	cytoplasm	nucleus	cytoplasm
1	25.8 ± 9.2	164.1 ± 26.6	50.6 ± 18.8	230.2 ± 40.5
2	13.6 ± 8.2	106.9 ± 31.1	18.6 ± 11.4	57.1 ± 26.1
3	17.4 ± 8.2	124.4 ± 28.9	27.7 ± 13.5	139.6 ± 7.8

Table 2. Factorial design of the data listed in Table 1.

	SS	DF	Ms
N	10378.80	2-1=1	10378.80**
E	72016.02	3-1=2	36008.01**
Z	418428.30	2-1=1	418428.30**
N × E	31961.45	2	15980.73**
E × Z	27803.85	2	13901.93**
N × Z	821.63	1	821.63
N × E × Z	361050.22	2	180525.11**
R (NEZ)	81753.40	108	756.98
I NEZ	1004213.67	120-1=119	

N : Nuclearity; mononucleate and binucleate cells.

E : Experimental group; experiment 1, 2 and 3.

** : Stochastically significant in 1% level of significance.

* : Stochastically significant in 5% level of significance.

Table 3. Mean grain counts of the nucleus and the cytoplasm of 10 mononucleate and 10 binucleate cells in the pancreatic acinar cells of the mice injected with tritium labelled leucine.

experimental group	nuclearity			
	mononucleate		binucleate	
	nucleus	cytoplasm	nucleus	cytoplasm
1	17.6 ± 8.6	114.3 ± 39.7	18.3 ± 11.2	125.8 ± 38.1
2	10.2 ± 8.7	83.8 ± 34.8	14.4 ± 14.9	99.2 ± 42.6
3	7.3 ± 3.8	61.6 ± 18.1	10.7 ± 7.7	88.9 ± 25.5

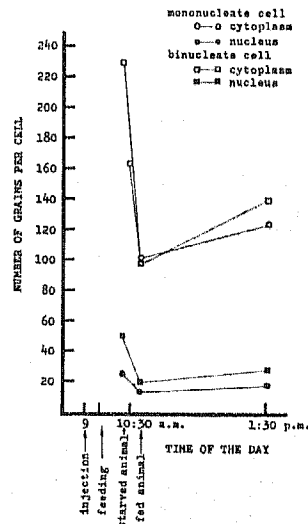


Fig. 1. Change in the number of silver grains with the feeding in the pancreatic acinar cells of the mice injected with ^3H -tryptophane.

の方が1時間よりすべての場合に銀粒子数は増加したが、³H-leucine では逆にすべての場合に減少した。

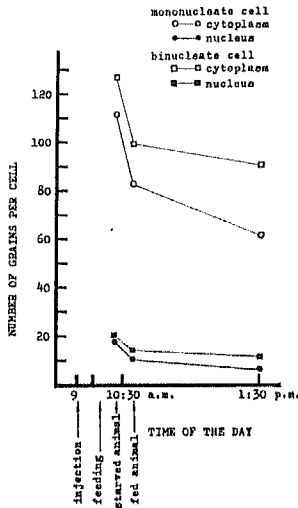


Fig. 2. Change in the number of silver grains with the feeding in the pancreatic acinar cells of the mice injected with ³H-leucine.

Table 4. Factorial design of the data listed in Table 3.

	SS	DF	Ms
N	3255.22	2-1=1	3255.22*
E	14803.03	3-1=2	7401.57**
Z	204270.02	2-1=1	204270.02**
N × E	435.50	2	217.75
E × Z	6591.10	2	3295.55*
N × Z	755.66	1	755.66
N × E × Z	77487.47	2	38743.74**
R(N E Z)	76211.90	108	705.67
I N E Z	383809.90	120-1=119	

Abbreviations are the same as in Table 2.

Table 5. Mean grain counts of the nucleus and the cytoplasm of 10 mononucleate and 10 binucleate cells in the ileum epithelial cells of the mice injected with tritium labelled tryptophane.

experimental group	nuclearity					
	mononucleate				binucleate	
	villi		crypt		nucleus	cytoplasm
	nucleus	cytoplasm	nucleus	cytoplasm	nucleus	cytoplasm
1	16.0 ± 8.3	55.8 ± 13.0	20.4 ± 6.2	57.2 ± 17.4	34.2 ± 12.6	75.8 ± 19.6
2	22.1 ± 9.8	60.6 ± 12.4	25.3 ± 10.8	61.3 ± 12.6	51.6 ± 22.9	95.4 ± 19.4
3	16.4 ± 8.1	61.3 ± 18.2	26.2 ± 11.3	49.6 ± 10.2	33.7 ± 13.3	63.0 ± 28.9

また、1核細胞、2核細胞ともに核より細胞質の方が銀粒子数は顕著に多く、食餌の有無、食後の経過時間に伴う銀粒子数の変動も細胞質の方が大であった。

³H-tryptophane を注射して給餌した場合、食後1時間では、細胞質の銀粒子数は1核細胞より2核細胞で僅かではあるが少なくなった。しかし、他の場合にはすべて2核細胞の方が1核細胞より銀粒子数は多かった。³H-leucine を注射した時の経過時間に対する銀粒子数の変化は、³H-tryptophane の場合と全く逆に減少したとはいえ、2核細胞は1核細胞より常に多くの³H-leucine を取込んでいた (Fig. 8)。

上述の如く、実験 (G)、細胞核の数 (N)、銀粒子の計測場所 (核あるいは細胞質) (Z) の違いで生じた銀粒子数の変動を推計学的に要因分析して得られた結果 (Table 2, 4) は、これらの変動がいずれも1%の危険率で有意であることを示した。すなわち、2核細胞は1核細胞より、また細胞質は核より常に多量の³H-tryptophane、または³H-leucine を取込んでいたといえる。

回腸について得られた結果は Table 5 と 7, Fig. 3 と 4 に示した。一般的な傾向として、膀胱の場合とは全く逆に食餌によって標識銀粒子数は増加した (Fig. 13, 14) が、食後4時間には再び減少した。

³H-tryptophane 注射の場合には (Fig. 15)、腸陰窩細胞の核と1核細胞の細胞質で、食後1時間より4時間の方が僅かではあるが銀粒子数は増加したことを除けば、他の場合には4時間後の方が減少した。このような銀粒子数の変動を通じて、常に1核細胞、腸陰窩細胞、2核細胞の順に銀粒子は多くなっている (Fig. 12)。³H-leucine 注射では、実験群間の銀粒子数の変動は大で、殊に1核細胞の核で著しかった。細胞質と核がそれぞれ標識される場合には、その銀粒子数は前者の方が多かった。しかし、細胞の違いによる銀粒子数の差はほとんどなかった (Fig. 11)。

回腸において上述の如くに得られた結果を、1核細

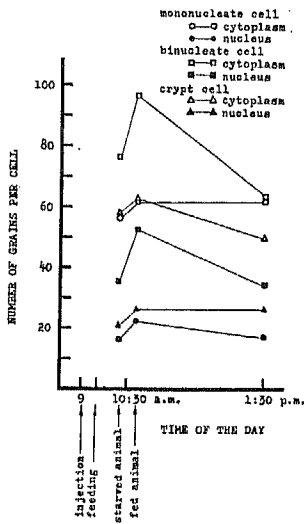


Fig. 3. Change in the number of silver grains with the feeding in the ileum epithelial cells of the mice injected with ³H-tryptophane.

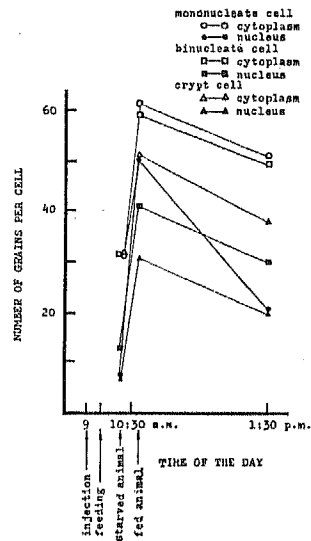


Fig. 4. Change in the number of silver grains with the feeding in the ileum epithelial cells of the mice injected with ³H-leucine.

Table 6. Factorial design of the data listed in Table 5.

	SS	DF	Ms
N	12301.98	2-1=1	12301.98**
E	4506.06	3-1=2	2253.03**
Z	47163.68	2-1=1	47163.68**
N × E	1575.84	2	787.92
E × Z	98.54	2	49.27
N × Z	6.00	1	6.00
N × E × Z	1689.73	2	844.87
R (NEZ)	40685.50	108	376.72
INEZ	108027.33	120-1=119	

Abbreviations are the same as in Table 2.

胞と2核細胞について推計学的に処理をした結果をTable 6と8に示す。³H-tryptophane注射では、

1核細胞と2核細胞の間、実験条件の違い、細胞質と核の3要因による変動がいずれも有意であった。しかし、³H-leucine注射では1核細胞と2核細胞による変動は有意でなく、実験条件の違いと計測場所の違いの2要因がそれぞれ有意であった。したがって、³H-tryptophane注射の場合にのみ、2核細胞は1核細胞より多くの銀粒子によって標識されたといえる。

考 察

膵臓は多種類の消化酵素を生成、分泌している器官であり、したがって、酵素蛋白の生成という点で、膵臓機能と蛋白質代謝とは密接な関係にあることが指摘されている。例えば、Véghelyi等⁽¹⁾によれば、食物中の蛋白質量の多少は直ちに分泌される酵素量に影響を与えるという。蛋白質代謝に関するこのような特徴

Table 7. Mean grain counts of the nucleus and the cytoplasm of 10 mononucleate and 10 binucleate cells in the ileum epithelial cells of the mice injected with tritium labelled leucine.

experimental group	nuclearity					
	mononucleate				binucleate	
	villi		crypt		nucleus	cytoplasm
	nucleus	cytoplasm	nucleus	cytoplasm		
1	6.7±5.2	33.0±12.0	6.3±3.5	33.1±15.9	16.1±23.7	32.1±11.3
2	50.2±9.6	62.4±12.3	31.8±7.9	51.9±16.8	41.8±14.8	57.2±19.0
3	21.1±8.2	51.9±16.8	19.0±18.8	36.9±13.5	29.6±12.0	47.2±12.5

Table 8. Factorial design of the data listed in Table 7.

	SS	DF	Ms
N	1.40	2-1=1	1.40
E	19125.72	3-1=2	9562.86**
Z	11662.41	2-1=1	11662.41**
N×E	372.72	2	186.36
E×Z	573.01	2	285.51
N×Z	343.41	1	343.41
N×E×Z	688.02	2	344.01
R(NEZ)	21825.90	108	202.09
INEZ	54592.59	120-1=119	

Abbreviations are the same as in Table 2.

は、ここで得られた結果にも示されているように思われる。すなわち、アミノ酸の種類に関係なく、食餌をした方が少ない時より臍細胞を標識した銀粒子数は著しく少なくなった。これらの実験では、絶食させたものも食餌をしたものも同じ時刻に殺して試料をとっており、またその時刻（食後1時間）は臍液分泌の始まる頃である。したがって、食餌の有無による銀粒子数の差は、酵素原顆粒中の酵素蛋白質の成分として取込まれた ^3H -tryptophane または ^3H -leucine が、消化活動を通じて消化液として細胞外に分泌されたことによると説明し得る (Fig. 9, 10)。これはまた、銀粒子数の変動が核よりも細胞質で一層大であったことから察せられる。

食後1時間から4時間へかけての銀粒子数の変動が、 ^3H -tryptophane と ^3H -leucine で全く異っていた。これは ^3H -tryptophane が主に代謝の活潑な酵素成分として酵素原顆粒中に取込まれたのに反して、 ^3H -leucine では一部は酵素原顆粒中に取込まれたとはいえ、その多くは酵素蛋白質以外の蛋白質に取込まれたためと思われる。すなわち、取込まれた上記2種のアミノ酸の経時的変動の違いは代謝の質的な違いで生じたものであろう。

このような蛋白質の代謝を通じて、細胞を標識した銀粒子数はほとんどの場合に2核細胞の方が1核細胞より多く、またこれら細胞の銀粒子数の差が食後1時間より4時間で大であったことは、2核細胞の方が1核細胞より蛋白質合成は盛んであったことを示すものであろう。

回腸においては、腸陰窩細胞、絨毛細胞のいずれも、同一時刻に殺したマウスでは絶食したものより給食したものの方が銀粒子数は多く、給食することによって蛋白質合成が盛んになったことを示している。こ

れに続いて食後4時間までは銀粒子数が減少し、蛋白質合成の低下を暗示している。柴田^⑤はマウスの回腸上皮細胞のRNA合成を調べたが、食後1時間から3時間へかけて同様にその合成能が一時的に低下することをみている。同一時期におけるRNAと蛋白質の代謝能に関するこのような一致は、この低下が決して個体差等によるものでなく、消化管上皮として機能的な面で何等かの意義をもっているように思われる。

1核細胞と2核細胞における蛋白質の合成能は、 ^3H -tryptophane では明らかに2核細胞において優位であったが、 ^3H -leucine の場合には細胞核の数による差は認められなかった。

^3H -tryptophane と ^3H -leucine のこのような違いは臍臓の場合にも考えられたように、それらを主として取込んだ蛋白質の質的な相違、したがってそれらの代謝の過程、または活性において異っていたことによって生じたのかも知れない。

要 約

^3H -tryptophane または ^3H -leucine をマウスの腹腔内に注射し、臍臓と回腸上皮の分離細胞の標本からラジオオートグラフをつくり、1核細胞と2核細胞の蛋白質合成能を比較した。

臍臓では、同一時刻に殺したにもかかわらず、食餌を与えた方が与えないもの(25時間絶食)より細胞を標識した銀粒子数はアミノ酸の種類に関係なく著しく少なくなった。 ^3H -tryptophane を注射したマウスでは、その後銀粒子数は僅かに増加したが、 ^3H -leucine 注射のものではその後も漸減した。これらの変動を通じて、2核細胞は常に1核細胞より多くの銀粒子で標識されていた。

回腸では臍臓の場合と全く逆に、食餌を与えた時の方が銀粒子数は増加した。その後はわずかな例外を除いて、アミノ酸の種類に関係なく減少した。 ^3H -tryptophane 注射の場合には、2核細胞の方が1核細胞より多くの ^3H -tryptophane を取込んだが、 ^3H -leucine では両細胞の間には有意の差はなかった。

これらの結果から、一般的には2核細胞は1核細胞より蛋白質合成が盛んであると結論しうる。また、両組織細胞で ^3H -tryptophane と ^3H -leucine を取込む態度が経時的に異つたのは、これらアミノ酸が主として取込まれる蛋白質の質的な差によったものと思われる。

最後に、御指導と御校閲をいただいた尾持昌次教授ならびに永田哲士助教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- ①Nagata, T., Shimamura, K., Onozawa, M., Kondo, T., Okubo, M. and Momozé, S.: Relationship of binuclearity to cell function in some organs. I. Frequencies of binucleate cells in some organs of toads summer and in winter, *Med. J. Shinshu Univ.*, **5**: 147-152, 1960
- ②Nagata, T., Shimamura, K., Kondo, T., Onozawa, M., Momozé, S. and Okubo, M.: Relationship of binuclearity to cell function in some organs. II. Variation of the frequencies of binucleate cells in some organs of dogs owing to aging, *Med. J. Shinshu Univ.*, **5**: 153-158, 1960
- ③Omochi, Sh.: Über das Verhältnis zwischen der Amitose und der Zellfunktion, *Med. J. Shinshu Univ.*, **6**: 163-170, 1961
- ④大久保幹雄: イヌ膵細胞の胎生期および離乳後における無糸核分裂および二核細胞の出現率について, *信州医誌*, **9**: 701-704, 1960
- ⑤Nagata, T. and Kondo, T.: Studies on the amitosis in the parotid gland cells of rat. II. A transition of frequencies of amitotic and binucleate cells caused by feeding, *Med. J. Shinshu Univ.*, **5**: 91-96, 1960
- ⑥島村和夫: イヌ旁細胞の胎生期, 哺乳期および離乳後における無糸核分裂数と二核細胞の変動について, *解剖誌*, **34**: 703-708, 1959
- ⑦近藤恒二郎: 腸円柱上皮における細胞分裂に関する研究, I. 胎生期, 哺乳期および離乳後における腸の円柱上皮細胞, *解剖誌*, **35**: 152-161, 1960
- ⑧近藤恒二郎: 腸円柱上皮における細胞分裂に関する研究, II. 夏期および冬期におけるガマの円柱上皮細胞の観察, *解剖誌*, **35**: 238-246, 1960
- ⑨Nagata, T.: A radioautographic study of the DNA synthesis in rat liver, with special reference to binucleate cells, *Med. J. Shinshu Univ.*, **7**: 17-25, 1962
- ⑩柴田治: ラット膵細胞におけるDNA合成のオートラジオグラフによる研究, 特に無糸核分裂細胞と2核細胞について, *信州医誌*, **15**: 497-502, 1966
- ⑪Nagata, T. and Nawa, T.: A radioautographic study on the nucleic acids syntheses of binucleate cells in cultivated fibroblasts of chick embryos, *Med. J. Shinshu Univ.*, **11**: 1-5, 1966
- ⑫Nagata, T.: A radioautographic study on the RNA synthesis in the hepatic and the intestinal cells of mice after feeding, with special refer-

ence to binuclearity, *Med. J. Shinshu Univ.*, **11**: 49-61, 1966

⑬Nagata, T., Shibata, O. and Omochi, Sh.: A new method for radioautographic observation on isolated cells, *Histochemie*, **2**: 255-259, 1961

⑭Véghelyi, P. V. and Kemény, T. T.: Protein metabolism and pancreatic function, in *The exocrine pancreas*. Eds, A. V. S. de Reuck and M. P. Cameron, J., A. Churchill Ltd., London, p. 390, 1962

⑮柴田治: *信州医誌* **16**: 843-849, 1967

ABSTRACT

Male albino mice were injected with ^3H -leucine or ^3H -tryptophane intraperitoneally, and the radioautographs were prepared from the isolated the pancreatic acinar cells and the ileum epithelial cells to study the protein synthesis with special reference to binucleate cells.

In the pancreatic acinar cells, the intensity of labelling by each of the radioactive amino acids was lower in the fed mice than the starved ones though they were sacrificed at the same time. This should account for the probable reason that the digestive-enzyme protein which incorporated the radioactive amino acids may be secreted with the feeding. In the case of the tryptophane injection, the radioactivity shown by the number of photographic silver grains was slightly recovered in 4 hours after the feeding, in 4.5 hours after the injection, while, in the case of the leucine injection, the activity was continuously decreased. Through these alternation, the radioactivity was always higher in the binucleate cells than in the mononucleate cells. From the results, it is concluded that the protein synthesis in the pancreatic acinar cells is more active in the binucleate cells than in the mononucleate cells.

In the ileum epithelial cells, in contrast with the case of the pancreas, the intensity of the cellular radioactivity of the mice sacrificed initially at the same time was higher in the fed mice than the starved, and lowered gradually in 4 hours after the feeding, in 4.5 hours after the injection. In the case of the

tryptophane, the protein synthesis was more active in the binucleate cells than in the mononucleate cells. To the contrary, the incorporation of the leucine was not significantly different between the mononucleate and the binucleate cells. Such a difference of incorporation between the two amino acids is supposed to be due a functional difference between the proteins incorporating each of them.

PLATES

EXPLANATION OF PLATES

All the figures were photomicrographed from radioautographs of isolated cells or sections of the pancreases and the ileums of the mice sacrificed at various time intervals after the injection of a ^3H -amino acid. Plate 1 contains the photomicrographs taken from the radioautographs of the pancreases, while Plate 2 those of the ileums, respectively.

EXPLANATION OF FIGURES

PLATE 1

- Fig. 5. A labelled binucleate cell (upper left) and a labelled mononucleate cell (lower right) from the starved mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -tryptophane injection. $\times 1900$. Both the cells are intensely labelled.
- Fig. 6. A labelled binucleate cell (left) and a labelled mononucleate cell (right) from the fed mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -tryptophane injection. $\times 2200$.
- Fig. 7. A labelled mononucleate cell (upper left) and a labelled binucleate cell (lower right) from the fed mouse sacrificed 4.5 hours after ^3H -tryptophane. $\times 2100$.
- Fig. 8. A labelled binucleate cell (left) and a labelled mononucleate cell (right) from the fed mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -leucine injection. $\times 2100$. Their labellings are less than those of the animal sacrificed at the same time after ^3H -tryptophane injection as is shown in Fig. 2.
- Fig. 9. A part of a section from the pancreas of the starved mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -leucine injection. $\times 560$. Most of the

labelled silver grains are found at the apical part of the pancreatic acinar cells.

- Fig. 10. A part of a section from the pancreas of the fed mouse sacrificed 4.5 hours after ^3H -leucine injection. $\times 550$. The silver grains labelling the pancreatic acinar cells are less in number than those in Fig. 5.

PLATE 2

- Fig. 11. A labelled crypt cell (upper right) and two labelled mononucleate villus cells (upper and lower left) from the starved mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -leucine injection. $\times 1900$
- Fig. 12. A labelled binucleate villus cell (upper left) and two labelled mononucleate villus cells (bottom) from the starved mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -tryptophane injection. $\times 1900$. The labelling of the binucleate cell is intenser than that of the mononucleate cell.
- Fig. 13. Intestinal villi of a section from the ileum of the fed mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -leucine injection. $\times 350$. Labelling is intenser in the roots than in the tips of the villi.
- Fig. 14. Intestinal villi of a section from the ileum of the starved mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -leucine injection. $\times 460$.
- Fig. 15. Intestinal villi of a section from the ileum of the starved mouse sacrificed 1.5 hours after ^3H -tryptophane injection. $\times 520$.

PLATE 1

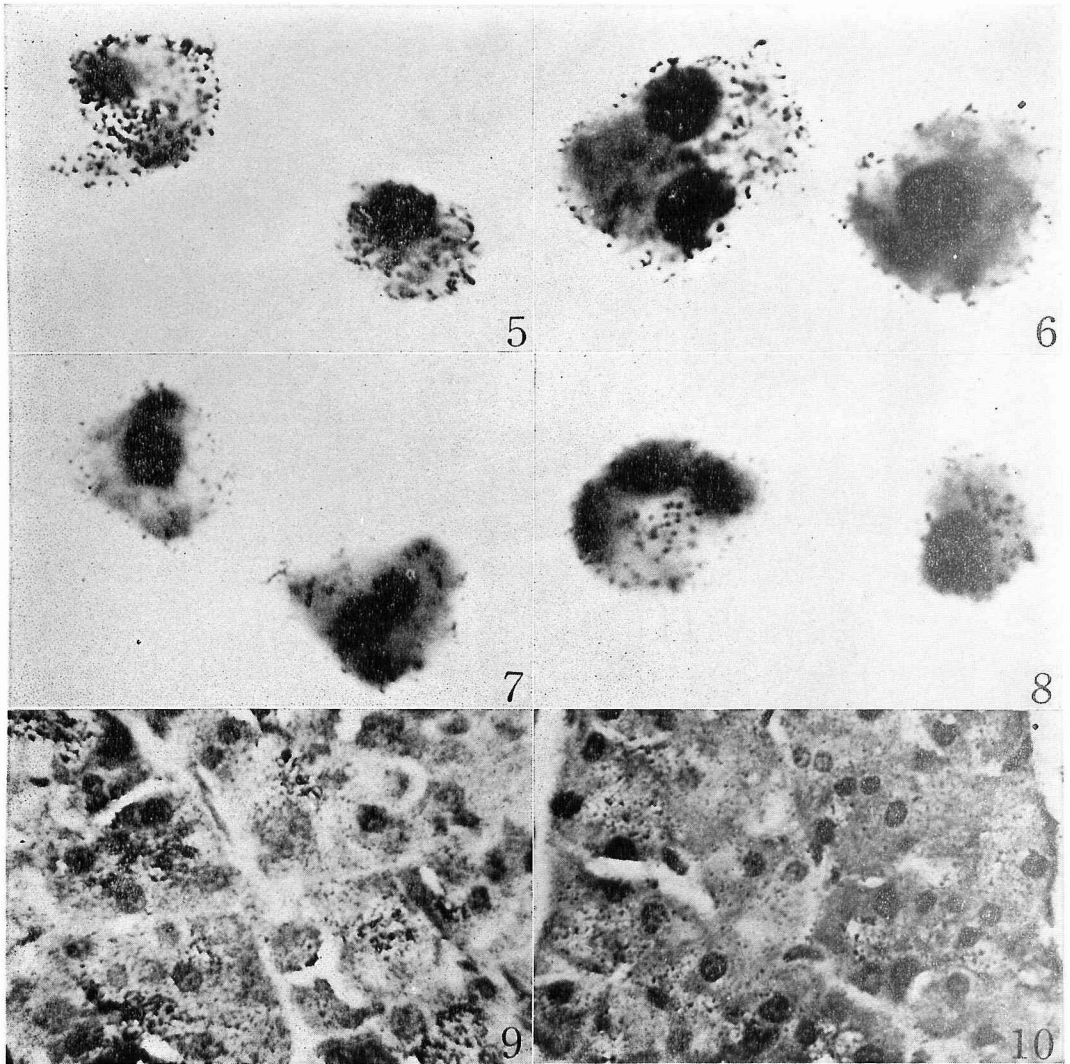


PLATE 2

