

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	鳥類のリンパ濾胞の構造と機能：胚中心とファブリシウス嚢
Author(s)	今村，桂子
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11102
Right	

学位論文
Doctor's Thesis

鳥類のリンパ濾胞の構造と機能

-胚中心とファブリシウス嚢-

(Structure and function of avian lymphoid follicles

-Germinal center and the bursa of Fabricius-)

今村 桂子

(Keiko Imamura)

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻生体微細構築学

指導教員

浴野 成生 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程生体医科学専攻生体微細構築学

2008 年 3 月

学 位 論 文
Doctor's Thesis

論文題名：鳥類のリンパ濾胞の構造と機能-胚中心とファブリシウス嚢-
(Structure and function of avian lymphoid follicles
-Germinal center and the bursa of Fabricius-)

著者名：今村 桂子
(Keiko Imamura)

指導教員名：熊本大学大学院医学教育部博士課程
生体医科学専攻生体微細構築学 浴野 成生 教授

審査委員名：病体制御学担当	松下修三 教授
免疫識別学担当	西村泰治 教授
分子病理学担当	山本哲郎 教授

2008 年 3 月

目次

要旨	1
発表論文（関連論文およびその他論文）	3
謝辞	4
略語一覧	6
第1章 研究の背景と目的	7
第2章 研究方法	20
第3章 研究結果	25
第4章 考察	34
第5章 結語	36
参考文献	37
補遺	43

要旨

系統発生的に鳥類と哺乳類でみられる胚中心 (GC) は、B cell が体細胞突然変異、アイソタイプスイッチ、plasma cell への分化を起こす主要な場である。GC は、濾胞樹状細胞 (FDC) 及び T cell が分布する light zone (LZ) と、B cell が分裂している dark zone (DZ) から構成されている。

ニワトリの GC は、濾胞樹状細胞と T cell が分布している LZ と B cell が分裂している DZ とで構成され、哺乳類の GC と同等の構造を持っている。マウスでは、GC の B cell が PNA (Peanut agglutinin) と結合することから、PNA と強く結合した細胞を GC の細胞として解析が進められてきた。しかし単一の GC を単離し、解析することはできなかった。一方、ニワトリの GC は結合組織で囲まれ、単離することが可能であることから、本研究では、単一の GC を脾臓から単離する方法を樹立し、single cell suspension をつくり、GC を構成する細胞の phenotype を調べた。

ニワトリの GC は、脾動脈の分岐部に発達する周囲を結合組織で囲まれている球形の組織で、動脈と結合組織で密に接している。従って、脾動脈の周囲の赤脾髄、白脾髄を除くと脾動脈の分岐部に付着した球形の GC を得ることができる。更に、GC の付着した動脈の枝を collagenase で処理することによって、GC を動脈から分離し、単一の GC を得ることができる。

このようにして得られた単一の GC を single cell suspension にし、細胞表面の phenotype を調べると、GC は B cell (Bu1a⁺ cell) を $64 \pm 7\%$ 、T cell (CD3⁺ cell) を $12 \pm 2\%$ 含んでいた。GC cell の細胞表面の sIg のアイソタイプを調べると、IgG⁺ cell は $29 \pm 3\%$ 、IgA⁺ cell は $5 \pm 0\%$ 、IgM⁺ cell は $5 \pm 2\%$ であった。一方、B cell を 95%、T cell を 1% 含む BF では、IgG⁺ cell は $6 \pm 1\%$ 、IgA⁺ cell は $0 \pm 0\%$ にしかすぎず、IgM⁺ cell は $84 \pm 4\%$ であった。このことから、GC はスイッチしたアイソタイプ (IgG、IgA) をもつ細胞をきわめて多く含むことが明らかとなった。

さらに、GC cell の sIg の phenotype を二重染色で調べてみると、sIgM⁺IgG⁺ single positive cell が $27 \pm 7\%$ 検出された。一方、BF ではそれらの細胞は $0 \pm 0\%$

であった。このように、GC にはアイソタイプが IgG にスイッチし終えている sIgM⁺IgG⁺ single positive B cell がきわめて多く存在することから、GC はアイソタイプスイッチの主要な場であることが細胞レベルで示された。

さらに、GC では Bu1a-IgG⁺ cell が $5 \pm 1\%$ みられた。しかも、Bu1a-IgG⁺ cell の多くが IgG が強陽性であった。ニワトリでは、plasma cell は Bu1a⁻なので、Bu1a-IgG⁺ cell は IgG を産生する plasma cell に分化したかあるいは分化するであろう細胞だと考えられる。よって、GC は plasma cell への分化の場でもあることも細胞レベルで示された。

また、GC には CD3⁺の T cell が 12%含まれていた。GC の T cell の分布を調べたところ、LZ に CD4⁺ T cell がみられた。ただし、CD8⁺ T cell はみられなかった。このことから、CD4⁺ T cell が GC の LZ における B cell の分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究で用いた単一の GC の単離する手法は、今後、GC 構成細胞の機能についてさらに詳細に解析する有効な手段の一つであると考えられる。

発表論文（関連論文およびその他論文）

1. 関連論文

- 1) Imamura, K., M. Yasuda, B. Riwar, S. Inui, S. Ekino. 2007. Characteristic cellular composition of germinal centers. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. In press

2. その他の論文

- 1) Ninomiya, T., K. Imamura, M. Kuwahata, M. Kindaichi, M. Susa, S. Ekino. 2005. Reappraisal of somatosensory disorders in methylmercury poisoning. *Neurotoxicology and Teratology*. 27: 643-653.
- 2) 浴野成生, 二宮正, 今村桂子, 諏佐マリ. 2007. メチル水銀による大脳皮質損傷 - 水俣病を診断するために -. *精神神経学雑誌*. 109(5): 420-437.
- 3) Ekino, S, M. Susa, T. Ninomiya, K. Imamura, T. Kitamura. 2007. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of Neurological Sciences*. 262: 131-144.

謝辞

本研究は、熊本大学大学院医学教育部生体医科学専攻生体微細構築学分野の浴野成生教授のご指導のもとで行いました。教授は、科学系の実験や研究に関する知識や技術を全く備えていない私を学生として受け入れ、実験や研究の進め方、科学論文の書き方など全面的に、丁寧に、ご指導くださいました。私は、先生のおかげで学びの多い、かけがえのない、日々を送ることができました。感謝の気持ちをここで表し尽くすことは到底できませんが、私をここまで導き、励まし、支え、指導してくださった浴野教授に心から深く感謝いたします。

主論文の共著者である熊本大学医学部保健学科の乾誠治教授には、実験および論文作成あたりご助言、ご指導をいただきました。緩衝液（PBS）の作り方さえも知らなかった私に丁寧にご指導くださったことは今でも印象強く残っています。乾教授に心から感謝の意を表します。

熊本大学大学院医学薬学研究部生体微細構築学分野の二宮正助教、本田晃子助教、園田佳世子氏には、論文作成や実験・研究の進め方に関して多くのご助言とご指導をいただくとともに、実験動物の維持管理等で大変お世話になりました。特に、二宮先生には化学、物理、生物のことをわかりやすく、丁寧に教えていただきました。また先生方は私を何度も励まし支えてくださいました。この場を借りて、心から深く感謝いたします。

熊本大学大学院教育学部家政教育の桑畑美沙子教授は、私が博士課程に進学するきっかけを与えてくださった先生です。また先生は、私が博士課程に入った後もずっと私を見守り、ご助言と励ましの言葉をくださいました。先生に心から深く感謝いたします。

熊本大学法学部の諏佐マリ准教授には、英語論文の作成に関し、ご助言、ご指導をいただきました。博士課程入学試験の英語試験対策の際にもご指導いただきました。また、先生は私を何度も温かく励ましてくださいました。先生に心から深く感謝いたします。

浴野明子さんには、差し入れなど食生活の面でのお心遣いをいただきました。また、温かい励ましの言葉をいただきました。とてもうれしかったです。ありがとうございました。

博士課程の大学院生活をおくるなかで、くじけそうになったときもありました。そのときに、簗田諭美さん、篠原浩平さん、高島大輝さん、本道典枝さん、稲田恵子さん、那須才野香さん、今村育男・洋子さん、西千香子さん、西津実・智恵さん、宮本由美子先生、西文子さん、中村理奈さん、弥永昌並さん、伊藤陽子さん、岩間由希さん、安永美晴さん、坂田美保さん、藤本恭子さん・・・ここでは全ての方のお名前をあげきれませんが、たくさんの親族・友人の方々が見守り、励まし、支えてくださいました。この場をお借りして、みなさまに心から感謝いたします。

最後に、わがままばかりの私をずっと温かく見守り支えてくれた家族に、心から感謝しています。おかげで、とても充実した、かけがえのない日々を過ごすことができました。本当にありがとう。

略語一覧

B cell: B lymphocyte (B 細胞)

T cell: T lymphocyte (T 細胞)

Ag: antigen (抗原)

Ab: antibody (抗体)

APC: antigen-presenting cell (抗原提示細胞)

MALT: mucosa-associated lymphoid tissue (粘膜関連リンパ組織)

GC: germinal center (胚中心)

BF: the bursa of Fabricius (ファブリシウス嚢)

PALS: peri-arteriolar lymphoid sheath (動脈周囲リンパ鞘)

PELS: peri-ellipsoidal lymphoid sheath (エリプソイド周囲リンパ鞘)

LZ: light zone (明領域)

DZ: dark zone (暗領域)

FDC: follicular dendritic cell (濾胞樹状細胞)

Ig: immunoglobulin (免疫グロブリン)

sIg: surface immunoglobulin (細胞表面に発現している免疫グロブリン)

PNA: peanut agglutinin (ピーナッツ凝集素)

第1章 研究の背景と目的

1-1. 免疫系

免疫系 (immune system) とは、①生体内に侵入した異物 (抗原: Ag) に対して、自己か非自己かを識別し、②非自己に対して特異的な応答をし、③記憶を誘導し、④再度 Ag が体内に侵入した際にすばやく反応する、といった特徴をもつ生体防御機構である。それらの免疫反応は、T cell と B cell と抗原提示細胞 (APC) 等の細胞が担っている。

1-2. 免疫系の系統発生

免疫系は、系統発生学的に、脊椎動物から出現されている (図 1, 2) [浴野, 2002]。B cell、T cell、免疫グロブリンが明瞭に認められるのは軟骨魚類からである (図 2) [浴野, 2002]。

鳥類と哺乳類は、IgM のほかに IgG と (IgE (哺乳類)、) IgA をもつ (図 1, 2) [浴野, 2002]。また、鳥類と哺乳類は、免疫グロブリン遺伝子を再組換えするだけでなく、免疫グロブリン遺伝子の可変部領域に遺伝子変換や点突然変異などの体細胞突然変異を起こすことで、抗体の多様性を獲得している (図 1, 2) [浴野, 2002]。遺伝子変換では、偽遺伝子の断片が免疫グロブリン遺伝子の可変部領域のなかに導入され、交換される。点突然変異では、免疫グロブリン遺伝子可変部領域の塩基の一つが変化する。これらを繰り返すことによって、抗体の特異性が変化する。点突然変異はマウスの胚中心 (GC) およびヒツジの回腸パイエル板のリンパ濾胞で生じることが知られている [浴野, 2002]。遺伝子変換は、ニワトリのファブリシウス嚢 (BF)、ウシの回腸パイエル板、ウサギの虫垂などのリンパ濾胞で生じることが知られている [浴野, 2002]。このように、点突然変異や遺伝子変換などの体細胞突然変異は、リンパ濾胞で生じる [浴野, 2002]。リンパ濾胞は、鳥類と哺乳類に見られる構造で、それらより古い爬虫類、両生類等では存在しない。(図 1, 2) [浴野, 2002]。

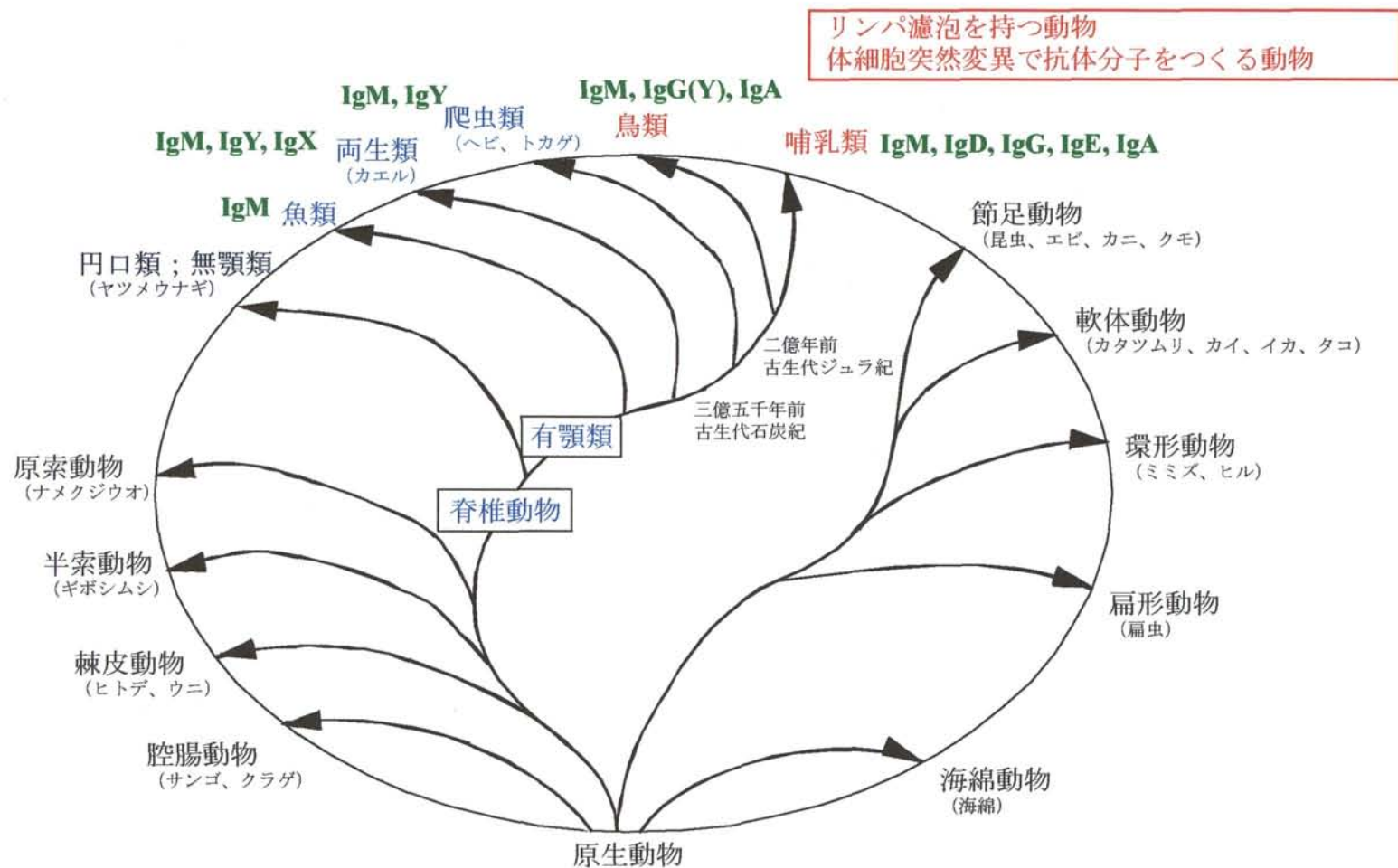


図1. 免疫系の系統発生

	T cell	B cell	IgM	IgG (X, Y)	IgA	再組換え	記憶	既往反応	体細胞 突然変異	リンパ濾胞 (GC)
円口類		?	?							
軟骨魚類	+	+	+			+				
硬骨魚類	+	+	+			+				
両生類	+	+	+	+		+				
鳥類 哺乳類	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

図 2. 生体防御系と免疫系の進化

1-3. リンパ濾胞

リンパ濾胞とは、B cell が主となって構成された球形の組織である[浴野, 2002]。リンパ濾胞が分布する場所は大きく 3 つ（脾臓、リンパ節、粘膜関連リンパ組織）に分けられる。脾臓では、血管内に侵入した抗原によってリンパ濾胞が形成される[Kelsoe, 1995(b); Kroese, et al. 1990; Liu, et al., 1992; Nieuwenhuis, et al., 1984]。リンパ節では、皮下に侵入した抗原がリンパ管で運ばれ、リンパ節の皮質にリンパ濾胞が形成される[Kroese, et al. 1990; Liu, et al., 1992]。扁桃や小腸・空腸パイエル板、虫垂などの粘膜下にある粘膜関連リンパ組織（MALT）でもリンパ濾胞が分布している[Liu, et al., 1992; MacLennan, 1994]。これら MALT のリンパ濾胞には、トリの BF、ヒツジ・ウシのパイエル板のように胎児期から発達しているリンパ濾胞と、ウサギ・ヒトの虫垂、マウスのパイエル板のように生後抗原刺激で発達するものの二種類がある[Dasso, et al., 2000; Jones, et al., 1972; Reynolds, et al. 1983; Reynolds, 1987; Sminia, et al., 1983; Yasuda, et al., 2002; Yasuda, et al., 2006]。

1-4. 胚中心 (GC)

胚中心 (GC) は抗原刺激によって、リンパ節、脾臓、扁桃などの末梢リンパ組織に形成されるリンパ濾泡である[Kroese, et al. 1990; MacLennan, 1994; Nahm, et al., 1992; Nieuwenhuis, et al., 1984]。GC は B cell が免疫グロブリン遺伝子の可変部領域で体細胞突然変異を起こしたり、アイソタイプスイッチを起こしたり、plasma cell に分化する場として知られている。[Han, et al., 1997; Kraal, et al., 1982; Nahm, et al., 1992; Nieuwenhuis, et al., 1984; Papavasiliou, et al., 1997]。GC は、明領域 (light zone: LZ) と暗領域 (dark zone: DZ) の二つに分けられる (図 3, 表 1) [Kelsoe, 1995(a); Kroese, et al. 1990; Liu, et al., 1992; MacLennan, 1994; Nieuwenhuis, et al., 1984; Yasuda, et al., 1998]。LZ には、B cell、濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell: FDC)、T cell が分布する。FDC は抗原抗体複合体 (Ag-Ab complexes) を保持している (表 1) [Heinen, et al., 1986]。DZ には

分裂し、細胞表面の免疫グロブリン (sIg) が陰性の B cell が分布している (表 1)。
LZ では、B cell が対応する特異的な Ag と出会うことにより、アポトーシスから
逃れ、記憶細胞あるいは plasma cell への分化を生じると考えられている[Yasuda,
et al., 1998]。

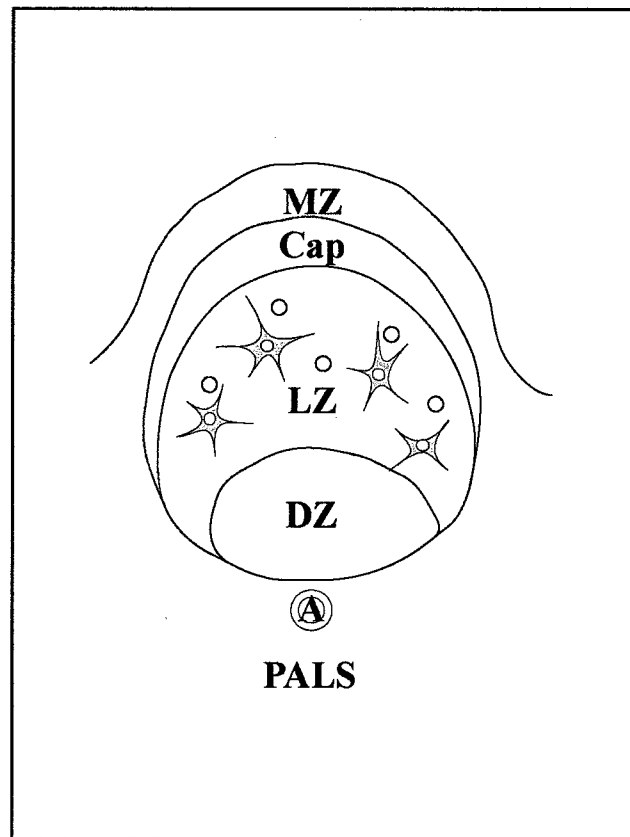


図 3. ラット脾臓におけるGCの構造

- : T cell
- ★ : FDC
- MZ : 辺縁帯
- cap : 帽状域
- LZ : 明領域
- DZ : 暗領域
- PALS : 動脈周囲リンパ鞘
- A : 動脈

表 1. GCのLZおよびDZの特徴

領域	構成する細胞の種類と特徴	機能
LZ	1. B cell :Igを発現している 2. T cell 3. FDC	1. FDCが抗原抗体複合体(immune complexes)を保持している 2. B cellがFDCに保持されているAgの刺激を受けて選択される 3. LZのヘルパーTcellがB cellの選択、アイソタイプスイッチ、さらなる分化に重要な役割を果たしていると考えられる
DZ	1. B cell :sIgが陰性 分裂している	1. B cellが分裂増殖し、点突然変異、遺伝子変換などの遺伝子の体細胞突然変異を起こし多様性を獲得する。

1-5. ニワトリにおける脾臓の構造

ニワトリでは、血管内に投与された Ag の刺激によって脾臓 GC が動脈分岐部に発達する (図 4、図 5 A) [Hoshi, 1972; Smithyman, 1977; White, et al., 1975]。

脾臓は白脾髄と赤脾髄からなり、白脾髄は動脈周囲リンパ鞘 (peri-arteliolar lymphoid sheath: PALS) とエリプソイド周囲リンパ鞘 (peri-ellipsoidal lymphoid sheath: PEELS) で構成されている (図 4) [Hoshi, 1972; Jeurissen, et al., 1994(a)]。PALS は中心動脈の周囲に発達し、主に T cell が分布している (図 4) [Hoshi, 1972; White, et al., 1975; Yasuda, et al., 1998]。したがって、PALS は T-dependent area (Thymus dependent area) と呼ばれている。一方、PEELS は、筆毛動脈の末端にある ellipsoid (Schweigger-Seidel sheath と同じ) の周囲に発達し、主に B cell が分布している (図 4) [Hoshi, 1972; Jeurissen, et al., 1994(a); Jeurissen, et al., 1994(b); Yasuda, et al., 1998]。GC は PALS の動脈分岐部に発達する (図 4, 図 7 A,B) [Hoshi, 1972; Jeurissen, et al., 1994(a); Jeurissen, et al., 1994(b); Smithyman, 1977; White, et al., 1975; Yasuda, et al., 1998]。

筆毛動脈の末端である莢毛細血管は細網細胞と細網線維によって取り囲まれ、ellipsoid を形成している [Hoshi 1972; Jeurissen, et al., 1994(a)]。Ellipsoid の周囲に B cell が集積し、PEELS とよばれている (図 4) [Hoshi 1972; Jeurissen, et al., 1994(a); Jeurissen, et al., 1994(b); Yasuda, et al., 1998]。血液は莢毛細血管から ellipsoid へと流れ、血中の Ag は ellipsoid に分布する細網細胞に捕捉される [White, et al., 1975]。ellipsoid の細網細胞に捕捉された Ag は、動脈に沿って動脈の分岐部に移動し、集積する (図 4) [White, et al., 1975]。動脈分岐部に分布した樹状様の Ag もしくは Ag-Ab complexes を中心に B cell、T cell が集まり、GC が形成され则认为られている [Hoshi, 1972; Jeurissen, et al., 1994(a); Jeurissen, et al., 1994(b); White, et al., 1975]。

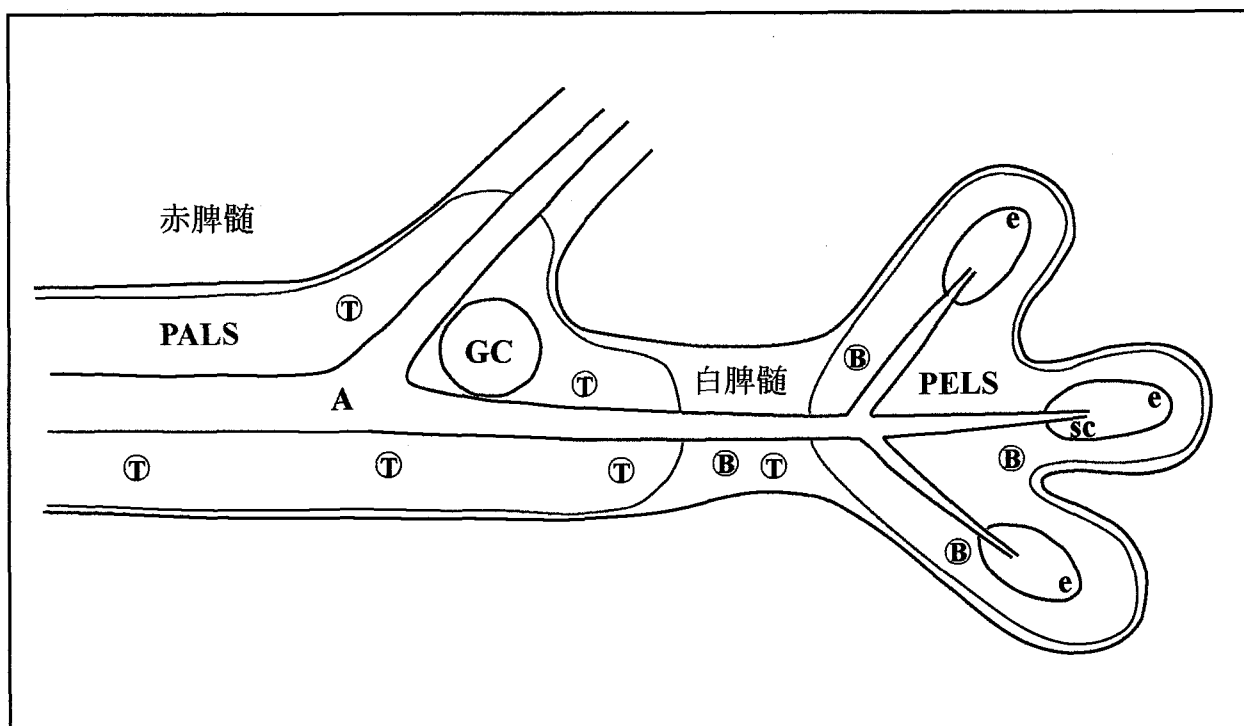


図 4. ニワトリ脾臓の解剖

- A : 中心動脈
- sc : 莢毛細血管
- T : T cell
- B : B cell
- PALS : 動脈周囲リンパ鞘
- PELS : エリプソイド周囲リンパ鞘
- e : エリプソイド
- GC : 胚中心

1-6. ニワトリ GC の構造と機能

哺乳類の GC と同様に、ニワトリ GC は Ag-Ab complexes を形成した FDC と T cell が分布する LZ と、増殖している B cell が分布する DZ から構成されている (図 5 B) [Yasuda, et al., 1998]。GC の大部分は B cell によって構成されている (図 6 A) [Yasuda, et al., 1998]。ただし、濾胞の中央部には T cell が分布している (図 6 B)。sIg を持つ細胞は主に濾胞中央部に分布している (図 6 C,D) [Yasuda, et al., 1998]。一方、濾胞の周辺部には sIg を持つ細胞はほとんどみられない (図 6 C,D) [Yasuda, et al., 1998]。また、濾胞中央部には凝集した IgG が樹状様に分布していることから、樹状様の IgG の凝集は、FDC によって保持されていると推測される。さらに、分裂している細胞は濾胞周辺に分布している (図 6 E) [Yasuda, et al., 1998]。これらのことから、ニワトリ GC は Ag-Ab complexes を保持した FDC および T cell が分布する濾胞中央部の LZ と、sIg 陰性の B cell および増殖している B cell が分布する濾胞周辺部の DZ から構成され则认为られる (図 5 B) [Yasuda, et al., 1998]。ニワトリ GC では、B cell の遺伝子変換および点突然変異による体細胞突然変異が起こっていることが明らかにされており、GC は BF と同様に B cell の多様性を獲得する場であると考えられている [Arakawa, et al., 1996; Arakawa, et al., 1998]。これらのことから、ニワトリ GC は、哺乳類の GC と同等の構造と機能をもっていると认为られる [Yasuda, et al., 1998]。

なお、ニワトリの GC は、結合組織で囲まれ、単一の GC として単離できることから、私たちのグループは、単一 GC を脾臓から単離する方法を樹立した (図 7) [Arakawa, et al., 1996; Arakawa, et al., 1998; Hoshi, 1972; Jeurissen, et al., 1994(a); Smithman, 1977; Yasuda, et al., 2003]。

1-7. 本研究の目的

組織切片では、IgG あるいは IgA とで形成された抗原抗体複合体が存在しているために、B cell の発現している sIg のアイソタイプは解析するのは困難であった [Kroese, et al. 1990]。そこで、本研究では、単一の GC を脾臓から単離する方法

を用いて、単一の GC の single cell suspension をつくり、単離した単一の GC 由来の GC cell の phenotype を調べた。特に、二重免疫蛍光検査法を用いて GC B cell が発現している sIg を解析した。

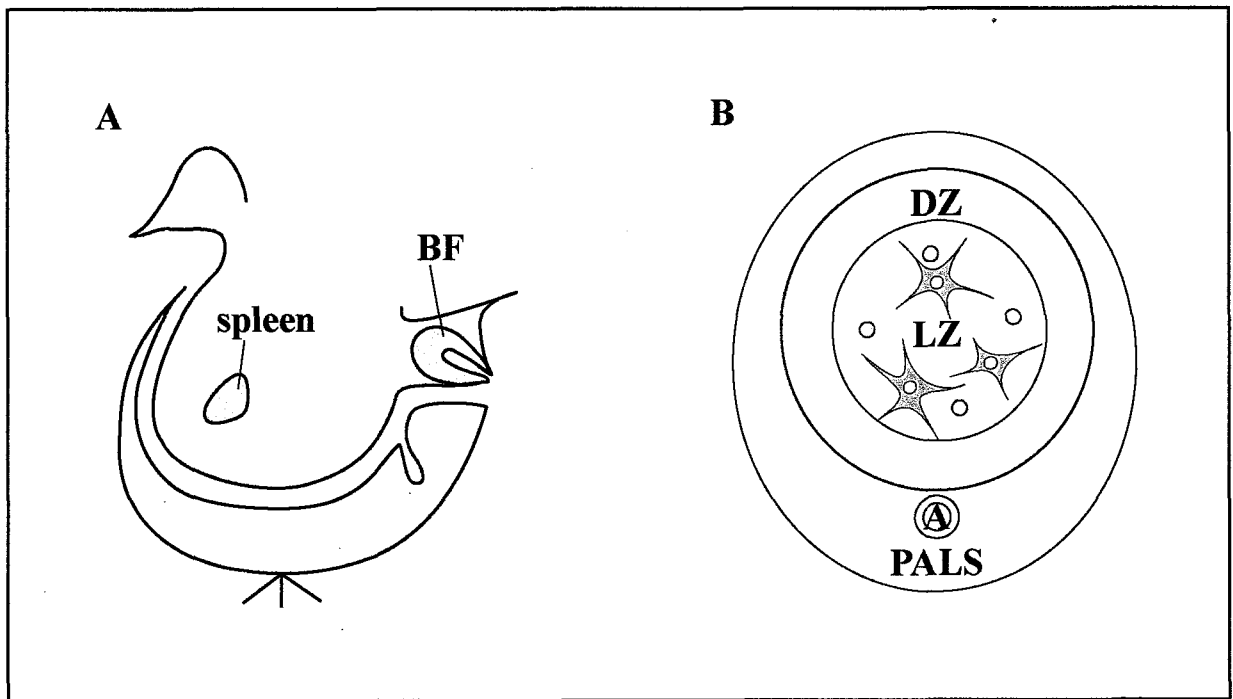


図5. ニワトリのリンパ濾胞の分布および脾臓GCの構造

A : ニワトリのリンパ組織

B : ニワトリ脾臓GCの構造

○ : **T cell**

★ : 濾泡樹状細胞

LZ : 明領域

DZ : 暗領域

PALS : 動脈周囲リンパ鞘

A : 中心動脈

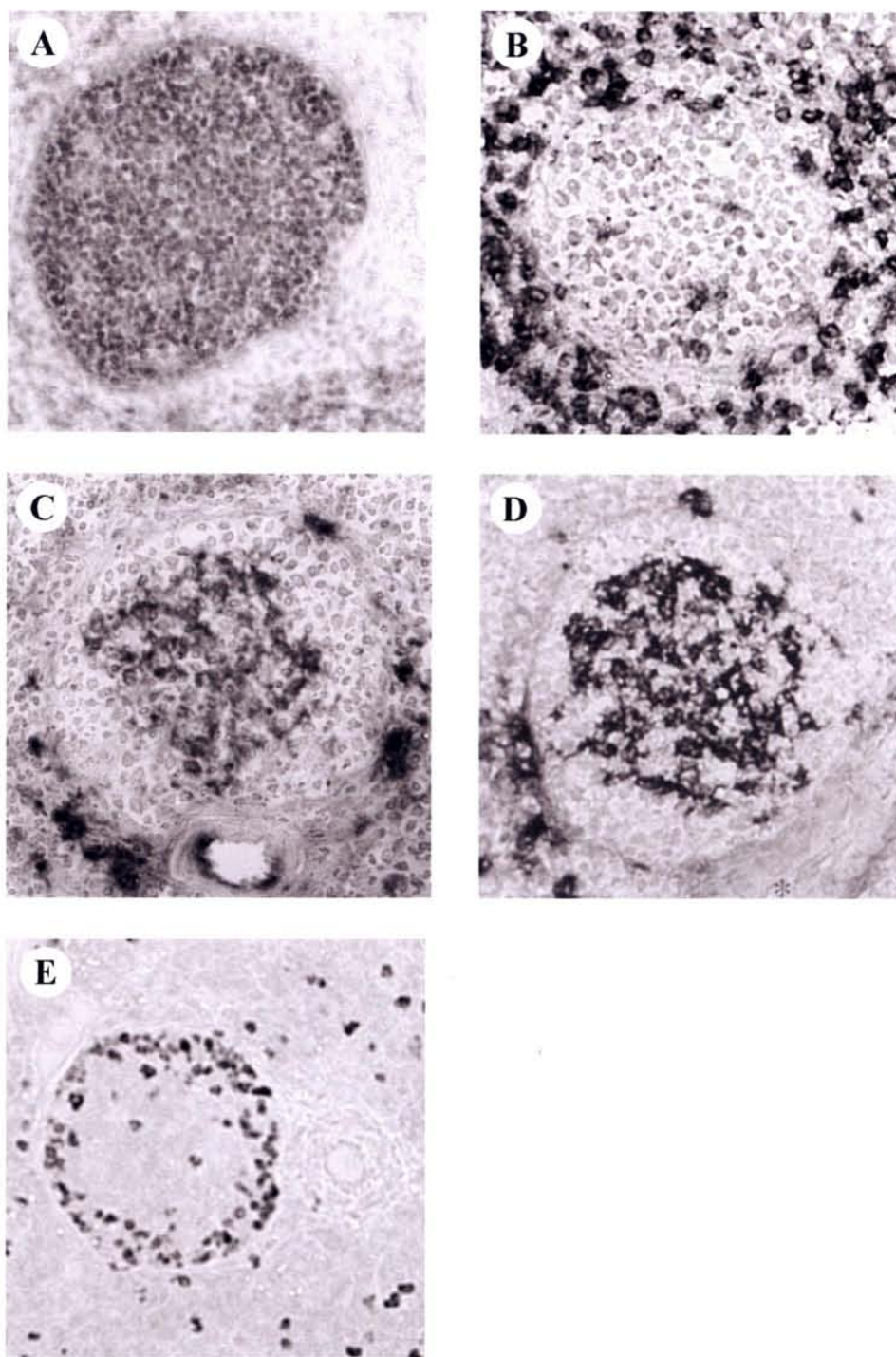


図 6. ニワトリ脾臓GCの組織

- (A) : Bu1a⁺ cellの分布
- (B) : CD3⁺ T cellの分布
- (C) : IgM⁺ cellの分布
- (D) : IgG⁺ cellの分布
- (E) : BrdU⁺ cellの分布

(Yasuda, et al., 1998)

第2章 研究方法

2-1. ニワトリ

ニワトリは、バーゼル免疫研究所 (Gipf-Oberfrick, Switzerland) の H.B.21 と、熊本大学で飼育されている H.B.15 を用いた。これらのニワトリは、通常の状態、自由に水や餌を食べられるように飼育された。全ての処置は、バーゼル免疫研究所および熊本大学で設置されている動物の飼育および使用に関する規則にもとづいて行った。

2-2. 抗原および免疫

2-8 週令のニワトリを、4-hydroxy-3-iodo-5-nitrophenyl acetyl coupled to BSA (NIP-BSA) 抗原 (100 μ g/0.5ml 生理食塩水) で免疫した。脾臓 GC を免疫後 5 日に単離した。

2-3. 抗体

ニワトリの Bu1a 抗原 (B cell 特異的)、 μ -chain、 γ -chain、 α -chain、CD3、CD4 および CD8 に特異的なモノクローナル抗体を使用した。L22 は B cell の膜表面の抗原である Bu1a に対する mAb である [Houssaint, et al., 1987; Pink, et al., 1983]。M-1 は μ -chain に対する mAb である [Chen, et al., 1982]。ChIgG-47.3 は γ -chain に対する mAb である [Koch, et al., 1989]。ChIgA-46.5 は α -chain に対する mAb である [Koch, et al., 1989]。CT3 は T cell の膜表面の抗原である CD3 に対する mAb である [Chen, et al., 1986]。CT4 は T cell の膜表面の抗原である CD4 に対する mAb である [Chan, et al., 1988]。CT8 は T cell の膜表面の抗原である CD8 に対する mAb である [Chan, et al., 1988]。L22 は Basel Institute for Immunology (Basel, Switzerland) で開発作製された。M-1 は Sera-lab (Sussex, England) から購入した。ChIgG-47.3 および ChIgA-46.5 は Central Veterinary Institute で開発作製され確認された。CT3、CT4 および CT8 は Beckman Coulter K.K.社 (Tokyo, Japan) から購入した。

2-4. GC の単離方法

以下の手順で脾臓の GC を単離した。

- ① 脾臓を脾門の動脈を含んだまま脾臓を採る。
- ② 脾臓を、5%の FCS を加え冷やした PBS を入れたペトリ皿に入れる。
- ③ 脾動脈の門の部分をしっかりを持つ。
- ④ 脾臓の結合組織の被膜をひっぱりはがす。
- ⑤ 脾動脈を一方のピンセットで保持したまま、もう一方のピンセットで赤脾髄と白脾髄を梳いて除く。
- ⑥ 脾動脈の枝を根元から枝先に向けてピンセットで、動脈についている赤脾髄と白脾髄を動脈の枝を梳くようにして、丁寧に赤脾髄と白脾髄を除く。
- ⑦ 動脈の分岐部に、樹になるリンゴの様に、GC が付着しているのが発見できる (図 7, B)。動脈分岐部にある球状の組織体が GC であることを確認するために、球状の組織体の凍結切片を anti-Bu1a 抗体で染色した。動脈分岐部の球状の組織体を構成する大部分の細胞は Bu1a⁺であったことから、その球状の組織体は GC であると確認された。
- ⑧ PBS で洗った後、GC が付着した動脈の枝を新しいペトリ皿に移す。
- ⑨ GC のついた動脈の枝をコラーゲン分解酵素で 37°C、30 分間反応させる。コラーゲン分解酵素は Sigma 社の type II を 2mg/ml の割合で用いた。これにより単一の GC が動脈から分離される (図 7, E)。
- ⑩ 顕微鏡で観察しながら single GC をガラスのパスツールピペットで吸い取り、96 穴の U-bottom plate (Denmark の Nunc 社)に一個ずつ移した。

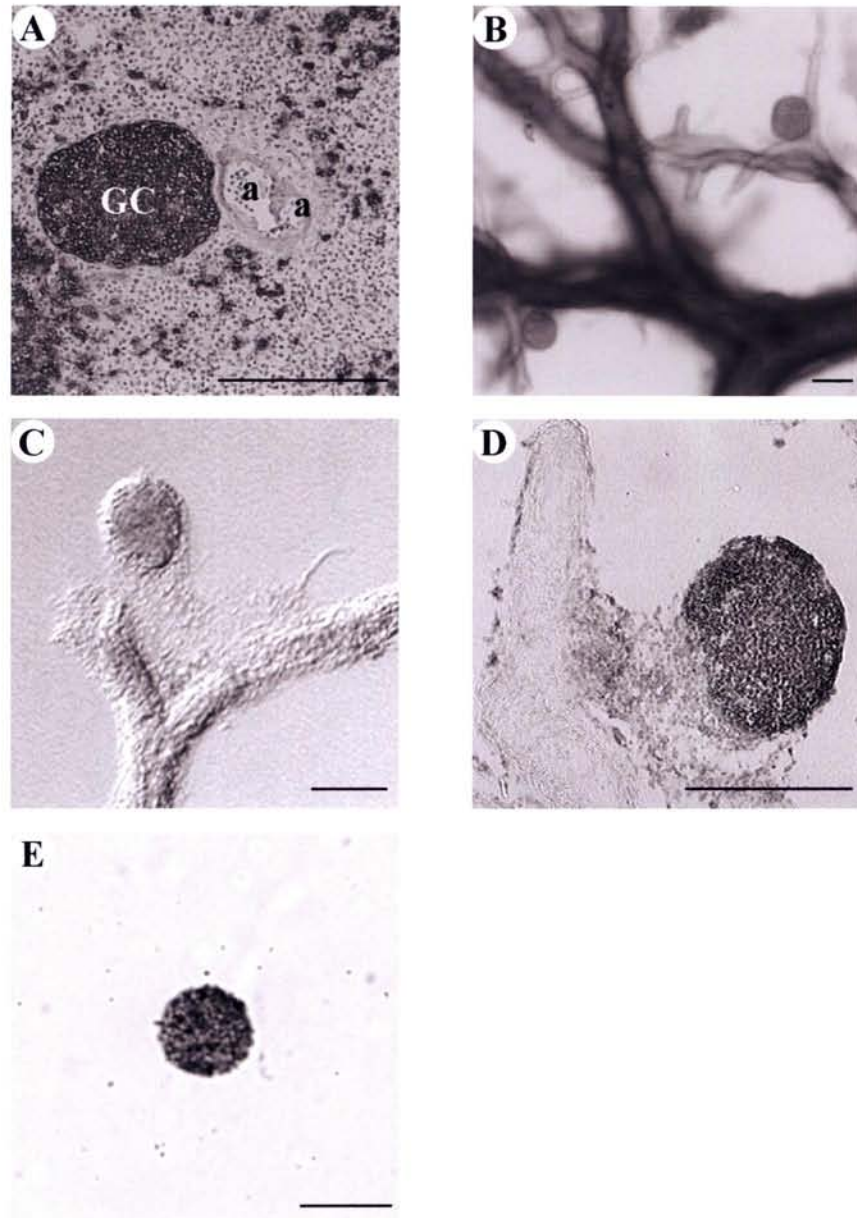


図 7. ニワトリ脾臓GCの単離される過程

- (A) : 免疫された脾臓の凍結切片を**anti-Bu1a**で染色した。
GCは動脈(a)に接着しているB cell濾胞として観察できる。
- (B) : 赤脾髄と白脾髄を取り去ると、GCは動脈の分岐部に球体の構造物として検出される。
- (C) : GCは動脈の分岐部と結合組織で接着している。
- (D) : 動脈の分岐部にある球体の構造物の凍結切片を**anti-Bu1a**で免疫染色した。球体の構造物は、**Bu1a+ cell**で構成されているので、GCであると確認された。
- (E) : 単一のGCは、**collagenase**処理によって動脈から分離された。
図中の一は100 μ mを示す。

2-5. 細胞の調整および免疫蛍光検査法

単一の GC の single cell suspension は、ガラス製パスツールピペットで、96 穴の U-bottom-plate に移して作られた。免疫したニワトリ由来（静脈内に免疫してから 5 日後）の BF 細胞および脾臓細胞は、細かくした組織をステンレス製の金網で漉すことで得られる。脾臓細胞はさらに、Ficoll 密度勾配遠心分離法を用いて精製された。single cell suspension を 5% の FCS-PBS を用いて二度洗浄し、96 穴の U-bottom-plate に移した。BF の single cell suspension も同様の手順で準備された。細胞は、それぞれ適切な濃度の mAb と反応させた。洗浄後、100 倍に希釈した FITC-conjugated sheep anti-mouse Ig を用いて二次反応を行った。二重免疫蛍光検査法は以下の通りである。第一段階は、ラベルされていない mAb と反応させた後、FITC-conjugated sheep anti-mouse Ig と反応させた。その後、正常マウス血清で block した。第二段階は、ビオチン化した mAb と反応させた後、PE-conjugated streptavidine と反応させた。その後、FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) を用いて two-color flow cytometry を行った。

2-6. 組織切片の免疫ペルオキシダーゼ染色

脾臓の組織切片を、間接の免疫ペルオキシダーゼ法を用いてモノクローナル抗体で染色した。二次抗体として、Vectastain[®] ABC kit (Vector Lab., Inc., Burlingame, CA) を用いた。

染色法は以下の通りである。

- ① 十分に乾燥させた組織切片をアセトンで固定する。固定後乾燥させる。
- ② 組織に含まれる内因性ペルオキシダーゼを 0.3% H₂O₂ メチルアルコール溶液で反応させ、失活させる。処理した切片を水道水で洗浄する。
- ③ 緩衝液 (PBS) で希釈したウマ血清を、組織切片が被われるように滴下し、20 分間 blocking 反応させる。反応後、余分な血清液を吸い取る。
- ④ mAb を組織切片に滴下し、60 分間反応させる。反応後 PBS で洗浄する。
- ⑤ ビオチン化二次抗体を組織切片に滴下し、30 分間反応させる。反応後 PBS で

洗浄する。

- ⑥ ABC 試薬を組織切片に滴下し、30-60 分間反応させる。反応後 PBS で洗浄する。
- ⑦ ペルオキシダーゼ基質溶液で 2-7 分間反応させる。反応後、水道水で洗浄する。
- ⑧ 組織切片を CuSO_4 in NaCl 溶液に 5 分間浸し、反応を止め、発色を鮮明にする。
- ⑨ ヘマトキシリン液で核を染色する。
- ⑩ 上昇アルコールで組織切片を脱水させる。脱水した組織切片を封入する。

第3章 研究結果

3-1. GC の細胞構成

表2に示すように、GC cell の発現をBFおよび脾臓と比較した。GCにおけるB cell (Bu1a⁺ cell) の頻度は $64 \pm 7\%$ で、脾臓におけるB cell の頻度 ($24 \pm 1\%$) よりも2.7倍高かった。GCにおけるT cell の頻度 (CD3⁺ cell) は $12 \pm 2\%$ で、脾臓のT cell の頻度 ($59 \pm 2\%$) の1/5であった。これらの結果は、GCはT cell を含んでいるB cell 濾胞であり、脾臓から独立した構造体であることを示している。対照的に、BFはT cell をほとんど含んでいないB cell 濾胞であった ($95 \pm 1\%$ のBu1a⁺ cell, $1 \pm 0\%$ のCD3⁺ cell)。

表 2. ニワトリの脾臓 GC、ファブリシウス嚢および脾臓を構成する細胞の phenotype とその割合 ^{a)}.

Antibodies	GC	The bursa	Spleen
Bu1a	64 ± 7 ^{b)} (4) ^{c)}	95 ± 1 (11)	24 ± 1 (13)
IgM	5 ± 2 (8)	84 ± 4 (10)	25 ± 2 (16)
IgG	29 ± 3 (12)	6 ± 1 (19)	2 ± 0 (32)
IgA	5 ± 0 (4)	0 ± 0 (8)	1 ± 0 (18)
CD3	12 ± 2 (4)	1 ± 0 (4)	59 ± 2 (6)

^{a)} 2-8週令のニワトリを NIP-BSA で免疫した後、それぞれの構成細胞の phenotype を flowcytometer を使って解析した。

^{b)} 平均±標準誤差

^{c)} 解析したニワトリの数

3-2. GC の B cell の phenotype

GC cell の phenotype について、flowcytometry を使って解析した結果、GC cell のわずか $5 \pm 2\%$ が sIgM を発現していた (表 2)。一方、BF の細胞の $84 \pm 4\%$ が sIgM を発現していた。さらに、GC における sIgG⁺ cell の頻度は $29 \pm 3\%$ で、BF の $6 \pm 1\%$ 、脾臓の $2 \pm 0\%$ より高かった。加えて、GC cell の $5 \pm 0\%$ が sIgA を発現していたのに対し、BF および脾臓は sIgA⁺ の細胞をほとんど含んでいなかった (BF では $0 \pm 0\%$ 、脾臓では $1 \pm 0\%$)。このように、GC は IgG あるいは IgA アイソタイプを発現している多くの細胞と、IgM アイソタイプを発現しているわずかの細胞を含んでいた。これらの結果は、GC はアイソタイプスイッチを引き起こす主要な場所であることを示唆している。

3-3. GCにおけるアイソタイプスイッチ

GC、BF および脾臓における IgG⁺ cell をさらに anti- γ , anti- μ , anti-Bu1a を用い two-color flow cytometry で調べた。表 3 に示すように、GC cell の $27 \pm 7\%$ が sIgM⁺IgG⁺ single positive cell であった。これは IgM から IgG へのアイソタイプスイッチが起こった結果によるものと考えられる。sIgM⁺IgG⁺ single positive cell は GC の IgG⁺ cell の約 90% に及んでいた。一方、BF および脾臓は、sIgM⁺IgG⁺ single positive cell をそれぞれわずか $0 \pm 0\%$ 、 $1 \pm 0\%$ しか含んでいなかった。アイソタイプスイッチを起こしていないと考えられる sIgM⁺IgG⁻ cell の頻度は、GC では $2 \pm 1\%$ であったのに対し、BF では $81 \pm 3\%$ 、脾臓では $26 \pm 1\%$ であった。IgG producing plasma cell に分化するであろう IgG^{brightest} cell は GC ではみられたが (図 8 A,B)、BF ではみられなかった (図 8 C,D) [Okumura, et al., 1976]。BF は sIgM⁺IgG^{dull} cell を含んでおり、これは yolk IgG の付着によって形成されたものであり、IgM から IgG へのアイソタイプスイッチによるものではない [Ekino, et al., 1995]。まとめると、これらの結果は、GC がアイソタイプスイッチの特有の場を備えていることを示している。

さらに、GC は Bu1a⁺IgG⁺ cell を $5 \pm 1\%$ 含んでいた (表 4)。これは IgG を産生している plasma cell であると考えられる。なぜならば、plasma cell は B cell のマーカーである Bu1a を失うからである [Ekino, et al., 1995; Houssaint, et al., 1987]。BF および脾臓は Bu1a⁺IgG⁺ cell をそれぞれ $0 \pm 0\%$ 、 $1 \pm 0\%$ しか含んでいなかった。これらの結果は GC が B cell の IgG 産生 plasma cell へ分化する場を提供していることを示唆している。

表 3. ニワトリ GC、ファブリシウス嚢および脾臓を構成する細胞における IgM
および IgG の発現の割合 ^{a)}

Antibodies	GC	The bursa	Spleen
	(4) ^{b)}	(8)	(9)
IgM ⁺ IgG ⁺	27 ± 7 ^{c)}	0 ± 0	1 ± 0
IgM ⁺ IgG ⁺	3 ± 1	4 ± 1	2 ± 1
IgM ⁺ IgG ⁻	2 ± 1	81 ± 3	26 ± 1

a) 2-8 週令のニワトリを NIP-BSA で免疫した後、それぞれを構成する細胞の発現
を flowcytometer を使って解析した。

b) 解析したニワトリの数

c) 平均±標準誤差

表 4. ニワトリ GC、ファブリシウス嚢および脾臓の構成する細胞における Bu1a
および IgG の発現の割合 ^{a)}

Antibodies	GC	The bursa	Spleen
	(4) ^{b)}	(7)	(12)
Bu1a ⁻ IgG ⁺	5 ± 1 ^{c)}	0 ± 0	1 ± 0
Bu1a ⁺ IgG ⁺	25 ± 4	6 ± 1	2 ± 0
Bu1a ⁺ IgG ⁻	39 ± 3	90 ± 1	22 ± 1

a) 2-8 週令のニワトリを NIP-BSA で免疫した後、それぞれを構成する細胞の発現
を flowcytometer を使って解析した。

b) 解析したニワトリの数

c) 平均±標準誤差

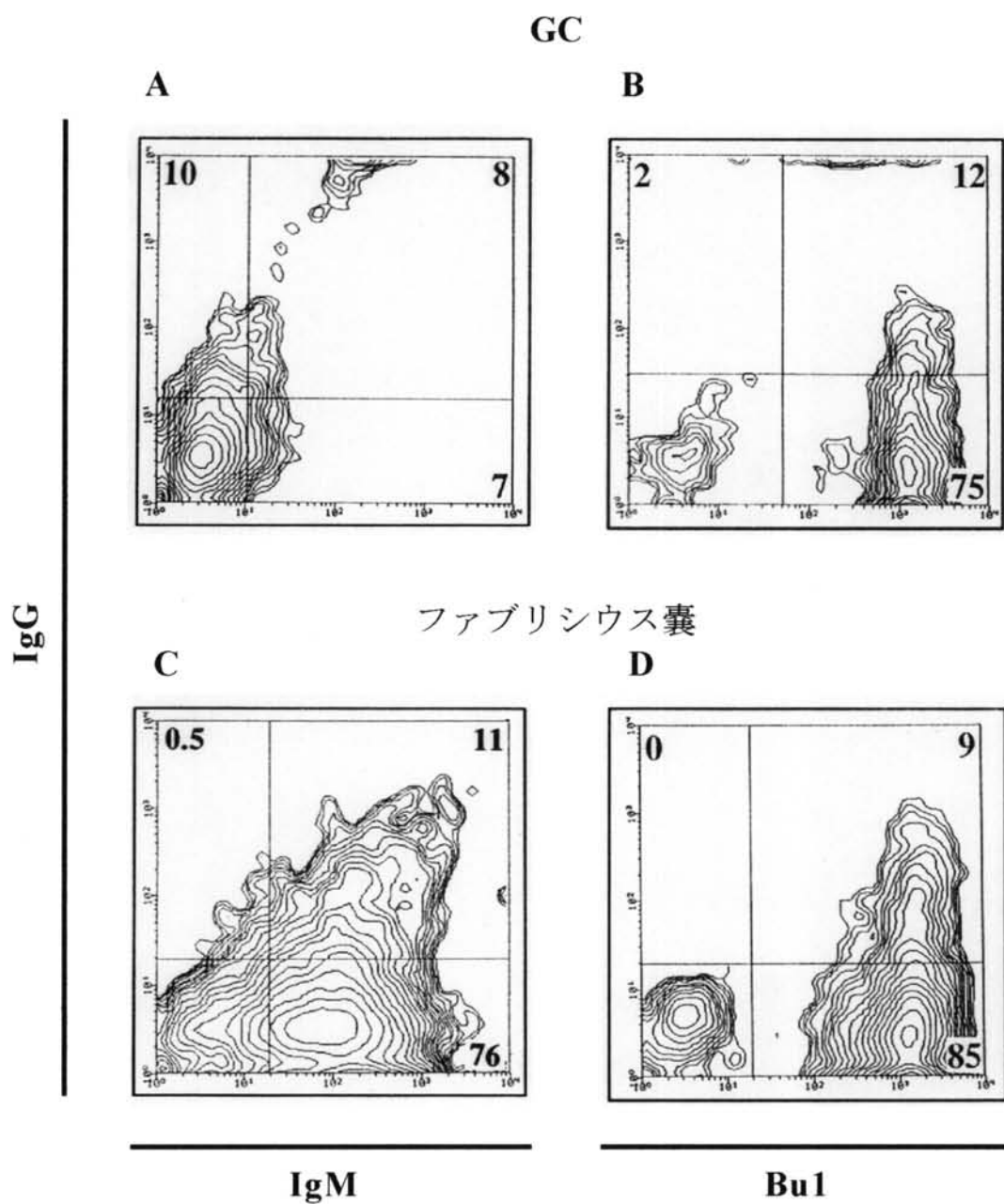


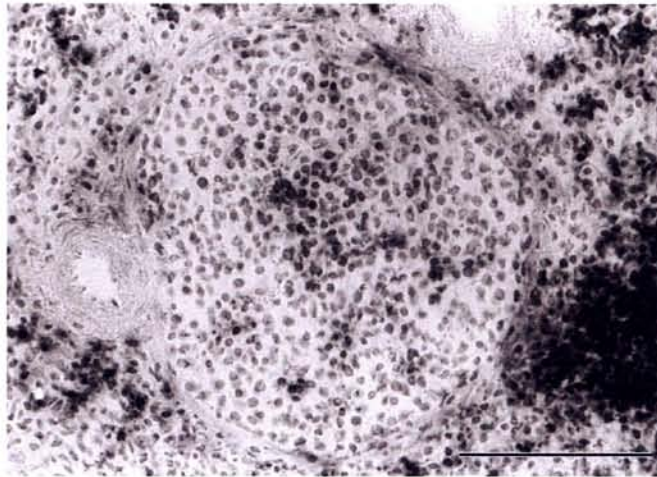
図 8. ニワトリGC構成細胞およびファブリシウス囊構成細胞のBu1a、sIgMおよびsIgGの発現強度

- (A) : GC細胞におけるsIgMおよびsIgGの発現強度
 (B) : GC細胞におけるBu1aおよびsIgGの発現強度
 (C) : ファブリシウス囊細胞におけるsIgMsおよびsIgGの発現強度
 (D) : ファブリシウス囊細胞におけるBu1aおよびsIgGの発現強度

3-4. GC における CD4⁺ T cell および CD8⁺ T cell の分布

T cell (CD3⁺ T cell) は GC の構成する細胞の 12%を占めていた (表 2)。CD3⁺ T cell は CD4⁺ T cell と CD8⁺ T cell の 2 種類がある。そこで、これらの T cell の分布を免疫ペルオキシダーゼ染色によって調べてみた。その結果、CD4⁺ T cell は濾胞内に多く分布しているのが観察された (図 9 A)。CD4⁺ T cell は主に LZ に分布していた。一方、CD8⁺ T cell は GC 外に分布しているものの、GC 内には分布していなかった (図 9 B)。この結果から、GC の T cell の大部分が CD4⁺ T cell であると推測される。このことから、CD4⁺ T cell が GC における B cell のアイソタイプスイッチやplasma cell への分化などに重要な役割を果たしていると考えられる。

A



B

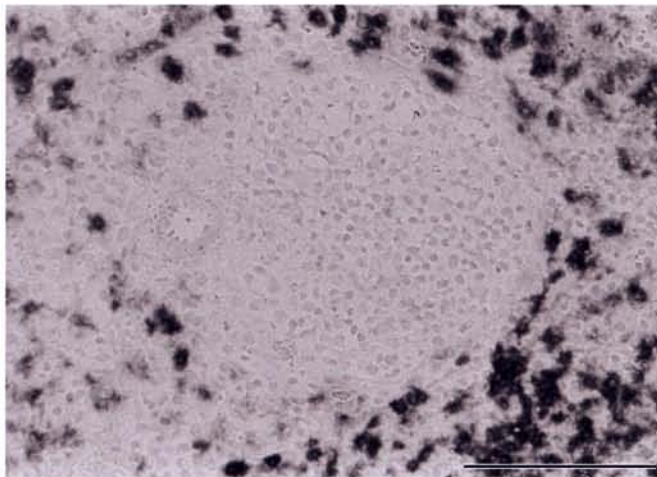


図 9. 脾臓GCにおける T cell の分布

(A): GCにおけるCD4+ T cellの分布

(B): GCにおけるCD8+ T cellの分布

barは50 μ mを示す。

第4章 考察

哺乳類において、単一の GC はリンパ組織から単離されるのが困難なため、GC の細胞の構成は明らかにされていなかった。ニワトリにおいて、GC は哺乳類の GC と同等の構造をもち、脾臓から単離することが可能である[Arakawa, et al., 1996; Arakawa, et al., 1998; Hoshi, 1972; Jeurissen, et al., 1994(a); Smithman, 1977; Yasuda, et al., 2003]。私たちは脾臓から単一の GC を単離する方法を樹立した。私たちは、図 7 で示されているように、単一の完全な GC を入手することができた。この方法を用いて、私たちは GC の特徴的な細胞構成を明らかにした。単離された GC は 64% の B cell と 12% の T cell を含んでいた。一方、脾臓は 24% の B cell と 59% の T cell を含んでいた。これらの結果は、GC は脾臓のなかの独立した構造物として形成していることを示している。

GC の細胞の sIg で最も顕著なアイソタイプは IgG であった。GC における sIgG⁺ cell の頻度は、脾臓よりおよそ 15 倍高かった。GC はまた、sIgA⁺ cell を脾臓よりおよそ 5 倍多く含んでいた。一方、GC における sIgM⁺ cell の頻度は、脾臓よりも極めて低かった。これらの結果は、IgM から IgG へ、もしくは IgG から IgA へのアイソタイプスイッチが GC で起こったことを示している。さらに、IgM から IgG へのアイソタイプスイッチをすでに終えていると考えられる IgM⁺IgG⁺ single positive cell は、GC 内の IgG⁺ cell のおよそ 90% にも及んでいた。これらの結果は、GC が B cell のアイソタイプスイッチの特有な場であることを明らかにした。

Bu1a はニワトリにおける B cell の細胞膜表面マーカーであり、plasma cell に分化した後は失われる[Ekino, et al., 1995; Houssaint, et al., 1987]。私たちは、sIgG⁺ cell における Bu1a マーカーの発現を調べた。Bu1a-IgG⁺ cell は BF と脾臓でほとんど検出されなかった。一方、GC は Bu1a-IgG⁺ cells を 5% 含み、しかもそれらの多くは IgG^{brightest} cells であった。IgG^{brightest} cells が IgG secreting cell になると報告されている[Okumura, et al., 1976]。これらの結果は、GC の環境が plasma cell あるいは IgG secreting cell へ分化するための優先的な場を備えているということを明らかにしている。

GC における T cell の phenotype に関する分析は、哺乳類と同様に、ニワトリの LZ において CD4⁺ T cell が優勢であることを明らかにした[MacLennan, 1994; Nieuwenhuis, et al., 1984]。CD8⁺ T cell は GC ではほとんどみられなかった。私たちの以前の研究で、 γ RNA に特異的な probe を用いた in situ hybridization によって検出される IgG producing cell は、LZ に観察された[Yasuda, et al., 1998; Yasuda, et al., 2003]。このことは、GC の LZ で IgG へのアイソタイプスイッチが生じていることを示している。LZ の CD4⁺ T cell は GC の B cell がアイソタイプスイッチおよび plasma への分化することに貢献しているのではないかと考えられる[Kelsoe, 1995(a); Kroese, et al. 1990; Yasuda, et al., 1998]。

第5章 結語

私たちはニワトリの GC を単離する方法を樹立した。この方法によって、単一の GC を構成する細胞に単染色および二重染色を施すことができた。それにより GC の構成細胞について種類のみならず質的量的にも明らかにすることができた。さらに GC の B cell の分化について詳細に調べることができた。

本研究で用いたこの手法は、今後、ニワトリの GC を構成する個々の細胞の特徴をさらに詳細に解析する際に有効であると考えられる。ニワトリの脾臓 GC の研究結果は、哺乳類の GC にも演繹できると考えている。

参考文献

Arakawa, H., S. Furusawa, S. Ekino, and H. Yamagishi. 1996. Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers. *EMBO J.* 15: 2540-2546.

Arakawa, H., K. Kuma, M. Yasuda, S. Furusawa, S. Ekino, and H. Yamagishi. 1998. Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers. *J Immunol.* 160: 4232-4241.

Chan, M.M., C.H. Chen, L.L. Ager, and M.D. Cooper. 1988. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *J Immunol.* 140: 2133-2138.

Chen, C.H., J.E. Lehmeyer, and M.D. Cooper. 1982. Evidence for an IgD homologous on chicken lymphocytes. *J Immunol.* 129: 2580-2585.

Chen, C.H., L.L. Ager, G.L. Gartland, and M.D. Cooper. 1986. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. *J Exp Med.* 164: 375-380.

Dasso, J.F., H. Obiakor, H. Bach, A.O. Anderson, and R.G. Mage. 2000. A morphological and immunohistological study of the human and rabbit appendix for comparison with the avian bursa. *Dev Comp Immunol.* 24: 797-814.

Ekino, S., B. Riwar, F.G.M. Kroese, E.H. Schwander, G. Koch, and P. Nieuwenhuis. 1995. Role of environmental antigen in the development of IgG⁺ cells in the bursa of Fabricius. *J Immunol.* 155: 4551-4558.

Han, S, S.R. Dillon, B. Zheng, M. Shimoda, M.S. Schlissel, and G. Kelsoe. 1997. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science*. 278: 301-305.

Heinen, E., P. Coulie, J. van Snick, M. Braun, N. Cormann, M. Moeremans, C. Kinet-Denoel, and L.J. Simar. 1986. Retention of immune complexes by murine lymph node or spleen follicular dendritic cells: role of antibody isotype. *Scand J Immunol*. 24: 327-334.

Houssaint, E., E. Diez, and J.R.L. Pink. 1987. Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen. *Immunology*. 62: 463-470.

Hoshi, H. 1972. On the Nature of the Periellipsoidal Lymphoid Tissue of Chick Spleen. *Tohoku J exp Med*. 106: 285-305.

Jeurissen, S.H.M., L., Vervelde, and E.M. Janse. 1994(a). Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. *Poultry Science Rev*. 5: 183-207.

Jeurissen, S.H.M., and E.M. Janse. 1994(b). Germinal centers develop at predilicted sites in the chicken spleen. In: *In Vivo Immunology* (Heinen, E. et al., editors). New York: Plenum Press. p.237-241.

Jones, W.R., M.D. Kaye, and R.M.Y. Ing. 1972. The Lymphoid Development of the Fetal and Neonatal Appendix. *Biology of the neonate: foetal and neonatal reseach*. 20: 334-345.

Kelsoe, G. 1995(a). *In situ* studies of the germinal center reaction. Adv Immunol. 60: 267-288.

Kelsoe, G. 1995(b). The germinal center reaction. Immunology Today. 16: 324-326.

Koch, G., and I.C.M.A. Jongenelen. 1989. Enzyme Immunospot Assay for the Detection of Immunoglobulin- and antibody-secreting cells in chickens. In: Recent Advances in Avian Immunology Research (Bhogal, B., Koch G. editors). Alan R. Liss, Inc. p. 67-77.

Kraal, G., I.L. Weissman, and E.C. Butcher. 1982. Germinal centre B cells: antigen specificity and changes in heavy chain class expression. Nature. 298: 377-379.

Kroese, F.G.M., W. Timens, and P. Nieuwenhuis. 1990. Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. Current Topics in Pathology. 84: 103-148.

Liu, Y.J., G.D. Johnson, J. Gordon, and I.C.M. MacLennan. 1992. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. Immunology Today. 13: 17-21.

MacLennan, I.C.M. 1994. Germinal centers. Annu Rev Immunol. 12: 117-139.

Nahm, M.H., F.G.M. Kroese, and J.W. Hoffmann. 1992. The evolution of immune memory and germinal centers. Immunol Today. 13: 438-441.

Nieuwenhuis, P., and D. Opstelten. 1984. Functional anatomy of germinal centers. *The American Journal of Anatomy*. 170: 421-435.

Okumura, K., M.H. Julius, T. Tsu, Leonore A. Herzenberg, and L.A. Herzenberg. 1976. Demonstration that IgG memory is carried by IgG-bearing cells. *Eur J Immunol*. 6: 467-472.

Papavasiliou, F., R. Casellas, H. Suh, X.F. Qin, E. Besmer, R. Pelanda, D. Nemazee, K. Rajewsky, and M.C. Nussenzweig. 1997. V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science*. 278: 298-301.

Pink, J.R., and A.M. Rijnbeek. 1983. Monoclonal Antibodies against chicken lymphocyte surface antigens. *Hybridoma*. 2: 287-296.

Reynolds, J.D., and B. Morris. 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol*. 13: 627-635.

Reynolds, J.D. 1987. Mitotic rate maturation in the Peyer's patches of fetal sheep and in the bursa of Fabricius of the chick embryo. *Eur J Immunol*. 17: 503-504.

Rose M.L., M.S.C. Birbeck, V.J. Wallis, J.A. Forrester, and A.J.S. Davis. 1980. Penut lectin binding properties of germinal centres of mouse lymphoid tissue. *Nature*. 284: 364-366.

Sminia, T., E.M. Janse, and B.E.C. Plesch. 1983. Ontogeny of Peyer's Patches

of the Rat. Anat Rec. 207: 309-316.

Smithyman, A.M. 1977. A simple procedure for the isolation of germinal centres from chicken spleen. Dev Comp Immunol. 1: 263-270.

Weinstein, P.D., P.A. Schweitzer, J.A. Cebra-Thomas, and J.J. Cebra. 1991. Molecular genetic feature reflecting the preference for isotype switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cell. International Immunology. 3: 1253-1263.

White, R.G., D.G. Henderson, M.B. Eslami, and K.H. Nielsen. 1975. Localization of a protein antigen in the chicken spleen. Effect of various manipulative procedures on the morphogenesis of the germinal centre. Immunology. 28: 1-21.

Yasuda, M., Y. Taura, Y. Yokomizo, and S. Ekino. 1998. A comparative study of germinal center: fowls and mammals. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 21: 179-189.

Yasuda, M., S., Tanaka, H. Arakawa, Y. Taura, Y. Yokomizo, and S. Ekino. 2002. A comparative study of gut-associated lymphoid tissue in calf and chicken. Anat Rec. 266: 207-217.

Yasuda, M., E. Kajiwarra, S. Ekino, Y. Taura, Y. Hirota, H. Horiuchi, H. Matsuda, and S. Furusawa. 2003. Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic geminal center after antigenic stimulation. Dev Comp Immunol. 27: 159-166.

Yasuda, M., C.N. Jenne, L.J. Kennedy, and J.D. Reynolds. 2006. The sheep and cattle Peyer's patch as a site of B-cell development. *Vet Res.* 37: 401-415.

浴野成生. 2002. B細胞の系統発生. *医学の歩み*. 200: 569-574.

1. 序論

ヒトは、咽頭扁桃、耳管扁桃、口蓋扁桃、舌扁桃、パリエル板及び虫垂という MALT (mucosa-associated lymphoid tissue : 粘膜関連リンパ組織) をもっている。これらの組織は、B cell を中心としたリンパ濾胞（主に胚中心）と濾胞間に分布する T 細胞と粘膜上皮から構成されている [Nave, et al., 2001]。リンパ濾胞に接した上皮は濾胞関連上皮 (follicle associated epithelium : FAE) と呼ばれ、抗原を捕捉すると言われている M cell を含んでいる [Neutra, et al., 1996]。

これらの MALT は、食物、腸内細菌等の環境抗原の刺激を受けていると漠然に理解されているが、具体的にはどのような経路で抗原がリンパ組織を刺激しているかは未だに明らかでない。

ニワトリのファブリシウス嚢は、B cell を供給する最大の場所、即ち B cell の中枢あるいは一次リンパ組織であると同時に、MALT でもある [Glick, et al., 1956; Lydyard, et al., 1976; Weill, et al., 1987]。ファブリシウス嚢の内腔は、総排泄腔と連絡し、常時腸管内容物を反射で取り込んでいる [Bockman, et al., 1973; Bockman, et al., 1977; Sayegh, et al., 2000; Schaffner, et al., 1974(a); Sorvari, et al., 1975; Sorvari, et al., 1977]。ファブリシウス嚢は、およそ一万個のリンパ濾胞からなり、それぞれの濾胞は強い貪食能を持つ FAE に接している [Bockman, et al., 1973; Bockman, et al., 1977; Olah, et al., 1978; Sayegh, et al., 2000; Schaffner, et al., 1974(a); Sorvari, et al., 1975; Sorvari, et al., 1977]。FAE から墨等の無機物質が濾胞に運び込まれるのは以前から報告されていた [Bockman, et al., 1973; Schaffner, et al., 1974(a); Sorvari, et al., 1975; Sorvari, et al., 1977]。ただし FAE と濾胞にはアミノペプチダーゼ等の消化酵素が豊富にあり、細菌、蛋白等の有機物はたとえ上皮に捕捉されても分解される [Grossi, et al., 1977; Ruuskanen, et al., 1977; Schaffner, et al., 1974(a); Schaffner, et al., 1974(b)]。ファブリシウス嚢に投与した有機物の抗原は、いつも上皮のアピカルサーフェスにのみ検出され、リンパ球の分布する濾胞内で検出されることはほとんどなかった。

しかし抗原をファブリシウス嚢内腔に投与すると、抗原特異的な免疫応答の増幅あるいは、血液中に抗体が誘導されることが報告されている[Sorvari, et al., 1975; Sorvari, et al., 1977]。この現象は、ファブリシウス嚢内腔に投与された抗原が何らかの形でファブリシウス嚢の B cell を刺激していることを強く示唆している。

我々は、腸管の抗原がどのようにしてファブリシウス嚢濾胞に保持され免疫系を刺激するのかを調べてきた[Ekino, et al., 1979; Ekino, et al., 1980; Ekino, et al., 1985(a); Ekino, et al., 1985(b); Ekino, et al., 1993]。環境抗原が消化酵素の分解を免れ、リンパ濾胞に長期間保持されるには、母親由来の抗体と結合することが必要であることを確認したので、簡単に報告したい。

2. 要旨

ファブリシウス嚢に投与された抗原は、対応する特異的母親由来の抗体と結合することにより、濾胞上皮と濾胞髄質の消化酵素による分解から免れ、長期間濾胞髄質の中心部に樹状様に分布する。これら抗原抗体複合体は、おそらくファブリシウス嚢髄質の濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell : FDC) に保持されていると推測される。

3. 研究方法

・ニワトリ

受精卵は、一部 inbred の H.B15 strain (Kumamoto, Japan) および outbred White Leghorn chickens (Mie, Japan) を用いた。卵は私たちの研究室で孵卵、孵化させた。

・母親由来の IgG のないニワトリのつくり方

孵化 18 日目に外科的に BF を取り (SBx)、母ニワトリから IgG 産生を排除した (Yasuda, et al., 1998)。SBx された母ニワトリは隔離された清潔な部屋で飼育され、抗生物質が投与され、性成熟まで生き延び、IgG のない卵を産むことがで

きた (Yasuda, et al., 1998)。私たちは SBx された母ニワトリを 1.5 年もの間飼育し、ついに母親由来の IgG のない受精卵およびニワトリを手に入れることに成功した。

- ・抗体

ニワトリの、 μ -chain、 γ -chain、および Bu1 抗原に特異的なモノクローナル抗体 (mAbs) を用いた。HIS C12 (anti- μ) は University of Groningen および the Central Veterinary Institute-DLO で開発作製され確認された (Jeurissen, et al., 1988)。M-1 (anti- μ) は Sera-lab (Sussex, England) から購入された (Chen, et al., 1982)。CVI-ChIgG-47.3 (anti- γ) は the Central Veterinary Institute で開発作製され確認された (Koch, et al., 1989)。L22 (anti-Bu1a) は the Basel Institute for Immunology で作製された (Pink, et al., 1983)。

- ・免疫ペルオキシダーゼ染色

組織切片を、免疫ペルオキシダーゼ染色法を用いて mAbs で染色した (Ekino, et al., 1995)。Vectastain ABC kit (Vector lab. Inc., Burlingame, CA) を二次抗体として用いた。

- ・Whole-mount in situ hybridization

プライマーは、EMBL/GenBank/DDBJ の data bases からのヌクレオチドシーケンスから設計された。5' of Cm exon 3; CM3, AGTGGATCCGTCGTGCAGCAGGACAT: 3' of Cm exon 4; CM2, ATCGAATTCACCCGAAGCCCTATCCA: 5' of Cg exon 3; CG3, AGTGGATCCGACGGCGCTCAGAGCTG: 3' of Cg exon 4; CG4, GCGGTGGTGACGAATTCGGTGGCGGG。bCM3 および bCG2 は、ニワトリ C 遺伝子の 0.7 kb の PCR 断片およびニワトリ C 遺伝子の 0.5 kb の PCR 断片を挿入することで設計された。bCM3 および bCG2 プラスミドを使うためにハイブリ

ダイゼーション用に Digoxigenin (DIG) -UTP でラベルされた RNA プローブを準備した。Antisense プローブを作るために BamHI-linearized bCM3 および bCG2 が T3 RNA polymerase で転写され、sense プローブを作るために EcoRI-linearized bCM3 および bCG2 が T7 RNA polymerase で転写された。Whole-mount in situ hybridization は以前に報告された方法で行われた (Shimamura, et al., 1994)。

- ・細胞の準備と免疫蛍光検査法

BF の細胞は、細かく切った臓器をステンレス製の金網で漉して入手された。二重免疫蛍光染色法は以前報告した方法と同様に行われた (Ekino, et al., 1995)。

- ・yolk 由来の母親由来 IgG の精製

yolkに含まれる母親由来IgGは、カラギーナン溶液でyolkのリボ蛋白が除かれた後、ナトリウム硫酸塩で塩析された後、DEAE-Sephacel カラムでの chromatographyによって分離された(Hatta, et al., 1990)。

- ・anti-BSA yolk IgGの作成

母ニワトリ (outbred Mie, Japan) を、孵化後20週齢および22週齢の時に、0.5ml のcomplete Freund'sアジュバント (Difco, Dtroit, MI) を加えたBSA (1 mg/ 0.5ml, fraction V, Pharmasia) で免疫し、25週齢の時に0.5mlのincomplete Freund's アジュバント (Difco, Detroit, MI) を加えたBSA (1mg/ 0.5ml) で免疫した。anti-BSA 抗体の力価は免疫後11週でプラトーに達した (免疫前の0.1と比較すると約1.1にまで達した)。

- ・FITC-labelled maternal IgGの静脈内投与

精製された yolk IgG は、Goding の方法によって FITC (Dojindo, Kumamoto, Japan) と結合された (Goding, 1976)。FITC-MIgG (2 mg/0.1 ml) は、孵化 18

日目の MIgG のない胎児の尿漿膜の静脈に投与された。FITC-MIgG が投与された MIgG のないニワトリの BF は、孵化 20 日目と孵化後 10 日目に confocal microscopy で検査された。

- ・ FITC-MIgG および TRITC-BSA の BF 内腔への投与

BSA は TRITC (Research Organics, Ohio, USA) と結合された。8 μ l の生理食塩水に入っている BSA に対する抗体を含む FITC-MIgG (0.05mg) と TRITC-BSA 抗原 (0.05mg) を孵化 19 日目の胎児の BF 内腔に投与した (Fig. 13 A)。FITC-MIgG と TRITC-BSA の接種後に、bursal duct を結紮した (Ekino, et al., 1995)。

- ・ FITC-MIgG の尿漿膜の静脈への投与および TRITC-BSA の BF 内腔への投与

BSA に対する抗体を含む FITC-yolk IgG (2mg) を 0.1ml 生理食塩水に溶かし、孵化 18 日の胎児に注射した。加えて、0.1mg の TRITC-BSA を 8 μ l の生理食塩水に溶かし、孵化 19 日目の胎児の BF 内腔に投与した (Fig. 13 F)。TRITC-BSA の接種の後、bursal duct を結紮した。処置されたニワトリの BF は孵化後 10 日目に検査された。

- ・ confocal scanning laser microscope (CSLM) による画像分析

BF の組織切片はメタノールで 5 分間固定され、CSLM (Leica) で検査された。CSLM の 60 倍の対物レンズは、0.65 μ m の厚さの光学切断でおよそ、0.2 μ m の側面分割を作り出すことが可能である。抗原と抗体の co-localization を 60 倍の対物レンズを使って調べた。

4. 研究結果

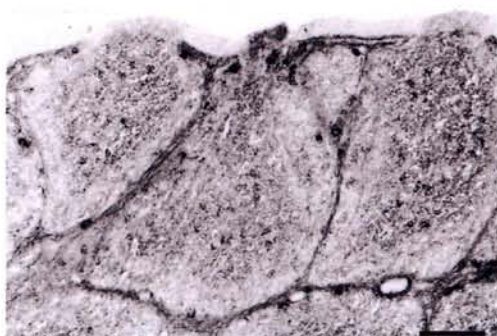
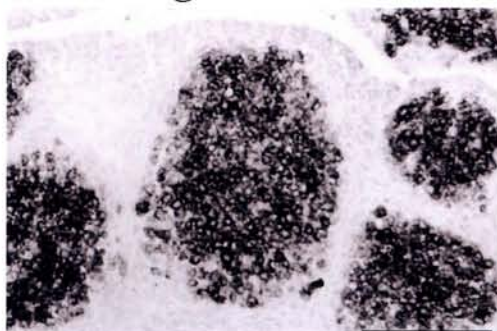
*ファブリシウス嚢に分布する IgG bearing cells は、IgG を産生していない。

図 10 に見られるように、孵化前には見られなかった IgG 陽性細胞が孵化後ファブリシウス嚢濾胞髄質に出現した (図 10 B)。しかし IgG 産生細胞は髄質には検出されなかった。これらのことから孵化後出現する IgG bearing cells は、ヒナの血液に由来する IgG が付着したものと推測された。即ち母親由来 (卵黄由来) の IgG (MIgG) が孵化後濾胞髄質に凝集したものと考えられた。

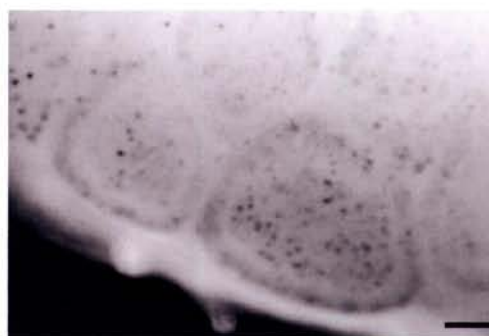
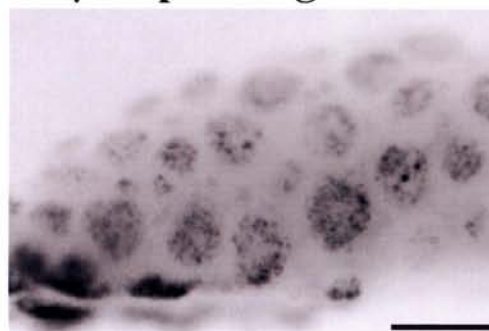
図.10

A

IgM⁺ cells



Cμ-expressing cells

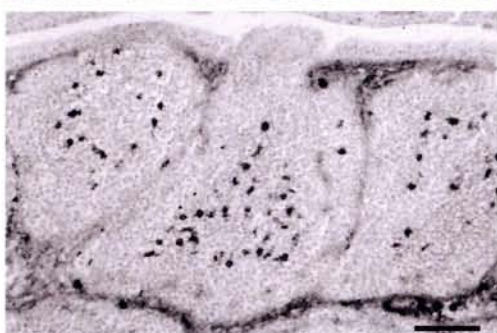
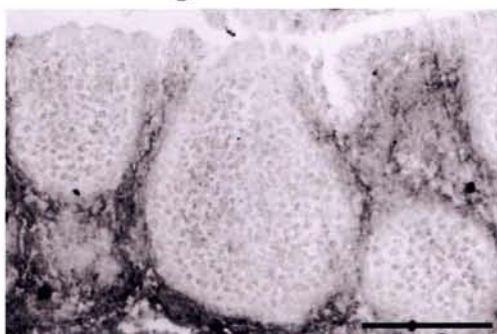


**Before
hatching**

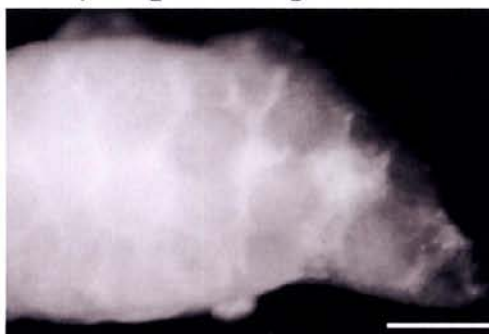
**After
hatching**

B

IgG⁺ cells



Cγ-expressing cells



**Before
hatching**

**After
hatching**

*ファブリシウス嚢に分布する IgG bearing cells は、母親由来の IgG が抗原依存性に凝集したものである。

私達は、孵卵 17 日から 18 日に外科的にファブリシウス嚢を除き、B cell の無いニワトリを作った。これらのニワトリの中から、IgM と IgG の無い母ニワトリを選び、IgG のない種卵を手に入れることに成功した。この種卵を孵化し、MIgG の無い (MIgG-free) ヒナを得た。一週間後にこのヒナのファブリシウス嚢を調べたところ正常のヒナのファブリシウス嚢髄質に見られる IgG bearing cells が全く見つからなかった (図 11 D)。更に以前発表した研究でも示したが、MIgG は正常にあるが腸管からの抗原刺激を奪ったニワトリ (BDL-ニワトリ) でも IgG bearing cells は誘導されなかった (図 11 G) (Ekino, et al., 1995)。これらのことから、孵化後ヒナのファブリシウス嚢濾胞髄質に出現する IgG bearing cells は MIgG が抗原依存性に付着したものであることが明らかになった。

孵化後の正常ヒナのファブリシウス嚢では、IgM⁺IgG⁺ double positive cells が出現する。この IgG 陽性 B cell も MIgG を除くか、あるいはファブリシウス嚢への抗原刺激を無くすと出現しなくなった (図 11 E,F,H,I)。従って正常ヒナのファブリシウス嚢に孵化後出現する IgG 陽性 B cell は、MIgG が抗原依存性に B cell に付着したことによって出現したことが明らかになった。

MIgG を FITC で標識 (FITC-MIgG) して、MIgG-free の胎児と孵化後のヒナに投与すると、胎児では FITC-MIgG は瀰漫性に分布し、凝集せず (図 12 A,B)、FITC-MIgG の B cell への付着も観察されなかった (図 12 C,D,E)。一方、孵化後のヒナでは、FITC-MIgG の樹状様の分布と B cell へ付着が観察された (図 12 F,G,H,I,J)。これらの事実は、MIgG が抗原依存性に、濾胞髄質に樹状様に凝集し、B cell に付着することを再確認した。

Fig. 11

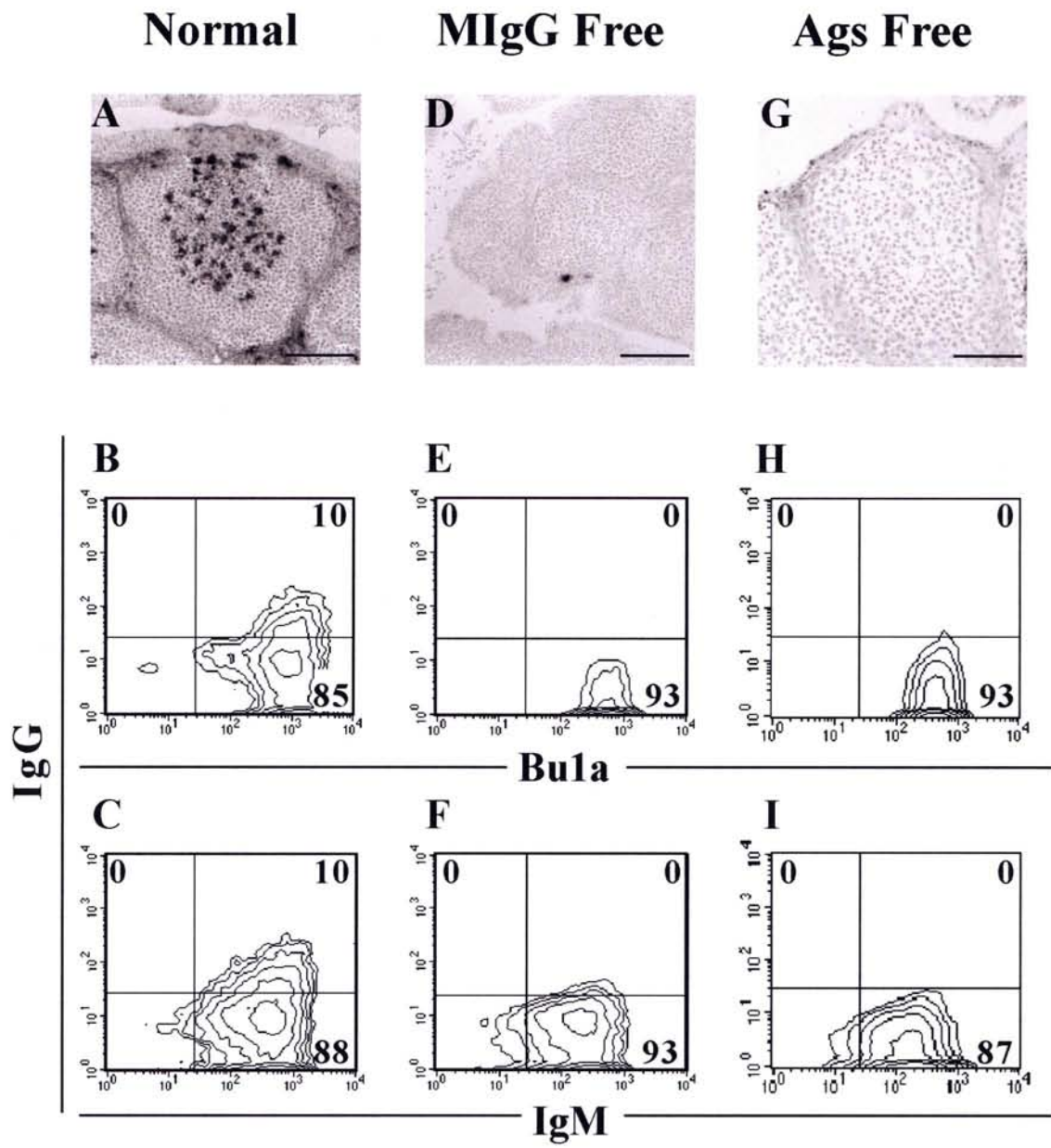
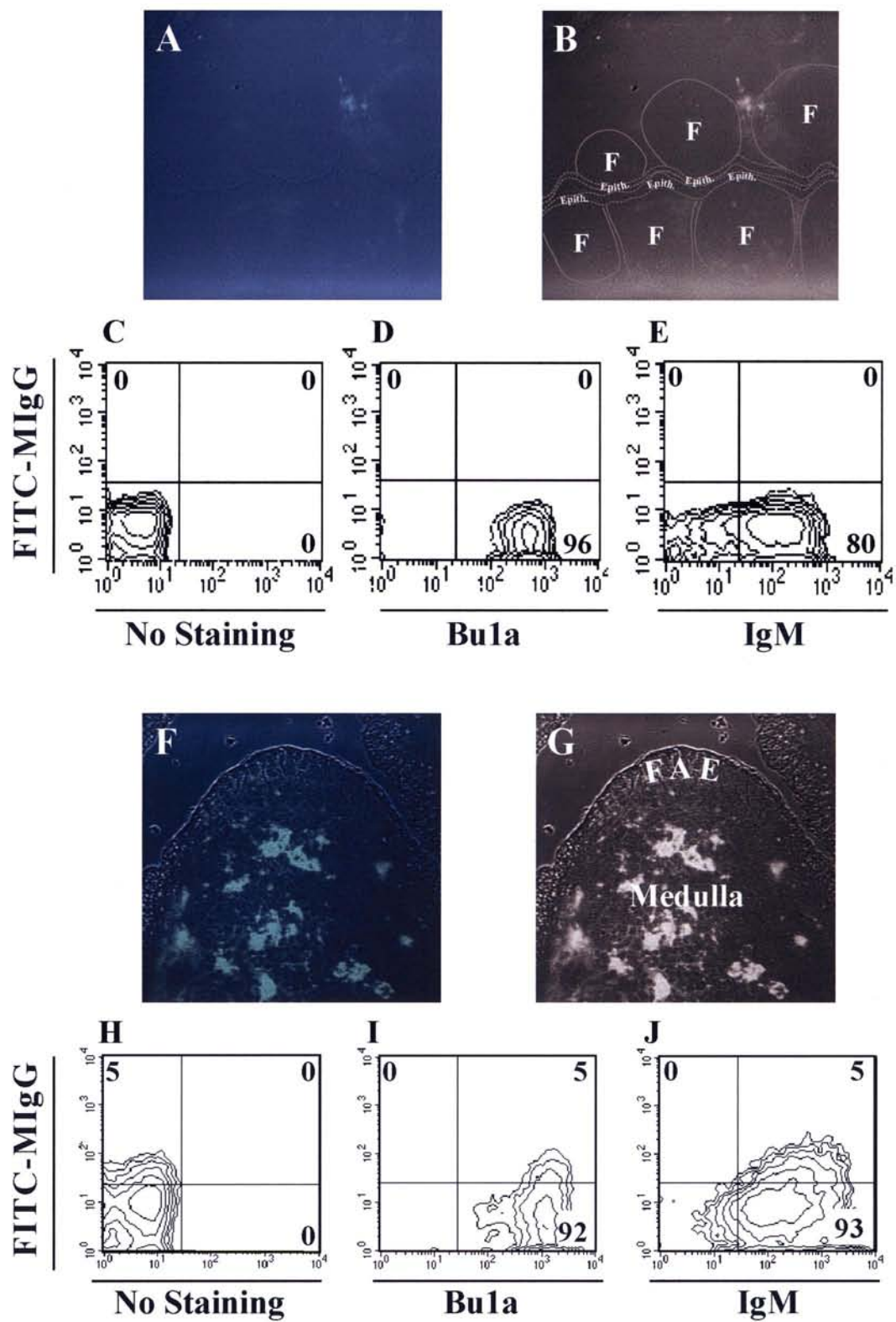


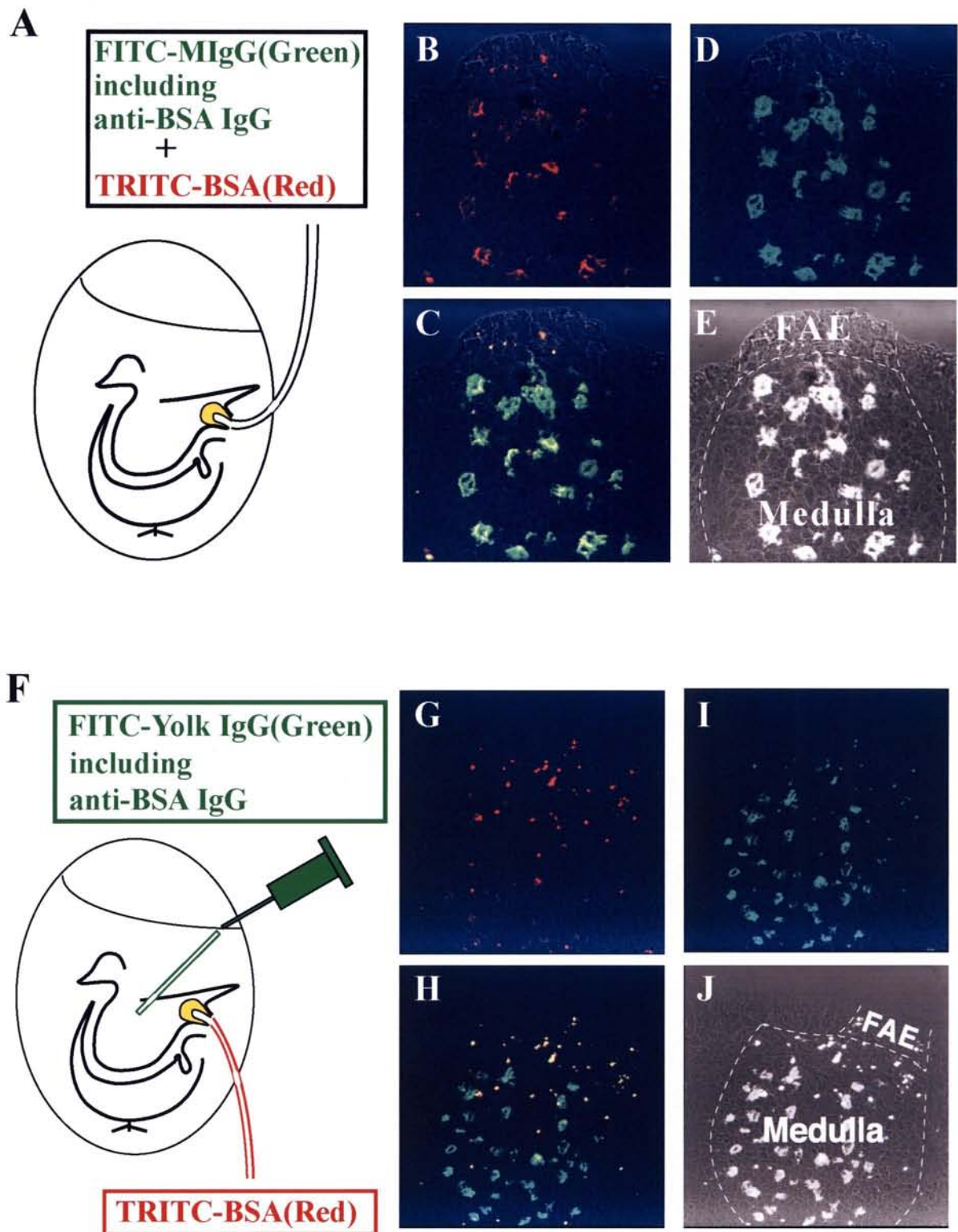
Fig. 12



*ファブリシウス嚢は、環境抗原と MIgG の複合体をつくり、髄質に保持する。

TRITC で標識した BSA と BSA に対する特異抗体を含む FITC-MIgG を同時にファブリシウス嚢内腔に投与すると、TRITC-BSA は FITC-MIgG と共存して樹状様に分布した (図 13 A,B,C,D,E)。更に FITC-MIgG を臍静脈に投与した後、TRITC-BSA をファブリシウス嚢内腔に投与すると、やはり TRITC-BSA と FITC-MIgG は共存して樹状様に分布した (図 13 F,G,H,I,J)。これらのことから環境抗原は、MIgG に対応する特異抗体があると複合体を作り、ファブリシウス嚢髄質に保持されることが明らかになった。

図.13



5. 考察

本研究によって、ファブリシウス囊髄質に分布する IgG bearing cells は、生後に母親由来の IgG が抗原依存性に凝集してできたものであることが明らかとなった。これら抗原抗体複合体は、おそらくファブリシウス囊髄質の濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell : FDC) に保持されていると推測される。

この研究の結果から、ファブリシウス囊における、外界環境抗原と母親由来の抗体の役割について次のように推測した。まず、胎児は yolk を介して母親由来の抗体を受け取る。孵化後、ヒナは腸管内容物を含む抗原にさらされるようになる。このとき、母親由来の抗体のなかで BF 内腔の外界環境抗原に特異的に反応するものは、抗原と結合し複合体となる。母親由来の複合体になった抗原は、濾胞上皮と濾胞髄質の消化酵素による分解から免れ、長期間濾胞髄質の中心部に樹状様に保持される。抗原抗体複合体によって BF の B cell は刺激、選択され、胎児期に形成された B cell の一次レパトリーの中から機能的な B cell レパトリーがつくられる。機能的な B cell は末梢のリンパ組織に送られ、再びその抗原が生体に入ったときにすばやく反応できるように備えている。このように、中枢リンパ組織といわれている BF で B cell が抗原と接触し選択されるシステムがあると仮定すると、ヒナは環境に適応した免疫系を全身のリンパ濾胞でより効率的につくることができると予想される。

6. 自由討論

私は、食物が栄養として腸管上皮から生体に吸収されることは知っていたが、腸管内腔の食物が上皮から異物として取り込まれ免疫系を刺激する可能性があるという話は、本研究室に入るまで全く知らなかった。それまで、私はバクテリアやウイルスなどの抗原（異物）はできるだけ体内に入らない方が良く考えていたし、異物を特殊な上皮からわざわざ体内に取り込んでいるとは想像すらしていなかった。私は、食物と腸管の免疫系との関係について極めて強い興味を抱いた。

私は、外来環境抗原(異物)が腸管の上皮からリンパ濾胞へ取り込まれることを、

ニワトリの肛門に墨を滴下する実験や FITC-BSA を BF 内腔に投与する実験で実際に観ることで納得することができた。また、外界環境抗原の刺激がファブリシウス嚢の発達や抗体産生に重要であることを、BDL ニワトリの実験で知ることができた。本研究ではニワトリがモデル動物であったが、ヒツジや、ウシ、ブタのパイエル板そしてウサギの虫垂もニワトリのファブリシウス嚢と類似のリンパ組織であることから、ヒトの MALT でもニワトリのファブリシウス嚢と類似のことが生じているのではないかと考えるようになった。現在行われている経口および経鼻ワクチンは、抗原が粘膜の特殊な上皮から入ることを前提とされたものである。実際に、経口および経鼻ワクチンは効果があると聞いている。このように、抗原が MALT の B cell を刺激し免疫系を発達させているのが事実であれば、外界環境抗原は生体の免疫系にとって重要なものであると、私は現在では考えるようになった。また、抗菌グッズに囲まれている現代の生活が果たしていいのか、疑問を持つようにもなった。抗原（菌）を排除する生活は、環境に適応した免疫系を獲得するために必要な抗原という情報を自ら排除しているようにも感じられる。

さらに、ニワトリでは、外界環境抗原が母親由来の抗体と複合体を作ることによって消化酵素による分解を免れ、B cell を刺激することを知った。このことから、母親の抗体が新生児の免疫系の発達に果たす新しい役割を考えるようになった。ヒトでは、母親は妊娠期間、胎盤を通じて IgG を胎児に渡す。また出産後、母親は母乳を介して IgG (IgA) を新生児に渡す。ニワトリファブリシウス嚢における母親由来の抗体と外界環境抗原との関わりが、ヒトの MALT においても当てはまるならば、新生児は外界環境抗原と母親から受け取った抗体をもとに、環境に適応した免疫系を獲得すると考えられる。となると、新生児が多様な外界環境抗原にさらされることは、ある意味必要なことではなかろうかと私は思う。一方、母親が胎児や新生児に渡す IgG は、新生児が接触する多様な外界環境抗原に特異的でかつ多様な抗体であることが望ましいと私は思う。となると、母親は妊娠前から多様な外界環境抗原に接触し、それらに適応した抗体レパートリーを備えておくことが必要とも考えられないだろうか。

私は、家政教育時代まで、食物を栄養素という側面でしか捉えていなかった。博士課程で免疫系の研究を通じて、ヒトが摂取する食物が栄養素としてだけでなく免疫系を刺激する抗原となりうることや、母乳が乳児の栄養素としてだけでなく免疫系を獲得するための基礎となることを知った。博士課程で免疫について学ぶことができたおかげで、食物を免疫学的側面から捉えるきっかけを得ることができたと思う。

また、私は家政教育時代に水俣病患者の食生活の聞き取り調査を行っていたこともあって、本研究室で行われているメチル水銀中毒症に関する研究にも参加してきた。現在も世界中でメチル水銀中毒症が起こっていることを、またメチル水銀中毒が私たちの現在の生活、特に食生活と無関係でないことを、私は本研究室に入って初めて知った。魚介類（食物）に含まれるメチル水銀によって、中枢神経である脳の細胞が損傷され、感覚障害などが引き起こされることを知った。また、魚の種類や大きさによってメチル水銀濃度は異なるので、摂取する魚の選択を工夫することで有害なメチル水銀の摂取を少量に押さえながら、有益な栄養素を摂取することが可能であることも知った。これらのことから、メチル水銀と安全な食生活について考えるきっかけを得ることができた。

このように、食物を免疫学的側面やメチル水銀中毒症に関する側面から捉えるきっかけを私は本研究室で得ることができた。とはいっても、両方のテーマに関して私が理解していることはほんの少しだと思う。研究室の先生方が長年積み上げてこられた広く深い知識と経験に、またそれぞれの学問の奥の深さに圧倒された。また、事実に基づきながら、証拠をもって、しかも体を通して実感しながら、理解し学んでいくことの重要性を改めて教えてもらった。私は今ようやく、自分で動いて、調べ、学んで、理解していくスタート地点に来た気がする。これから、博士課程で学んだことをきっかけに、それらのテーマについて自分で調べ、納得しながら、理解し、学んでいきたい。また、そうして得られた知識を他の人々にわかりやすく伝えていきたいと思う。

* 参考文献

Bockman, D.E., and M.D. Cooper. 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.

Bockman, D.E., and W. Stevens. 1977. Gut-associated lymphoepithelial tissue: bidirectional transport of tracer by specialized epithelial cells associated with lymphoid follicles. *J Reticuloendothelial Society.* 21: 245-254.

Chen, C.H., J.E. Lehmeyer, and M.D. Cooper. 1982. Evidence for an IgD homologous on chicken lymphocytes. *J Immunol.* 129: 2580-2585.

Ekino, S., K. Matsuno, S. Harada, H. Fujii, Y. Nawa, and M. Kotani. 1979. Amplification of plaque-forming cells in the spleen after intracloacal antigen stimulation in neonatal chicken. *Immunology.* 37: 811-815.

Ekino, S., Y. Nawa, K. Tanaka, K. Matsuno, H. Fujii, and M. Kotani. 1980. Suppression of immune response by isolation of the bursa of Fabricius from environmental stimuli. *Aus J Exp Biol Med Sci.* 58:289-296.

Ekino, S., K. Suginochara, T. Urano, H. Fujii, K. Matsuno, and M. Kotani. 1985(a). The bursa of Fabricius: a trapping site for environmental antigens. *Immunology.* 55: 405-410.

Ekino, S., T. Urano, H. Fujii, and M. Kotani. 1985(b). The bursa of Fabricius as a trapping mechanism for environmental antigens. *Adv Exp Med and Biol.* 186: 487-493.

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.

Ekino, S., B. Riwar, F.G.M. Kroese, E.H. Schwander, G. Koch, and P. Nieuwenhuis. 1995. Role of environmental antigen in the development of IgG⁺ cells in the bursa of Fabricius. *J Immunology.* 155: 4551-4558.

Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap. 1956. The bursa of Fabricius and antibody production on the domestic fowl. *Poult Sci.* 35: 224-225.

Goding, J.W. 1976. Conjugation of antibodies with fluorochromes: modification to the standard methods. *J Immunol Meth.* 13: 215-226.

Grossi, C.E., P.M. Lydyard, and M.D. Cooper. 1977. Medullary localization of extracellular immunoglobulin and aminopeptidase in lymphoepithelial follicles of the chicken bursa of Fabricius and rabbit appendix. *Dev Comp Immunol.* 1: 157-164.

Hatta, H., M. Kim, and T. Yamamoto. 1990. A Novel Isolation Method for Hen Yolk Egg Antibody, "IgY". *Agric Biol Chem.* 54: 2531-2535.

Jeurissen, S.H.M., E.M. Jansen, S. Ekino, P. Nieuwenhuis, G. Koch, and G.F. De Boer. 1988. Monoclonal Antibodies as Probes for Defining Cellular Subsets in the Bone Marrow, Thymus, Bursa of Fabricius, and Spleen of the Chicken. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 19: 225-238.

Koch, G., and I.C.M.A. Jongenelen. Enzyme Immunospot Assay for the Detection of Immunoglobulin- and antibody-secreting cells in chickens. 1989. In: Recent Advances in Avian Immunology Research (B. Bhogal and G. Koch editors) Alan R. Liss, Inc. p. 67-77.

Lydyard, P.M., C.E. Grossi, and M.D. Cooper. 1976. Ontogeny of B cells in the chicken I. Sequential development of clonal diversity in the bursa. J Exp Med. 144: 79-97.

Nave, H., A. Gebert, and R. Pabst. 2001. Morphology and immunology of the human palatine tonsil. Anat Embryol. 204: 367-373.

Neutra, M.R., E. Pringault, and J.P. Kraehenbuhl. 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. Annu Rev Immunol. 14: 275- 300.

Olah, I., and B. Glick. 1978. The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. Poultry Sci. 57: 1445-1450.

Pink, J.R., A.M. Rijnbeek. 1983. Monoclonal Antibodies against chicken lymphocyte surface antigens. Hybridoma. 2: 287-296.

Ruuskanen, O., A. Toivanen, and J. Raekallio. 1977. Histochemical characterization of chickens lymphoid tissues. Dev Comp Immunol. 1: 231-240.

Sayegh, C.E., S.L. Demaries, K.A. Pike, J.E. Friedman, and M.J.H. Ratcliffe. 2000. The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell

development. Immunological Reviews. 175: 187-200.

Schaffner, T., J. Mueller, M.W. Hess, H. Cottier, B. Sordat, and C. Ropke. 1974(a). The Bursa of Fabricius: A Central Organ Providing for Contact between the Lymphoid System and Intestinal Content. Cellular Immunology. 13: 304-312.

Schaffner, T., M.W. Hess, and H. Cottier. 1974(b). A reappraisal of Bursal functions. Ser Haemat. 7: 568- 592.

Shimamura, K., S. Hirano, A.P. McMahon, and M. Takeichi. 1994. *Wnt-1*-dependent regulation of local E-cadherin and α N-catenin expression in the embryonic mouse brain. Development. 120: 2225-2234.

Sorvari, T., R. Sorvari, P. Ruotsalainen, A. Toivanen, and P. Toivanen. 1975. Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius. Nature. 253: 217-219.

Sorvari, R., and T.E. Sorvari. 1977. Bursa Fabricii as a peripheral lymphoid organ. Transport of various materials from the anal lips to the bursal lymphoid follicles with reference to its immunological importance. Immunology. 32: 499-505.

Weill, J.C., and C.A. Reynaud. 1987. The chicken B cell compartment. Science. 238: 1094-1098.

Yasuda, M., S. Furusawa, H. Matsuda, Y. Taura, T. Urano, Y. Yokomizo, and S.

Ekino. 1998. Development of maternal IgG-free chick obtained from surgically bursectomized hen. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease*. 21: 191-200.