

学位論文  
Doctoral Thesis

ファブリキウス嚢における常在大腸菌抗原と母親由来IgGの役割

(The role of indigenous *E. coli* antigens and maternal IgG  
in the bursa of Fabricius)

熊谷 佳世子

Kayoko Kumagai

指導教員

浴野 成生 前教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻生体微細構築学

紹介教授

若山 友彦 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻生体微細構築学

2016年度

学位論文

Doctoral Thesis

ファブリキウス嚢における常在大腸菌抗原と母親由来 IgG の役割

The role of indigenous *E. coli* and maternal IgG in the bursa of Fabricius

熊谷 佳世子

Kayoko Kumagai

熊本大学大学院 生命科学研究部 生体微細構築学分野

指導教員：生体微細構築学分野 浴野 成生 前教授

紹介教員：生体微細構築学分野 若山 友彦 教授

審査委員：免疫学分野 押海 裕之 教授

審査委員：形態構築学分野 福田 孝一 教授

審査委員：機能病理学分野 伊藤 隆明 教授

審査委員：細胞病理学分野 菰原 義弘 准教授

2016 年 10 月

## 目 次

要 旨 .....	1
学位論文の骨格となる参考論文.....	3
謝 辞 .....	4
略語一覧.....	5
第1章 研究の背景と目的.....	6
1. ファブリキウス囊の構造 .....	6
2. B 細胞の多様性獲得器官としてのファブリキウス囊.....	7
3. ファブリキウス囊における抗原捕捉機構 .....	8
4. ファブリキウス囊内腔の環境抗原 .....	9
5. ファブリキウス囊髄質における IgG 陽性細胞.....	9
6. MIgG のヒナ胎児への移行 .....	9
7. 本研究の目的 .....	10
第2章 実験方法 .....	11
1. 実験材料.....	11
3. 実験計画.....	11
4. 抗体 .....	11
5. 凍結切片作製 .....	12
6. 組織切片の免疫ペルオキシダーゼ染色.....	12
7. 組織切片の蛍光二重染色 .....	13
8. ELISA 用大腸菌抗原の準備.....	13
9. ELISA プレートへの大腸菌抗原のコーティング .....	14
10. 常在大腸菌抗原のポジティブコントロール染色.....	14

11. 血清中の抗大腸菌 IgG 抗体と抗大腸菌 IgM 抗体の抗体価測定 .....	15
12. 統計学的解析 .....	16
第3章 実験結果 .....	17
1. ファブリキウス囊の濾胞には大腸菌抗原が分布している .....	17
2. ファブリキウス囊髄質の大腸菌抗原は MIgG と共存している .....	21
3. 新生児期のファブリキウス囊は環境抗原の捕捉部位である .....	24
4. 抗大腸菌ポリクローナル抗体と二次抗体の特異性の検討 .....	26
5. 常在大腸菌抗原と MIgG によって形成される抗原抗体複合体は孵化後の抗大腸菌 IgM 抗体の発達に寄与する .....	28
第4章 考察 .....	30
第5章 結語 .....	33
第6章 参考文献 .....	34

## 要 旨

### 【目的】

ニワトリのファブリキウス嚢は一次リンパ器官として知られている。ファブリキウス嚢の濾胞は抗原を捕捉する濾胞関連上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) を備えている。しかし、タンパク質や細菌のような生物活性のある抗原はファブリキウス嚢の実質内には検出されてこなかった。私達のグループの研究結果は、ファブリキウス嚢髄質に観察される母親由来の IgG(maternal IgG: MIgG) が環境抗原との免疫複合体を形成していることを示唆した。そこで抗原は MIgG と免疫複合体を形成することによって酵素による消化から免れるという仮説のもとに、ファブリキウス嚢の常在菌である大腸菌が MIgG と複合体を形成し、ファブリキウス嚢濾胞髄質に保持されていることを検証した。さらにファブリキウス嚢に保持された免疫複合体が孵化後の免疫系の発達に及ぼす影響を検討した。

### 【方法】

大腸菌に対するポリクローナル抗体を用いた免疫ペルオキシダーゼ染色法によって、ファブリキウス嚢、脾臓および盲腸扁桃における大腸菌抗原の分布を研究した。また二重免疫染色法により大腸菌抗原と MIgG の共存を調べた。さらに常在大腸菌に対する血清 IgM の抗体価を ELISA 法で測定し、免疫複合体がファブリキウス嚢の B 細胞へ与える影響を検討した。

### 【結果】

孵化後のファブリキウス嚢髄質に凝集した大腸菌抗原が検出された。それらの大部分が MIgG と共存していた。大腸菌抗原は脾臓、盲腸扁桃の実質には検出されなかった。健常なニワトリは、孵化後、常在大腸菌に対する高い血清 IgM 抗体価の発達が見られた。一方、ファブリキウス嚢への腸管からの抗原の侵入を阻止したファブリキウス嚢管結紮術 (bursal duct ligation: BDL) を行ったニワトリでは常在大腸菌に対する高い血清 IgM 抗体価の発達が強く抑制された。

### 【考察】

新生児期のファブリキウス嚢は大腸菌抗原の捕捉部位であることが明らかになった。これら

の大腸菌抗原は **MIgG** とファブリキウス囊髄質で免疫複合体を形成し細網細胞に保持されていた。ファブリキウス囊濾胞髄質に捕捉された免疫複合体が特異的血清 **IgM** 抗体の急速な発達の誘導に重要な機能を果たしていることが示された。

#### 【結論】

本研究は、

- ① ファブリキウス囊濾胞髄質において、環境抗原は **MIgG** と免疫複合体を形成する。
- ② ファブリキウス囊濾胞髄質に保持された免疫複合体は、血中の特異的抗体を誘導すること明らかにした。

## 学位論文の骨格となる参考論文

### 1. 関連論文

- 1) Sonoda K, Noguchi K, Ekino S. Immune complexes of *E. coli* antigens and maternal IgG in the bursa of Fabricius. *Cell and Tissue Research* 354: 813-821. 2013

### 2. その他の論文

- 1) Ekino S, Arakawa H, Sonoda K, Noguchi K, Inui S, Yokoyama H, Kodama Y. The origin of IgG-containing cells in the bursa of Fabricius. *Cell Tissue Research* 348:537–550. 2012
- 2) Ekino S, Sonoda K. New insight into the origin of IgG bearing cells in the bursa of Fabricius. *International Review of Cell and Molecular Biology* 312: 101-137. 2014
- 3) Ekino S, Sonoda K, Inui S. Origin of IgM<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> lymphocytes in the bursa of Fabricius. *Cell and Tissue Research* 362:153–162. 2015

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々にご支援ご協力を賜りました。謹んで御礼申し上げます。本研究の過程におきまして懇切なるご指導とご鞭撻ならびに研究の楽しさと苦しさをご教示いただきました熊本大学大学院生命科学研究部生体微細構築学分野 浴野成生前教授に深謝申し上げます。論文作成におきまして多大なご配慮を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部生体微細構築学分野 若山友彦教授に深く御礼申し上げます。大腸菌の分離培養に際しましては熊本大学大学院生命科学研究部生体微細構築学分野 野口和浩助教にご協力いただきました。論文作成にあたり多くの貴重なご示唆と温かいご支援をいただきました熊本大学大学院生命科学研究部生体情報解析学分野 乾誠治教授に心より厚く御礼申し上げます。



## 略語一覧

FAE: follicle-associated epithelium 濾胞関連上皮

IFSE: interfollicular surface epithelium 濾胞間上皮

MIgG: maternal IgG 母親由来 IgG

FDC: follicular dendritic cell 濾胞樹状細胞

BDL: bursal duct ligation ファブリキウス嚢管結紮術

PBS: phosphate-buffered saline リン酸緩衝生理食塩水

PBS-T: phosphate-buffered saline with Tween 20 0.05% Tween 20 添加リン酸緩衝生理食塩水

DAB: 3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride

FITC: fluorescein isothiocyanate

TRITC: tetramethylrhodamine isothiocyanate

ELISA: enzyme-linked-immunosorbent assay

FcγR: Fcγ receptor Fcγ 受容体

## 第1章 研究の背景と目的

### 1. ファブリキウス嚢の構造

ファブリキウス嚢は総排泄孔背側に細い管でつながる盲端憩室型のリンパ組織である（図1A）(Schaffner et al. 1974; Sorvari et al. 1975)。内腔は10数個の縦のひだで占められ、互いに独立した約10,000個の濾胞が存在する（図1B）(Olah and Glick, 1978)。これらの濾胞は孵化前から上皮内に発達してできた髄質と孵化後基底膜より内側に発達する皮質から構成されている（図2）。髄質は基底膜によって全身循環から隔離されており、毛細血管のネットワークが基底膜を取り囲んでいる（図2）。また髄質は抗原捕捉能を持つM細胞で構成される濾胞関連上皮 (follicle-associated epithelium: FAE) を内腔面に備えている(Owen and Bhalla, 1983)。皮質にはB細胞以外にT細胞と形質細胞が分布している(Ekino et al. 1995, Yasuda et al. 2002)。リンパ管は濾胞間結合組織に分布している（図2）。

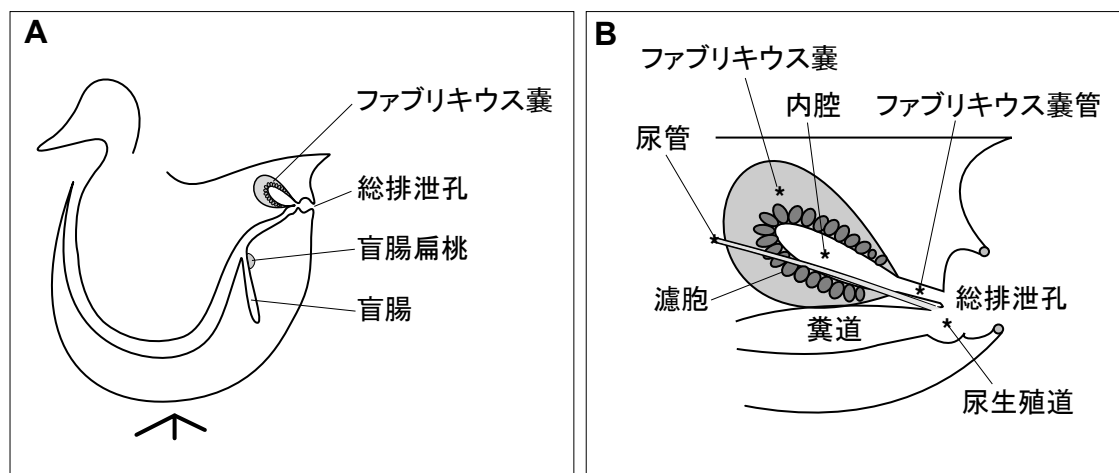


図1. ファブリキウス嚢の解剖

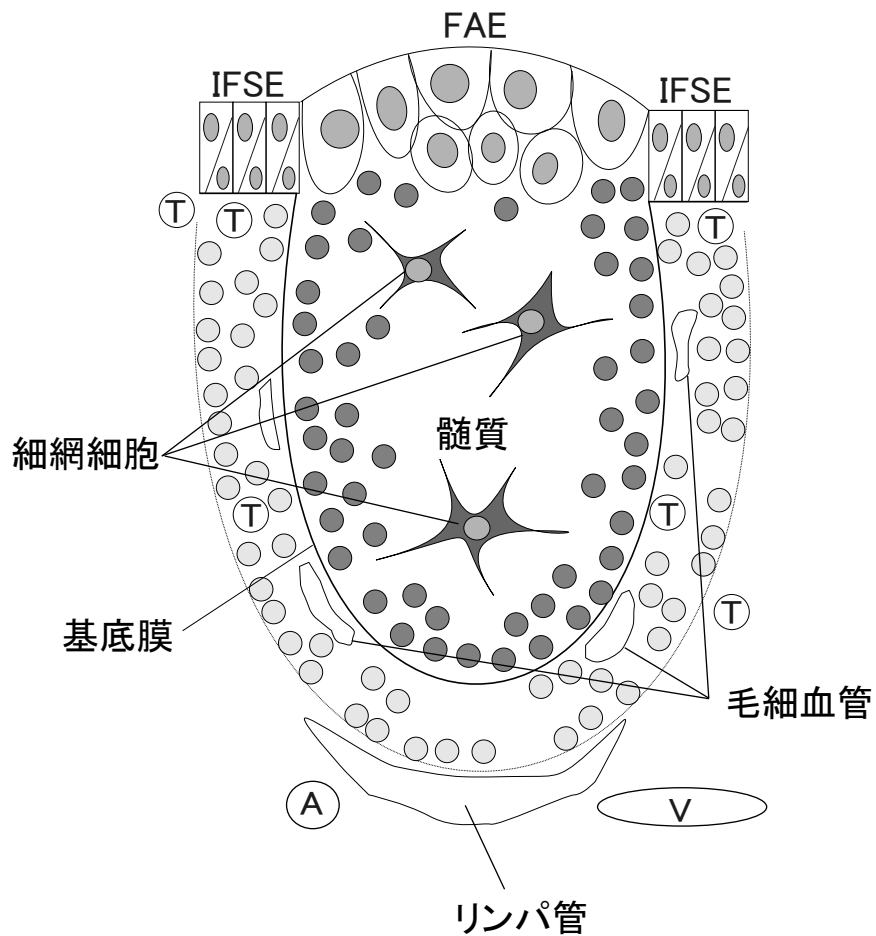


図2. ファブリキウス囊の組織

A:動脈、V:静脈、T:T細胞

## 2. B 細胞の多様性獲得器官としてのファブリキウス囊

鳥類において、ファブリキウス囊は B 細胞の増殖と多様化のための一次リンパ器官であり、B 細胞に増殖と多様性獲得のための微小環境を提供する(Reynaud et al. 1994, Ratcliffe 2006)。ヒナ胎児内の間葉組織で抗体遺伝子の再構成を終え膜型 IgM を発現している B 細胞は孵卵 14 日目頃ファブリキウス囊の上皮内に侵入し、濾胞髄質を形成し始める(Kincade and Cooper 1971; Houssaint et al. 1987)。ニワトリの B 細胞は多様性を形成するための VDJ 各ゲノム遺伝子の断片の数が少なく(Reynaud et al. 1987)、遺伝子再編成による多様性獲得は極めて少ない

(Ratcliffe and Paramithiotis 1990)。ファブリキウス嚢における B 細胞の多様性獲得は遺伝子再構成後の遺伝子変換あるいは体細胞高頻度突然変異によって生じる(Reynaud et al. 1987)。濾胞を形成する B 細胞は増殖する過程で遺伝子変換により初期の多様性を獲得する。ファブリキウス嚢における遺伝子変換は  $10^{11}$  種類以上の免疫グロブリンの多様性を生じさせると言われている(Ratcliffe and Paramithiotis, 1990)。この遺伝子変換がファブリキウス嚢における B 細胞の一次レパートアを誘導する。この遺伝子変換はランダムに起きるため、ファブリキウス嚢で生じた一次レパートアは無方向性で、機能的ではない (Rajewsky et al. 1987)。これらの一次レパートアを機能的なレパートアに変化させる機構については不明である。

### 3. ファブリキウス嚢における抗原捕捉機構

ファブリキウス嚢は総排泄孔とつながる腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue: GALT) でもあり(Schaffner et al. 1974; Sorvari et al. 1975)、細い管を介して腸管とつながっている。そのためファブリキウス嚢内腔には独特の常在細菌叢が生息している (Kimura et al. 1986)。ファブリキウス嚢の壁面にある薄い平滑筋層による蠕動運動と、呼吸運動と同期した律動的なファブリキウス嚢の吸引力により、総排泄孔に存在する環境物質はファブリキウス嚢内腔へ運搬される(Romanoff 1960, Schaffner et al. 1974)。

ファブリキウス嚢のリンパ濾胞は、抗原捕捉能をもつ FAE を備えている。FAE は内腔の環境抗原を取り込み、ファブリキウス嚢髄質へ移送する(Bockman and Cooper 1973; Schaffner et al. 1974; Sorvari et al. 1975; Sorvari and Sorvari 1977)。インディアンインクのような生物活性のないトレーサーが総排泄孔へ投与された場合、これらは FAE に取り込まれたあと髄質内の細胞間隙に移送される (Bockman and Cooper 1973; Schaffner et al. 1974; Sorvari et al. 1975; Sorvari and Sorvari 1977)。一方タンパク質や細菌のような生物活性のある抗原は髄質内に観察されない。ただし多量に抗原がある場合は一時的に髄質にとどまり、その後 24 時間以内に髄質から消失する (Fuller 1973; Schaffner et al. 1974; Sorvari and Sorvari 1977)。ファブリキウス嚢の FAE の細胞は $\alpha$ -ナフトール-アセテートエステラーゼと $\beta$ -グルクロニダーゼを有しており

(Schaffner et al. 1974)、髄質の細胞間隙にはアミノペプチダーゼが分布している (Grossi et al. 1977)。これらの酵素が、細菌等の微生物を急速に分解すると考えられてきた。

#### 4. ファブリキウス嚢内腔の環境抗原

ニワトリ胎児は、孵化3日前から肺による呼吸運動を開始しはじめる。呼吸運動に伴って、ファブリキウス嚢は羊水、卵白等を吸引する。孵化後、ファブリキウス嚢には *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科; *E. coli* 大腸菌に代表される *Escherichia* 属を標準属とする通性嫌気性のグラム陰性桿菌)、*Streptococcus* (連鎖球菌)、*Lactobacillus* (乳酸桿菌) 等の常在菌が発達する。これらの細菌は、胎児が卵殻をピッキングし始める孵化2日前頃から胎児を汚染し始める。これらのことから、ファブリキウス嚢への環境抗原の影響を検証するためには、ニワトリ胎児のファブリキウス嚢は孵化4日前には腸管から隔離する必要がある。

#### 5. ファブリキウス嚢髄質における IgG 陽性細胞

孵化後のファブリキウス嚢の組織切片には IgG 陽性細胞が髄質に検出される(Kincade and Cooper, 1971; Thorbecke et al. 1968)。ファブリキウス嚢は一次リンパ器官と考えられてきたので、この IgG 陽性細胞の出現は抗体のクラススイッチがファブリキウス嚢髄質で抗原の刺激を受けずに連続的に起こると推測されてきた (Kincade and Cooper 1971)。しかし私達のグループの研究により、ファブリキウス嚢髄質の IgG 陽性細胞はその場で生合成されたものではなく、凝集した MIgG が細網細胞に補足された結果生じたものであることが明らかになった (Ekino et al. 2012)。IgG 陽性細胞が MIgG の無いトリでは発達しないこと、ファブリキウス嚢への外界抗原の侵入を阻止すると IgG 陽性細胞が観察されないことから MIgG の凝集は MIgG と外界抗原の抗原抗体複合体によって形成されていることが推測された。

#### 6. MIgG のヒナ胎児への移行

MIgG は孵化の 2、3 日前より卵黄からヒナ胎児へ急激に移行し始める(Kowalczyk et al.

1985)。血中に入った MIgG の量は孵化後 3 日齢から 4 日齢にかけて急激に上昇する(Laursen et al. 1998)。ヒナに移行した MIgG は孵化後 2 週間から 3 週間で急速に血中から消えていく。

## 7. 本研究の目的

ファブリキウス嚢では、孵化後 MIgG が外界抗原と複合体を形成し、ファブリキウス嚢濾胞髄質に外界抗原免疫複合体を長期間保持していることを検証する。

1) 外界抗原として優勢常在菌である大腸菌に着目し、大腸菌抗原のファブリキウス嚢内における分布を組織学的手法により検証する。

2) ファブリキウス嚢濾胞髄質に保持された大腸菌抗原と MIgG の抗原抗体複合体が B 細胞の発達にどのような影響を及ぼすか調べるために、常在大腸菌特異的な血中 IgM 抗体の発達を調べた。

## 第2章 実験方法

### 1. 実験材料

実験には雑系ホワイトレグホンの種卵を用いた。孵卵、孵化および飼育は当分野実験室の孵卵器、育雛器を用いて行った。この実験を行うにあたりすべての行程は熊本大学動物実験委員会が定める実験動物と動物実験に関連する規則に準拠して行った。

### 2. ファブリキウス嚢管結紮術 (bursal duct ligation: BDL) による腸管からのファブリキウス嚢の隔離

肺呼吸を始める前の孵卵 18 日目のニワトリのファブリキウス嚢と腸管をつなぐ管を両側の血管とリンパ管および尿管を傷つけることなくクリップで結紮した。すべての外科的行程は無菌状態で行った。孵化 18 日目の BDL はファブリキウス嚢内腔への母親由来の抗原（卵白等）及び細菌、食物由来の抗原の流入を阻止する。

### 3. 実験計画

大腸菌抗原の分布についてファブリキウス嚢、脾臓、盲腸扁桃の凍結切片を調査した。孵卵 21 日目のヒナ胎児 3 例、孵化後 3 日齢の健常なニワトリ 10 例、孵化後 1 週齢の健常なニワトリ 7 例および孵化後 1 週齢の BDL を行ったニワトリ 7 例のファブリキウス嚢を用いた。脾臓と盲腸扁桃については孵化後 1 週齢の健常なニワトリ 7 例を使用した。

### 4. 抗体

大腸菌抗原を検出するために抗大腸菌ウサギポリクローナル抗体 (B357) を Dako より購入した。B357 は大腸菌の共通抗原に特異的に反応し、他の細菌に交差反応を示さない (Liu et al. 1995; Walmsley et al. 1998)。ニワトリ $\alpha$ 鎖、 $\mu$ 鎖に特異的なモノクローナル抗体も使用した。抗 $\alpha$ 鎖(CVI-ChIgG-47.3)は中央獣医学研究所(オランダ)より供与された (Koch and Jongenelen

1989; Ekino et al. 1995)。抗  $\mu$  鎖 (M-1) は Southern Biotech より購入した。

## 5. 凍結切片作製

摘出したファブリキウス嚢を氷冷した包埋剤 (O.C.T. compound: サクラファインテック) 少量を入れたクリオモルドに入れ、上からさらに包埋剤を追加した。クリオモルドに包埋したサンプルをステンレス製のすくい網で静かに発泡スチロール性の容器に注いだ液体窒素に入れた。熱伝導性の低い発泡スチロールの容器を使用することで液体窒素の蒸発が最小限に抑えられ、液中のサンプルの様子を確認しながら凍結終了の最適のタイミングでサンプルを引き上げることができる。安定性を保つために発泡スチロールの容器をステンレスの容器に入れ使用する。凍結した標本ブロックをクリオモルドからはずし、クリオスタット (CM3050 S; Leica) の土台に包埋剤で固定した。荒削りをして面出しした後 10 $\mu$ m で切片を薄切し、切片の剥がれにくいシランコートをしたスライドグラス (S2440; マツナミ) に張り付けた。その後すぐに冷風にて乾燥させ使用時まで標本箱に入れ-40 $^{\circ}$ Cで保存した。

## 6. 組織切片の免疫ペルオキシダーゼ染色

十分に乾燥させた切片をアセトンで 10 分間固定後、冷風で 15 分間乾燥させた。孵化前のファブリキウス嚢と脾臓は内因性のペルオキシダーゼの活性が強いため染色前に切片を不活化させる。アセトン固定した組織切片を 100%冷メタノールに 30%の過酸化水素水を加え 0.3%過酸化水素加メタノールにした液に 10 分間浸漬し処理した。切片を PBS ですすいだ後 2000 倍に希釈した抗大腸菌ウサギポリクローナル抗体 (B357; Dako) を一次抗体として 60 分間反応させ PBS で 3 回洗浄した。続いてペルオキシダーゼ標識の抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体 (ヤギ) で 30 分間反応させ PBS で 3 回洗浄した。この二次抗体はいかなる非特異的反応も示さなかった。ペルオキシダーゼの活性は 0.01%の過酸化水素を含んだ 0.05M のトリス-HCl 緩衝液(pH7.6)で 0.5mg/ml に調整した 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB: 同仁堂) を用いて実証した。DAB は基質として過酸化水素の存在下でペルオ



キシダーゼにより茶褐色に変化する。DAB による反応産物の色調は 0.9%の塩化ナトリウム水溶液で 0.5%に調整された硫酸銅に 5 分間浸漬することで増強された。対比染色としてマイヤーのヘマトキシリン染色を用いた。

#### 7. 組織切片の蛍光二重染色

クリオスタットで 10 $\mu$ m に薄切した切片を少なくとも 30 分間風乾した。その後アセトンで 10 分間室温にて固定し、再び冷風で 15 分間乾燥させた。これらの切片に一次抗体として 2,000 倍に希釈した抗大腸菌ウサギポリクローナル抗体 (B357; Dako) を用いて 45 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄した。次に FITC を標識した抗ウサギ IgG 抗体で 45 分間遮光下にて反応させた。この標識抗体による非特異的反応は観察されなかった。切片を PBS で 3 回洗浄したのち、ブロッキングのため 5%の正常マウス血清で 30 分間遮光下にて反応させ、再び PBS で 3 回洗浄した。次にビオチン標識した抗  $\gamma$  鎖抗体を遮光下で 45 分間反応させ PBS で洗浄後、TRITC 標識したエクストラアビジンで 60 分間遮光下にて反応させた。TRITC 標識したエクストラアビジンはいかなる非特異的な反応も示さなかった。標本を PBS で洗浄後親水性の封入剤 (Vectashield; Vector Lab) で封入し、共焦点顕微鏡による解析を行った (FV-1000; Olympus)。

#### 8. ELISA 用大腸菌抗原の準備

大腸菌はファブリキウス嚢における優勢常在菌であるため、7 週齢のニワトリのファブリキウス嚢から大腸菌を分離した。ファブリキウス嚢の組織を PBS で 3 回洗浄したのちホモジナイズした。常在大腸菌は DHL (desoxycholate hydrogen sulfide lactose) 寒天培地 (E- MA85; 栄研) により分離され、生化学的大腸菌同定キットの API 20 E システムによって大腸菌と同定された。これらの常在大腸菌は HI (heart infusion) 寒天培地 (HEART INFUSION AGAR; DIFCO) に 37°C で 24 時間培養された。培地に発育した大腸菌のコロニーを生理食塩水に回収してメッシュで濾過して寒天を取り除き、4°C 5,000g で 20 分間遠心した。遠心後上清を捨てて PBS を加え 3 回洗浄した。分光光度計を用いて 660nm における大腸菌の濁度を測定し、菌数を約

$5 \times 10^{10}$  / ml に調整した。大腸菌浮遊液を氷冷しながら超音波破碎装置 (Ultrasonic Homogenizer VP-50 ; TAITEC) で菌を破碎した。出力は 50 W20 % で 10 秒間オン 10 秒間オフのインターバルで 20 分間行った。破碎後 4°C 5,000g で 20 分間遠心し上清を回収し抗原液とした。

#### 9. ELISA プレートへの大腸菌抗原のコートティング

抗原液のタンパク濃度をローリー法に基づくタンパク測定キット (DC Protein Assay Kit II ; Bio-Rad) を用いて測定した。抗原液としての最終タンパク濃度が 5 $\mu$ g/ml になるようにコートティング用緩衝液で希釈した。コートティング用緩衝液は 50mM NaHCO<sub>3</sub> に 50mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えながら、pH9.6 に用時調整した。調整した抗原液を 96 穴のプレートに 100 $\mu$ l ずつ入れ、吸着・ブロッキング用シールで蓋をして 4°C で一晩静置した。抗原液を除き PBS-T (0.05% Tween 20 添加リン酸緩衝液) で 3 回洗浄した。ブロッキング溶液 (3%BSA 含有の PBS-T) を 150 $\mu$ l ずつ入れ、シールで蓋をして 37°C で 1 時間静置した。その後ブロッキング溶液を除き PBS-T で 3 回洗浄した。蓋をせずプレートを逆さにした状態で、37°C で 90 分間乾燥させた。乾燥後保存用シールで蓋をし、4°C で保存した。

#### 10. 常在大腸菌抗原のポジティブコントロール染色

ファブリキウス嚢から分離された常在大腸菌をプレパラートに塗抹し、固定後間接免疫ペルオキシダーゼ染色法を用いて抗大腸菌ウサギポリクローナル抗体で染色した。一次抗体を加えずに染色したものをネガティブコントロールとした。ファブリキウス嚢由来の常在大腸菌は抗大腸菌ウサギポリクローナル抗体に陽性反応を示したが、二次抗体には反応を示さなかった。

次にポジティブコントロールとして常在大腸菌を含んだ組織を用意した。ファブリキウス嚢から分離培養した常在大腸菌を 2%ホルマリンにより死滅させ生理食塩水で 3 回洗浄した。死菌となった常在大腸菌 ( $5 \times 10^9$  / 0.1ml 生理食塩水) を 1 週齢のニワトリに静注した。静注から 2 分後のニワトリの脾臓をポジティブコントロールとして 2 例用いた。大腸菌を静注しな

い健常な 1 週齢のニワトリの脾臓をネガティブコントロールの組織とした。両コントロール群を間接免疫ペルオキシダーゼ染色法により抗大腸菌ウサギポリクローナル抗体で染色した。ポジティブコントロールとした脾臓には大腸菌抗原が検出されたが、ネガティブコントロールとした脾臓には検出されなかった。

#### 11. 血清中の抗大腸菌 IgG 抗体と抗大腸菌 IgM 抗体の抗体価測定

2 週齢の健常なニワトリと BDL のニワトリの血清を用いて、大腸菌に対する IgG 抗体と IgM 抗体の抗体価を ELISA 法により測定した。血清はそれぞれ PBS-T で 1,000 倍と 100 倍に希釈したものをそれぞれ 1 倍として 2 倍連続希釈法により大腸菌抗原をコーティングしたマイクロプレート (Immulon 2HB, Thermo) の各ウェルに 100 $\mu$ l ずつ注入した。このマイクロプレートを 25 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。血清を捨て 200 $\mu$ l の PBS-T で 3 回洗浄した。次に抗ニワトリ  $\gamma$  鎖抗体を 4,000 倍、抗ニワトリ  $\mu$  鎖抗体を 200 倍に PBS-T でそれぞれ希釈し、各プレートに 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l ずつ加え 25 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。各抗体を捨て 200 $\mu$ l の PBS-T で 4 回洗浄した。その後、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (シンプルステイン MAX-PO; ニチレイ) を PBS-T で 4 倍希釈したものを 100 $\mu$ l ずつ加え 25 $^{\circ}$ C 30 分間反応させた。標識二次抗体を捨て、200 $\mu$ l の PBS-T で 4 回洗浄した。基質溶液\* (O-フェニレンジアミン二塩酸塩溶液) を 100 $\mu$ l ずつ加え、アルミホイルでプレートを遮光し 25 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。そこに発色反応停止液\*\*を 100 $\mu$ l ずつ加え発色の進行を阻止した。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices ;VMax) を用いて吸光波長 492nm、補正波長 630nm で吸光度を測定した。血清の代わりに PBS-T を加えたものをブランクとして用いた。それぞれの検量線を作製し吸光度 0.1 をエンドポイントとして抗体価の力価を決定した。基質溶液\*、発色反応停止液\*\*の調整は以下の通り行った。

#### \*基質溶液

・ 0.2M のリン酸水素二ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 溶液を A 液、0.1M のクエン酸一水和物

(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O) 溶液を B 液とした。

・ A 液と B 液をそれぞれ 12.5ml ずつ混合したものに *o*-PHENYLENDIAMINE TABLETES を 1錠溶解し、そこに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 5μl 加えて混合し基質溶液とした。

\*\*発色反応停止液

・ 3N の H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4ml を 44ml の蒸留水に加え作製した。

## 12. 統計学的解析

平均値と標準偏差および標準誤差を計算し、グループの分散と標準偏差は F 検定で解析した。F 検定により分散が等しいことが示され、P 値はスチューデントの t 検定により算出した。すべての統計学的解析は Stat View J version 4.11 for Macintosh (Haycock et al. 1992) により行なった。

### 第3章 実験結果

#### 1. ファブリキウス囊の濾胞には大腸菌抗原が分布している

以前の研究により孵化後ファブリキウス囊の髄質に検出される IgG 陽性細胞は MIgG と外界抗原の抗原抗体複合体の付着によって生じることが示唆された(Ekino et al. 2012)。ファブリキウス囊内腔に存在する外界抗原として常在細菌叢がある(Kimura et al. 1986)。これらの常在細菌叢は主に *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科。 *E. coli* 大腸菌に代表される *Escherichia* 属を標準属とする通性嫌気性のグラム陰性桿菌)、 *Streptococci* (連鎖球菌)、 *Lactobacilli* (乳酸菌) で構成されている。なかでも最も優勢な常在菌は大腸菌である (Fuller 1973; Kimura et al. 1986)。そこで MIgG とともに髄質に保持されている外界抗原として常在大腸菌に着目し、ファブリキウス囊における大腸菌抗原の分布を免疫ペルオキシダーゼ染色法で調べた。

孵卵 21 日目、孵化後 3 日齢と 1 週齢の健全なニワトリおよび孵化前に BDL を行い腸管から隔離された孵化後 1 週齢のニワトリのファブリキウス囊を比較した。それぞれのファブリキウス囊の凍結切片を作製し、抗大腸菌ポリクローナル抗体を用いた免疫ペルオキシダーゼ法によって染色した。大腸菌抗原は孵化後 3 日齢と 1 週齢の健全なニワトリのファブリキウス囊の濾胞に観察された (図 3B, C)。対照的に孵卵 21 日目の健全なニワトリと孵化後 1 週齢の BDL のファブリキウス囊では大腸菌抗原は検出されなかった (図 3A, E)。大腸菌抗原は孵化後 3 日齢で 60%、1 週齢ですべての例の濾胞に確認された (表 1)。桿状の大腸菌はファブリキウス囊の内腔にのみ観察され実質には確認できなかった (図 3C-1a 矢印、図 4A, C 矢印)。にもかかわらず大腸菌抗原は断片として FAE と髄質に観察された。これはファブリキウス囊の FAE あるいは髄質に分泌されている酵素によって大腸菌が分解されて取り込まれたために生じると考えられる (Schaffner et al. 1974; Grossi et al. 1977)。孵化後 1 週齢の BDL を行ったニワトリのファブリキウス囊は腸管から隔離されているために大腸菌抗原が観察されなかったと考えられ、濾胞に見つかる大腸菌抗原は腸管を介してファブリキウス囊内腔から取り込まれたものと推測される。ファブリキウス囊に生息する大腸菌や連鎖球菌のような常在菌は孵

卵 21 日目でファブリキウス囊の内腔に検出される (Kimura et al., 1986)。しかしこの時期はまだヒナ胎児への MIgG の移行期間なので、もし濾胞内で大腸菌と MIgG が抗原抗体複合体を形成していたとしても微量で光学顕微鏡では確認できなかったと考えられる。二次抗体による非特異的反応は見られなかった (図 7B)。ファブリキウス囊髄質に外界抗原である大腸菌抗原が検出されたことから、ファブリキウス囊は一次リンパ組織であるとともに二次リンパ組織でもあることが示唆された。

ニワトリ	頻度(%)	(陽性数/例数)
孵卵21日目	0	(0/3)
孵化後3日齢	60	(6/10)
孵化後1週齢	100	(7/7)
1週齢 BDL	0	(0/7)

表 1. ファブリキウス囊髄質に大腸菌抗原が検出される頻度

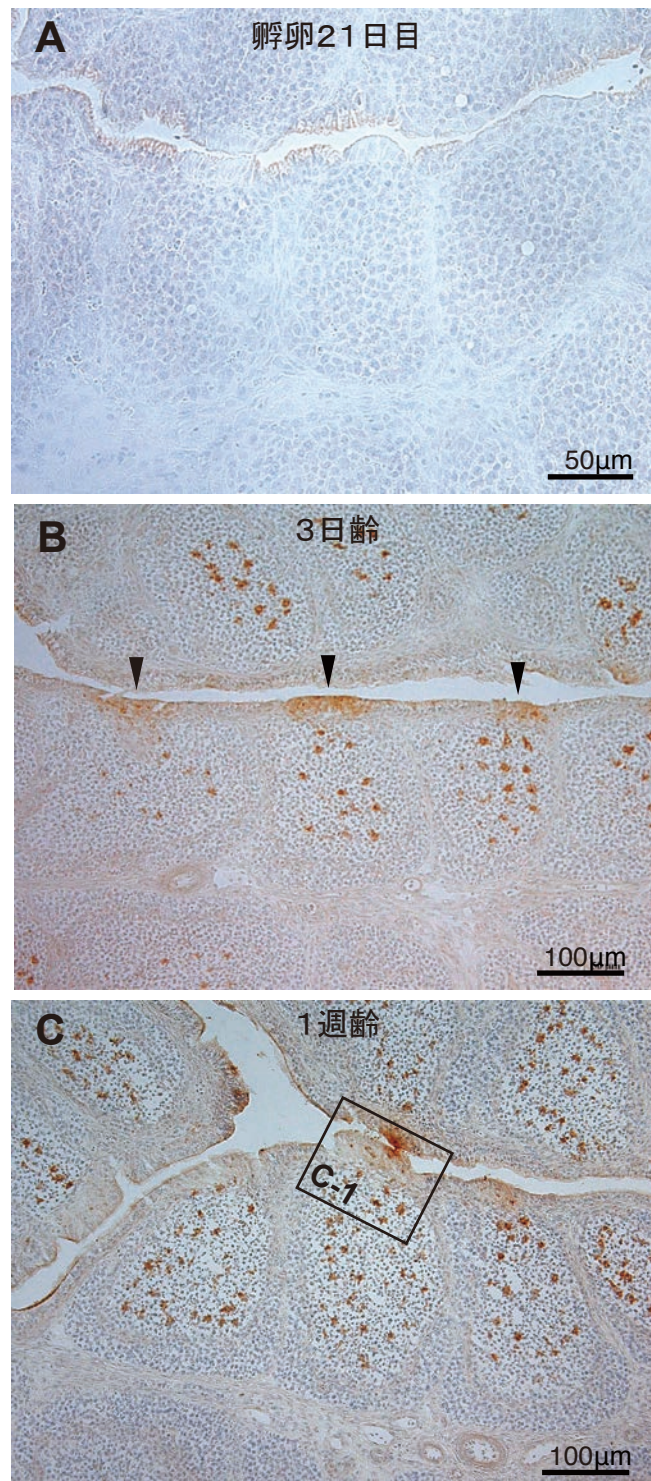


図3. ファブリキウス嚢における大腸菌抗原の分布 (1)  
 A) 孵卵21日目、B) 孵化後3日齢、C) 孵化後1週齢、  
 矢頭はFAE

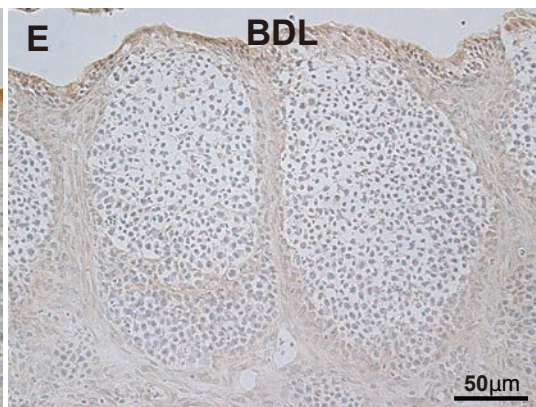
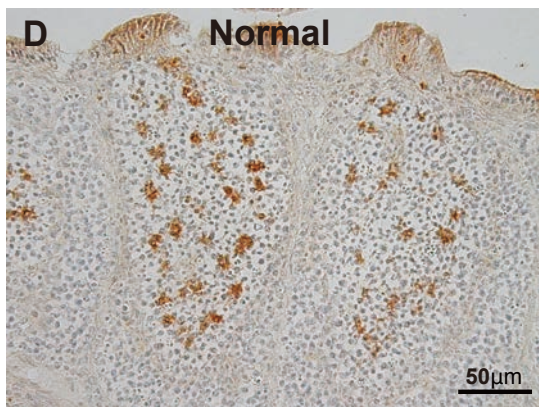
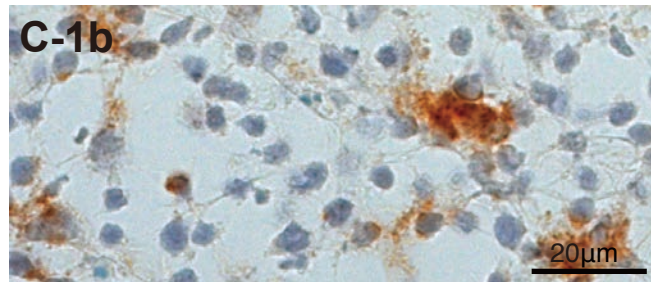
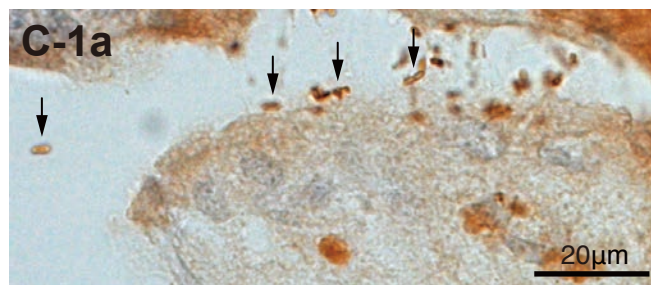
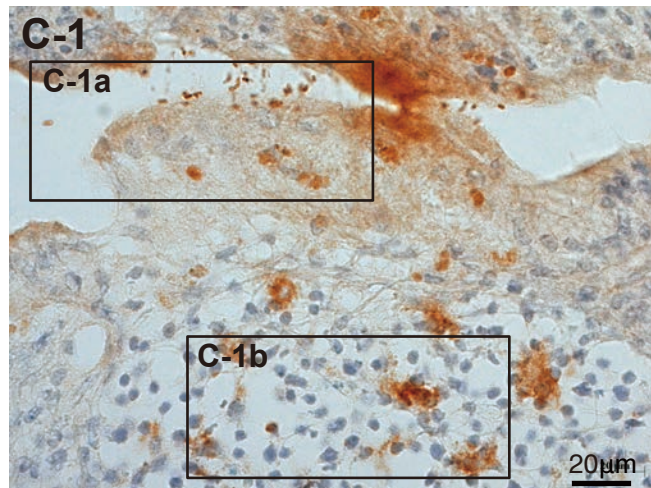


図 3. ファブリキウス嚢における大腸菌抗原の分布 (2)

C-1 は C の拡大像、C-1a と C-1b は C-1 の拡大像、

矢印：ファブリキウス嚢内腔の大腸菌

D) 1 週齢の健全なニワトリのファブリキウス嚢、

E) 1 週齢の BDL を行ったニワトリのファブリキウス嚢



## 2. ファブリキウス囊髄質の大腸菌抗原は MIgG と共存している

孵化後 3 日齢と 1 週齢のファブリキウス囊の濾胞に見つかった大腸菌抗原が母親由来の IgG と濾胞内で共存していることを組織学的に確認するために、孵化後 1 週齢のファブリキウス囊の凍結切片を蛍光二重染色により調査した。大腸菌抗原を緑色で凝集した IgG を赤色で染色した場合、共焦点レーザー顕微鏡解析による重ね合わせ画像は共存部分が黄色を示す (図 4C, F、図 5C)。ファブリキウス囊髄質の大腸菌抗原は凝集した IgG と共存し黄色を呈していた。凝集した大腸菌抗原と IgG は樹状様の分布を示した。これらの結果はファブリキウス囊髄質の大腸菌抗原が IgG と抗原抗体複合体を形成し細網細胞に捕捉されていることを示唆している。一方で重ね合わせ画像で緑色に見える単独の大腸菌抗原 (図 4C, F、図 5C) は FAE には観察されたが、髄質にはほとんど観察されなかった。これらの単独の抗原はおそらく酵素によって消化されファブリキウス囊髄質にとどまることができない (Sorvari and Sorvari 1977)。したがって、MIgG は FAE から取り込まれた抗原と髄質で免疫複合体を形成し、それによって細網細胞に捕捉されることにより抗原が酵素による消化から逃れるのに重要な役割を果たしているということが示唆された。

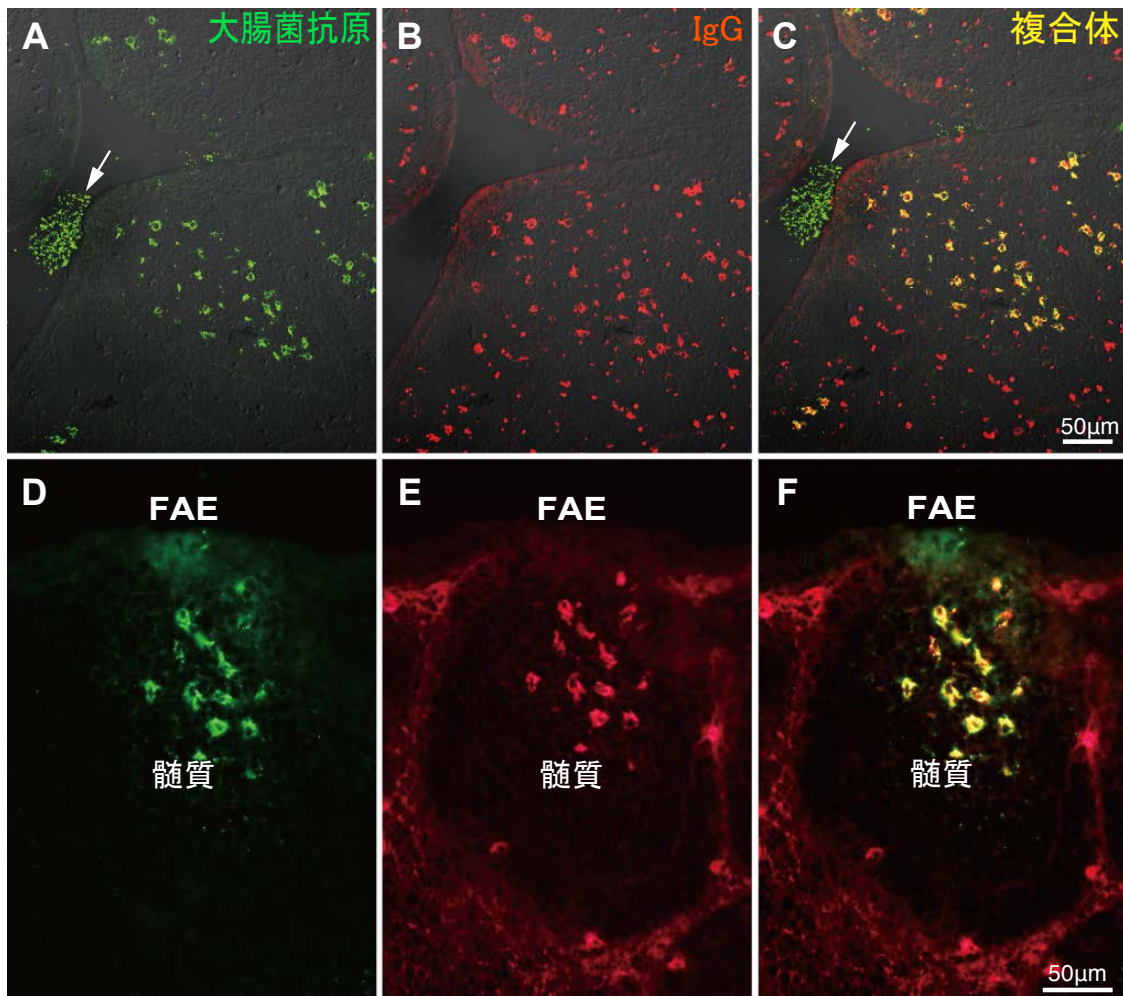


図4. 1週齢ファブリキウス嚢における大腸菌抗原とIgGの共焦点顕微鏡画像

A-C) 低倍率の共焦点顕微鏡画像、C) A, Bの重ね合わせ画像、

D-F) 高倍率の共焦点顕微鏡画像、F) D, Eの重ね合わせ画像

矢印：ファブリキウス嚢内腔の大腸菌

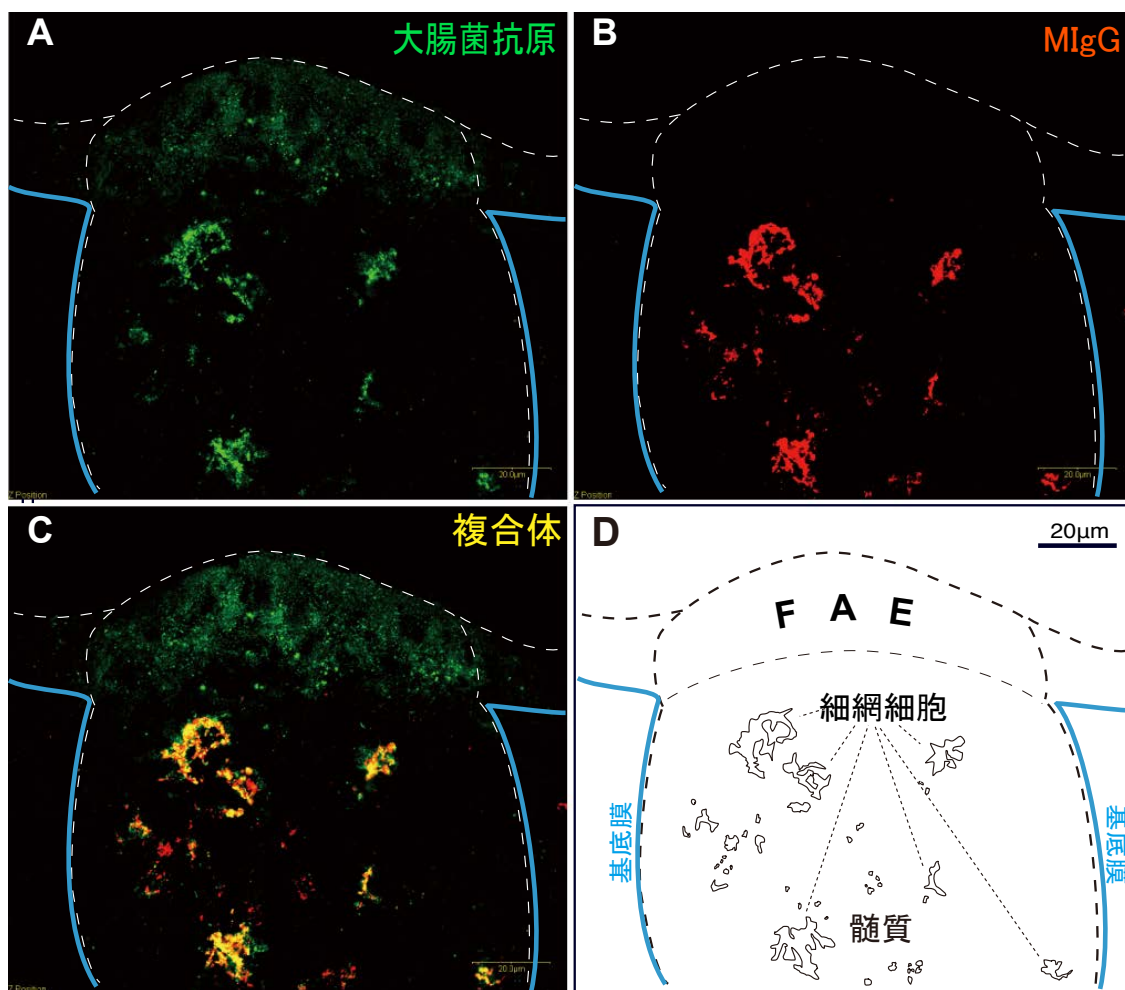


図 5.1 週齢ファブリキウス嚢における大腸菌抗原と IgG の高倍率の共焦点顕微鏡画像

### 3. 新生児期のファブリキウス嚢は環境抗原の捕捉部位である

過去の報告によりファブリキウス嚢が腸管由来の環境抗原の主要な捕捉部位であることが示唆されている(Ekino et al. 1985)。このことを検証するために1週齢の健常なニワトリ7例の脾臓と盲腸扁桃における大腸菌抗原の分布を免疫ペルオキシダーゼ染色法によって調査した。大腸菌抗原は調べたいずれの脾臓にも観察されなかった(図 6A, A-1)。おそらくファブリキウス嚢濾胞の基底膜が大腸菌抗原が全身循環へ通過するのを防いでいると考えられる。盲腸扁桃においても大腸菌抗原は実質内に観察されなかった(図 6B, B-1)。これら2つの組織において二次抗体による非特異的反応は見られなかった。大腸菌抗原が脾臓にも盲腸扁桃にも検出できないことはファブリキウス嚢に見つかる大腸菌抗原が他のリンパ組織由来のものではないことを示している。これは新生児期のニワトリのファブリキウス嚢が腸管由来の大腸菌抗原の捕捉部位であるということを示唆している。

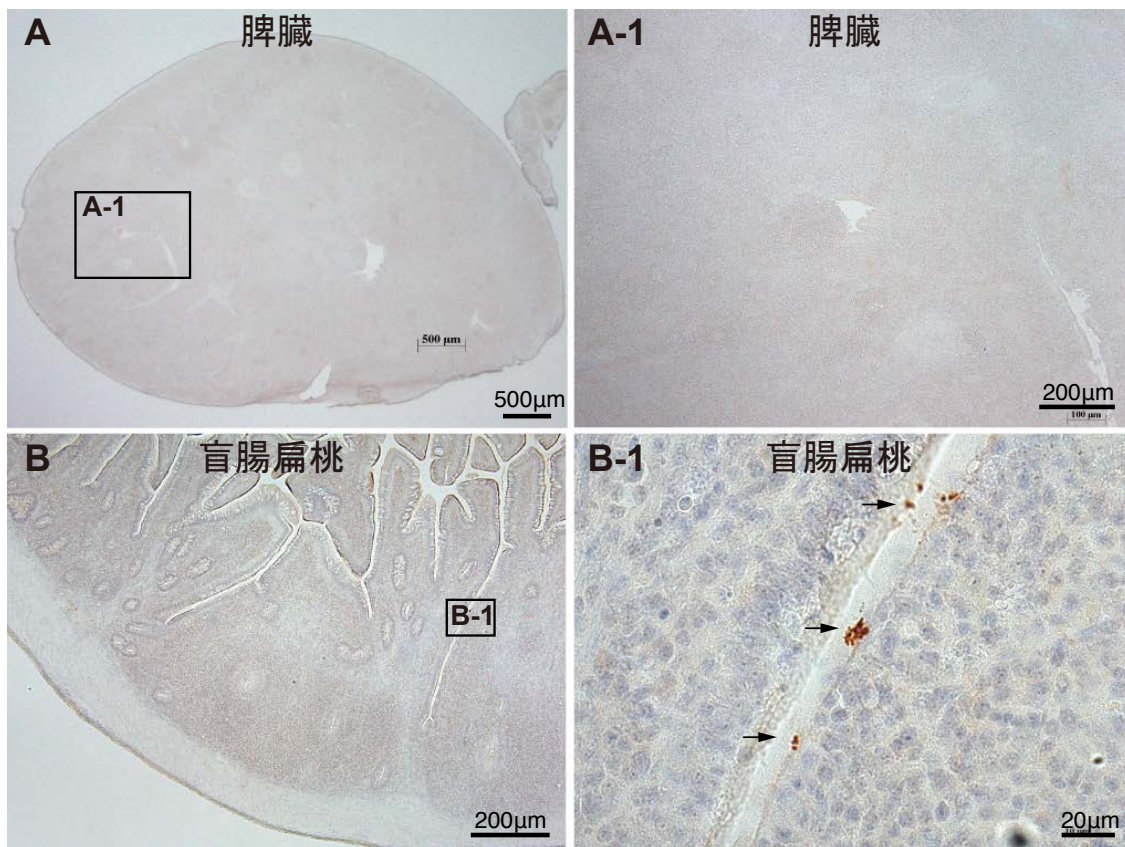


図 6. 1週齢ニワトリの脾臓 と盲腸扁桃 における大腸菌抗原の分布

A) 1週齢ニワトリの脾臓、A-1) Aの拡大像、

B) 1週齢ニワトリの盲腸扁桃、B-1) Bの拡大像

矢印：盲腸扁桃内腔の大腸菌抗原

#### 4. 抗大腸菌ポリクローナル抗体と二次抗体の特異性の検討

大腸菌の免疫染色の一次抗体に用いた抗大腸菌ポリクローナル抗体 (B357: Dako) は大腸菌の共通抗原に反応するが、他の細菌に対する反応はないと報告されている(Liu et al. 1995; Walmsley et al. 1998)。本研究で用いたファブリキウス嚢の常在大腸菌に対しても陽性反応を示すか確認するために、ファブリキウス嚢から分離同定された常在大腸菌の塗抹標本を作製し、組織切片と同様に免疫ペルオキシダーゼ染色した。グラム陰性桿菌である大腸菌は抗大腸菌ポリクローナル抗体 (B357: Dako) によって陽性反応を示し桿状に染色されていた (図 7C)。また一次抗体を省いた陰性対照例では陽性反応は観察されなかった (図 7D)。一次抗体がファブリキウス嚢由来の常在大腸菌に陽性を示し、二次抗体による非特異的な反応はないことが明らかになり、陽性反応を示したものはすべて大腸菌抗原であることが実証された。

さらに組織内においても一次抗体が大腸菌に対して特異的な反応を示すか検証するためにファブリキウス嚢由来の常在大腸菌の死菌を静注した脾臓の凍結切片の免疫ペルオキシダーゼ染色を行った。死菌を静注した脾臓の標本では抗大腸菌ポリクローナル抗体によって大腸菌抗原が特異的に検出された (図 7E)。これに対して静注を行わなかった脾臓に陽性反応は検出されなかった (図 7F)。結果として組織切片における抗大腸菌ポリクローナル抗体の陽性反応は人工産物や非特異的な反応でなく抗原特異的な反応であることが実証された。したがってファブリキウス嚢の濾胞および内腔に見られた抗大腸菌ポリクローナル抗体による陽性反応は大腸菌抗原の存在を示していると考えられる。

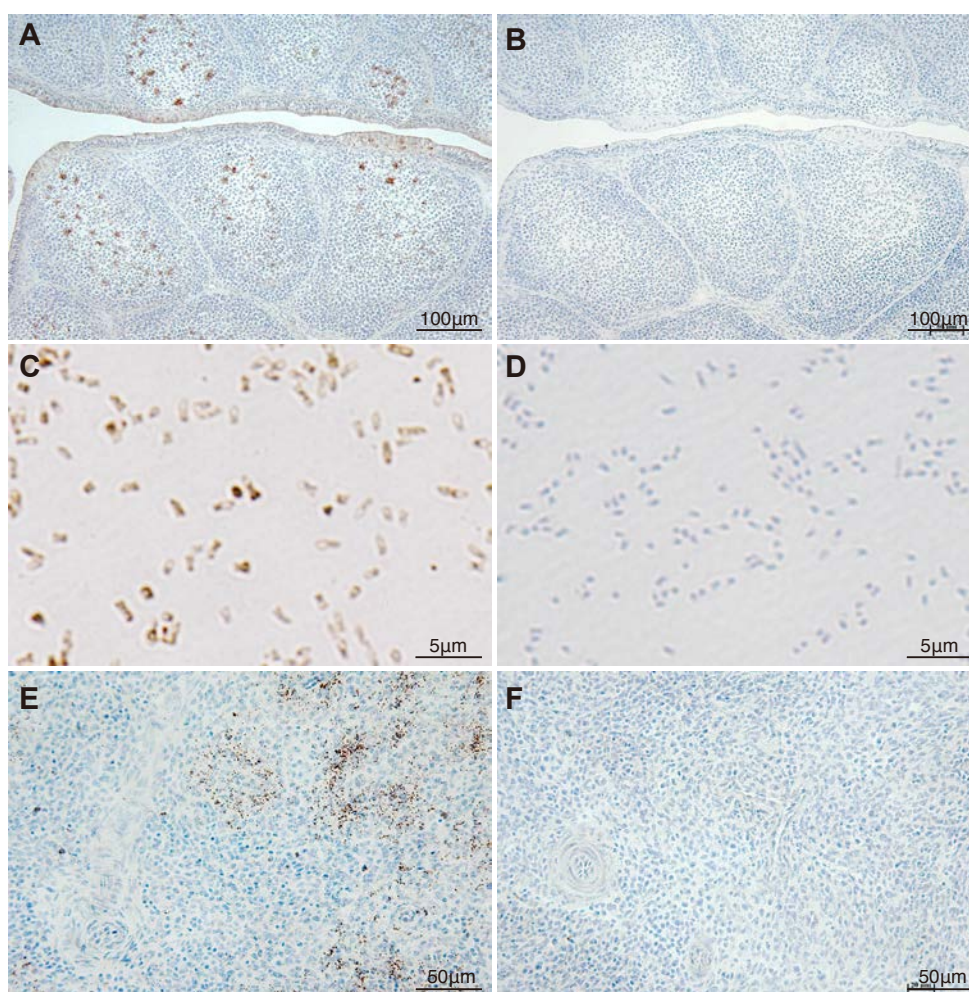


図 7. 抗大腸菌ウサギポリクローナル抗体を用いた大腸菌抗原の免疫ペルオキシダーゼ染色

- A) 1 週齢ニワトリファブリキウス嚢
- B) 1 週齢ニワトリファブリキウス嚢；一次抗体 (-)
- C) 常在大腸菌の塗抹標本
- D) 常在大腸菌の塗抹標本；一次抗体 (-)
- E) 常在大腸菌を静注した 1 週齢ニワトリ脾臓
- F) 1 週齢の健常なニワトリの脾臓

5. 常在大腸菌抗原と MIgG によって形成される抗原抗体複合体は孵化後の抗大腸菌 IgM 抗体の発達に寄与する

大腸菌抗原により形成される抗原抗体複合体が孵化後 IgM 抗体の発達に有利な影響を与えるのかどうかを検討するために、大腸菌に対する IgG 抗体と IgM 抗体の抗体価を ELISA 法を用いて測定した。サンプルは 2 週齢の健常なニワトリと BDL を行ったニワトリの血清を用いた。IgG 抗体は卵黄を介して子に移行するため(Brambell 1970, Rose and Orlans 1981)、高力価の大腸菌に対する IgG 抗体が健常なニワトリと BDL のニワトリの両方の血清中に検出された(図 8A)。一方 IgM 抗体は子に移行しないために血清中の IgM 抗体は孵化後発達する(Martin and Leslie 1973; Rose and Orlans 1981; Hamal et al. 2006)。2 週齢の健常なニワトリの血清中に大腸菌に対する IgM 抗体を検出した。対照的に BDL を行ったニワトリの血清中に大腸菌に対する IgM 抗体はほとんど検出できなかつた( $P < 0.01$ ) (図 8B)。これらの結果はファブリキウス囊髄質において大腸菌抗原により形成された抗原抗体複合体が血清中の大腸菌に対する IgM 抗体の急速な発達において重要な機能を持っていることを示唆している。



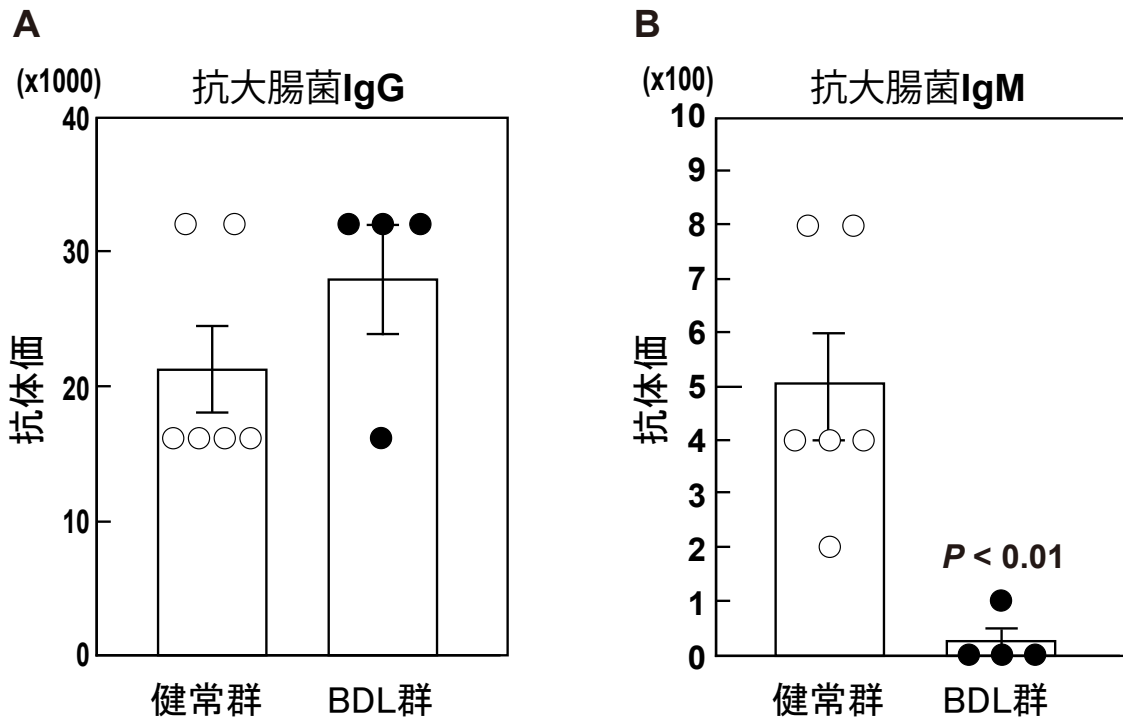


図8. 大腸菌抗原に対する血清中IgGとIgMの抗体価  
 2週齢の健常なニワトリの抗体価 (○)、  
 BDLを行った2週齢のニワトリの抗体価 (●)、  
 縦棒;標準誤差

## 第4章 考察

本研究により一次リンパ組織とされてきたファブリキウス嚢に常在大腸菌抗原が存在することが明らかになった。これらの抗原が酵素による消化を免れファブリキウス嚢髄質に保持されるためには MIgG が重要な役割を果たしていることが示唆された。MIgG と抗原により形成される抗原抗体複合体はファブリキウス嚢髄質の細網細胞に捕捉されている。抗原抗体複合体を保持し樹状様の突起を持つ細網細胞はヒトやマウスでは胚中心に観察され、FDC と定義される(Tew et al. 1990; Maeda et al. 1995; van den Berg et al. 1995)。したがってファブリキウス嚢髄質で抗原抗体複合体を捕捉している細網細胞も FDC と推測される。

孵化前のファブリキウス嚢における B 細胞の増殖と多様化は抗原非依存性である。この時期、表面 IgM 陽性 B 細胞の抗原非依存性の増殖と多様化はファブリキウス嚢髄質の微小環境によって誘導される。孵化前のファブリキウス嚢の B 細胞の抗原非依存性の分化にはおそらくファブリキウス嚢髄質の細網ネットワークの自己分子が重要な役割を果たしていると考えられている(Ratcliffe 2006)。しかしながら孵化後凝集した抗原抗体複合体はファブリキウス嚢髄質の細網ネットワーク上に分布していた。これは孵化後自己分子と抗原抗体複合体の両方がファブリキウス嚢髄質の B 細胞の分化に影響を及ぼしていることを意味している。

ファブリキウス嚢の B 細胞の多様化は孵化前の遺伝子変換によって生じる (Reynaud et al. 1994)。さらにファブリキウス嚢において体細胞超突然変異によって生じた一次レパートアは無方向性で非機能的と考えられている (Rajewsky et al. 1987)。しかしながら、孵化後になるとファブリキウス嚢髄質の B 細胞は抗原抗体複合体として FDC に保持された外界抗原に出会う多くの機会を得る。ファブリキウス嚢の FDC に外界抗原により形成される抗原抗体複合体が長期間保持されることは、外界環境に適応したレパートアがファブリキウス嚢の B 細胞によって優先的に作られることを示唆している。

ファブリキウス嚢における常在細菌叢は大腸菌 *E. coli* や乳酸桿菌 *Lactobacillus* によっても構成されている(Fuller, 1973; Kimura et al. 1986)。さらにファブリキウス嚢はファブリキウス嚢

の細菌叢と同様に盲腸内細菌のような多彩な腸管由来の環境抗原にも暴露されうる。したがってファブリキウス囊髄質の B 細胞は孵化後腸管由来の広く多様な抗原にさらされることが推測される。ファブリキウス囊の B 細胞が腸管由来の様々な種類の抗原にさらされることで外界環境に適した B 細胞の選択と抗原特異的な記憶 B 細胞あるいは抗体産生前駆細胞へのさらなる分化が生じると考えられる。

ファブリキウス囊の B 細胞は表面に機能的シグナル伝達要素である IgM を持ち (Ratcliffe and Tkalec 1990)かつ FcγR を発現しており (Viertlboeck et al. 2007)、sIgM と FcγR のどちらかあるいは両方に抗原抗体複合体が結合するとファブリキウス囊髄質の B 細胞にはさらなる分化が誘導されると考えられている。また FcγR に IgG が単独で結合した場合はシグナルが入らないが、抗原抗体複合体として凝集した IgG が FcγR に結合した場合は B 細胞にシグナルが伝達される (Viertlboeck et al. 2007)。おそらくファブリキウス囊髄質の抗原抗体複合体はクローン性増殖なしに抗原特異的な抗体分泌前駆細胞への分化を誘導する (Lydyard et al. 1976; Sorvari and Sorvari 1977; Ekino et al. 1979)。これらの前駆細胞は短寿命のナイーブ B 細胞に比し長寿命と考えられている (Davani et al. 2014; Paramithiotis and Ratcliffe 1993)。さらに細菌のような胸腺非依存性抗原によって刺激を受けたファブリキウス囊髄質の抗体分泌前駆細胞は末梢で抗体分泌細胞へと分化し、血中に特異的な抗体を供給すると推測される (Sorvari and Sorvari 1977; Ekino et al. 1985)。

大腸菌に対する血清中の IgM 抗体の発達はファブリキウス囊内腔への大腸菌の侵入と大腸菌抗原による抗原抗体複合体の形成を阻止したニワトリでは健常なニワトリに比し極度に妨げられていた。このことは血清中の大腸菌に対する IgM 抗体の急速な発達においてファブリキウス囊髄質の大腸菌抗原により形成される免疫複合体が重要な機能を果たしていることを示している。さらに以前の研究でファブリキウス囊への環境細菌抗原の刺激により細菌に対する特異的な抗体が誘導されることが示された (Ekino et al. 1985)。したがってファブリキウス囊髄質の細菌抗原からなる免疫複合体は外界環境の細菌に対する特異的な IgM 抗体の誘導に重要な役割を果たすと推測される。

IgM は補体依存性の殺菌作用、細菌や感染性粒子および凝集塊のオプソニン作用が IgG よりも 1 分子あたりの効果がより大きい(Boes et al. 1998)。外界抗原に対する血清中の IgM 抗体の急速な発達は感染症から新生児を守り、母親によって経験されたと同じ細菌環境における子の生存に貢献することに重要な役割を果たしている (Boulinier and Staszewki 2008; Hasselquist and Nilsson 2009)。したがって以下の仮説を提唱する。母親は獲得した免疫学的記憶を MIgG として子に提供する。新生児のニワトリは MIgG を用いて免疫複合体として環境抗原を捕捉し、ファブリキウス囊髄質の細網細胞にそれらを保持できる。ただしこれは母親が経験した同じ環境に育つという条件において成立する。免疫複合体は体細胞突然変異を繰り返した個々のファブリキウス囊の B 細胞を刺激し、ファブリキウス囊における抗原特異的抗体分泌前駆細胞の分化を誘導する。このように新生児のニワトリは環境細菌に対する血清中の IgM 抗体を効果的に発達させ、より高い生存率を得る。結果的に、卵黄に蓄積された IgG によって子は母親によって獲得された免疫学的記憶を受け継ぐことに成功する。

## 第5章 結語

本研究において、孵化後のファブリキウス嚢に MIgG と共存する常在大腸菌抗原の存在が証明された。常在大腸菌抗原は MIgG と免疫複合体を形成しブリキウス嚢髄質の FDC に捕捉されることで酵素による分解から免れていると推測された。これらのブリキウス嚢髄質の FDC に保持された常在大腸菌抗原の免疫複合体は血清中の急速な抗大腸菌 IgM 抗体の発達に重要な機能を担っていることが示された。また新生児期のファブリキウス嚢は腸管からの大腸菌抗原の捕捉部位であることが示された。

ファブリキウス嚢には常在大腸菌のみならず多様な細菌性抗原が存在するため、ファブリキウス嚢の B 細胞が腸管由来の様々な種類の抗原にさらされることで外界環境に適した B 細胞の選択と抗原特異的な記憶 B 細胞あるいは抗体産生前駆細胞へのさらなる分化が生じると推測される。以上のことは母親から引き継いだ IgG をもつヒナが孵化後母親の経験と同じ環境で生育することを条件に成立すると考えられる。IgG を介した母親からの免疫学的記憶の継承は、鳥類のみならず胎盤や母乳から MIgG を受け継ぎ、かつパイエル板のような抗原捕捉機構をもつ腸管関連リンパ組織を備えた哺乳類にも適用されうると考えられる。

## 第 6 章 参考文献

1. Schaffner T, Mueller J, Hess MW, Cottier H, Sordat B, Ropke C (1974) The bursa of Fabricius: a central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content. *Cell. Immunol.* 13, 304-312
2. Sorvari T, Sorvari R, Ruotsalainen P, Toivanen A, Toivanen P (1975) Uptake of environmental antigens by the bursa of Fabricius. *Nature* 253, 217-219
3. Olah I, Glick B (1978) The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. *Poultry Sci.* 57, 1445-1450
4. Owen RL, Bhalla DK (1983) Lympho-epithelial organs and lymph nodes. In: *Biomedical Research Applications of Scanning Electron Microscopy* (G. M. Hodges and K. E. Carr, Eds.) Vol. 3, pp. 79-169 Academic Press, London.
5. Ekino S, Riwar B, Kroese FGM, Schwander EH, Koch G, Niuwenhuis P (1995) Role of environmental antigen in the development of IgG<sup>+</sup> cells in the bursa of Fabricius. *J. Immunology* 155, 4551-4558
6. Yasuda M, Tanaka S, Arakawa H, Taura Y, Yokomizo Y, Ekino S (2002) A comparative study of gut-associated lymphoid tissue in calf and chicken. *Anat. Rec.* 266, 207-217
7. Reynaud CA, Bertocci B, Dahan A, Weil JC (1994) Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion. *Adv Immunol* 57: 353-378
8. Ratcliffe MJH (2006) Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Dev Comp Immunol* 30: 101-118
9. Kincade PW, Cooper MD (1971) Development and distribution of immunoglobulin-containing cells in the chicken. An immunofluorescent analysis using purified antibodies to m, g and light chains. *J Immunol* 106:371-382

10. Houssaint E (1987) Cell lineage segregation during bursa of Fabricius ontogeny. *J. Immunol.* 138, 3626-3634
11. Reynaud CA, Anquez V, Grimai H, Weill JC (1987) A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 48, 379-388
12. Ratcliffe MJH, Paramithiotis E (1990) The end can justify the means. *Seminars in Immunology* 2, 217-226
13. Rajewsky K, Foster I, Cumano A (1987) Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. *Science* 238, 1088-1094
14. Romanoff AL (1960) The cloaca and bursa of Fabricius. In: Romanoff, A.L. (Ed.), *The Avian Embryo Structural and Functional Development*. The Macmillan Company, New York, pp. 497–508
15. Bockman DE, Cooper MD (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
16. Sorvari R, Sorvari TE, (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
17. Grossi CE, Lydyard PM, Cooper MD (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
18. Fuller R (1973) Differences in the microfloras of the intestine and the bursa of Fabricius as illustrated by the coliform/lacto-bacillus ratio in the two sites. *Br. Poult. Sci.* 14, 221-224
19. Kimura N, Yoshikane M, Kobayashi A (1986) Microflora of the bursa of Fabricius of chickens *Poult. Sci.* 65, 1801-1807
20. Rahn H, Ar A, Paganelli CV (1979) How bird eggs breathe. *Scientific American* 240, 38-47

21. Thorbecke GJ, Warner NL, Hochwald GM, Ohanian SH (1968) Immune Globulin Production by the Bursa of Fabricius of Young Chickens. *Immunology* 15, 123-134
22. Ekino S, Arakawa H, Sonoda K, Noguchi K, Inui S, Yokoyama H, Kodama Y (2012) The origin of IgG-containing cells in the bursa of Fabricius. *Cell Tissue Res* 348:537–550
24. Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J, Roth TF (1985) Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology* 54, 755–762
25. Laursen SB, Hedemand JE, Nielsen OL, Thiel S, Koch C, Jensenius C (1998) Serum levels, ontogeny and heritability of chicken mannan-binding lectin (MBL). *Immunology* 94, 587-593
26. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF (1995) Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 108:1396–1404
27. Walmsley RS, Anthony A, Sim R, Pounder RE, Wakefield AJ (1998) Absence of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Klebsiella pneumoniae* antigens within inflammatory bowel disease tissues. *J Clin Pathol* 51:657–661
28. Koch G, Jongenelen ICMA (1989) Enzyme immunospot assay for the detection of immunoglobulin- and antibody-secreting cells in chickens. In: Bhogal B, Koch G (eds) *Recent advances in avian immunology research*. Liss, New York, pp 67–77
29. Ekino S, Riwar B, Kroese FGM, Schwander EH, Koch G, Niuwenhuis P (1995) Role of environmental antigen in the development of IgG<sup>+</sup> cells in the bursa of Fabricius. *J. Immunology* 155, 4551-4558
30. Haycock KH, Roth J, Gagnon J, Finzer WF, Soper C (1992) *StatView*. Abacus Concepts, Berkeley
31. Ekino S, Suginozawa K, Urano T, Fujii H, Matsuno K, Kotani M (1985) The bursa of Fabricius: a trapping site for environmental antigens. *Immunology* 55, 405-410
32. Brambell FWR (1970) *Transmission of immunity in birds. The transmission of passive immunity from mother to young*. North Holland Publishing Company, Amsterdam.



33. Rose ME, Orlans E (1981) Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Dev. Comp. Immunol.* 5, 15-20
34. Martin LN, Leslie GA (1973) Ontogeny of IgA in normal and neonatally bursectomized chickens, with corroborative data on IgY and IgM. *Proc Soc Exp Biol Med* 143:241–243
35. Hamal K, Burgess SC, Pevzner IY, Erf GF (2006) Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult Sci* 85:1364–1372
36. Tew JG, Kosco MH, Bruton GF, Szakal AK (1990) Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol Rev* 117:185–211
37. Maeda K, Matsuda M, Imai Y (1995) Follicular dendritic cells: structure as related to function. In: Kosco-Vilbois MH (ed) *An antigen depository of the immune system: follicular dendritic cells.* Springer, Berlin, pp 119–139
38. van den Berg TK, Yoshida K, Dijkstra CD (1995) Mechanism of immune complex trapping by follicular dendritic cells. In: Kosco-Vilbois MH (ed) *An antigen depository of the immune system: follicular dendritic cells.* Springer, Berlin, pp 49–67
39. Ratcliffe MJH, Tkalec L (1990) Cross-linking of the surface immunoglobulin on lymphocytes from the bursa of Fabricius results in second messenger generation. *Eur J Immunol* 20:1073–1078
40. Viertlboeck BC, Schweinsberg S, Hanczaruk MA, Schmitt R, Du Pasquier L, Herberg FW, Gobel TW (2007) The chicken leucocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. *PNAS (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)* 104, 11718-11723
41. Lydyard PM, Grossi CE, Cooper MD (1976) Ontogeny of B cells in the chicken I. Sequential development of clonal diversity in the bursa. *J Exp Med* 144: 79-97
42. Ekino S, Matsuno K, Harada S, Fujii H, Nawa Y, Kotani M (1979) Amplification of plaque-forming cells in the spleen after intracloacal antigen stimulation in neonatal chicken. *Immunology* 37:811–815
43. Paramithiotis E, Ratcliffe MJH (1993) Bursa-dependent subpopulations of peripheral B

- lymphocytes in chicken blood. *Eur J Immunol* 23: 96-102
44. Davani D, Pancer Z, Ratcliffe MJH (2014) Ligation of surface Ig by gut-derived antigen positively selects chicken bursal and peripheral B cells. *J. Immunol.* 192, 3218–3227
45. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J (1998) A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med* 188:2381–2386
46. Boulinier T, Staszewski V (2008) Maternal transfer of antibodies: raising immuno-ecology issues. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 282-288
47. Hasselquist D, Nilsson J-A (2009) Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Phil Trans R Soc B* 364: 51-60