

## 総合論文

## ニワトリのリンパ球造成と性ステロイドホルモン

近藤 康博  
(応用動物科学コース)

**Effects of Sex-steroid Hormones on Lymphocyte Genesis in the Central Lymphoid Organs of Chickens**

Yasuhiro Kondo  
(Course of Applied Animal Science)

Lymphocytes play essential roles as a kind of leukocyte in the defense mechanism of animals against infectious factors. Lymphocytes are classified into two subsets, T lymphocytes and B lymphocytes in mammals or avian species. In avian species, T lymphocytes differentiate and proliferate in the thymus which is a central lymphoid organ common to mammals and avian species, whereas on the other hand, B lymphocytes have been known to occur in the bursa of Fabricius (bursa) which is a unique central lymphoid organ of birds. Steroid hormones, such as androgen and estrogen, have been reported to change differentiations and proliferations of these lymphocytes in corresponding lymphoid organs, indicating steroid hormones give influence lymphocyte development positively or negatively in the bursa and thymus of birds. Studying the relation between steroid hormones and lymphocyte development in the central lymphoid organs is important, because changes in the lymphocyte genesis in central organs of birds may result in altered levels of antibody production and immune functions related to T lymphocyte activity. We have studied effects of androgen and estrogen on lymphocyte differentiation and proliferation in the central lymphoid organs of chicken at Okayama University since the 1980s. In the present report, the results of these studies are summarized.

**Key words :** lymphocyte, steroid hormone, bursa of Fabricius, thymus

リンパ球は動物の生体防御機構において重要な役割を演じる白血球である。リンパ球はBリンパ球とTリンパ球に大別される。鳥類では、Tリンパ球は胸腺と呼ばれる中枢リンパ器官で、Bリンパ球は鳥類特有の中枢リンパ器官であるファブリキウス嚢 (Bursa of Fabricius, ブルサ) で分化・成熟する。鳥類では性成熟に伴ってブルサの退縮が見られること<sup>3)</sup>、あるいはアンドロジェンを投与したニワトリではブルサの有意な萎縮が起こること<sup>4)</sup>が報告され、アンドロジェンが鳥類のBリンパ球あるいはそれらの分化に影響を与えることがすでに1950年代には知られていた。さらにその後、エストロジェンについても抗体産生やBリンパ球活性も対する影響が報告された<sup>19)</sup>。これらの報告は鳥類のリンパ球分化における性ステロイドホルモンの何らかの関与を示しており、性ステロイドホルモンが鳥類免疫系やリンパ球分化の変調因子である可能性を示唆している。これらのことから、鳥類のリンパ球分化と性ステロイドホルモンの関係を追究することは生理学的に興味深い課題である。本報告は、ニワトリのBリンパ球とTリンパ球の分化・造成に対す

るアンドロジェン (テストステロン, TT) とエストロジェン (エストラジオール, E2) の影響に関して、著者らが岡山大学において実施した研究成果をまとめたものである。

**ブルサおよびブルサのリンパ球に対する TT 投与の効果**

TT をニワトリの筋肉内に投与するとブルサ重量が減少することから、ブルサの細胞に対する TT の作用が示唆されているが、TT の作用部位については、間質細胞作用説、上皮細胞作用説あるいはリンパ球作用説、あるいは全細胞作用説があり特定されていなかった。ここでは、ブルサに対するアンドロジェンの影響に関する試験の結果について論じる。

0 から13週齢の間に TT (10 mg/100 gBW) を投与 (i.m.) したヒナ (白色レグホン種) では不可逆的なブルサ重量の有意な減少が観察された (対照値に対する割合: 投与後1週目=73.4%, 2週目=52.6%, 3週目=

67.1%)。TTを投与したヒナでは、投与10日目には、リンパ球造成の場であるリンパ嚢は減少し、残存するリンパ嚢は著しく小型化した。これらのリンパ嚢の変化に伴って間質領域の割合は増大した。これらの組織学的な変化はTT投与に伴うブルサの萎縮はリンパ嚢の消失・縮小によるものであり、TT投与によって引き起こされる抗体産生能力の低下<sup>2)</sup>はブルサのリンパ嚢におけるBリンパ球の分化・成熟の阻害に起因していることを強く示唆した。

ブルサにおけるアンドロジェンの標的部位については前述のように種々の説があるが、ブルサのリンパ球に対する直接作用について検討を加えた。ブルサのリンパ嚢のBリンパ球は分化の程度によって標識抗原(マーカー)の種類やそれらの量において異なるいくつかの集団に分けられている<sup>12)</sup>。アンドロジェンがそれらの細胞に一律に影響を与えて、ブルサの萎縮や抗体産生能の低下を誘導するのか、あるいは特定の分化段階の細胞に特異的に作用するのかについて検討するのは興味深い課題である。そこでブルサのリンパ球構成に対するTTの影響について追究した。鳥類のBリンパ球分化では、鳥類Bリンパ球に特有の標識抗原であるBu-1抗原を発現するリンパ球系の細胞がブルサに侵入し、ブルサの細網上皮細胞が提供する分化因子<sup>8)</sup>などの影響を受けて抗原受容体(surface immunoglobulin, sIg)を発現するよう分化する。TTを投与したヒナのブルサでは、Bu-1を発現しているがsIgを発現していない細胞(Bu-1<sup>+</sup>sIg<sup>-</sup>cell)の割合は有意に低下した一方、sIgを発現している細胞(Bu-1<sup>+</sup>sIg<sup>+</sup>cell)の割合に変化はなかった<sup>15)</sup>。さらにBリンパ球あたりのBu-1抗原量はTTによって有意に低下した<sup>15)</sup>。これらの結果は、アンドロジェンはブルサにおいて比較的初期の分化段階にあるBリンパ球を直接傷害することを示唆している。Bリンパ球を減少させることが知られているシクロホスファミドと副腎皮質ホルモンによる同様の試験では、これらの薬物はブルサの複数のBリンパ球集団に一律の影響を与える結果が得られており<sup>14)</sup>、上記のTTの作用はアンドロジェンに特有であることが示唆された。一方、TTの投与はブルサBリンパ球のうち、直径6 $\mu$ mで比重1.050の細胞を特異的に減少させた<sup>13)</sup>。これらの結果を総合すると、アンドロジェンはブルサの特定のBリンパ球(Bu-1<sup>+</sup>sIg<sup>-</sup>, 径: 6 $\mu$ m, 比重: 1.050)に特異的に作用すると考えられる。

#### ニワトリのBリンパ球におけるTTの取り込み

1週齢から8週齢の間、ブルサのリンパ球における<sup>3</sup>H-TTの取り込みは胸腺のリンパ球よりも高く、常に2から3倍の値を示した<sup>10)</sup>。これらの結果はアンドロジェンに対するブルサBリンパ球の高い感受性を支持している。抗ニワトリImmunoglobulin (Ig) - ウサギ血清のIg画分を結合させたセファローズ 6 MBを用いたアフ

ィニティークロマトグラフィーによってブルサのリンパ球からsIg陽性細胞とsIg陰性細胞を分離・採取し、これらの細胞における<sup>3</sup>H-TTの取り込み量を測定すると、sIg陰性細胞の値はsIg陽性細胞に比較して有意に高かった<sup>15)</sup>。標識抗原による解析では、TT投与によってブルサのリンパ球のうちsIgを発現していない細胞が特異的に減少することが明らかにされており<sup>15)</sup>、この細胞のTTに対する特異的な感受性の高さはTTの取り込み能に関連していることが示された。14日齢の鶏胚のブルサに由来する上皮細胞が単離・培養されており<sup>7)</sup>、この細胞の培養上清中には鶏胚のブルサ細胞のsIgM分子の発現を誘導する分子量1300程度のペプチドと思われる因子が存在することからブルサの上皮細胞はニワトリのBリンパ球のsIgの発現を誘導する因子を産生していることが明らかにされている<sup>8)</sup>。アンドロジェンがブルサの上皮細胞に抑制性的作用を及ぼすとすれば上皮細胞によるこのsIgM誘導因子の産生も阻害され、sIg陰性細胞からsIg陽性細胞への分化が抑えられる結果ブルサ中のsIg陽性細胞が減少すると想定される。しかし、ブルサでは、TT投与に伴うsIg陰性細胞の減少が引き起こされることから、アンドロジェンはブルサにおけるBリンパ球分化に影響するのではなく、リンパ球に直接的に作用することが示唆された。TTに対するニワトリのBリンパ球性腫瘍細胞株(LL 1104B)の感受性は同Tリンパ球性腫瘍細胞株(BMC 1.1)に比較して高く、この細胞の増殖はTTによって濃度依存的に抑制された<sup>11)</sup>。さらに、<sup>3</sup>H-TTの取り込み量はLL 1104B株で高かった。このように、TTはリンパ球性腫瘍細胞においても直接的な抑制作用を示すことが明らかになっている。

#### ニワトリのリンパ球に対するエストロジェンの作用 — 処理濃度と処理時期による相違

アンドロジェンとは異なりリンパ球やリンパ球関連の免疫機能に対するエストロジェンの影響は複雑であり、様々な観点の研究において促進的影響と抑制的影響が報告されており結論が得られていない。

鳥類のリンパ球やリンパ球機能に対するエストロジェンの影響についてはほとんど研究されていなかった。そこで、ニワトリや鶏胚を用いてリンパ球やリンパ球機能に対するエストロジェンの影響について検討した。

ステロイドホルモンをエチルアルコールに溶解して卵殻ごと発育鶏卵に浸漬することによって鶏胚にステロイドホルモンを投与することができる(受精卵浸漬法)。この場合には定量的な投与はできないが、胚内のE2の濃度はエチルアルコールに溶解したE2の濃度に比例している<sup>24)</sup>。4日齢と14日齢の鶏胚を受精卵浸漬法によってE2で処理すると、4日胚処理群では、孵化後の抗原感作に対する抗体産生は濃度(0.05から1.0%)依存的に上昇した<sup>17)</sup>。一方、14日胚で処理したヒナの抗体産生0.25%

以上の濃度処理で低下した。また、4日胚でE2処理したヒナの胸腺中のCD4陽性Tリンパ球の割合は0.25%以上の濃度で濃度依存的に上昇した<sup>17)</sup>。CD4陽性Tリンパ球はヘルパーT細胞としてBリンパ球の抗体産生を介助していることから、この細胞の増加はエストロゲンによる抗体産生増幅に関連していると考えられる。ニワトリでは、ブルサへのリンパ系幹細胞の侵入は胚期の7日目以降に、胸腺では同5日目以降に起こることが知られている<sup>21)</sup>。したがって、4日胚にはリンパ球系の細胞はこれらの中枢リンパ器官には存在しておらず、この時期におけるE2の効果は上皮細胞や間葉系細胞などのリンパ球系以外の細胞に対する作用に基づいていると考えられる。しかしこれまでのところ、胚期の初期におけるブルサや胸腺のエストロゲン受容体の存在については検討されていない。これらの結果から、エストロゲンはブルサの複数種の細胞に作用してBリンパ球分化に影響を与えること、および、ブルサにおけるBリンパ球分化や孵化後の抗体産生を促進する可能性があることが示された。ヒナと成鶏から採取した末梢血リンパ球のphytohemagglutinin (PHA, Tリンパ球活性化因子)に対する反応性は $10^{-7}$ から $10^{-9}$ MのE2によって有意に上昇し、 $10^{-5}$ Mでは有意に低下した<sup>16)</sup>。また、リンパ球のinterleukin 2 (IL 2, Tリンパ球増殖因子)に対する反応性とIL 2産生能は $10^{-9}$ MのE2で有意に上昇したが、 $10^{-5}$ Mでは有意に低下した<sup>16)</sup>。エストロゲンは処理濃度によってTリンパ球の活性に異なる影響を与えるという興味深い結果と思われる。

#### 鶏胚のブルサと胸腺におけるエストロゲン受容体

ニワトリのブルサと胸腺におけるリンパ球分化は性ステロイドホルモンによって種々の影響を受けることを述べてきた。ステロイドホルモンは一般に細胞の核に存在する受容体を介して作用する。ブルサのアンドロゲン

受容体についてはオートラジオグラフィーによる解析によってそれらの存在が明らかにされている<sup>5,6)</sup>。しかし、鳥類ではリンパ球とエストロゲンの関係についての研究はアンドロゲンに比較して遅れていたためにリンパ組織のエストロゲン受容体の解析は進んでいなかった。そこで、我々はブルサと胸腺におけるエストロゲン受容体(ER)について、その存在、胚期における動態あるいは意義などについて、RT-PCRと免疫組織化学的な手法を用いて解析した。

#### ① ブルサにおけるER発現

ERには $\alpha$ と $\beta$ の2種のアイソフォームが知られている。ここでは、ニワトリのER $\alpha$ とER $\beta$ についてデザインされたプライマーを用いて、ヒナのブルサ、ブルサ由来の培養上皮細胞<sup>7)</sup>におけるER-mRNA発現を追究した<sup>22)</sup>。ER $\alpha$ -mRNAはポジティブコントロールの卵管で検出され、さらにヒナのブルサと培養ブルサ上皮(CBEC)でも発現が観察された。一方、ER $\beta$ -mRNAの発現は認められなかった(Fig. 1)。これらの結果から、ブルサでは、上皮細胞成分などにER $\alpha$ が発現しているが、ER $\beta$ は存在しないことが示され、ブルサに対するエストロゲンの効果は上皮細胞などの成分に存在するER $\alpha$ を介していることが示された。

#### ② 鶏胚のブルサにおけるER $\alpha$ 発現の動態

鶏胚に処理されたエストロゲンはブルサのリンパ球に作用して孵化後の抗体産生に影響を与えることはすでに述べた。さらに、孵化後の抗体産生に対する効果の性質(促進性か抑制性)はエストロゲンを処理する胚期によって異なることも知られている。これらの結果はエストロゲンがブルサにおけるBリンパ球分化に積極的に貢献している可能性を示している。とすれば、Bリンパ球の分化・造成が最も活発な時期である胚の後期のブルサにおいてエストロゲンがBリンパ球分化に貢献していることを示すことが重要であると考えられる。そこ

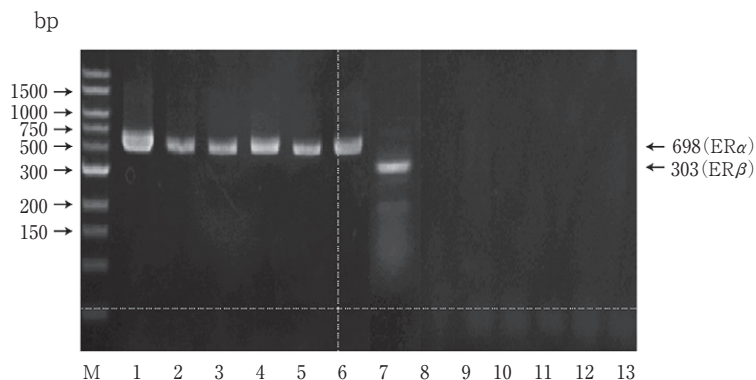


Fig. 1 RT-PCR products amplified with a primer set designed for chicken estrogen receptor (ER)- $\alpha$  and chicken ER- $\beta$ . Lanes 1-6 and lanes 7-13 represent RT-PCR products amplified with a primer set designed for chicken ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ , respectively. Lanes 1 and 8: oviduct, lanes 2, 3, 9 and 10: whole bursa sampled at day 14 of embryogenesis, lane 4, 5, 11 and 12: chicken bursal epithelial cells, lanes 6 and 13: ovary, lane 7: liver of chick embryo and lane M: molecular markers.

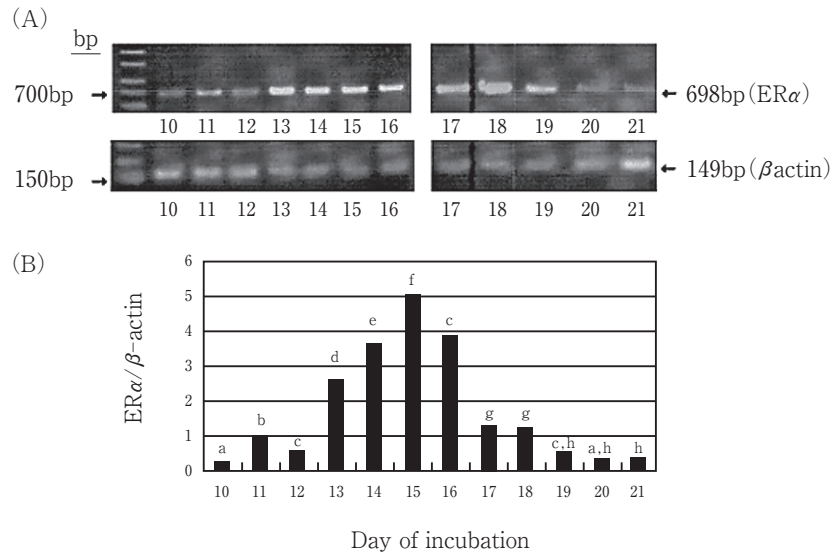


Fig. 2 (A) Estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$ )-mRNA expression in chick embryos and (B) relative densities of RT-PCR products of ER $\alpha$  compared to those of  $\beta$ actin at day 10 to 21 of embryogenesis. Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

で、10日齢から21日齢の鶏胚における ER $\alpha$ -mRNA の発現を調査してその時期における発現量を比較した<sup>23)</sup>。ER $\alpha$ -mRNA 発現は10日胚からわずかに検出され、その後急激に上昇して14から16日胚で最高値に達した後孵化時に向けて低下した(Fig. 2)。後期胚のブルサでは、ER $\alpha$ -mRNA 発現に大きな変動が認められた。ER $\alpha$ は多くの組織に普遍的には発現しているとされているが、後期胚のブルサにおける大きな変動はブルサのER $\alpha$ がなんらかの生理的な役割を演じていることを示唆している。免疫染色では、ブルサのリンパ球、上皮細胞層および間質に陽性細胞が観察され、それらにおける陽性細胞密度は14日齢以降上昇し、16日でピークを示した後低下した(Fig. 3)。m-RNA 発現と細胞密度の変化は、mRNA 発現の変動と同様、15から16日胚においてエストロジェンはなんらかの生理的役割を演じている可能性を示唆している。ブルサにおけるER $\alpha$ 陽性細胞を免疫染色とケラチン染色を併用することによってさらに詳細に検討したところ<sup>9)</sup>、ER $\alpha$ はリンパ球のリンパ球、上皮層のろ胞関連上皮 (FAE) とろ胞間上皮 (IFE) および間質細胞に発現していることが明らかになった(Fig. 4)。Bリンパ球の分化・造成に大きく関与するとされているリンパ球の細網上皮細胞にはER $\alpha$ は認められなかった(Fig. 4)。これらの結果は胚のブルサにおけるBリンパ球分化に対するエストロジェンの効果はリンパ球に対する直接的な作用、上皮細胞成分 (IFE と FEA) や間質細胞を介する未知の経路に対する作用に基づくことを示唆している。

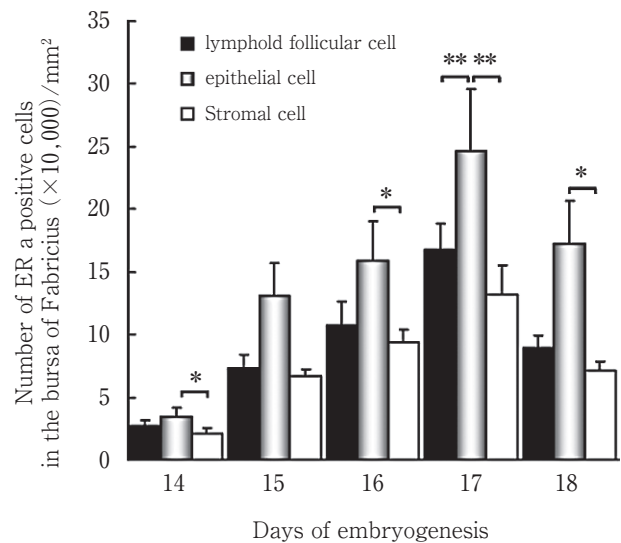


Fig. 3 Number of ER $\alpha$ -positive cell in the lymphoid follicle (black columns), epithelial layer (grey columns) and stroma (white columns) of the bursa of chick embryos at day 14 to 18 of embryogenesis. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

### ③ 胸腺における ER 発現とその動態

15日胚の胸腺材料を用いて測定するとブルサと同様胸腺にも ER $\alpha$ -mRNA の発現が観察された<sup>25)</sup> (Fig. 5)。胸腺組織の ER 陽性細胞の様態をケラチン染色を併用して検討した結果、ER はブルサと同様リンパ球 (Tリンパ球) に発現していることが明らかになった。胸腺では、さらに髄質に特有の構造であるハッサル小体と大型で特

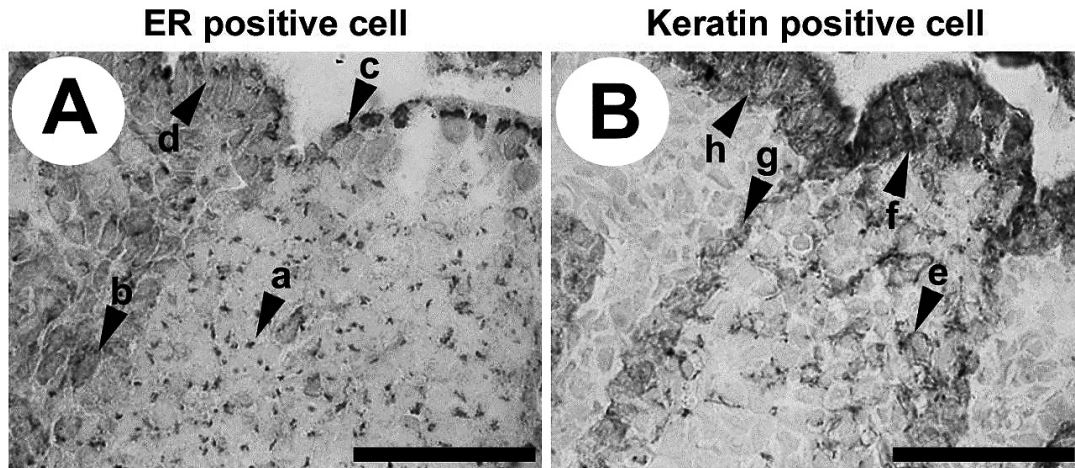


Fig. 4 ER $\alpha$ -positive cells in the bursa of 9<sup>th</sup> day old chick embryos. A-a : lymphocytes, A-g (B-g): stromal cells, A-c (B-h): IFE cells, A-d (B-f): FAE cells, B-e : reticular epithelial and A-g (B-g): stromal cells. Bars show 50  $\mu$ m.

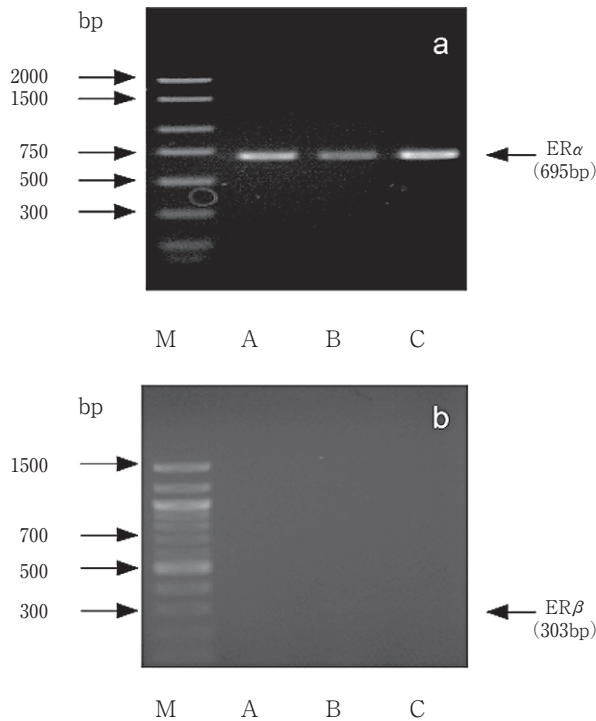


Fig. 5 Representative electrophoresis patterns of ER $\alpha$ -mRNA (a) and ER $\beta$ -mRNA (b) in the thymus (lane A) and bursa of Fabricius (lane B) sampled from 15-day-old chick embryos and the oviduct sampled from 6-month-old hens (lane C). Lane M shows the pattern of size markers.

定できない間葉系の細胞にも ER 発現が認められた。一方、ブルサと同様、リンパ球 (Tリンパ球) の分化・造成に関与するとされる細網上皮細胞は ER 陰性であった (Fig. 6)。胚期の胸腺の ER 陽性リンパ球数は17日胚以

降継続的に高く、20胚で最高値を示した (未発表データ)。この結果は17日胚で最高値を示した後、孵化にかけて ER 陽性リンパ球数が有意に低下するブルサとは異なった。

④ 鶏胚のブルサの ER $\alpha$  発現に対する E2 投与の効果およびブルサにおけるエストロゲン合成酵素の mRNA 発現

14日齢から16日齢で浸漬法によって E2 処理した胚のブルサでは ER $\alpha$  陽性細胞密度は有意に上昇した (Fig. 7)。また、エストロジェンの合成に関与するいくつかの酵素 (P450scc, P450c17, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD, Aromatase) の m-RNA が10日齢から20日齢の鶏胚のブルサに発現していることが明らかにされた<sup>24)</sup> (Fig. 8)。これらの結果はエストロゲンが後期鶏胚のブルサにおけるBリンパ球分化に積極的に関与していることを改めて示唆している。また、エストロゲン合成酵素-mRNA のブルサにおける発現は、この時期のブルサではエストロゲンが合成されている可能性を強く示唆している。鶏胚のブルサにおいて ER-mRNA を発現している細胞は不明であるが、エストロゲンはパラクライン機構あるいはオートクライン機構によって後期鶏胚のBリンパ球分化・造成に関与していると想定される。腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) はブルサのBリンパ球のアポトーシスを誘導することが知られているが<sup>20)</sup>、TNF- $\alpha$  スーパーファミリーのいくつかのメンバーの mRNA がブルサに発現していることが報告されている<sup>1)</sup>。ヒトの血管内皮細胞では、エストラジオールが TNF- $\alpha$  によって誘導されるアポトーシスに対する防御効果を発揮することが明らかにされている<sup>18)</sup>。15日胚齢前後は、ブルサにおいて8から14日胚齢で定着したBリンパ球の分化 (抗原受容体発現など) や増殖 (クローン増殖) が最も活発に行われる時期であり、孵化後のBリンパ球拡大や抗体産生

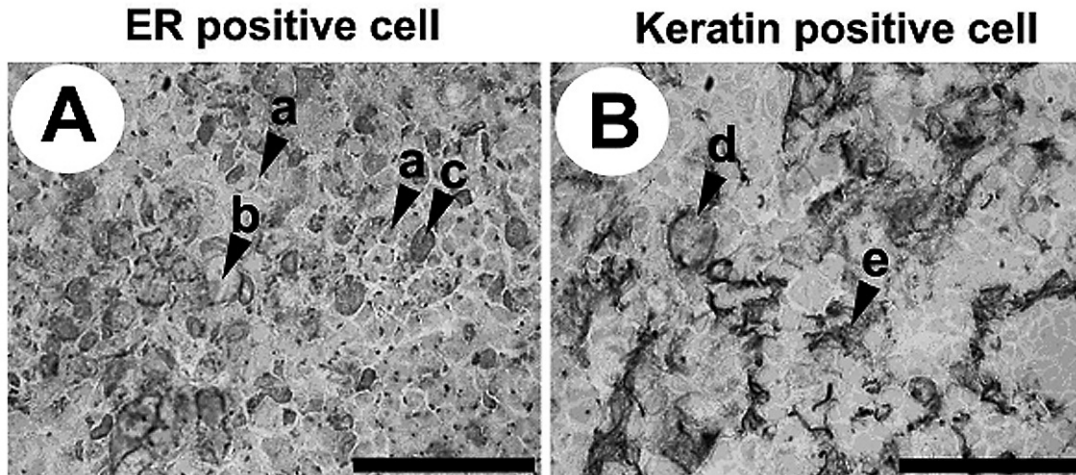


Fig. 6 ER $\alpha$ -positive cells in the thymus of 9<sup>th</sup> day old chick embryos. A-a : lymphocytes, A-b (B-d) : Hassall's corpuscles, A-c : unspecified large cells and B-e : reticular epithelial cells.

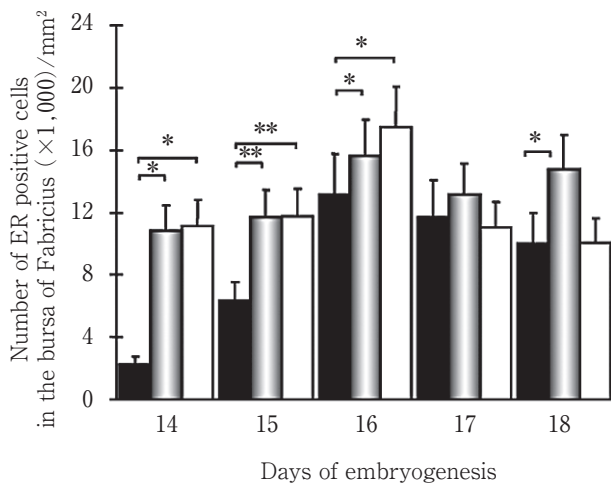


Fig. 7 Density of ER-positive cells (number of cells/mm<sup>2</sup>) in the bursa of chick embryos 4h after treatment with 17 $\beta$ -estradiol on the 14<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> days of embryogenesis. Black column, gray column and open column represent control, 0.5%-estradiol-treated and 1.0%-estradiol-treated chick embryos, respectively. All results are given as means and standard errors.  $n=6$  in each group at each determining point \* $P<0.05$  versus control. \*\* $P<0.01$  versus control.

能の獲得における胚後期の ER 発現の特異的な上昇やこの時期のブルサのエストロジェン合成機構の意義は大きいと考えられる。今後の課題として、TNF- $\alpha$  によるブルサにおける B リンパ球分化・増殖阻害に対するエストロジェンの効果について検討していくことが重要であろう。

#### 鶏胚のブルサの B リンパ球に対するエストロジェン投与の効果 — 胚齢と投与量による効果の違い

後期鶏胚の特定時期 (16 から 17 日胚) のブルサにおける高い ER 発現の B リンパ球分化における意義を検討するために、胚では受精卵の漿尿膜に分布する血管から、ヒナでは翼下静脈から、異なる投与時期 (13 日胚齢から 1 週齢) と投与量 (濃度 :  $10^{-2}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-6}$  M および投与量 : 50  $\mu$ L) で E2 を投与してブルサ中の Bu-1 陽性細胞と sIgM 陽性細胞の割合を求めた (未発表データ)。 $10^{-6}$  M では、いずれの場合にも対照との間の差はみられなかったが、 $10^{-2}$  M では Bu-1 陽性細胞、sIgM 陽性細胞ともに ER 発現が高い時期 (15 日胚と 17 日胚) には割合は低下し、ER 発現が低い時期 (19 日胚と 21 日胚) では逆に上昇した。一方、 $10^{-4}$  M では、両細胞の割合ともに ER 発現が高い時期には上昇、発現が低い時期には低下した (Fig. 9)。鶏胚のブルサの B リンパ球に対する E2 の効果は投与した E2 濃度と ER 発現様態の積によって決まることが示された。ここで用いた E2 の濃度と適用量によって達成される鶏胚内の E2 濃度は不明であるが、B リンパ球分化が促進されるためにはこの積が適度であることが必要であると想定される。鶏胚のブルサにおける B リンパ球分化の生理的な条件では、ER 発現とエストロジェン合成を結ぶなんらかの信号系が存在しており、それらの調節によって B リンパ球分化が制御されている可能性も想定できる。今後の興味深いテーマの一つと考えられる。一方、エストロジェンは Bu-1 陽性細胞にも sIgM 陽性細胞にも影響したことから、すべての分化過程にある B リンパ球に直接または間接的に作用すると考えられ、分化が進んだ sIg (sIgM) 陽性細胞には作用しないアン

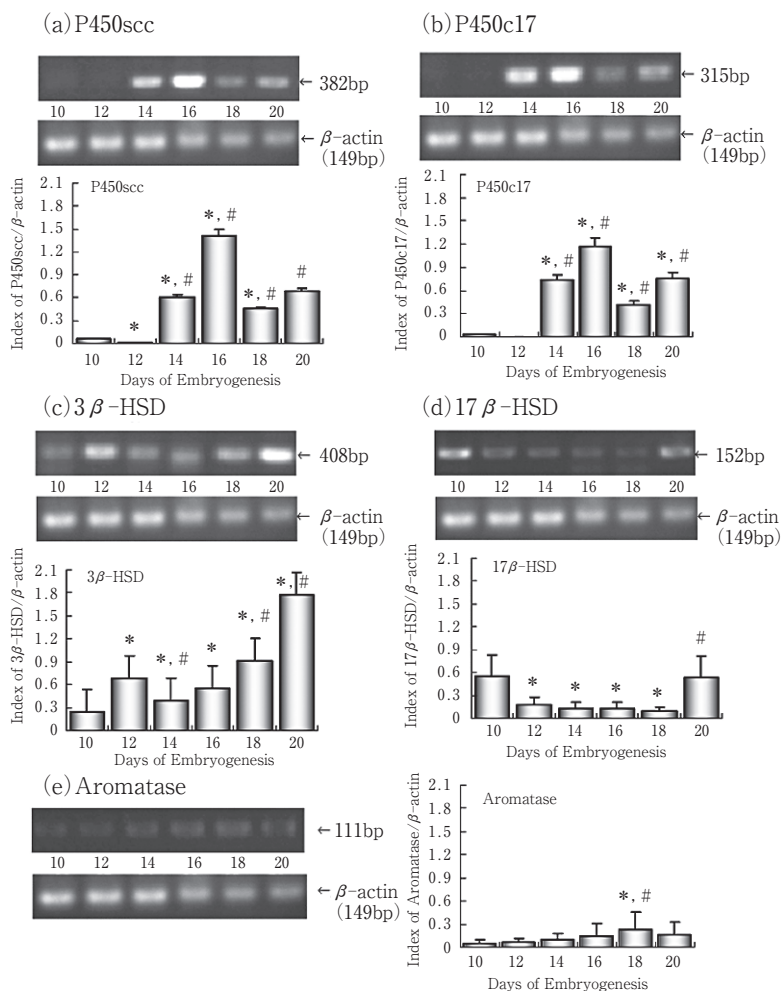


Fig. 8 Messenger RNA (mRNA) expressions of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, 3β-HSD, 17β-HSD and aromatase) in the bursa of chick embryos on the 10<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> day of embryogenesis. Upper parts of (a) to (d) and the left side of (e) represent mRNA expression of each steroidogenic enzyme and β-actin, and lower parts of (a) to (d) and the right part of (e) show relative densities of RT-PCR products of steroidogenic enzymes compared with those of β-actin on the 10<sup>th</sup> to 20<sup>th</sup> day of embryogenesis. All results are given as means and standard errors. *n* = 5 in each mRNA measurement at each determining point. *P* < 0.01 versus 10th day. #*P* < 0.01 versus 12th day.

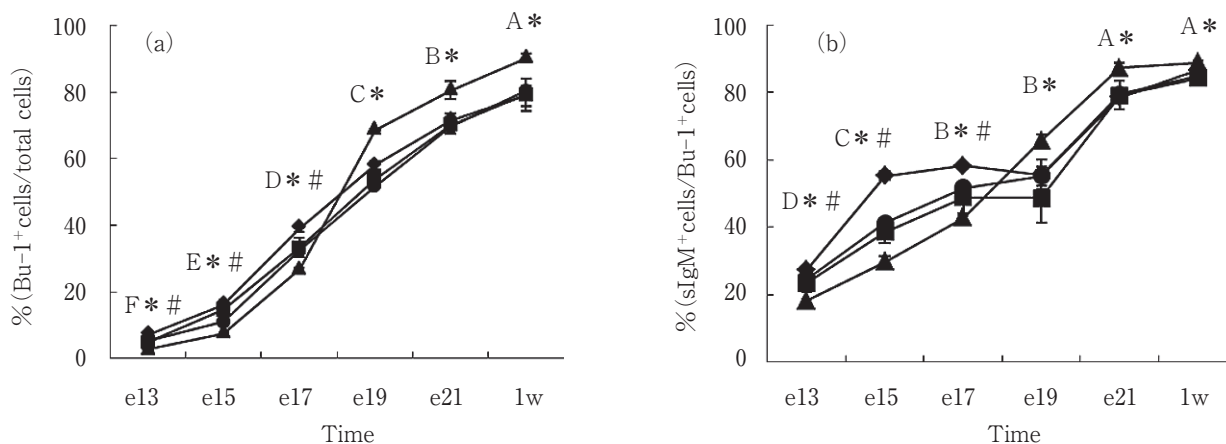


Fig. 9 Effects of E2 on the percentages of the Bu-1<sup>+</sup> cells (a) and the rate of the sIgM<sup>+</sup> cells in the Bu-1<sup>+</sup> cells (b) in the bursa. e13 to e21 represent 13<sup>th</sup> day to 21<sup>th</sup> day of embryogenesis, and 1w represents 1 week of age. (●) Control, (■) E2 10<sup>-6</sup>, (◆) E2 10<sup>-4</sup>, (▲) E2 10<sup>-2</sup>. Values are means ± SD. A, B, C, D, E, F means with different letters are significantly different for different times of embryo and chick in the group without E2 treatment (*p* < 0.05), \* means are significantly different between the group without E2 treatment and the group with 10<sup>-2</sup> mol/L E2 treatment (H group) in identical times of embryo and chick, # means are significantly different between the group without E2 treatment and the group with 10<sup>-4</sup> mol/L E2 treatment (M group) in identical times of embryo and chick (*p* < 0.05).

ドロジェンとは異なることも示された。

### 総括

- ① 性ステロイドホルモンはニワトリのブルサにおけるBリンパ球分化に影響する。アンドロジェンはブルサの未分化なBリンパ球 (sIgM 陰性細胞) に作用して分化を停止させる。一方、エストロジェンはブルサのすべてのBリンパ球に影響するが、適用濃度によってBリンパ球分化を促進あるいは抑制する。
- ② 鶏胚のブルサと胸腺にはER- $\alpha$ が発現しており、ブルサにおける発現はm-RNAと免疫組織化学から、15から17日で特異的に高かった。この時期はブルサにリンパ球系幹細胞が侵入した直後の時期であり、ER高発現がBリンパ球分化に関与している可能性を示した。一方、胸腺では、後期胚ではすべての時期で高く特異的な時期の高発現はみられなかった。
- ③ 後期鶏胚のブルサではエストロジェン合成酵素のm-RNAが発現しており、この時期にはエストロジェンはパラクライン機構などによってBリンパ球分化に関与していることが示唆された。
- ④ 後期鶏胚では、E2の促進作用にはER発現とエストロジェン濃度の積が適切であることが必要であると考えられた。

### 引用文献

- 1) Abdalla, S. A., H. Horiuchi, S. Fukuzawa, H. Matsuda : Molecular cloning and characterization of chicken tumor necrosis factor (TNF)-superfamily ligands, CD30L and TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 643-650 (2004)
- 2) Breitenbach, R. P and L. K. Pauly : Effects of testosterone propionate on lymphoid tissue and antibody production in chickens. *Poultry Sci.*, **41**, 542-547 (1961)
- 3) Glick, B. : Normal growth of the bursa of Fabricius in chicken. *Poultry Sci.*, **35**, 224-225 (1956)
- 4) Glick, B. : Experimental modification of the bursa of Fabricius. *Poultry Sci.*, **36**, 18-23 (1957)
- 5) Gasc J-M, M. Sar and W. E. Stumpf : Androgen target cells in the bursa of Fabricius of the chick embryo : autoradiographic localization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **160**, 55-58 (1979)
- 6) Gasc, J-M and W. E. Stumpf : The bursa of Fabricius of the chicken embryos : localization and ontogenic evolution of sex steroid target cells. *J. Embryol. Exp. Morph.*, **63**, 225-231 (1981)
- 7) Han, S., E. Mitsusada, A. Abe and Y. Kondo : Serum-free culture of chicken bursal epithelial cells. *J. poultry Sci.*, **40**, 69-73 (2003)
- 8) Han, S., M. Kondo, A. Abe, Y. Kimura, K. Ohtsuki and Y. Kondo : Surface IgM-inducing factor in the culture supernatant of bursal epithelial cells derived from chick embryos. *J. Poultry Sci.*, **40**, 130-138 (2003)
- 9) Katayama, M., T. Fukuda, K. Narabara, A. Abe and Y. Kondo : **Localization of estrogen receptor in the central lymphoid organs of chickens during the late stage of embryogenesis.** *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 2003-2007
- 10) 近藤康博・佐藤孝二・江口敬子 : リンパ球におけるテストステロンの選択的な取り込み, 日本免疫学会記録, **8**, 400 (1978)
- 11) 近藤康博・塩田雅彦・田辺 昭・鳥海 徹・佐藤孝二 : リンパ腫症及びマレック病腫瘍細胞に対するテストステロンほか各種ステロイドホルモンの効果, 岡山大学農学部学術報告, **55**, 7-13 (1980)
- 12) 近藤康博・田辺 昭・鳥海 徹・佐藤孝二 : ニワトリのファブリシウス囊におけるB<sup>+</sup>リンパ球およびsIg<sup>+</sup>リンパ球の分布. *日本畜産学会報*, **55**, 728-734 (1984)
- 13) 近藤康博・田辺 昭・佐藤孝二 : ニワトリのファブリシウス囊リンパ球構成に対するテストステロンの効果 I. 細胞の大きさと密度勾配による解析. *日本家禽学会誌*, **22**, 214-220 (1985)
- 14) 近藤康博・田辺 昭・佐藤孝二 : ファブリシウス囊と胸腺リンパ球構成に対するシクロホフファミドと酢酸コルチゾンの効果 — 標識抗原とsIgによる解析. *日本家禽学会誌*, **23**, 227-234 (1986)
- 15) Kondo, Y., A. Tanabe and K. Sato : Effects of testosterone on distribution and epitope densities of surface markers of bursocytes. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**, 833-840 (1987)
- 16) Kondo, Y., H. Oka, A. Abe and A. Tanabe : Dose-related effects of  $\beta$ -estradiol on chicken T cell activity. *Jpn. Poultry Sci.*, **31**, 327-334 (1994)
- 17) Kondo, Y., C. Goto and A. Abe : **Effects of estrogen treatment during the embryogenic period on chick antibody production.** *J. Poultry Sci.*, **41**, 85-93 (2004)
- 18) Ling, S., L. Zhou, H. Li, A. Dai, J. P. Liu, P. A. Komesaroff and K. Shadhir : Effects of 17 $\beta$ -estradiol on growth and apoptosis in human vascular endothelial cells : influence of mechanical strain and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Steroids*, **71**, 799-808 (2006)
- 19) Nicol, T., D. L. Bilbey, L. M. Charles, J. L. Corcingley and F. Markham : Oestrogen : The natural stimulant of body defence. *J. Endocrinol.*, **30**, 277-291 (1964)
- 20) Paramithiotis, E., K. A. Jacobsen, J. H. Ratcliffe : Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of fabricius. *J. Exp. Med.*, **181**, 105-113 (1995)
- 21) Péault B., F. Dieterlen-Lièvre and N. M. Le Douarin : Cellular interactions occurring during primary lymphoid organ ontogeny in birds. *In Avian Immunology : Basis and Practice* (Toivanen, A and P. Toivanen eds), pp 39-63, CRC Press, Boca Raton (1987)
- 22) Shin Y-H, F. Takagi, S. Sugita, S. Han, T. Tsuji, A. Abe and Y. Kondo : Evidence for estrogen receptor expression in the bursa epithelia cells of chicks. *Anim. Sci. J.*, **76**, 255-259 (2005)
- 23) Shin Y-H., Y. Yonezawa, A. Abe and Y. Kondo : Changes in estrogen receptor alpha expression in the bursa of Fabricius during chick embryonic development. *Anim. Sci. J.*, **79**, 97-103 (2008)
- 24) Shin Y-H., S. Shiraiishi, K. Narabara, A. Abe and Y. Kondo : Effects of estrogen on estrogen receptor expression in the bursal cells of chick embryos and steroidogenic enzymes gen expression in the bursa : relevance of estrogen receptor and estrogen synthesis in the bursa of chick embryos. *Anim. Sci. J.*, **83**, 156-161 (2012)
- 25) Yonezawa, Y., Y-H, Shin, A, Abe and Y. Kondo : Estrogen



receptor alpha expression in the thymus of chick embryos during late stage of embryogenesis. *Anim. Sci. J.*, **79**, 270-

273 (2008)