

ニワトリ胚におけるリンパ球の膜特異抗原と 膜表面 Ig の発生と成長に伴う変動

近藤康博・有安利夫・田辺 昭・鳥海 徹

(家畜衛生学研究室)

Received June 30, 1984

Ontogeny and Age Distribution of Specific Antigens and Surface Immunoglobulins on the Lymphocyte Membranes of Chick Embryos

Yasuhiro KONDO, Toshio ARIYASU, Akira TANABE and Tooru TORIUMI

(Laboratory of Animal Hygiene)

Ontogeny and distribution of T antigen (T), B antigen (B), surface immunoglobulin (sIg) and surface immunoglobulin M (sIgM) positive lymphocytes in the chick embryos were investigated by the direct immunofluorescence.

T positive (T⁺) and B positive (B⁺) lymphocytes were first detected on the 11th embryonic day (ED), while sIg positive (sIg⁺) and sIgM positive (sIgM⁺) lymphocytes were detected on the 12th ED in the thymus. T⁺ lymphocytes were first detected on the 10th ED, while B⁺, sIg⁺ and sIgM⁺ lymphocytes were detected on the 11th ED in the bursa of Fabricius (BF).

In the thymus, T⁺ and B⁺ lymphocytes gradually increased by the 14th ED, whereas T⁺ lymphocytes exceeded B⁺ lymphocytes in percentage and B⁺ lymphocytes gradually decreased after the 15th ED. In the BF, on the other hand, T⁺ and B⁺ lymphocytes gradually increased by the 16th ED, whereas B⁺ lymphocytes exceeded T⁺ lymphocytes in percentage and T⁺ lymphocytes gradually decreased after the 17th ED.

Both sIg⁺ and sIgM⁺ lymphocytes increased in parallel from the 11th ED to the 16th ED, and sIg⁺ lymphocytes exceeded sIgM⁺ lymphocytes in percentage after the 17th ED in the BF.

These results suggest that T lymphocytes in the thymus may still be immature by the 14th ED and the differentiation of mature lymphocytes may begin on and after the 15th ED, while B lymphocytes in the BF may still be immature by the 16th ED and differentiation of mature B lymphocytes may begin on and after 17th ED. Furthermore, it seems that sIg of the B lymphocyte is only IgM until the 16th ED and sIgM of B lymphocyte begin to switch to other classes of sIg on and after the 16th ED.

緒 言

鳥類では、免疫機能は主として、ファブリシウス嚢 (BF) で産生される B リンパ球と、胸腺で産生される T リンパ球によって確立される。両リンパ球は発生的・機能的な差異を持つだけでなく、マーカーとしてそれらの膜表面に特異な膜抗原、すなわち B リンパ球には B 抗原 (B) が、T リンパ球には T 抗原 (T) が存在することによって区別される。また、B リンパ球では、膜表面の免疫グロブリン (sIg) が T リンパ球に比べて著しく多い⁸⁾ ことが知られ、もう一つの B リンパ球のマーカーとして用いられている。従来より、これらのマーカーの発達とリンパ球の機能における関連が示唆されている^{3,9)}。これらのマーカーの個体発生とその後の胚における発達についての報告は、2, 3 行なわれているが、一致した見解は得られてい

ない。ここでは、鶏の胚のリンパ組織における B 抗原陽性リンパ球 (B^+ リンパ球), T 抗原陽性リンパ球 (T^+ リンパ球), 膜 Ig 陽性リンパ球 (sIg^+ リンパ球) の発生と分化について直接蛍光抗体法を用いて調査し, B 抗原, T 抗原及び sIg の胚における発生時期とその後の発達・分布を明らかにした。

材 料 と 方 法

1. 供 試 鶏

供試鶏は, ホワイトレグホン種のコマーシャルで, 9 日から 20 日フ化卵及び 0 週から 2 週齢のヒナを用いた。尚, 一回の実験につき卵では 5 から 10 個, ヒナでは 1 から 3 羽を用いた。

2. FITC 標識抗体の作成

3 週齢のヒナの胸腺をハンクス液中へ採取し, Ficoll-Paque (Pharmacia) を用いてリンパ球 (98% 以上) を分離した。その後, 3 回遠心・洗浄し, 細胞濃度を $5 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した。リンパ球液 2 ml に同量の Freund's complete adjuvante を加えて懸濁させた後, ウサギ (白色在来種) に皮下注射して一次免疫を施した。そして 1 ヶ月後, 同量のリンパ球懸濁液を耳静脈より注射して二次免疫を施した。さらに一週間後, 耳静脈より採血してその血清を分離した。この血清を BF より分離したリンパ球懸濁液で十分吸収を行ない, 抗 T リンパ球血清とした。次に, 3 週齢のヒナの BF より同様の方法で抗血清を作成し, 胸腺リンパ球で十分に吸収を行ない, 抗 B リンパ球血清とした。また, Ig 及び IgM は塩析法¹⁰⁾, IgM については, さらに Sephadex G-200 で分画して精製し, 前述の方法により抗 Ig 血清及び抗 IgM 血清を作成した。ついで, fluorescein isothiocyanate (FITC) とこれらの抗血清の conjugation を, 濱島ら⁶⁾ の方法により行なった。さらに Sephadex G-25 により遊離色素を除去し, 次に鶏肝パウダーにより非特異結合部分を吸着して除去した。尚, FITC 標識抗 T 血清及び FITC 標識抗 B 血清については, それぞれのリンパ球との間の凝集反応で抗体の存在を確認した。さらに, FITC 標識抗 Ig 血清及び FITC 標識 IgM 血清に関しては, 寒天免疫電気泳動を行ない, その純度を確認した後, 蛍光標識抗体として以下の実験に供した。

3. 蛍光陽性リンパ球の観察と陽性比率の測定

前述の方法に従って, フ化卵とヒナの BF, 胸腺及び脾臓より, リンパ球懸濁液を作成して, その濃度を $5 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した。次に, その 0.2 ml と, あらかじめハンクス液で 10 倍希釈した FITC 標識抗 B 抗体・FITC 標識抗 T 抗体・FITC 標識抗 Ig 抗体・FITC 標識抗 IgM 抗体 0.2 ml を混和し, 4°C で 90 分間インキュベートした。インキュベーション終了後 2 ml のハンクス液で 2 度洗浄を繰り返行ない, 最後に 0.2 ml のハンクス液を加え, そのリンパ球濃度を再び $5 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した。蛍光陽性リンパ球の比率は, まず明視野でリンパ球数をかぞえ, 次いで暗視野で蛍光を発するリンパ球数を求めた。以上のカウントを 3 回繰り返して行ない, その陽性比率を測定した。

結 果

1. 胸 腺

胚齢 10 日目から胚齢 20 日目及びフ化後 0 週齢から 2 週齢の胸腺リンパ球より得られた結果は, Fig. 1 及び Fig. 2 に示した。 T^+ リンパ球及び B^+ リンパ球は, 胚齢 11 日目に初めて出現した。そして, T^+ リンパ球及び B^+ リンパ球とも胚齢 14 日目まで急激に上昇し, 両者とも約 40% に達した。胚齢 15 日目以降, T^+ リンパ球は胚齢 19 日目まで高率を維持し, 胚齢 20 日目に一旦減少した後, 再び急激な増加傾向に転じてフ化後 2 週齢では 72% に達した。一方, B^+ リンパ球は胚齢 15 日目以降, 胚齢 17 日目まで 35 から 40% の値で推移したが,

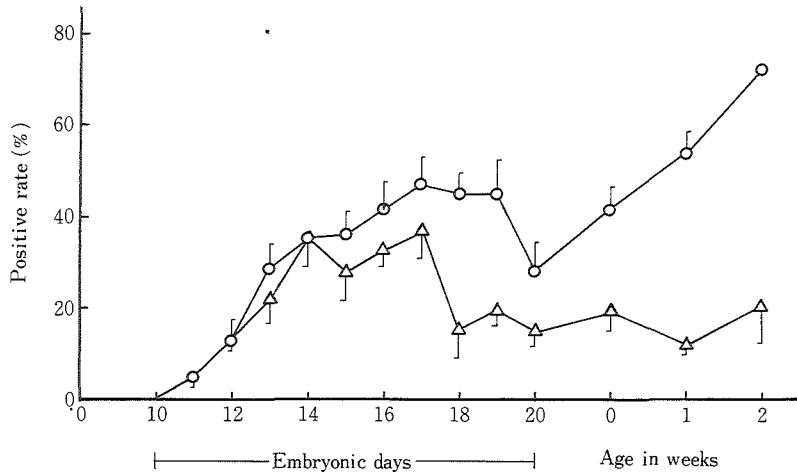


Fig. 1. Ontogeny and age distribution of T⁺ and B⁺ lymphocytes in the thymus of chick embryos and chicks at different age ; ○ : T⁺ lymphocyte, △ : B⁺ lymphocyte. Vertical bars represent standard deviation. Four to six embryos or chicks were used at each determination.

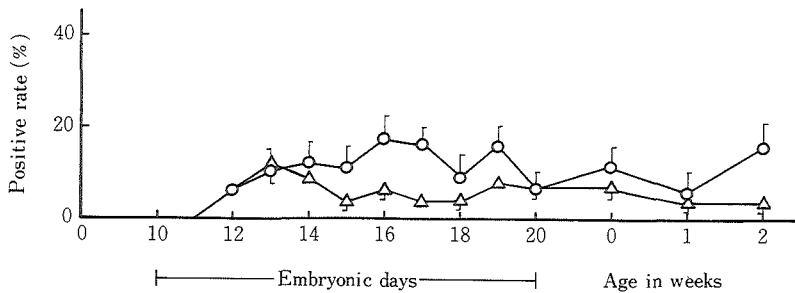


Fig. 2. Ontogeny and age distribution of sIg⁺ and sIgM⁺ lymphocytes in the thymus of chick embryos and chicks at different age ; ○ : sIg⁺ lymphocyte, △ : sIgM⁺ lymphocyte. Vertical bars represent standard deviation. Four to six embryos or chicks were used at each determination.

胚齢 18 日目に急激に減少し、フ化後 2 週齢まで 20% 前後の値で推移した。一方、胸腺での Ig⁺ リンパ球及び IgM 陽性リンパ球 (IgM⁺ リンパ球) は、胚齢 12 日目に出現したが、両者ともフ化後 2 週齢まで 5 から 20% 前後の低値を維持した。

2. ファブリシウス嚢

胚齢 9 日目から胚齢 20 日目及びフ化後 0 週齢から 2 週齢の BF リンパ球より得られた結果は、Fig. 3 及び Fig. 4 に示した。T⁺ リンパ球は胚齢 10 日目に出現し、一方 B⁺ リンパ球は胚齢 11 日目に出現した。そして T⁺ リンパ球及び B⁺ リンパ球とも胚齢 16 日目まで急激に上昇し両者とも約 40% に達した。胚齢 17 日目以降、T⁺ リンパ球は次第に減少傾向を示し、フ化時には約 20% に低下した。その後、2 週齢まで 20% 前後の値で推移した。一方、B⁺ リンパ球は胚齢 17 日目まで増加傾向を示し、それ以降胚齢 20 日目まで減少傾向に転じたもののフ化以降急激に上昇し、フ化後 2 週齢では 66.5% に達した。BF リンパ球中の sIg⁺ リンパ球及び sIgM⁺ リンパ球は、いずれも胚齢 11 日目に出現した。そして両リンパ球とも胚齢 16

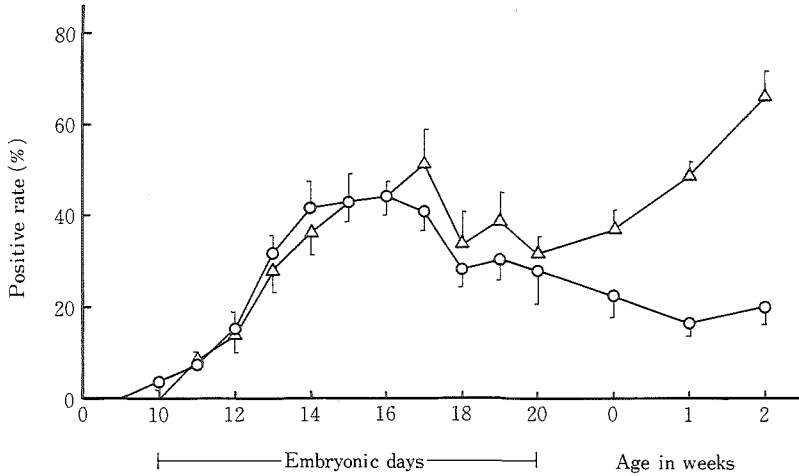


Fig. 3. Ontogeny and age distribution of T⁺ and B⁺ lymphocytes in the bursa of Fabricius of chick embryos and chicks at different age; ○ : T⁺ lymphocyte, △ : B⁺ lymphocyte. Vertical bars represent standard deviation. Four to six embryos or chicks were used at each determination.

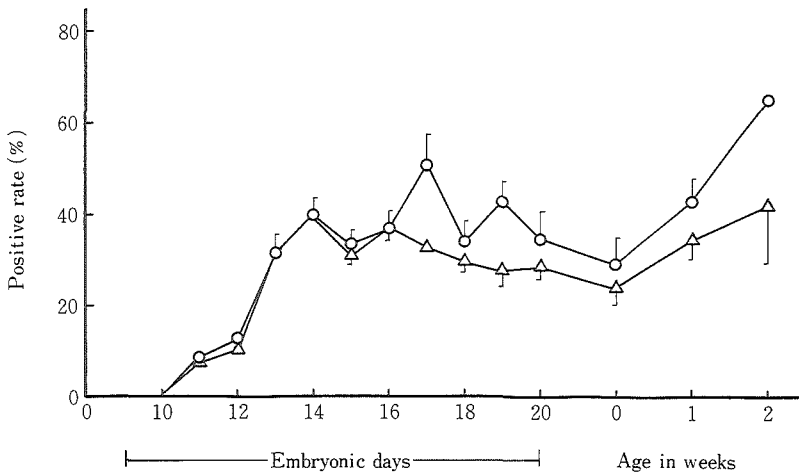


Fig. 4. Ontogeny and age distribution of sIg⁺ and sIgM⁺ lymphocytes in the bursa of Fabricius of chick embryos and chicks at different age; ○ : sIg⁺ lymphocyte, △ : sIgM⁺ lymphocyte. Vertical bars represent standard deviation. Four to six embryos or chicks were used at each determination.

日目まで急激な増加傾向を示し、その値は約 40% に達した。胚齢 17 日目以降フ化後 0 週齢まで両方とも徐々に減少したが、それ以後 sIgM⁺ リンパ球は、フ化後 2 週齢まで漸増する傾向を示したのに対し、sIg⁺ リンパ球はフ化後 2 週齢まで直線的に急激に上昇した為、胚齢 17 日目以降、sIg⁺ リンパ球の比率は sIgM⁺ リンパ球の比率を上回った。

3. 脾 臓

胚齢 10 日目から胚齢 20 日目及びフ化後 0 週齢から 2 週齢の脾臓リンパ球より得られた結果は、Fig. 5 及び Fig. 6 に示した。脾臓では B⁺ リンパ球及び T⁺ リンパ球は、いずれも胚

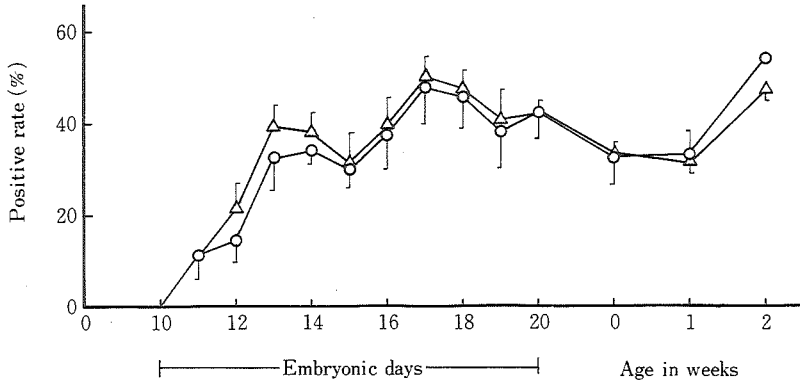


Fig. 5. Ontogeny and age distribution of T⁺ and B⁺ lymphocytes in the spleen of chick embryos and chicks at different ages ; ○ : T⁺ lymphocyte, △ : B⁺ lymphocyte. Vertical bars represent standard deviation. Four to six embryos or chicks were used at each determination.

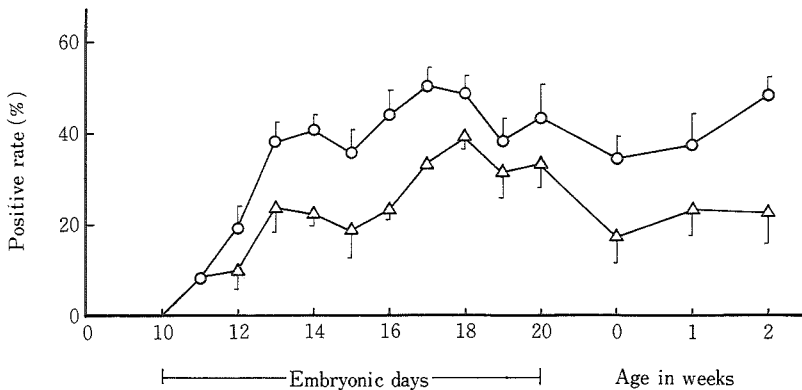


Fig. 6. Ontogeny and age distribution of sIg⁺ and sIgM⁺ lymphocytes in the spleen of chick embryos and chicks at different ages ; ○ : sIg⁺ lymphocyte, △ : sIgM⁺ lymphocyte. Vertical bars represent standard deviation. Four to six embryos or chicks were used at each determination.

齢 11 日目に出現した。両方の比率は、胚齢 13 日目まで急激に上昇して約 40% に達した。胚齢 14 日目以降、2 週齢にいたるまで両方の比率は変動があるものの、いずれも 30 から 50 % の値で推移した。一方、sIg⁺リンパ球及び sIgM⁺リンパ球は、胚齢 11 日目に出現した。sIg⁺リンパ球は、胚齢 13 日目まで急激に上昇し、その比率は約 40% に達した。その後、多少の変動はあるが、2 週齢にいたるまで 35 から 45% の値で推移した。sIgM⁺リンパ球は、胚齢 18 日目まで徐々に上昇して約 40% に達したが、その後減少して孵化時には、その比率は 20% に低下し、2 週齢までその値を維持した。胚齢 12 日目以降、2 週齢まで sIg⁺リンパ球は常に sIgM⁺リンパ球の割合を上回り、その差は 5 から 25% に達した。

考 察

従来鳥類において、胸腺は T リンパ球を、そして BF は B リンパ球を産生する中枢リンパ

組織であり^{4,5,7,11,12,16}、また T リンパ球はマーカーとして T 抗原を、B リンパ球はマーカーとして B 抗原及び sIg を持っていることが知られている^{1,13-15}。本実験においてフ化後、胸腺では T⁺ リンパ球の比率が、一方 BF では B⁺ リンパ球及び sIg⁺ リンパ球の比率が他のリンパ球の比率に比較して高率に認められたことは、この事に一致している。

本実験では、胚齢 11 日目の胸腺で T⁺ リンパ球及び B⁺ リンパ球が、そして胚齢 12 日目には sIg⁺ リンパ球及び sIgM⁺ リンパ球の発生が認められた。一方、BF では胚齢 10 日目で T⁺ リンパ球が、そして胚齢 11 日目には B⁺ リンパ球、sIg⁺ リンパ球及び sIgM⁺ リンパ球の発生が認められた。PAUL W. K. and M. D. COOPER の報告⁸) によると、胚齢 13 日目に BF で Ig⁺ リンパ球が確認されている。また ALBINI B. and G. WICK の報告^{2,3}) によると、胚齢 12 日目に胸腺で T⁺ リンパ球及び B⁺ リンパ球が、そして胚齢 13 日目に BF で T⁺ リンパ球及び B⁺ リンパ球が確認されている。本実験において得られた結果では、これらの報告に比較して、マーカーの出現が 1 から 2 日早かった。この出現時期の相違は、用いた鶏の系統差、抗体の純度、観察法(直接法と間接法)等の違いに起因するものと考えられる。

ところで、胸腺において、胚齢 14 日目まで T⁺ リンパ球及び B⁺ リンパ球の比率がほぼ同じ値で推移し、同様に BF において、胚齢 16 日目まで B⁺ リンパ球及び T⁺ リンパ球の比率がほぼ同じ値で推移した。本来、胸腺は T リンパ球を産生し、一方 BF は B リンパ球を産生する器官とされているが、この時点まで両中枢リンパ組織中のリンパ球が(T)及び(B)を合わせ持っていることから、胸腺が T リンパ球を、一方 BF が B リンパ球を分化成熟及び増殖させる機能及びその特異性を、両リンパ器官ともにこの時点まで持っていない。つまり未発達の状態であると考えられ、胸腺では胚齢 15 日目以降、一方、BF では胚齢 17 日目以降、T リンパ球あるいは B リンパ球の真の分化が開始されると思われる。

次に、BF 中における B リンパ球の sIg に関して、胚齢 16 日目まで sIg⁺ 及び sIgM⁺ リンパ球の比率が同じであることから、この時点までのリンパ球の sIg は、主として IgM であると考えられる。そして胚齢 16 日目以降、sIg⁺ リンパ球の比率が sIgM⁺ リンパ球の比率を大幅に上回することは、胚齢 16 日目前後に、B リンパ球の sIg が IgM から他のクラスの Ig への転換(スイッチ)が始まることを示唆していると考えられる。リンパ球膜表面の Ig については、リンパ球発生の初期には IgM が見られ、リンパ球が成熟するにつれて他のクラスの Ig への転換が起こるとされている。IgM から他のクラスの Ig への転換が胚齢 16 日目で起こることは、BF 中の B⁺ リンパ球の真の分化が胚齢 16 日目に起こることと一致しており、この点からも BF で産生されるリンパ球の真の分化が胚齢 16 日目頃に起こることが明らかであろう。

最後に、細胞性免疫機能、すなわち T リンパ球の機能を反映する GVH 反応は、T リンパ球が未熟な胚齢 14 日目では生ずるが、胚齢 15 日目では生じないことが知られている。このことと、本実験で得られた T リンパ球の分化と考え合わせると、非常に興味深く、今後液性及び細胞性免疫機能とリンパ球のマーカーの発達との関連について、いろいろな角度から、さらに追求することが重要であると考えられる。

摘 要

鶏の胚の胸腺、BF 及び脾臓中の T⁺ リンパ球、B⁺ リンパ球、sIg⁺ リンパ球及び sIgM⁺ リンパ球の比率の加齢に伴う変化を経時的に追求した。

胸腺では、胚齢 11 日目に T⁺ リンパ球及び B⁺ リンパ球が、胚齢 12 日目に sIg⁺ リンパ球及び sIgM⁺ リンパ球が発生した。一方 BF では、胚齢 10 日目に T⁺ リンパ球が、胚齢 11 日目に B⁺ リンパ球、sIg⁺ リンパ球及び sIgM⁺ リンパ球が発生した。

胸腺では、胚齢 15 日目から T⁺ リンパ球の比率が、一方 BF では胚齢 17 日目から B⁺ リ

ンパ球の比率が急激に上昇することから、この時点より真の分化が始まると考えられる。

BF では、sIg⁺ リンパ球及び sIgM⁺ リンパ球が胚齢 11 日目に発生してから胚齢 16 日目まで、ほぼ同じ値で推移していることから、胚齢 16 日目まで B リンパ球の sIg は IgM のみであると考えられる。

BF では、胚齢 16 日目以降、sIg⁺ リンパ球の比率が sIgM⁺ リンパ球の比率を大幅に上回ることから、胚齢 16 日目前後に、B リンパ球の sIg では、IgM から他のクラスの Ig への転換 (スイッチ) が始まると考えられる。

文 献

- 1) AITKEN, R. M., W. J. PENHALE and R. R. A. COOMBS: *Int. Arch. Allergy* **43**, 469-480 (1972)
- 2) ALBINI, B. and G. WICK: *Int. Arch. Allergy* **44**, 804-822 (1973)
- 3) ALBINI, B. and G. WICK: *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* **48**, 513-529 (1975)
- 4) BANKHURST, A. D., N. L. WARHER and J. SPRENT: *J. Exp. Med.* **134**, 1005-1015 (1971)
- 5) DENMAN, A. M., E. P. FRENKEL: *Immunology* **14**, 107-113 (1968)
- 6) 濱島義博, 京極方久: 螢光抗体法・免疫組織学 (第 3 版), 88-213, 医学書院, 東京 (1980)
- 7) HUDSON, L., N. THANTREY and I. M. ROITT: *Immunology* **28**, 151-159 (1975)
- 8) KINCADE, P. W. and M. D. COOPER: *J. Immunol.* **106**, 371-382 (1971)
- 9) 近藤康博, 田辺 昭, 鳥海 徹: 岡山大学農学部学術報告 **62**, 19-23 (1983)
- 10) 国安主税: 家畜衛生に必要な免疫の概念と術式 (第 5 版), 88-96, 日本獣医師会, 東京 (1980)
- 11) MCARTHUR, W. P., J. CHAPMAN and G. J. THORBECKE: *J. Exp. Med.* **134**, 1036-1045 (1971)
- 12) POTWOROWSKI, E. F.: *Immunology* **23**, 199-204 (1972)
- 13) RABELLINO, E. and H. M. GREY: *J. Immunol.* **106**, 1418-1420 (1971)
- 14) RABELLINO, E. and S. COLON, H. M. GREY and E. R. UNANUE: *J. Exp. Med.* **133**, 156-167 (1971)
- 15) TOBEN, H. R. and R. L. St. PIERRE: *Int. Arch. Allergy* **42**, 454-465 (1972)
- 16) WICK, G., B. ALBINI and W. JOHNSON: *Immunology* **28**, 305-313 (1975)