

《研究論文》

採卵鶏の産卵期における鰓後腺の形態変化の経時的観察

北島克好¹・上塚浩司²・中島弘美²

¹ 東京農工大学大学院連合農学研究科 (茨城大学), 稲敷郡阿見町中央 3-21-1 300-0393

² 茨城大学農学部, 稲敷郡阿見町中央 3-21-1 300-0393

採卵鶏の産卵期を通して、鰓後腺の形態学的変化を経時的に観察した報告は少なく、特に鰓後腺実質領域に占めるカルシトニン (CT) 陽性細胞の加齢による数的変化の詳細は明らかではない。本研究では、ジュリアライト雌を使用し、初産卵鶏、産卵ピーク鶏、誘導換羽前鶏および廃鶏の産卵 4 期と幼雛の鰓後腺について組織学および免疫組織化学的に観察した。同時に、臓器に併せて血液を採材し、血清 CT およびカルシウム (Ca) 濃度を測定した。鰓後腺を組織学的に観察した結果、初産卵鶏では他の産卵期や幼雛と比較して鰓後腺実質の腺上皮細胞領域の拡大や小～中型囊胞の増加がみられた。その後、産卵週齢が進むにつれて鰓後腺実質の腺上皮細胞の領域は縮小し、間質に結合組織が増生するとともに、囊胞内腔に内容物を含む極大型囊胞や小～中型囊胞数が増加していた。鰓後腺実質の腺上皮細胞を免疫組織化学的に観察した結果、CT 陽性細胞率および PCNA 陽性細胞率は初産卵鶏で最も高く、誘導換羽前鶏から廃鶏へと産卵週齢が進むとともに減少した。鰓後腺と同時採材の血液の血清 Ca 濃度は初産卵鶏が最も高く、週齢が進むとともに緩やかに低下した。一方、血清 CT 濃度は初産卵鶏で高く、それ以降は低下して産卵ピーク鶏、誘導換羽前鶏から廃鶏までほぼ同じレベルであった。以上により、産卵期において、血清 CT 濃度は一定のレベルで維持されていたが、加齢とともに鰓後腺実質の腺上皮細胞領域が縮小して CT 細胞陽性率も低下していたことから、CT 陽性細胞数は減少していることがわかった。

キーワード：鰓後腺, カルシトニン, 産卵, 加齢

緒言

鳥類の鰓後腺は、カルシウム (Ca) 調節ホルモンであるカルシトニン (CT) を分泌する腺細胞を臓器の実質構成要素とする独立した内分泌器官である。ニワトリ (*Gallus domesticus*) の産卵期における CT は、初産卵の開始時やそれ以降の日々の産卵周期においてエストロジェンや上皮小体ホルモンと共に卵殻形成に関わる重要なホルモンと考えられている (Peterson, 1965; 菅原, 1984; 杉山, 2005; Bar, 2008; Dacke *et al.*, 2015)。ニワトリの産卵期において、鰓後腺実質の腺上皮細胞や囊胞内腔を覆う上皮細胞 (囊胞上皮細胞) の形態、囊胞の形状、囊胞内容物の性状および間質結合組織の組織形態像について多くの報告がある (Dudley, 1942; Michelucci, 1961; Hodge, 1970; Isler, 1973; Kameda, 1984a, 2015; Kameda *et al.*, 1988)。しかし、産卵期の初産卵鶏から廃鶏までを通した鰓後腺の組織像を調査した報告は少なく、その知見に乏しい。

産卵期の血中 CT 濃度については、ウズラ (*Contunix japonica*) で幼雛から成熟後までを経時的に測定し性成熟前に一過性の上昇

がみられたとの報告がある (Boelkings and Kenny, 1973; Dacke *et al.*, 1973)。ニワトリでは、血中イオン化 Ca 濃度の上昇が鰓後腺からの CT 分泌の引き金になること (杉山, 2005) や、血漿 CT レベルと食事の Ca 摂取量とは正の相関関係を示したとの報告がある (Dacke *et al.*, 2015)。しかし、ニワトリでは初産卵鶏から廃鶏まで鰓後腺の組織像に併せて血液を同時に採材して経時的に血中 CT 濃度を測定した報告は見当たらない。

そこで、採卵鶏の幼雛 (3~4 週齢) から初産卵鶏 (19~20 週齢)、産卵ピーク鶏 (27~28 週齢)、誘導換羽前鶏 (65 週齢) および廃鶏 (103~104 週齢) の異なる産卵 4 期について鰓後腺の組織像および実質の腺上皮細胞の CT 陽性細胞分布と血中 CT 濃度の変化を明らかにすることを目的とした。

材料・方法

1. 供試動物および動物実験

供試鶏には、白色レグホーン種 (ジュリアライト) の雌 24 羽を使用した。24 羽の内訳は以下のとおりである。幼雛は茨城大学敷地内のウインドレス鶏舎で飼育された 3~4 週齢の 4 羽を頸椎脱臼による安楽死後、鰓後腺を採材した。初産卵鶏は同大で飼育された 19 週齢の 2 羽および有限会社つくばファーム (茨城県石岡市) から分与された 20 週齢の 2 羽の計 4 羽について初産卵を確認し、鰓後腺と血液の採材を実施した。産卵ピーク鶏 27~28 週齢の 5 羽、誘導換羽前鶏 65 週齢の 5 羽および廃鶏 103~104 週齢の 6 羽は、同ファームから分与、導入 2 日目までに産卵を確認し、同様に採材した。鰓後腺の採材は、飼料給与 2 時間後に安

2022 年 6 月 8 日受付, 2022 年 9 月 16 日受理
連絡者: 北島克好
〒300-0393 稲敷郡阿見町 3 丁目 21 番 1 号
茨城大学農学部
Tel: 029-888-8520
Fax: 029-888-8545
E-mail: s223814s@st.go.tuat.ac.jp

楽死をして鰓後腺、上皮小体および甲状腺を総頸動脈に沿って一体として摘出した。その際、卵管内の卵形成の位置（卵位）と臓器異常の有無を肉眼で観察した。血液は、鰓後腺採材と同時に浅尺骨皮静脈から採血を行い、遠心分離後の血清を -25°C に保存し、測定時に融解をして使用した。導入後の産卵鶏の飼養管理は、市販成鶏用配合飼料（表示値：Ca2.8%以上）を朝7時（1回/日；120g/羽）に給与し、飲水は自由摂取、光線管理は自然日長とした。本研究における動物実験は、茨城大学実験動物委員会の承認を受けて実施した（承認番号17080, 18110）。

2. 組織形態学的分析

(1) 組織切片の作製

採材した鰓後腺は、室温にて10%中性緩衝ホルマリン液で5日間浸漬固定した。その後、組織標本は常法に従いパラフィン包埋後、 $5\sim 7\mu\text{m}$ で薄切した連続切片をスライドガラスに貼付け、一般染色および免疫組織化学染色（免疫染色）を実施した。

一般染色は、ヘマトキシリン・エオジン染色（Hematoxylin and Eosin：HE染色）およびマッソントリクローム染色（Masson Trichrome：MT染色）を行った。抗CTの免疫染色は、ヒストファイン SAB-PO(R)キット（ニチレイバイオサイエンス、東京）を使用し、一次抗体として抗ニワトリCTポリクローナル抗体（製品番号PAA689Ga01, CLOUD-CLONE CORP USA, USA）の300倍希釈溶液を 4°C で一晩反応させた。抗体希釈液（製品番号S0809, Dako North America Inc, USA）を陰性対照として一次抗体の代わりに使用した。鰓後腺実質の腺上皮細胞の増殖能をみるマーカーであるProliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)の免疫染色には、ヒストファイン SAB-PO(M)キット（ニチレイバイオサイエンス、東京）を使用し、一次抗体は抗PCNAモノクローナル抗体（製品番号M 0879, Dako Cytonation, Denmark）の250倍希釈溶液を 4°C で一晩反応させた。陰性対照は抗CT免疫染色と同様に実施した。二次抗体以降は使用説明書に従った。発色は、ヒストファイン DAB 基質キット（ニチレイバイオサイエンス、東京）で調整したDAB溶液を室温で10分間反応させた後、マイヤーのヘマトキシリン染色液で40秒間対比染色し、水洗、脱水透徹後に封入して光学顕微鏡で観察した。鰓後腺のCT陽性細胞は細胞質が、PCNA陽性細胞は核が茶褐色に染色された細胞を陽性細胞として判定した（図1）。

(2) 鰓後腺の組織形態学的観察

鰓後腺は実質の腺上皮細胞、嚢胞、嚢胞上皮細胞および支持組織の間質について観察した。嚢胞内腔径のサイズおよび間質領域の面積の測定は、顕微鏡用デジタルマイクロスコープ（Moticam 3, 株式会社島津理化、東京）を装着した光学顕微鏡（BX50, オリパス株式会社、東京）および画像解析ソフト（Motic Images Plus 2.1S, 株式会社島津理化、東京）を用いて計測した。嚢胞内腔径のサイズ別分類については、Mchelucci (1961) およびHodges (1970) を参考にした。本研究では、初産卵鶏、誘導換羽前鶏および産卵鶏の各1羽から計38個（12個/羽以上）の嚢胞内腔径の長軸径と短軸径の最大長を計測した結果にもとづき移動平均法で全例の50%が入る範囲（長軸 $100\mu\text{m}$ 、短軸 $30\mu\text{m}$ ）を中型として、その前後を4段階（小型： $<30\mu\text{m}$ 、中型： $30\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 、大型： $100\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ 、極大型： $>300\mu\text{m}$ ）に設定

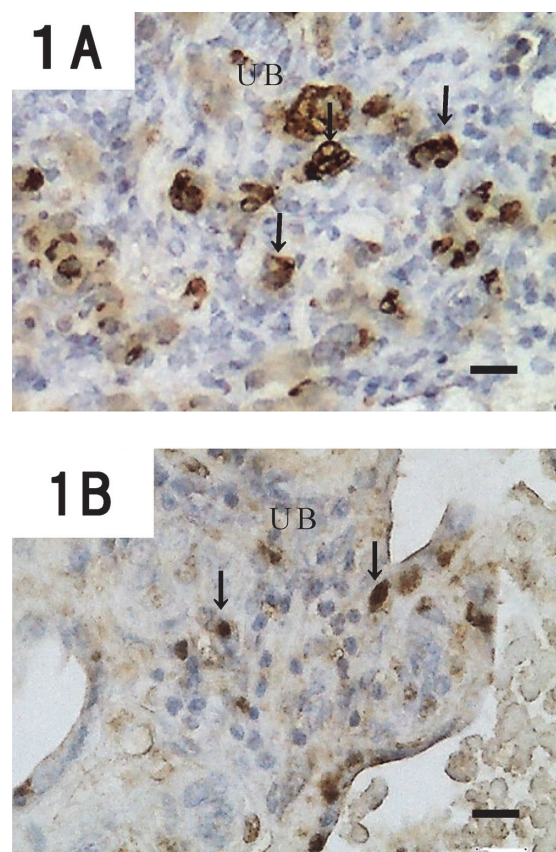


図1. 鰓後腺の抗CTおよびPCNA免疫染色の陽性細胞。抗CT免疫染色（1A）、抗PCNA免疫染色（1B）。Bar= $10\mu\text{m}$ （1A, 1B）。1A, 1B：初産卵鶏19週齢。鰓後腺実質の腺上皮細胞でCT陽性細胞は細胞質（1A 矢印）およびPCNA陽性細胞は核（1B 矢印）が茶褐色に染色された。

して産卵4期でサイズ別型に分類した割合で比較した。嚢胞の形状について、多くは間質結合組織間に独立して歪んだ円形もしくは楕円状を示すが、集簇した嚢胞や不定形な形状については隣接する嚢胞と間質結合組織で区分されているかを基準として最大長の内腔径を測定した。産卵4期のサイズ別分類の割合は群全体の総個数をサイズ別数で除して算出しパーセントで表示した。

(3) 鰓後腺の免疫染色による陽性細胞率の算出

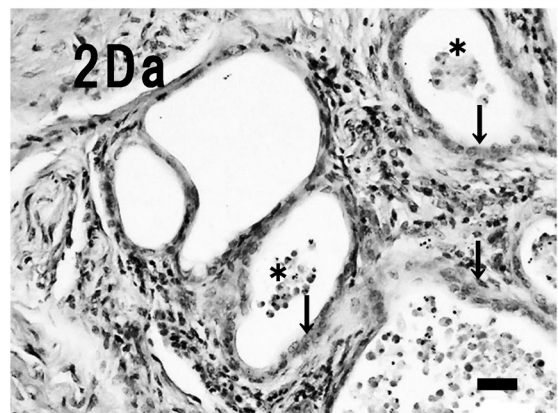
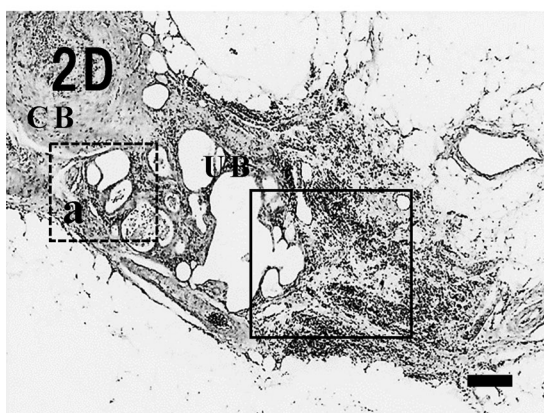
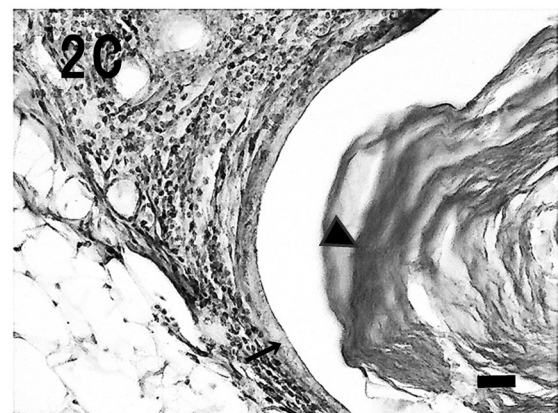
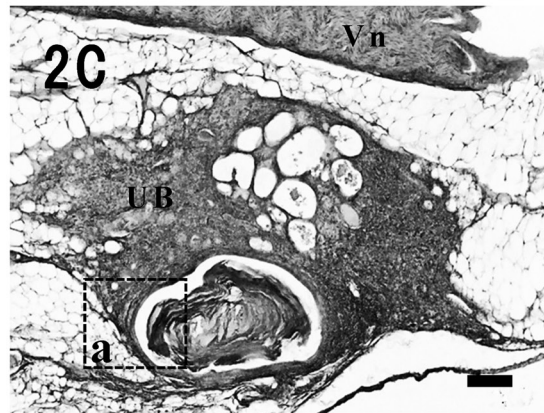
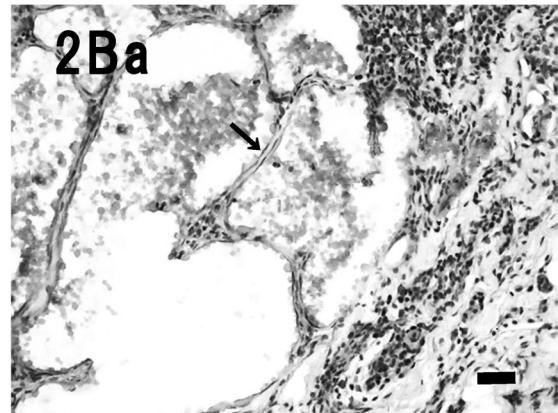
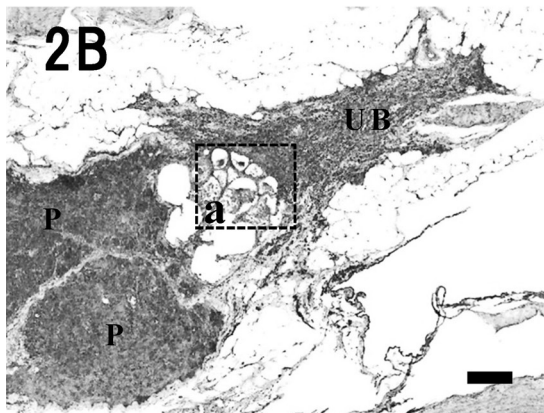
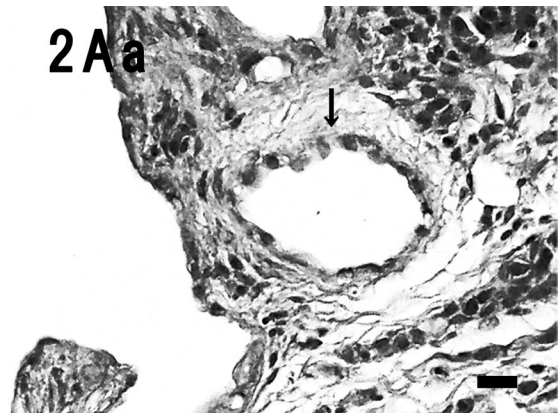
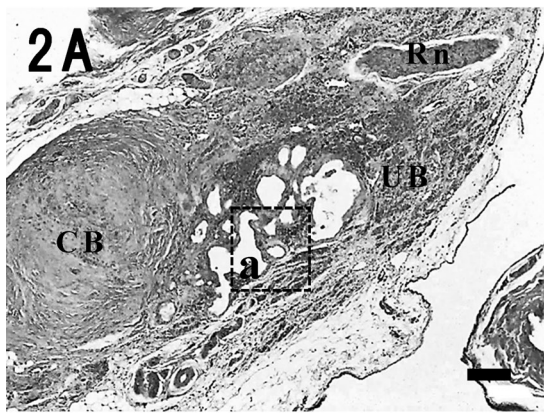
CTおよびPCNAの陽性細胞率は、光学顕微鏡（倍率200倍）で鰓後腺実質の腺上皮細胞を数えた1,000個に対して、CTおよびPCNA陽性細胞数を1,000で除してパーセントで表示した。

(4) 鰓後腺の間質および実質領域面積の測定と占有率

間質領域面積は、鰓後腺 $100,000\mu\text{m}^2$ （嚢胞内腔、上皮小体、動脈小体、リンパ球を除く）に対して、MT染色で青色に染色された部分の面積を間質領域面積として計測し、 $100,000\mu\text{m}^2$ で除して間質領域占有率（%）を算出した。実質領域面積は、 $100,000\mu\text{m}^2$ から間質領域面積およびその除外部分を除いた面積として計測し、 $100,000\mu\text{m}^2$ で除して実質領域占有率を算出した。

(5) 鰓後腺のCT陽性細胞領域が実質領域に占める割合

CT陽性細胞の分布する領域が鰓後腺実質領域に占める割合の



増減を比較するため、上記の3) CT細胞陽性率に実質領域占有率を乗じて算出した。

3. 血清 Ca 濃度の測定

ホスフォリパーゼ D (PLD) を用いた酵素法 (アキュラスオート Ca II, 株式会社シノテスト, 東京) にて日立 7180 型自動分析装置で血清のカルシウム濃度を測定した (オリエンタル酵母工業 (株) 生物化学研究所長浜ライフサイエンスラボラトリー)。

4. 血清 CT 濃度の測定

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法 (製品番号 CSB-E12014Ch, Chicken Calcitonin(CT) ELISA Kit, Wuhan Huamei Biotech Co., Ltd (Former Cusabio LLC), China) にてマイクロプレートリーダー (Flex Station 3 Molecular Devices, San Jose, USA) で血清 CT 濃度を測定した。

5. 統計処理

統計処理した値は平均値±標準偏差を表し、分析には Tukey HSD 検定を IBM SPSS Statistics version 24 (IBM 社, 米国) を用いて実施した。それぞれの P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

結 果

1. 卵管内における卵位の肉眼観察

臓器採材時の肉眼観察では、卵管およびその他の臓器に異常は認められなかった。卵管内の卵位について、卵白分泌部では初産卵鶏 4 羽中 2 羽 (以下 2/4 羽と表記)、産卵ピーク鶏で 2/4 羽、誘導換羽前鶏 2/4 羽、産卵ピーク鶏で 3/4 羽であった。同じく、卵殻形成部では初産卵鶏 2/4 羽、産卵ピーク鶏で 1/4 羽、誘導換羽前鶏で 0/4 羽、産卵ピーク鶏で 1/4 羽であった。

2. 鰓後腺の組織形態学的観察

(1) 囊胞内腔を覆う上皮細胞の形状

幼雛、初産卵鶏および産卵ピーク鶏における多くの囊胞上皮細胞は扁平上皮で構成されていたが、一部立方上皮細胞もみられた (図 2A, 2Aa, 2D, 2Da)。産卵ピーク鶏、誘導換羽前鶏および産卵ピーク鶏の大型囊胞において、内腔全体を覆う囊胞壁から内腔中心に向けて樹枝状に伸びた囊胞壁は扁平な上皮細胞で覆われていた (図 2B, 2Ba)。誘導換羽前鶏の極大型囊胞の内腔は扁平な上皮細胞で覆われ、囊胞内にはコロイド様の内容物を包含していた (図 2C, 2Ca)。産卵ピーク鶏では、大型囊胞に隣接した小～中型囊胞で内腔を覆

う扁平な上皮細胞の一部は立方状に変化し、囊胞の内腔には顆粒状物や脱落細胞等を含む内容物の塊が観察された (図 2D, 2Da)。

(2) 鰓後腺の囊胞の個数と内腔径のサイズ別分類

幼雛では、囊胞の平均個数は 3.3 ± 0.5 個/羽で最も少なく、サイズは大型が 38.4% で最も多かった。初産卵鶏では、平均個数は 6.0 ± 5.0 個/羽で、サイズは小～中型が増加して 87.5% を占めた。産卵ピーク鶏では、平均個数 4.5 ± 4.5 個/羽で個体差が大きかった。サイズは中型が増加し 55.5% で最も高かった。誘導換羽前鶏では、平均個数は 5.0 ± 2.7 個/羽で、囊胞内腔にコロイド様内容物を含む極大型と小～中型囊胞の集簇が観察された (図 2C)。産卵ピーク鶏では、平均個数は 6.4 ± 5.4 個/羽で個体間の差が最も大きく、サイズは大型～極大型が増加し 24.0% を占めた (表 1)。

(3) 鰓後腺に占める間質領域の割合

幼雛および産卵 4 期における鰓後腺 $100,000 \mu\text{m}^2$ に占める間質領域面積を比較すると、幼雛が $3.3 \pm 2.6\%$ で最も少なかった。初産卵鶏の間質は囊胞を含む実質の腺上皮細胞を MT 染色で青く染色される結合組織によって支持される明瞭な組織に発達し、 $15.6 \pm 2.5\%$ であった。誘導換羽前鶏から産卵ピーク鶏では、間質結合組織がさらに増生して臓器全体に占める間質の部分が大きく拡大して産卵ピーク鶏が $36.3 \pm 7.2\%$ で最も高く、他の鶏との間に有意 ($P < 0.05$) な差が認められた (表 2)。

3. 鰓後腺の CT および PCNA 陽性細胞の免疫組織化学的観察

実質の腺上皮細胞の CT 陽性細胞について、幼雛では鰓後腺全体に分布してみられた (図 3A, 3Aa)。初産卵鶏では臓器辺縁から中～小型囊胞を取囲む様に集簇していた (図 3B, 3Ba)。産卵ピーク鶏以降では実質の腺上皮細胞領域が縮小して CT 陽性細胞率も減少していた (図 3C, 3Ca, 3D, 3Da, 3E, 3Ea)。実質の腺上皮細胞の PCNA 陽性細胞は、連続切片で CT 陽性細胞が分布する領域とはほぼ重なって観察された (図 4A, 4B)。

4. 鰓後腺実質の腺上皮細胞の CT および PCNA 陽性細胞率

鰓後腺の CT 陽性細胞率では、幼雛の $27.9 \pm 7.1\%$ から初産卵鶏の $38.7 \pm 4.5\%$ まで高くなった。それ以降では、産卵ピーク鶏 $31.5 \pm 7.7\%$ 、誘導換羽前鶏 $26.1 \pm 5.0\%$ および産卵ピーク鶏 $20.8 \pm 6.8\%$ で産卵期の週齢が進むと陽性率は低下する傾向を示し、初産卵鶏と産卵ピーク鶏の間に有意 ($P < 0.05$) な差が認められた。PCNA 陽性細胞率では、幼雛は $27.5 \pm 2.4\%$ で、初産卵鶏 $28.5 \pm 6.1\%$ 、産卵ピーク鶏 $26.2 \pm 6.9\%$ 、誘導換羽前鶏 $21.8 \pm 9.1\%$ 、産卵ピーク鶏 $14.6 \pm 5.1\%$ で

図 2. 産卵 4 期の鰓後腺囊胞の組織形態

HE 染色。UB: 鰓後腺。P: 上皮小体。CB: 頸動脈小体。Vn: 迷走神経。Rn: 反回神経。Bar=100 μm (2A, 2B, 2C, 2D)。Bar=20 μm (2Aa, 2Ba, 2Ca, 2Da)。2A, 2Aa: 初産卵鶏 19 週齢 (鰓後腺右側)。2B, 2Ba: 産卵ピーク鶏 27 週齢 (鰓後腺右側)。2C, 2Ca: 誘導換羽前鶏 65 週齢 (鰓後腺左側)。2D, 2Da: 産卵ピーク鶏 103 週齢 (鰓後腺左側)。

2A: 初産卵鶏の中型囊胞 (内腔径 30~100 μm)。2Aa: 初産卵鶏の囊胞内腔を覆った立方状の囊胞上皮細胞 (矢印) (2A 黒破線囲みの拡大)。2B: 産卵ピーク鶏の大型囊胞 (内腔径 > 100 μm)。2Ba: 扁平な囊胞上皮細胞で内腔が覆われた囊胞 (2B 黒破線囲みの拡大)。扁平な上皮細胞からなる囊胞壁から内腔中心に向けて枝状に伸びた囊胞壁 (矢印)。2C: 誘導換羽前鶏では極大型の囊胞と隣接して多数の小～中型囊胞が集簇。2Ca: 極大型囊胞 (内腔径 > 300 μm) 内腔を覆う扁平な囊胞上皮細胞 (矢印) および囊胞内にコロイド様内容物 (黒矢頭) (2C 黒破線囲みの拡大)。2D: 腺細胞間に結合組織が増生して間質が拡大 (黒実線囲み)。2Da: 囊胞内腔に内容物 (*印) を含む小～中型囊胞 (内腔径 10~100 μm) と囊胞上皮細胞の一部が立方状に変化 (矢印) (2D 黒破線囲みの拡大)。

初産卵鶏では、中型囊胞の数が増し、産卵ピーク鶏では大型囊胞が、誘導換羽前鶏では極大型囊胞が観察された。産卵ピーク鶏では実質の腺上皮細胞間に結合組織が増生して間質領域が拡大し、小～中型の囊胞では立方状に変化した囊胞上皮細胞がみられた。

表 1. 鰓後腺の囊胞内径のサイズ別分類と構成割合

区分	週齢	平均 個数	囊胞内径サイズ別の割合				囊胞合 計総数
			小型 ($<30\mu\text{m}$)	中型 ($30\text{--}100\mu\text{m}$)	大型 ($100\text{--}300\mu\text{m}$)	極大型 ($>300\mu\text{m}$)	
幼 雛	3-4	3.3±0.5	4 ¹⁾ 30.8% ³⁾	4 30.8%	5 38.4%	0 0.0%	13 ²⁾ 100.0%
初産卵鶏	19-20	6.0±5.0	12 50.0%	9 37.5%	3 12.5%	0 0.0%	24 100.0%
産卵ピーク鶏	27-28	4.5±4.5	7 39.0%	10 55.5%	1 5.5%	0 0.0%	18 100.0%
誘導換羽前鶏	65	5.0±2.7	12 60.0%	6 30.0%	0 0.0%	2 10.0%	20 100.0%
廃 鶏	103-104	6.4±5.4	11 44.0%	8 32.0%	5 20.0%	1 4.0%	25 100.0%

平均値±標準偏差 (n=4)。

1) 鶏群内鰓後腺の囊胞内径サイズ別の個体数の合計：a。

2) 鶏群内鰓後腺の囊胞内径サイズ別の個体数合計の総数：b。

3) 鶏群内鰓後腺の囊胞内径サイズ別の割合 (%)：a/b×100。

表 2. 鰓後腺に占める間質領域の割合

区分	週齢	間質領域 (%) ¹⁾
幼 雛	3-4	3.3±2.6 ²⁾
初産卵鶏	19-20	15.6±2.5 ^b
産卵ピーク鶏	27-28	14.4±2.0 ^{ab}
誘導換羽鶏	65	21.7±6.8 ^{ab}
廃 鶏	103-104	36.3±7.2 ^a

平均値±標準偏差 (n=4)。

1) 鰓後腺 100,000 μm^2 (囊胞内腔, 上皮小体, 頸動脈小体, 胸腺細胞集族群を除く) に占める間質領域面積の割合 % を示す。

2) ^{abc} 異符号間に有意差有り。P<0.05

週齢が進むと陽性率は低くなった (表 3)。

5. 鰓後腺実質領域に占める CT 陽性細胞分布領域の割合

CT 陽性細胞の分布する部分が鰓後腺実質領域の占める割合を算出した結果, 初産卵鶏が 32.6±3.2% で最も高く, 週齢が進むと割合は低下して, 初産卵鶏と廃鶏 13.5±5.2% の間に有意 (P<0.05) な差が認められた (表 4)。

6. 血清 Ca 濃度の測定値

産卵 4 期では, 血清 Ca 濃度は初産卵鶏が最も高く 30.6±5.6 mg/dl であった。それ以降では, 産卵ピーク鶏 26.2±1.9 mg/dl, 誘導換羽前鶏 25.4±6.4 mg/dl および廃鶏 23.1±5.2 mg/dl で週齢が進むにつれて低くなる傾向を示した (表 5)。

7. 血清 CT 濃度の測定値

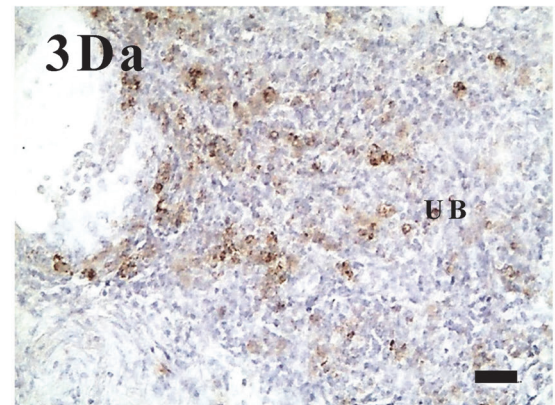
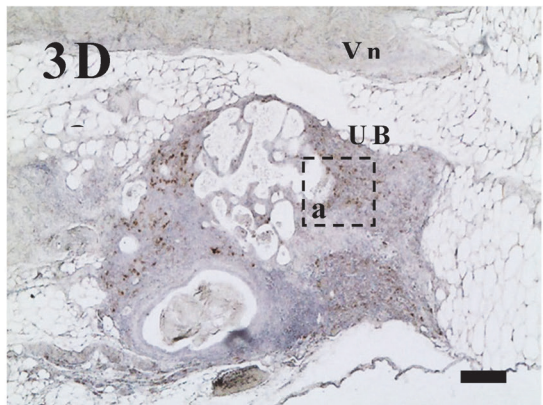
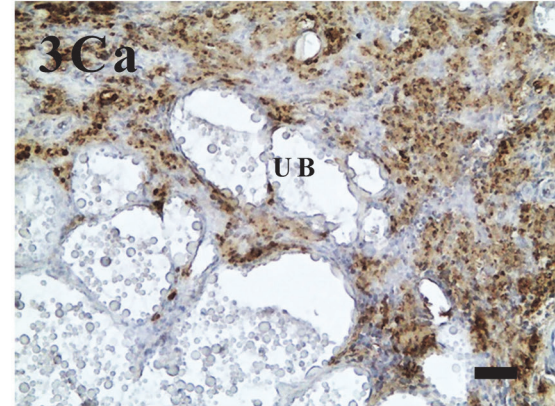
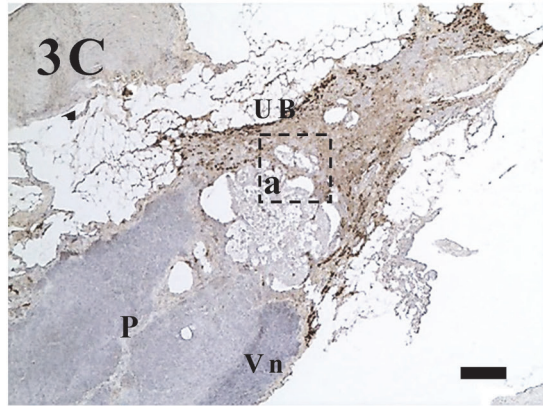
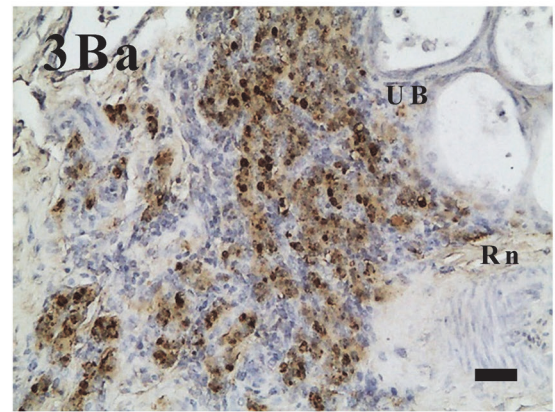
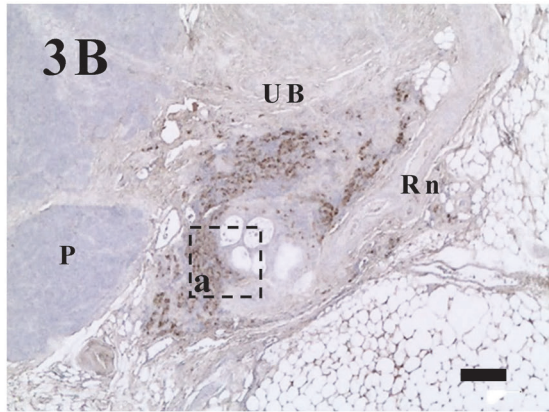
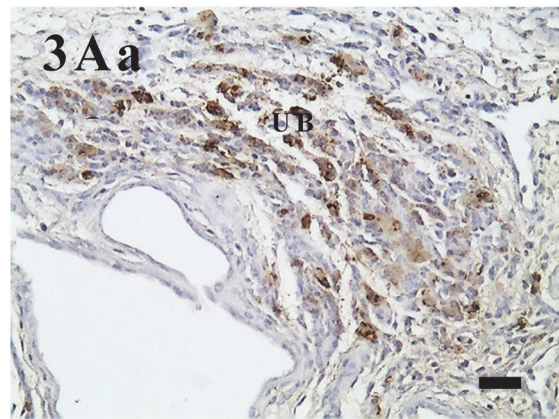
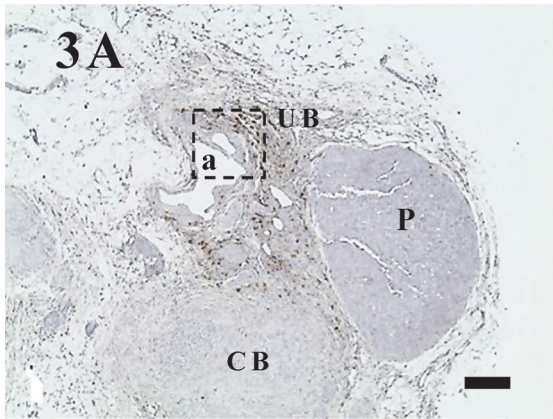
産卵 4 期では, 血清 CT 濃度は初産卵鶏が最も高く 183.7±40.1 pg/ml であった。それ以降では, 産卵ピーク鶏 155.8±32.0 pg/ml, 誘導換羽前鶏 166.0±23.5 pg/ml および廃鶏 166.3±24.3 pg/ml で初産卵鶏より低い値を示したが, 有意な差はなかった (表 5)。

考 察

本研究では, 採卵鶏の初産卵鶏から廃鶏に至る産卵 4 期と幼雛の鰓後腺について実質の腺上皮細胞, 囊胞および間質の組織像を観察し, 併せて血清 Ca および CT 濃度を測定した。鰓後腺の加齢による組織の変化は, 鰓後腺実質領域の CT 陽性細胞の減少と結合組織の増生による間質領域の拡大が観察された。血清 CT 濃度は初産卵鶏で最も高く, それ以降の経過の鶏ではほぼ同じレベルを示した。

鰓後腺実質の腺上皮細胞における CT 分泌に関して, 爬虫類と鳥類 (Sehe, 1965), および産卵鶏 (Hodges, 1970) でそれぞれ鰓後腺が分泌機能を有するとの報告がある。その分泌物について, ニワトリでカルシトニンと特定され (Coop *et al.*, 1967), さらに産卵鶏で腺上皮細胞が CT 産生細胞である (Isler, 1973) と報告された。また, CT 陽性細胞数の単位面積当たり割合は年齢 (採卵鶏の孵化~6ヶ月齢) とともに減少するとの報告がある (Kameda, 1984a, b)。本調査では, 鰓後腺の CT 陽性細胞率は初産卵鶏で最も高く, 産卵ピーク鶏では減少し, 廃鶏では初産卵鶏の半分程度に減少した。また, 細胞の増殖性マーカーである PCNA の陽性細胞率は初産卵鶏から廃鶏までに半減しており, 増殖活性が高い実質の腺上皮細胞数が減少していたと考えられる。さらに, 鰓後腺の実質領域に占める CT 陽性細胞の分布域の割合も減少していたことから, 加齢により CT 陽性細胞数は減少していることがわかった。

鰓後腺の囊胞上皮細胞は, 通常, 扁平もしくは立方単層上皮細胞で内腔を覆っているとの報告がある (Dudley, 1942)。一方, 単層もしくは重層状の低い円柱状上皮 (Michelucci, 1961), 扁平層状や多列状型もみられたとの報告もある (Chan, 1978; Kameda, 1984a)。本研究では, 初産卵鶏と廃鶏の小~中型囊胞において, 囊胞内腔を覆う扁平な上皮細胞の一部あるいは全周がほぼ立方状に変化していた。このことは, 本研究に使用した廃鶏



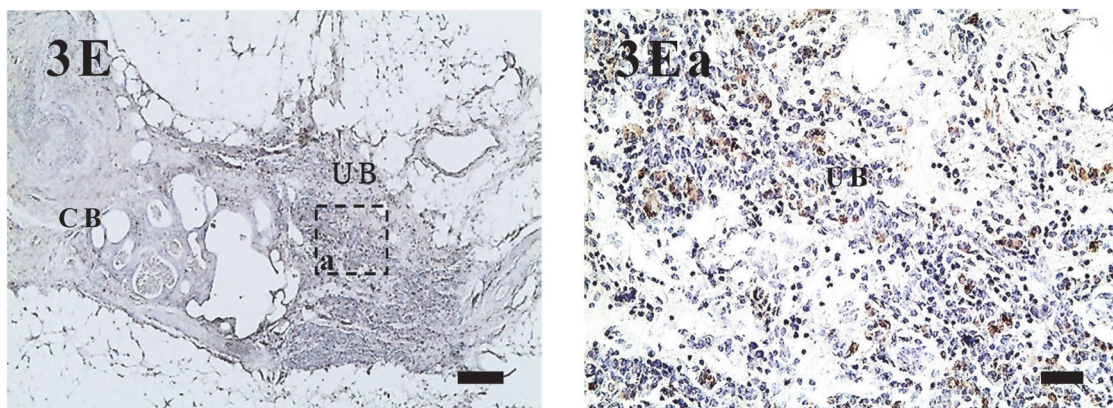


図 3. 幼雛および産卵 4 期の鰓後腺の CT 陽性細胞の分布領域
 抗 CT 免疫染色。UB：鰓後腺。P：上皮小体。CB：動脈小体。Vn：迷走神経。Rn：反回神経。Bar=100 μ m (3A, 3B, 3C, 3D, 3E) Bar=50 μ m (3Aa, 3Ba, 3Ca, 3Da, 3Ea)
 3A：幼雛 3 週齢（鰓後腺右側）。3B：初産卵鶏 19 週齢（鰓後腺左側）。3C：産卵ピーク鶏 27 週齢（鰓後腺右側）。3D：誘導換羽前鶏 65 週齢（鰓後腺左側）。3E：産卵 103 週齢（鰓後腺左側）。
 3A, 3Aa (3A 黒破線囲み拡大図, CT 陽性細胞率 22.4%, 実質領域の CT 陽性細胞分布領域の割合 21.9%)：幼雛の CT 陽性細胞は鰓後腺全領域にやや散在して存在。3B, 3Ba (3B 黒破線囲み拡大図, CT 陽性細胞率 37.7%, 実質領域の CT 陽性細胞分布領域の割合 32.8%)：初産卵鶏の CT 陽性細胞は嚢胞周囲を中心に集簇して拡大。3C, 3Ca (3C 黒破線囲み拡大図, CT 陽性細胞率 30.7%, 実質領域の CT 陽性細胞分布領域の割合 25.5%)：産卵ピーク鶏の CT 陽性細胞は鰓後腺全域に密に存在。3D, 3Da (3D 黒破線囲み拡大図, CT 陽性細胞率 17.7%, 実質領域の CT 陽性細胞分布領域の割合 13.6%), 3E, 3Ea (3E 黒破線囲み拡大図, CT 陽性細胞率 10.7%, 実質領域の CT 陽性細胞分布領域の割合 6.7%)：誘導換羽前鶏および産卵 103 週齢では、実質内の CT 陽性細胞が分布する領域は縮小。
 鰓後腺実質領域に分布する CT 陽性細胞の占める割合は、初産卵鶏が最も高く、産卵期の週齢が進むとその割合は低下し産卵 103 週齢が最も低かった。

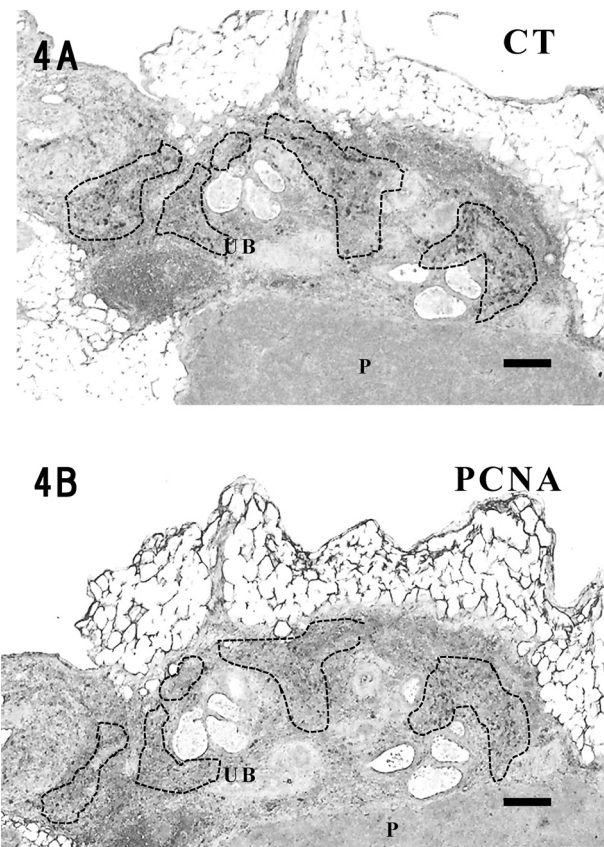


図 4. 鰓後腺の CT 陽性細胞と PCNA 陽性細胞の分布領域
 UB：鰓後腺。P：上皮小体。4A：抗 CT 免疫染色。
 4B：抗 PCNA 免疫染色。Bar=100 μ m。
 4A, 4B：誘導換羽前鶏 65 週齢（鰓後腺左側）連続切片。
 4A：CT 陽性細胞が分布する領域（黒破線内）。4B：PCNA 陽性細胞が分布する領域（黒破線内）。
 連続切片で抗 CT および抗 PCNA 免疫染色を実施し、両方の陽性細胞の分布する領域は重なる部分が多い。

とほぼ同年齢かそれ以上の成鶏では新たに活動的な嚢胞 (Dudley, 1942) や多数の活発な嚢胞 (Hodges, 1970) を持っているとの報告から、本研究の初産卵鶏で観察された立方状に変化した嚢胞上皮細胞は生理的に活動的な細胞であり、産卵期でも見られた立方状の変化は生理的に機能低下したかもしれない嚢胞の機能を補う変化ではないかと推測される。

鰓後腺嚢胞のサイズおよび数について、嚢胞は通常すべての年齢で発達の様々な程度で発見されるとの報告 (Dudley, 1942) や、年齢とともに減少する傾向にあるとの報告 (Michelucci, 1961) がある。一方で、若い鶏の成熟後に嚢胞数は増加するとの報告 (Hodges, 1970) や、成熟に伴って鰓後腺が拡大すると、嚢胞は徐々に体積および数を増加させ、疎性結合組織の増加もあるとの報告がある (Kameda, 1984a, b)。しかし、嚢胞数の変化について具体的な数字は示されていない。本研究では、嚢胞内径を計測してサイズ別に分類を行ったが、個体差が大きく具体的な傾向を

表 3. 鰓後腺実質の腺上皮細胞の CT および PCNA 陽性率

	週齢	CT 陽性細胞率%	PCNA 陽性細胞率%
幼 雛	3-4	27.9±7.1 ^{ab 1)}	27.5±2.4*
初産卵鶏	19-22	38.7±4.5 ^a	28.5±6.1
産卵ピーク鶏	28-29	31.5±7.7 ^{ab}	26.2±6.9
誘導換羽前鶏	65	26.1±5.0 ^{ab}	21.8±9.1
廃 鶏	103-104	20.8±6.8 ^b	14.9±5.1

平均値±標準偏差 (n=4, * : n=3)。

1) ^{ab} 異符号間で有意差あり。P<0.05

表 4. 鰓後腺実質領域に占める CT 陽性細胞分布領域の割合

区分	週齢	A : 実質領域 (%)	B : CT 陽性細胞率 (%)	C : 実質内の CT 陽性細胞 ¹⁾ 分布領域の割合 (%)
幼 雛	3-4	96.7±2.2	27.9±7.1	26.9±6.6 ^{ab 2)}
初産卵鶏	19-20	84.4±2.1	38.7±4.5	32.6±3.2 ^a
産卵ピーク鶏	27-28	85.8±1.7	31.5±7.7	26.8±6.4 ^{ab}
誘導換羽前鶏	65	78.3±5.9	26.1±5.0	20.5±4.8 ^{ab}
廃 鶏	103-104	63.7±6.3	20.8±6.8	13.5±5.2 ^b

平均値±標準偏差 (n=4)。

1) 鰓後腺 100,000 μm^2 (嚢胞内腔, 上皮小体, 頸動脈小体, 神経束, リンパ球集簇群を除く) から間質面積を除いた面積を実質面積とした占有率に CT 陽性率を乗じた数を CT 陽性細胞分布領域の割合 (C=A×B/100) とした。

2) ^{ab} 異符号間に有意差があることを示す。P<0.05

表 5. 血清 Ca 濃度と血清 CT 濃度

	週齢	血中 Ca 濃度 mg/dl	血中 CT 濃度 pg/ml
幼 雛	3-4	NT ¹⁾	NT
初産卵鶏	19-22	30.6±5.6	183.7±40.1
産卵ピーク鶏	28-29	26.2±1.9	155.8±32.0
誘導換羽前鶏	65	25.4±6.4	166.0±23.5
廃 鶏	103-104	23.1±5.2	166.3±24.3

平均値±標準偏差 (n=4)。

1) NT は, 非検査。

数字で示すことはできなかった。しかし, 誘導換羽前鶏には極大型嚢胞が, 廃鶏には嚢胞上皮細胞の変化や内腔に種々の内容物を含む小~中型嚢胞がみられたことは週齢が進んだ産卵期に特徴的な変化の一つとして考えられる。

鰓後腺の間質について, ニワトリでは孵化後に成熟するにつれて結合組織は増加するとの報告がある (Hodges, 1970; Kameda, 1984a, b)。本研究では, MT 染色による鰓後腺の間質結合組織領域の割合で幼雛の 3.3±2.6% から廃鶏の 36.3±7.2% までと加齢とともに結合組織が増生して間質の割合が増加する変化がみられ, これまでの報告を裏付けるものであった。

ニワトリの血中 Ca および CT 濃度と鰓後腺の CT 分泌の関係

について, 哺乳類と同様に血中イオン化 Ca の上昇が引き金となって鰓後腺からの CT 分泌が促進するとの報告 (杉山, 2005) や, ウズラの血中 CT 濃度では性成熟直前に急激な一過性の上昇を示したとの報告 (Dacke *et al.*, 1976) がある。本研究では, 初産卵鶏の血清 CT 濃度が最も高い値を示したことからニワトリにおいてもウズラと同様に雌鶏として性成熟および産卵にともなう変化と捉えることができる。産卵鶏の産卵周期に伴う血中 CT 濃度は, 排卵後の卵管内の卵位が卵殻分泌部期間よりも卵白分泌部期間の方が有意に高いとの報告がある (Parsons and Combs, 1981)。一方で, 食事の栄養レベルと給与方法の影響を調査したところ, 産卵周期中の血中 CT 濃度は Ca や副甲状腺ホルモン等

と異なり濃度変化が少なかったとの報告もある (Ren *et al.*, 2019)。ニワトリの血漿 CT レベルは食事時の Ca 摂取量と正の相関を持ち、従って循環 Ca レベルに相関するとしている (Dacke *et al.*, 2015)。このことから、本研究においては、血清 Ca 濃度は飼料摂取後の影響が大きいと考えて、給餌 2 時間後に鰓後腺と血液の採材を実施した。加齢による鰓後腺の CT 分泌と循環する血中の CT との相互関係を明らかにすることは今後の研究課題である。

採卵鶏の初産卵鶏から産卵 4 期を通して給餌 2 時間後の鰓後腺について組織学および免疫組織化学的に観察した。加齢とともに鰓後腺の間質領域は拡大し、多様な形態の嚢胞がみられた。一方、鰓後腺採材時の血清 CT 濃度は一定のレベルで維持されていたが、実質腺上皮細胞領域は縮小して CT 陽性細胞率も低下した。よって、鰓後腺実質腺上皮細胞の CT 陽性細胞数は加齢に伴う減少とみられる。

引用文献

- Bar A. Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds in strongly calcifying laying birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 151 : 477-490. 2008.
- Boelkins JN and Kenny AD. Plasma calcitonin levels in Japanese quail. *Endocrinology*, 92 : 1754-1760. 1973.
- Chan AS. Ultrastructure of the ultimobranchial follicles of the laying chicken. *Cell and Tissue Research*, 195 : 309-316. 1978.
- Copp DH, Cockcroft DW and Kueh Y. Calcitonin from ultimobranchial glands of dogfish and chickens. *Science*, 158 : 924-925. 1967.
- Dacke CG, Furr BJ, Boelkins JN and Kenny AD. Plasma calcitonin and gonadal hormones in Japanese quail. *Journal of Endocrinology*, 58 : 13-14. 1973.
- Dacke CG, Furr BJ, Boelkins JN and Kenny AD. Sexually related changes in plasma calcitonin levels in Japanese quail. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 55 : 341-344. 1976.
- Dacke CG, Sugiyama T and Gay CV. The role of hormones in the regulation of bone turnover and eggshell calcification. In: *Sturkie's Avian Physiology Sixth Edition* (Scanes G ed.) 549-574. ELISEVER. London. 2015.
- Dudley J. The development of the ultimobranchial body of the fowl, *Gallus domesticus*. *The American Journal of Anatomy*, 71 : 65-89. 1942.
- Hodges RD. The structure of the fowl's ultimobranchial gland. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 10 : 255-279. 1970.
- Isler H. Fine structure of the ultimobranchial body of the chick. *The Anatomical Record*, 177 : 441-459. 1973.
- Kameda Y. Immunohistochemical Study of cyst structures in chick ultimobranchial gland. *Archive histologicum Japonicum*, 47 : 411-419. 1984a.
- Kameda Y. Ontogeny of chicken ultimobranchial glands studied by an immunoperoxidase method using calcitonin, somatostatin and 19S-thyroglobulin antisera. *Anatomy and Embryology*, 170 : 139-144. 1984b.
- Kameda Y, Okamoto K, Ito M and Tagawa. Innervation of the C cell of chicken ultimobranchial glands studied by immunohistochemistry, fluorescence microscopy and electron microscopy. *The American Journal of Anatomy*, 82 : 353-368. 1988.
- Kameda Y. Morphological and molecular evolution of the ultimobranchial gland of nonmammalian vertebrates, with special reference to the chicken C cells. *Developmental Dynamics*, 246 : 719-739. 2015.
- Michelucci S. Ricerche morfologiche e sperimentali sul corpo ultimobranchiale negli Ucelli (*Gallus domesticus*). *Folia Endocrinologica*, 14 : 865-883. 1961.
- Parsons AH and Combs GF Jr. Blood ionized calcium cycle in the chicken. *Poultry Science*, 60 : 1520-1524. 1981.
- Peterson CF. Factors influencing egg shell quality. *World's Poultry Science Journal*, 21 : 110-138. 1965.
- Ren Z, Sun W, Liu Y, Han D, Cheng X and Yan J. Dynamics of serum phosphorus, calcium, and hormones during egg laying cycle in Hy-Line Brown laying hens. *Poultry Science*, 98 : 2193-2200. 2019.
- Sehe CT. Comparative studies on the ultimobranchial body in reptiles and birds. *General and Comparative Endocrinology*, 5 : 45-59. 1965.
- 杉山稔恵. 鳥類カルシウム代謝における骨髄骨の形成と吸収. *日本家禽学会誌*, 42 : 197-208. 2005.
- 菅原道照. 産卵鶏における Ca 代謝. *日本畜産学会報*, 55 : 1-12. 1984.

Serial Observation of Morphologic Changes in the Ultimobranchial Glands of Laying Hens in the Egg-laying Period

Katsuyoshi Kitajima¹, Koji Uetsuka² and Hiromi Nakajima²

¹United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agricultural and Technology (Ibaraki University),
3-21-1 Chuuu, Ami, Inashiki, Ibaraki 300-0393, Japan

²College of Agriculture Ibaraki University, 3-21-1 Chuuu, Ami, Inashiki, Ibaraki 300-0393, Japan

There have been few reports on morphological changes over times in the ultimobranchial glands of hens throughout the laying period, and especially the details of age-related numerical changes in calcitonin (CT)-positive cells in parenchymal regions are not clear. Therefore, in this study, using JULIA-LITE hens, we investigated the histological and immunohistochemical changes in ultimobranchial glands in four egg-laying phases, including first-laying hens, egg-laying peak hens, pre-induced molt hens, culled hens, and starting chicks. Histologically, in the first-laying hens, the expansion of the area of parenchymal regions of glandular epithelium cells, and the increase of the number of small to medium-sized cysts were observed, comparing to other egg-laying phases and starting chicks. After that, as the egg-laying week age progressed, the area of the parenchymal regions of glandular epithelium cells decreased, while the area of the interstitial connective tissue increased, and the number of not only very large cysts containing contents in the cyst lumen but small to medium-sized cysts increased. Immunohistochemically, among the parenchymal glandular epithelium cells, the rates of both CT-positive cell and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-positive cell were highest in first-laying hens, but they decreased with age. The serum Ca concentration was highest in first-laying hens, and gradually decreased with age, while the serum CT concentration was high in first-laying hens, and it decreased to keep almost the same level. From the results above, it was found that the number of CT-positive cells decreased, since the parenchymal regions of glandular epithelium cells was diminished with aging, and the rate of CT-positive cell also decreases in the period between the first-laying hen and the culled chicken.

(Japanese Journal of Poultry Science, 60 : J1-J10, 2023)

Key words : aging, calcitonin, egg laying, ultimobranchial gland