

# 日生研おより

第 68 卷 第 1 号(通巻 622 号) 2022 年(令和 4 年)1 月

## 挨拶・巻頭言

年頭のご挨拶

.....長井伸也(2)

## レビュー

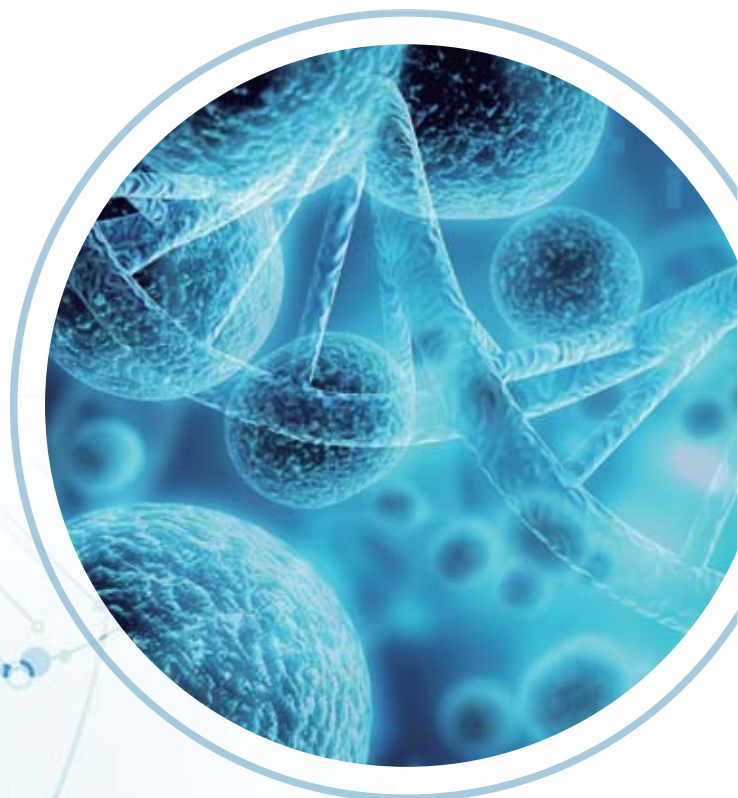
魚類の免疫機構

.....森友忠昭・片倉文彦(3)

マクロファージ病理学

第 2 回: 創傷治癒とマクロファージ

.....山手丈至(11)



## 年頭のご挨拶

長井伸也

謹んで新年のお慶びを申し上げます。皆様にはご健勝にて輝かしい新年をお迎えのことと存じます。2022年はぜひ幸多い年となりますことを心よりお祈り申し上げます。

2021年は1月1日から9月31日までの上半期において、新型コロナウイルス感染症の感染拡大により、東京ではその9割の期間、緊急事態宣言やまん延防止等重点措置が発令されるという異常な年でありました。そのような中、東京オリンピック・パラリンピックが開催され、久々に人々の心が癒されました。しかしその一方で、医療体制がひっ迫したため入院できずにご自宅でお亡くなりになるという事例も多発し、なんとも不条理な世の中になったものだと心が痛みました。

2022年はワクチンの接種率も高くなり、また日本では諸外国と比べて国民の一般的な感染予防対策も高く維持されていますので、たとえ今後感染ピークを迎えたとしても低く抑えられ、これを繰り返しながら徐々に終息へと向かってゆけばと心から願っております。

こういった人や動物の新興感染症の発生とも何か関係があるのかもしれませんが、地球の温暖化は着実に進行しているようです。2021年10月31日から11月12日の期間、イギリスのグラスゴーで国連気候変動枠組条約第26回締約国会議（COP26）が開催されました。そこでは各国が年々上昇する地球の気温とそれに伴って発生する自然災害などの深刻さを共有し、二酸化炭素などの温室効果ガスの排出量をいつまでにどの程度削減できるかがカギとなっています。我が国は2050年までに温室効果ガスの排出をゼロにすると言っています。

我々人類はこれまで、地球上にあるものが無限であるかのように無尽蔵に使うことによって繁栄をきわめて参りました。しかし21世紀に入り、地球の資源には限界があり、これまで人類が行ってきた行為によって地球が悲鳴を上げ始めていることに丁度気が付いたところではないでしょうか？ 人類が経済活動を行うにあたっては地球自体がインフラであり、これが失われれば当然人類も滅亡してしまいます。

ではこのような大きな問題に対して個人ベースでは何ができるのでしょうか？ 電気やガスなどのエネルギーを大切に使う、衣食住に使うものの廃棄を最小限にする、環境を汚さないなど色々と挙げられますが、一言で言いますと、「簡素な生活様式に戻る」こと、もっと端的には「多少の不便をがまんする生活」に集約されるのではないかと考えています。21世紀に入って今年で22年目になりますが、20世紀、人類は「便利かつ大量に消費する生活」を目指してきました。一方、21世紀は「多少不便だが簡素な生活」に意識を変えてゆくことが、地球を大切に、ひいては人類の存続につながってゆくのではないかなどと思いに耽った次第です。

では、本年も当研究所に対する皆様方の温かいご指導、ご鞭撻をお願い申し上げ、これにて新年のご挨拶とさせていただきます。

(理事長)

## 魚類の免疫機構

森友忠昭・片倉文彦（日本大学生物資源科学部獣医学科・魚病/比較免疫学研究室）

### はじめに

近年、魚類養殖の発展はめざましく世界における重要な食糧供給源となっている。この魚類養殖にとって脅威となるのが感染症であり、一度、発症すると壊滅的な被害を及ぼすことも多い。従来、これら感染症の対策として、抗生物質などの薬剤による治療が行われてきたが、抗生物質はウイルス感染症に効果が無いことや、薬剤耐性菌等による人や環境への影響の懸念などから、近年は魚類の獲得免疫機構を利用した、ワクチンによる予防が主流になっている。

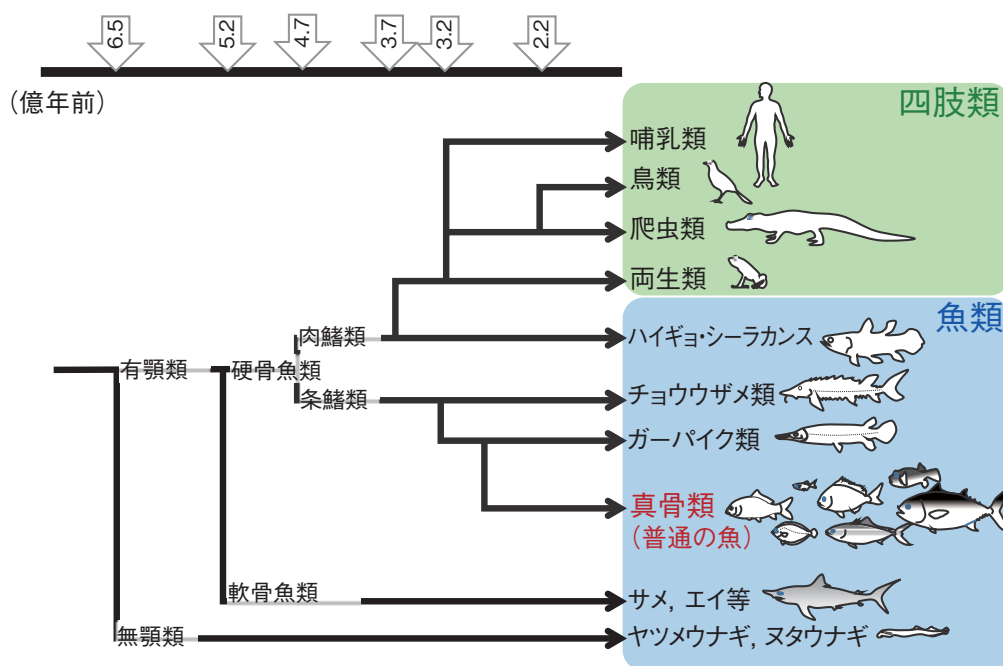
魚類は哺乳類と同様脊椎動物に属し、両者は共通祖先を有する。そのため基本的な免疫機構も多くの点で類似しているが、異なるところも多い。このことは魚病ワクチンの開発において、単に哺乳類の免疫系にそった理解や解釈を当てはめるだけでは無く、魚類の獲得免疫系を構成する細胞やそれら細胞が反

応する場などの魚類免疫系の特徴を知る必要がある。そこで、本稿では魚類と哺乳類の免疫系を比較し、魚類の免疫機構の特徴について述べたいと思う。

### 魚類とは—真骨魚類と哺乳類は共通祖先を有する—

魚類とは基本的に一生の間、水中で生活し、鰓（えら）呼吸を行い、鰭（ひれ）を用いて移動する変温動物であると定義される。分類学的には脊椎動物に属する動物群のうち、両生類・爬虫類・鳥類・哺乳類などの四肢動物を除外したものをさす。すなわち魚類とは無顎類・軟骨魚類・条鰭（じょうき）類・肉鰭（にくき）類などの異なる系統を包含する動物群の総称である（図1）。

現在、魚類の中で最も繁栄しているグループは条鰭類に属する真骨魚類である。また、現生魚類のほとんどが真骨魚類に含まれ、養殖対象魚種のほとんどもこのグループである。一方、ハイギョなどが含



### 脊椎動物の系統進化

図1 脊椎動物の系統進化  
図中上の矢印内の数字は分岐年（億年前）を示す。



## 脊椎動物（有顎類）の血球




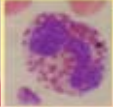

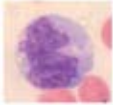






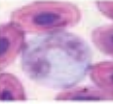







	赤血球	栓球	顆粒球			単球	リンパ球
哺乳類 (イヌ)		 血小板	 好中球	 好酸球	 好塩基球		 T/B細胞
鳥類 (ニワトリ)			 好異球 (偽好酸球)	 好酸球	 好塩基球		 T/B細胞
真骨魚類 (コイ)			 好中球 (好異球)	 好塩基球			 T/B細胞

図2 脊椎動物（有顎類）の血球組成

まれる肉鰭類は進化の過程で陸上に上がり、哺乳類などの四肢動物を生み出した。すなわち、現生の真骨魚類と哺乳類は4～5億年前に共通祖先から分岐したと考えられており、免疫系を含む臓器・組織など多くの共通点を有する。

### 血球から見た真骨魚類の免疫

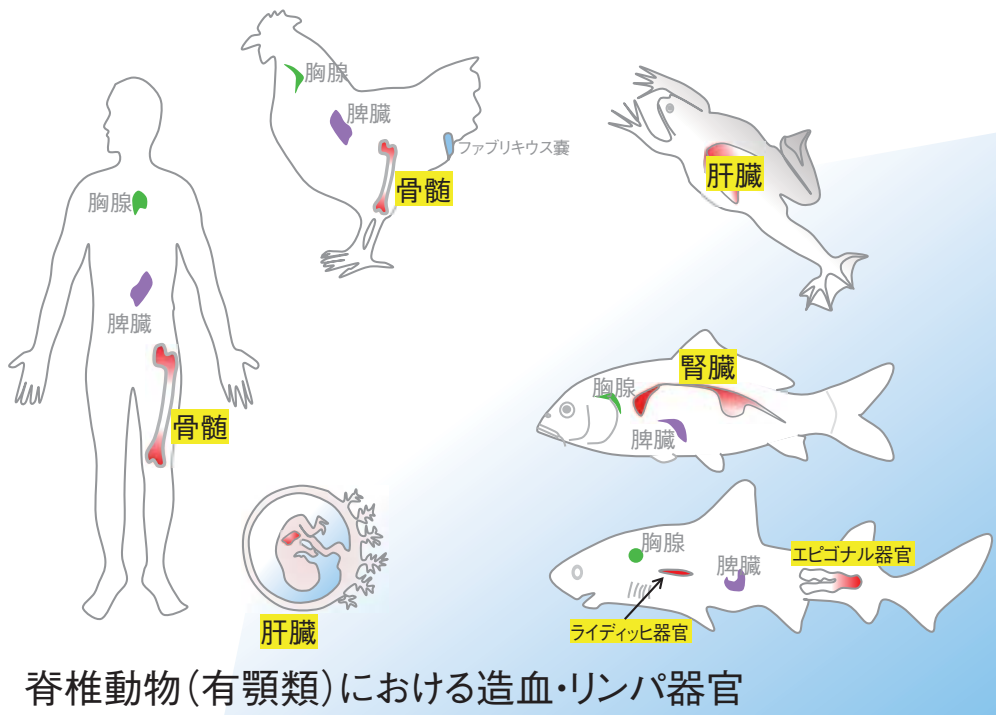
脊椎動物の血液細胞（血球）は、赤血球・栓球・顆粒球・単球・リンパ球から構成され、これら血球の機能・形態は比較的良く保存されている（図2）。しかし、異なる部分もある。例えば、哺乳類の赤血球や栓球（血小板）は無核であるのに対して、それ以外の脊椎動物（鳥類・爬虫類・両生類・魚類）の赤血球や栓球は有核である。また、哺乳類や鳥類の顆粒球は、顆粒の染色性から好中球（好異球）、好酸球、好塩基球などに分けられるが、真骨魚類では魚種により異なる。例えば、コイやフグでは好中球のほか好塩基球様細胞も認められるが、ニジマス・アユ・ウナギではほとんど好中球しか観察されない[1]。しかし、いずれの種においても初期生体防御に重要な「炎症部位に早期に現れ、貪食・殺菌を行う」好中球様の細胞は存在する[2]。また、哺乳類のリンパ球はT細胞・B細胞等に分けられるが、真

骨魚類でも同様の細胞が存在することが知られている[3]。これらのことは、脊椎動物において基本的な血球組成は共通であり、さらに獲得免疫機構を含む免疫機構も良く似ていることを意味する。

### 真骨魚類の造血器官

基本的な血球組成は脊椎動物間で保存されているが、造血部位は大きく異なる。例えば哺乳類・鳥類などの造血部位は骨髄であるが、多くの真骨魚類の主要な造血部位は腎臓である。腎臓で造血が起こるときくと、多くの方が違和感を持たれるかもしれない。しかし、軟骨魚類であるサメでは生殖腺に付随するエピゴナル器官や食道付近のライディッヒ器官などで造血が行われる。また、半水生のアフリカツメガエルの成体では肝臓が造血部位であり[4]、さらに、哺乳類でも胎生期の一時期に、肝臓造血がおこる。これらのことは脊椎動物の造血部位として決まった器官は無く、本来多様であることを意味する。このような観点からすると、真骨魚類の造血部位が腎臓であってもなんの違和感も無い（図3）。

図4は真骨魚類であるギンブナ幼魚の全身組織標本を示す。コイ科魚類の腎臓は鰾（うきぶくろ）の形に合わせるように頭部と体部が大きく膨らんで、



### 脊椎動物(有顎類)における造血・リンパ器官

図3 脊椎動物(有顎類)における造血・リンパ器官

それぞれ頭腎と体腎と呼ばれる。頭腎と体腎をそれぞれ拡大してみると、頭腎中には哺乳類の副腎に相当する内分泌組織が観察され、体腎中には尿管や糸球体などの泌尿器系組織が観察される。しかし、両者のスタンプ標本を作製してみると、幼若赤血球や幼若好中球など分化途中の各種幼若血球が多数観察され、共に造血部位としても機能していることがわかる(図5)。実際、我々が行った、腎臓造血細胞の移植実験により、腎臓中にはすべての血球を長期にわたり作り続ける能力を持った造血幹細胞が存

在することがわかっている。これらのことから、真骨魚類の腎臓は哺乳類の骨髄と相同の造血器官と言える[5][6][7]。

#### 魚類(真骨魚類)のリンパ器官

哺乳類のリンパ器官は、リンパ球の産生・分化がおこる一次リンパ器官(骨髄・胸腺など)と成熟したリンパ球が免疫反応を行う二次リンパ器官(脾臓・リンパ節・粘膜関連リンパ組織など)に分けら

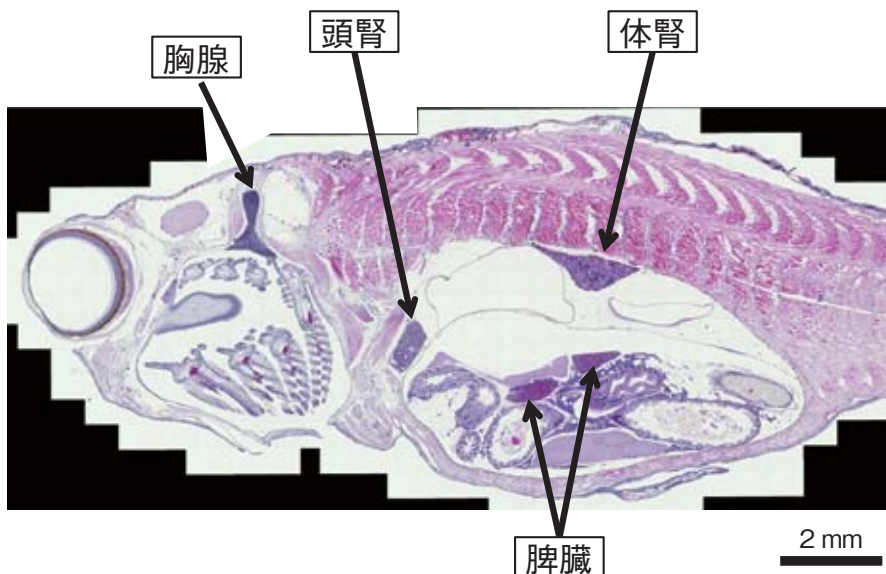


図4 真骨魚類(ギンブナ幼魚)の造血・リンパ器官

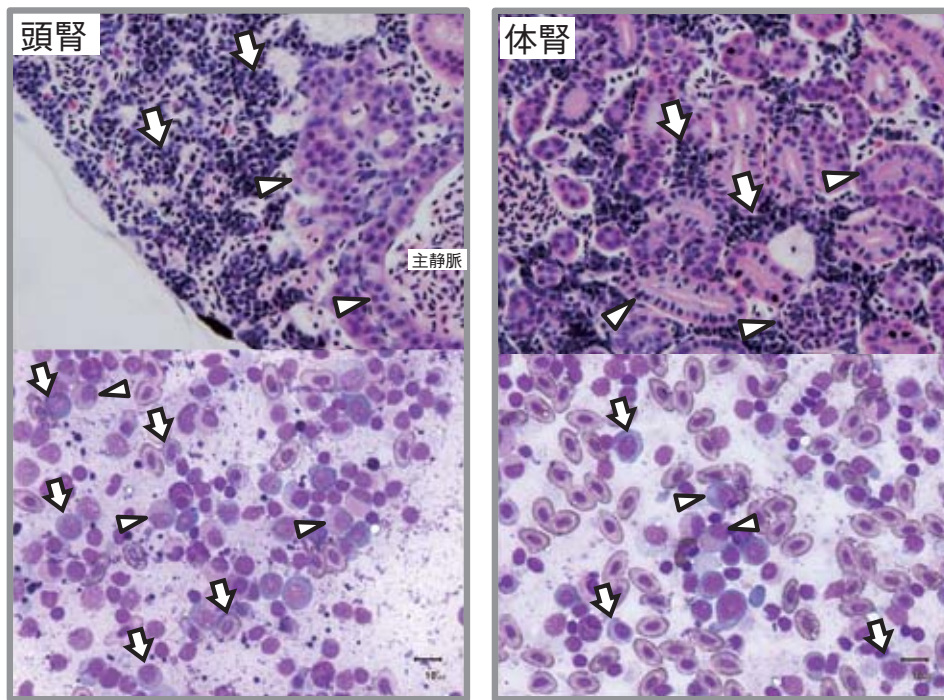


図5 ギンブナ幼魚の頭腎（左）と体腎（右）の組織像および塗抹標本  
 頭腎組織標本中の矢頭は哺乳類の副腎組織に相当する組織を示し、矢印は造血・リンパ組織を示す。  
 体腎組織標本中の矢頭は糸球体や尿細管を示し、矢印は造血・リンパ組織を示す。  
 頭腎および体腎の塗抹標本中の矢頭は幼若好中球を示し、矢印は幼若赤血球を示す。

れる。真骨魚類の場合、一次リンパ器官は前述のようにリンパ球を含む、すべての血球を産生する腎臓であり、また、同じく一次リンパ器官として胸腺も有している（胸腺は脊椎動物の進化において軟骨魚類以降認められる）。真骨魚類の胸腺は鰓腔の上の咽頭上部に左右一対見られ（図4）、拡大すると、哺乳類のような分葉構造は見られず、皮質と髄質の区別も明瞭ではない（図6左）。しかし、胸腺から細胞を分離し、抗CD4および抗CD8抗体で二重染色すると、CD4陽性かつCD8陽性のいわゆるダブルポジティブT細胞が認められる。一方、その他の脾臓・末梢血などではCD4陽性またはCD8陽性のシングルポジティブT細胞だけが観察される（図6右）。これらのことは哺乳類と同様に、真骨魚類の胸腺中でもダブルポジティブT細胞の段階を経て、シングルポジティブT細胞へ成熟・分化することを意味し、胸腺はT細胞の分化に必要な一次リンパ器官といえる [8]。

哺乳類の二次リンパ器官は、「脾臓」や全身に散在する「リンパ節」、腸管や気管の粘膜に付随して存在する「粘膜関連リンパ組織」などである。これ

らの内、真骨魚類は脾臓のみを有する。すなわち、真骨魚類ではリンパ節は存在せず、また、粘膜関連リンパ組織と呼べるものも存在しない（粘膜固有層にリンパ球が散在しているのみである）。

哺乳類の脾臓は老化赤血球を処理する場である赤脾髄とリンパ組織である白脾髄の領域に分けられる。真骨魚類の脾臓は白脾髄の発達が悪く、哺乳類で見られる胚中心も認められない（図7）。これらのことから二次リンパ器官としては、脾臓の役割は小さいと考えられている。実際、抗原感作に伴う抗体産生細胞は脾臓よりも腎臓中で多く認められる。腎臓中に存在するリンパ球の集合体が二次リンパ器官としての主要な機能を担っていると考えられている [9]。このように、真骨魚類の腎臓は一次リンパ器官としての機能のみならず二次リンパ器官としても重要な働きをしていると考えられる。

#### 真骨魚類のゲノム構造と免疫関連遺伝子

上述のように、真骨魚類と哺乳類は共通祖先種から分岐した。そのため、ゲノム構造においても両者



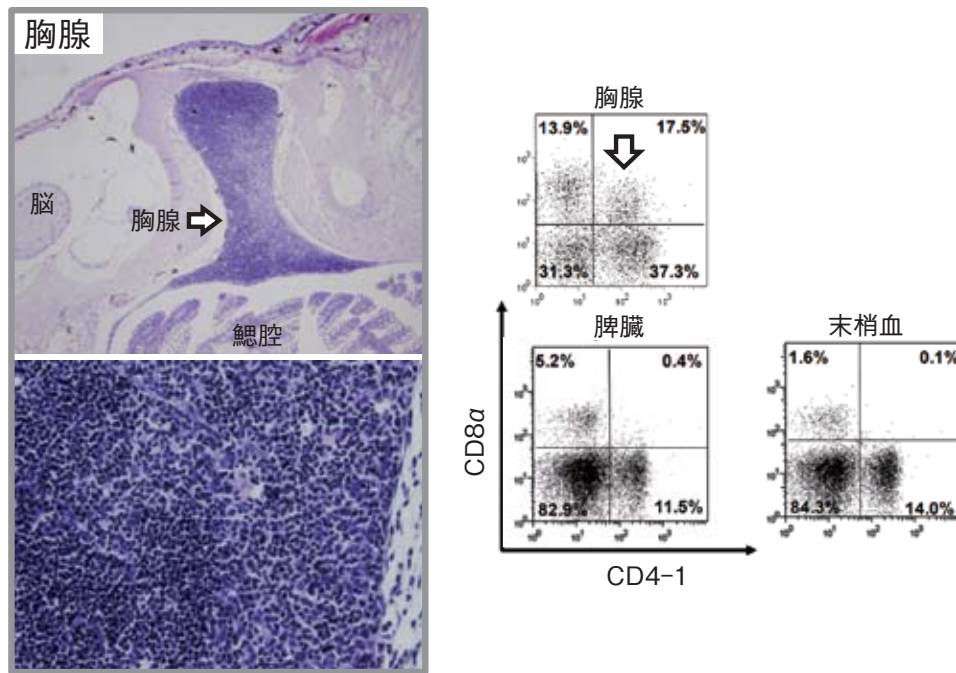


図6 ギンブナ幼魚の胸腺の組織像（左）とギンブナの胸腺・脾臓・末梢血白血球のフローサイトメトリーによる解析（右）

胸腺組織像の上は弱拡大、下は強拡大を示す。また、フローサイトメトリー解析では、抗ギンブナ CD4-1 抗体と抗ギンブナ CD8  $\alpha$  抗体による二重染色を行った。胸腺白血球でのみ CD4 かつ CD8 陽性のダブルポジティブ T 細胞が認められる。

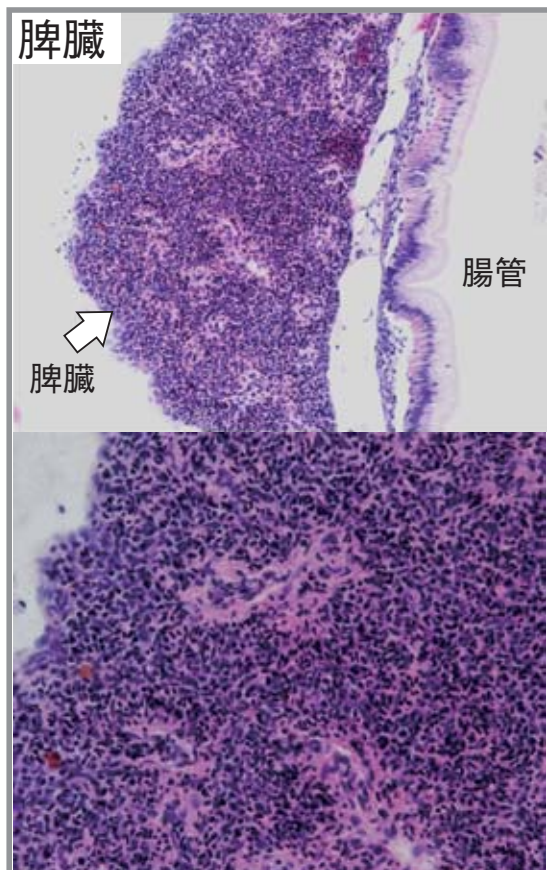


図7 ギンブナ（幼魚）の脾臓組織標本：上は弱拡大、下は強拡大を示す。莢動脈（細網細胞で鞘状に取り囲まれた血管）が観察される。赤脾髄・白脾髄の区別は明瞭でなく、白脾髄におけるリンパ球の集簇も乏しい。

は共通点が多い。図8は真骨魚類であるミドリフグとヒトのゲノムを比較し、両者の共通祖先のゲノムを推測したものである [10]。ミドリフグはゲノムサイズが約4億塩基対と脊椎動物の中では最も小さく、ジャンク DNA も少ないため、ヒトと並び早くからゲノム解読がなされていた。この論文によると、共通祖先種は  $n=12$  の染色体を有していたが、真骨魚類へ向かう進化の過程で染色体の倍加が起こり、その後さらに染色体レベルでの変異がおこり、ミドリフグでは  $n=21$  の染色体になった。一方、哺乳類へ向かう進化では、このような染色体の倍加は起こらなかったとされている。このように、真骨魚類と哺乳類はそれぞれ共通祖先のゲノムを引き継ぐが、両者が分岐した後のゲノム倍加の有無が真骨魚類と哺乳類では大きく異なる。

真骨魚類と哺乳類のゲノム倍加の違いはサイトカイン遺伝子において見ることができる。図9はヒトと真骨魚類であるゼブラフィッシュの G-CSF 遺伝子とその周囲の遺伝子の並びを比較したものである。まず、ゼブラフィッシュは G-CSF 遺伝子を異なる染色体上に1つずつ計2個有するが (*g-csfa*, *g-csfb*)、ヒトでは1個のみである。また、ヒトの G-

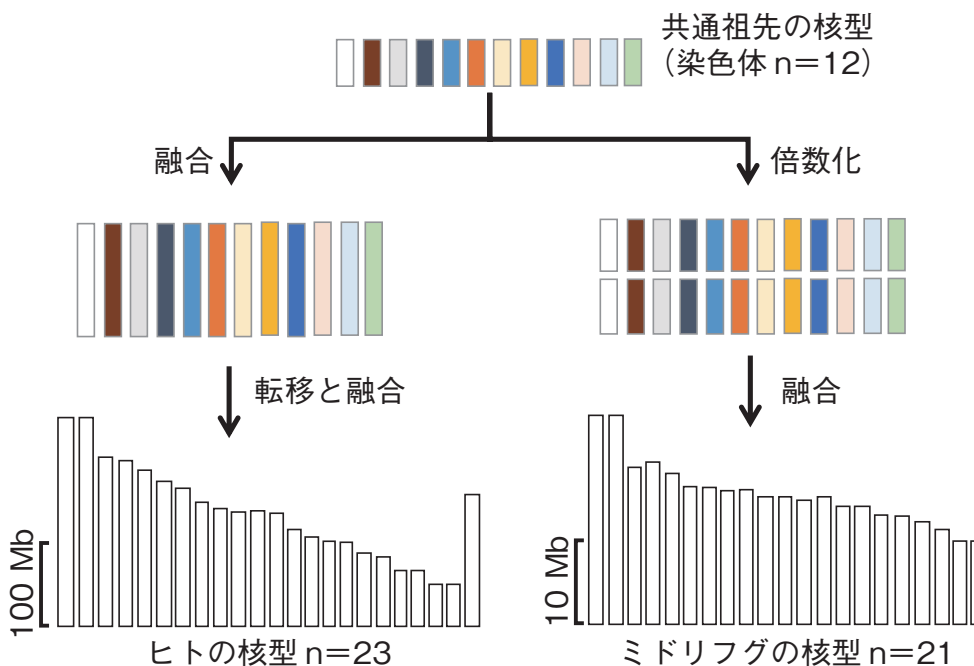


図8 ヒトとミドリフグのゲノム比較から導きだされる共通祖先の核型  
O. Jaillon, et al., *Nature* 2004 より引用・一部改変

CSF 遺伝子の周りで見られる遺伝子の多くは、それぞれのゼブラフィッシュ G-CSF 遺伝子の周りにも存在する [11]。また、図 10 は IFN $\gamma$  遺伝子周囲の遺伝子 (Th1 領域) の並びを比較したものである。IFN $\gamma$  遺伝子はゼブラフィッシュでも 1 個しか認められていないが、その周囲の遺伝子の種類や並びを比較すると、ヒトとゼブラフィッシュは良く似ている。しかし、ゼブラフィッシュではヒトでは見られない IFN $\gamma$ rel 遺伝子を持つなど異なるところもある [12]。また、図 10 の右は IL-4 および IL-13 周囲 (Th2 領域) の遺伝子の並びを比較したものである。Th2 関連サイトカインである IL-4 や

IL-13 は、ヒトでは、第 5 染色体上に近接して存在するが、ゼブラフィッシュ等の真骨魚類では IL-4/13 と命名されたホモログ遺伝子が第 9 と第 14 染色体上にそれぞれ存在する [13]。

このようにサイトカイン遺伝子 (周囲の遺伝子を含む) において、哺乳類では 1 個しか存在しないものが、真骨魚類では異なる染色体上に 2 個存在するものがあり、真骨魚類への進化の過程でおきたゲノム倍加を示唆する。また、哺乳類と真骨魚類でのこのような違いは、これらサイトカインによる免疫制御が大枠は類似するが、哺乳類とは異なった真骨魚類特有のしくみが存在することを意味する。

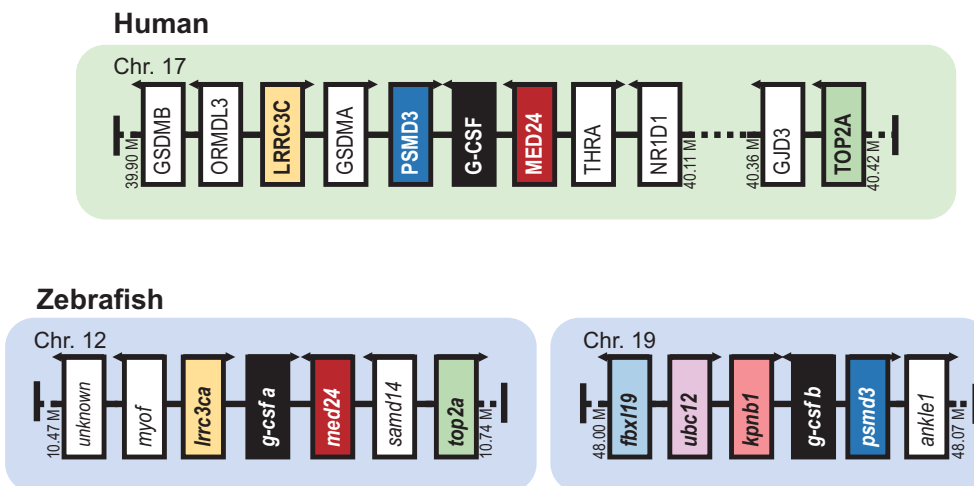


図9 ヒトとゼブラフィッシュの G-CSF 遺伝子周囲の比較



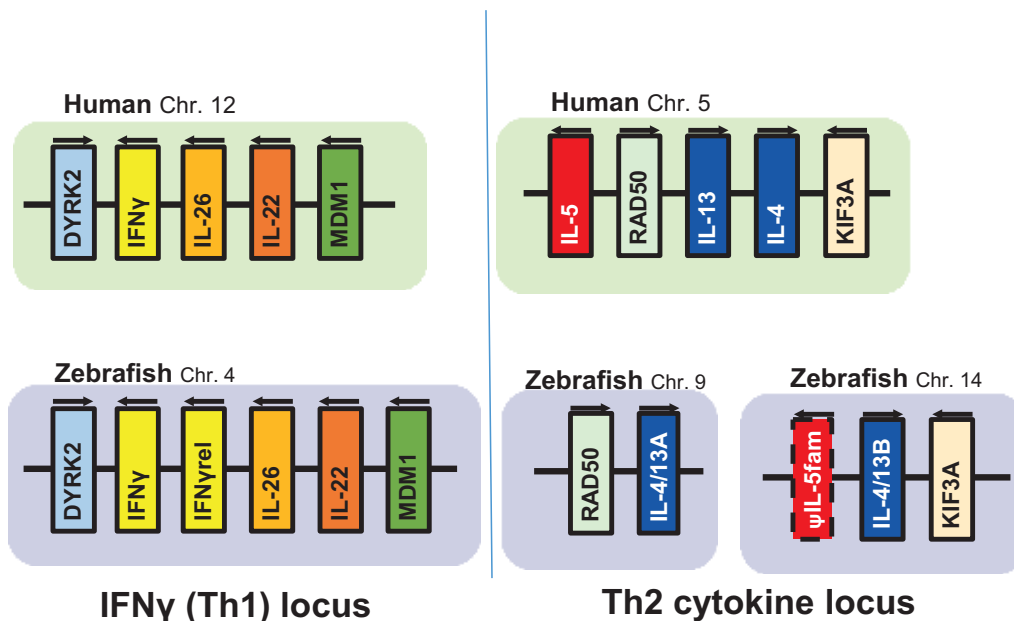


図 10 ヒトとゼブラフィッシュの Th1 & Th2 関連遺伝子座の比較

**抗体遺伝子**

抗体は獲得免疫の要となる分子であり、多くの真骨魚類で IgM・IgD・IgT/Z の 3 種類の分子が存在することが知られている。この内、IgM は血中の主要な抗体であり、また IgT/Z は粘液中に分泌される主要な抗体と考えられている [14]。

図 11 はヒトとゼブラフィッシュの免疫グロブリン重鎖遺伝子を比較したものである [15]。両者とも、可変部をコードする V・D・J 遺伝子断片群の下流に複数の定常部遺伝子が存在し、基本的な構造は良く似ている。哺乳類の場合、まず、V・D・J

遺伝子断片群間で遺伝子再構成がおこり多様な可変部が作られる。次に可変部は下流の定常部遺伝子である Cμ または Cδ と共に IgM または IgD を作る。そして、さらにこの可変部は遺伝子変換により下流の様々な定常部遺伝子と合体し、クラススイッチがおこる。このように、可変部を変えずに IgM/D から IgG や IgE などへと変換できる。一方、多くの真骨魚類では、IgM や IgD の他に別のクラスである IgT/Z が存在する。しかし、V 遺伝子断片群と IgM 遺伝子の間に IgT/Z 遺伝子が存在するため、図中の赤で示した V・Dμ 間の再構成により IgT/Z 遺伝子が除かれてしまう。このように IgM と IgT/Z

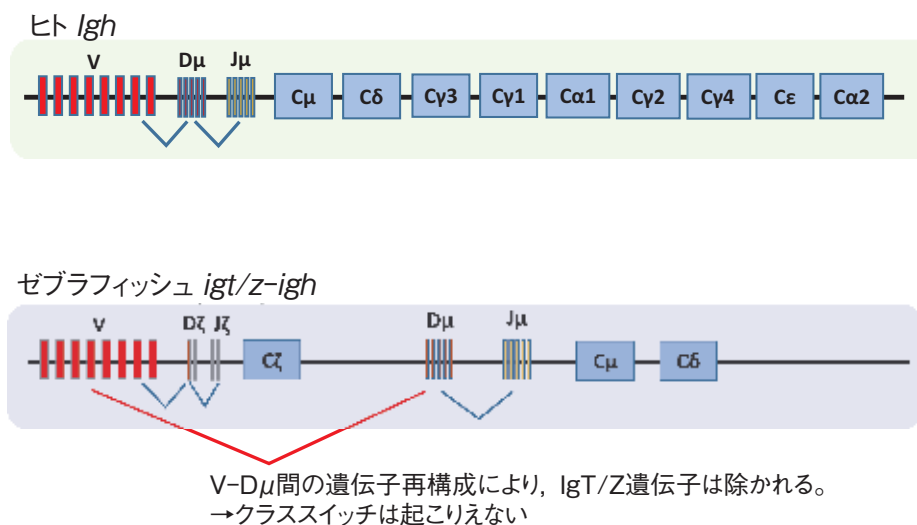


図 11 マウスとゼブラフィッシュの免疫グロブリン遺伝子 (H 鎖) の比較  
N Danilova, et al., Nat Immunol 2005 より引用・改変

では可変部が異なることになり、哺乳類で見られるクラススイッチは起きないことになる。

### 新たな実験魚クローンギンブナ —ワクチン開発のため—

真骨魚類は鰓や皮膚を含む全身が粘膜組織に覆われるため、これらが病原体の侵入門戸になる。また変温動物である魚類の免疫機能は水温の変化に影響されるなど、生息する水環境の変化に多大な影響を受ける。これらのことから、魚病ワクチンを開発する上で、哺乳類の免疫学の知見をそのまま当てはめればよいとは言えず、魚類の獲得免疫を構成する細胞の同定や、それら細胞の体内分布と動態、さらに免疫記憶細胞の存在証明などを推し進め、それらの役割や制御のしくみを明らかにする必要がある。従来、多くの研究者が、これらの命題に取り組んできたが、未だ不明の部分が多く、新たな実験手法が必要とされている。

そこで我々は“GFP-トランスジェニック・クローンギンブナ”を用いている。ギンブナは日本の多くの河川に生息するコイ科の魚種であるが、その多くを占める3倍体魚は雌性発生にて子孫を残すため、同系のギンブナ個体はすべて同じゲノムを持つ、すなわちクローンである。そのため、同系の個体間で細胞・組織の移植を行っても、自己と認識され、拒絶反応を起こさず、生着する。そこで、GFP陽性の抗原感作リンパ球を同系の野生型（GFP陰性）個体に移植することにより、これら移植細胞の体内での遊走・定着・増殖などを追跡する予定である。このような免疫細胞の体内動態が調べられる系は、魚類では非常に貴重である。

また、本研究では、移植するリンパ球を選別するため、各種モノクローナル抗体を用いる。我々のグループは、すでにギンブナ・ヘルパーT細胞を認識できる抗CD4-1抗体やキラーT細胞を認識できる抗CD8 $\alpha$ 抗体を作製しており、さらに、ギンブナのCD8 $\beta$ 分子、魚類特有のCD4アイソフォームであるCD4-2分子、粘膜免疫において重要と考えられている魚類免疫グロブリンのアイソタイプであるIgT/Zに対する抗体も作製中である。これら各種抗体によりリンパ球集団を様々に選別・移植し、

獲得免疫の成立に必要な細胞の同定と体内動態を調べる。

このように、我々が取り組む研究は、今までに無い細胞移植系とモノクローナル抗体による免疫細胞の選別を組み合わせ、新たな実験系を駆使したものであり、多くの新知見が得られる可能性が高い。

### まとめ

魚類（真骨魚類）は、哺乳類と同様、T細胞やB細胞からなる獲得免疫機構を有し、CD4陽性ヘルパーT細胞、CD8陽性キラーT細胞、IgM産生B細胞およびIgT/Z産生B細胞などのリンパ球亜集団の存在もわかっている。しかし、これらリンパ球が産生される場（一次リンパ器官）や、リンパ球が病原体などの抗原と反応する場（二次リンパ器官）は異なるところが多い。例えば、哺乳類の一次リンパ器官は、骨髄および胸腺だが、多くの魚類では腎臓および胸腺である。また、哺乳類の二次リンパ器官は脾臓・粘膜関連リンパ組織・リンパ節など、体の要所々々に配置されているのに対して、魚類では腎臓や脾臓以外に明確なリンパ組織は認められない。魚類はこれら原始的な共通祖先形質（と考えられる特徴）を保存しているだけでなく、進化の過程においてゲノム倍加などの現象を経て、免疫関連分子の数を増やすなど、独自の進化を遂げてきた。

今後、魚類特有の獲得免疫機構やその制御法が明らかにされることで、魚病ワクチン開発のさらなる進展が期待される。

### 参考文献

1. 中村弘明, 菊池慎一, 動物界における免疫系の進化 (11) 魚類の生体防御系. 医学のあゆみ, 2001. 199 (11) : p. 797-801.
2. 椎橋孝, 飯田貴次, 顆粒球—魚類好中球の活性酸素産生機構を中心として—, 「魚類免疫系, 渡辺翼編」. 2003, 恒星社厚生閣, 東京.
3. Nakanishi, T., et al., 2011. Cytotoxic T cells in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* **35**(12) : p. 1317-1323.
4. Nogawa-Kosaka, N., et al., 2011. Identification of ery-

- throid progenitors induced by erythropoietic activity in *Xenopus laevis*. *J. Exp. Biol.*, **214**(6) : p. 921–27.
5. Kobayashi, I., et al., 2006. Demonstration of hematopoietic stem cells in ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney. *Dev. Comp. Immunol.* **30**(11) : p. 1034–1046.
  6. Kobayashi, I., et al., 2007. Isolation of side population cells from ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney hematopoietic tissues. *Dev. Comp. Immunol.* **31**(7) : p. 696–707.
  7. Kobayashi, I., et al., 2010. Comparative gene expression analysis of zebrafish and mammals identifies common regulators in hematopoietic stem cells. *Blood* **115**(2) : p. e1–e9.
  8. Toda, H., et al., 2011. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* **35**(6) : p. 650–660.
  9. Bromage, E.S., et al., 2004. Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *J. Immunol.* **173**(12) : p. 7317–7323.
  10. Jaillon, O., et al., 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* **431**(7011) : p. 946–957.
  11. Katakura, F., et al., 2019. Paralogs of common carp granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) have different functions regarding development, trafficking and activation of neutrophils. *Front. Immunol.* **10** : p. 255.
  12. Yamaguchi, T., et al., 2015. Along the axis between type 1 and type 2 immunity; principles conserved in evolution from fish to mammals. *Biology* **4**(4) : p. 814–859.
  13. Ohtani, M., et al., 2008. Comprehensive clarification of two paralogous interleukin 4/13 loci in teleost fish. *Immunogenetics* **60**(7) : p. 383–397.
  14. Zhang, Y.-A., et al., 2010. IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nat. Immunol.* **11**(9) : p. 827–835.
  15. Danilova, N., et al., 2005. The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish : identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nat. Immunol.* **6**(3) : p. 295–302.

## レビュー

# マクロファージ病理学 第2回：創傷治癒とマクロファージ

山手丈至 (大阪府立大学名誉教授)

## はじめに

マクロファージは、損傷組織において、破壊された細胞の残屑や、外部から侵入する病原体などを、好中球とともに、貪食し排除する機能を有する。損傷組織や病原体の排除には、マクロファージから産生される消化酵素や殺菌作用のある因子が係わることから、その結果周囲組織の傷害や炎症が助長され

る。一方で、生体には損傷された組織を修復する機能も備わっている。その中心的な役割を演じる細胞もやはりマクロファージである。すなわち、マクロファージには、組織の傷害と修復の相反する二面性の機能がある。「ジキル博士とハイド氏」と形容できるかもしれない。

マクロファージの複雑な機能を理解する上で M1/M2 分極化の概念が提唱された。M1 型マクロ



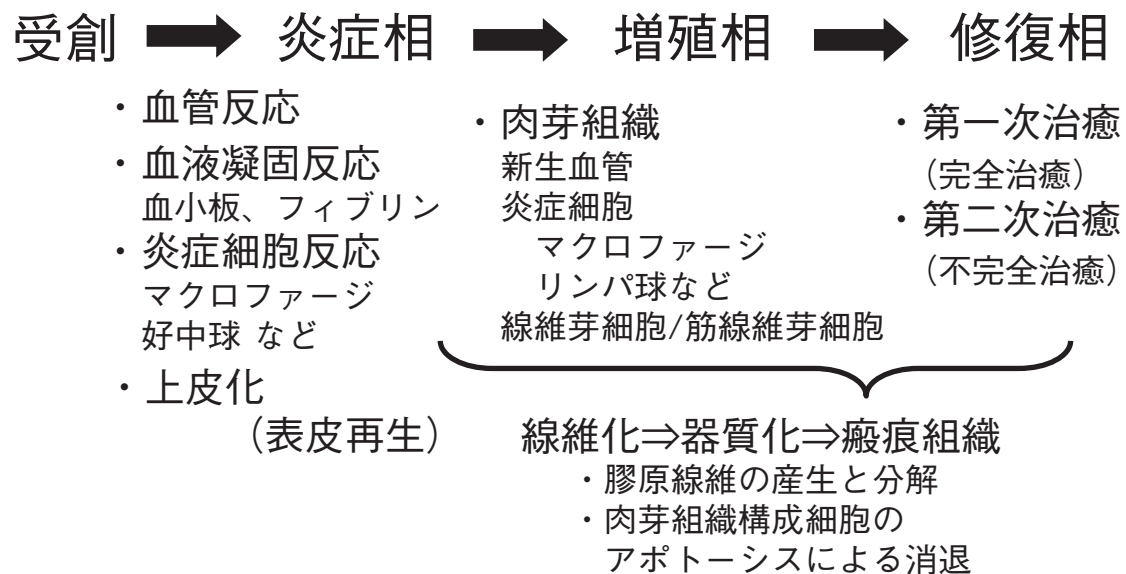


図1 皮膚の創傷治癒

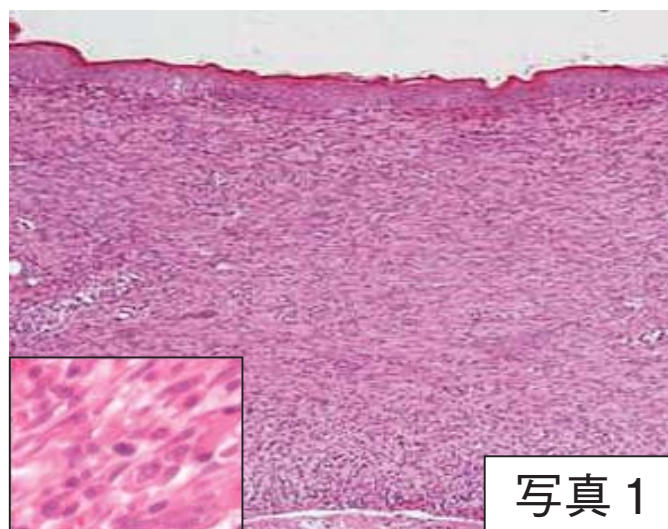
ファージは、CD68 を発現し、貪食能が高く、組織の傷害と炎症を誘導する一方、M2 型マクロファージは、CD163 を発現し抗炎症作用を有し、組織の修復・線維化に係わる [1]。しかし、M1/M2 分極化が、病態形成にどのように関与しているのかは十分に解明されていない。第2回においては、傷害から修復に至る一連の病態を観察することができるラットの皮膚と心筋の創傷治癒モデルを用いて、マクロファージの出現動態と特性について解析した研究成果を紹介する。

### 1. 皮膚の創傷治癒とは

皮膚深くに及ぶ創は治るのに時間を要する。この受け身の病変である皮膚の損傷は、炎症細胞の反応、組織の増殖・再生を経て再構築される。この過程を創傷治癒と称する。創傷治癒は、病理学的には、炎症相、増殖相、修復相に大別される (図1) [2, 3]。損傷の広がりや深さの程度、細菌汚染や栄養状態など二次的な影響により異なるが、治癒するには受創後半月程度か、それ以上の期間を要する。

**炎症相**は、受創後の急性反応期で、損傷血管からの出血と血管反応 (炎症性水腫や充血など)、血小板やフィブリンによる血液凝固反応、炎症細胞浸潤、そして表皮の再生 (上皮化) が生じ始める。血管反応である血管透過性の亢進により遊走してきたマク

ロファージなどの炎症細胞は、汚染微生物や異物に対する防衛反応と創部の浄化に働くとともに、さらなる炎症細胞の滲出と遊走に関与する。**増殖相**では、創面での表皮の再生がさらに進む。その下方の創床では、傷害された組織を補填するように肉芽組織が形成される。よって、増殖相は肉芽組織相とも呼ばれる。肉芽組織は、炎症細胞、新生血管、線維芽細胞と筋線維芽細胞、そして膠原線維 (主にI型コラーゲン) から成る。炎症細胞としては、炎症相から続く好中球もみられるが、増殖相ではむしろマクロファージが主体となる。この時期からリンパ球が散見される。肉芽組織の形成により、上皮化が進む創面は、肉眼的に不規則で凹凸状となり、新生血管によりその色調は赤みを帯びる。一見「肉様」にみえ、かつ軽い接触でも出血し易い状態となる。これが、肉芽組織と呼ばれる所以である。**修復相**では、増殖相で形成された肉芽組織が徐々に消退し、修復性の線維化が生じ組織が復元される。よって、再形成相とも呼ばれる。肉芽組織の構成成分である新生血管の内皮細胞、線維芽細胞・筋線維芽細胞などは役割を終えアポトーシスにより消退する [4, 5]。アポトーシスに陥った細胞はマクロファージにより貪食され排除される。細胞成分が減じると、筋線維芽細胞から産生される膠原線維から成る癥痕組織が形成される。この過程を器質化と呼ぶ。余剰の膠原線維がさらに分解され癥痕組織が小さくなり元の組織



に復す。これを第一次治癒（完全治癒）と呼ぶ。一方、創傷が広範囲で、深く、増殖した汚染微生物や異物混入などコンディション不良下で形成された癒痕組織では、膠原線維の分解が進まず、よって不規則な表面を呈し癒痕収縮し、創跡として残る。この状態を第二次治癒（不完全治癒）と呼ぶ。ケロイドは、上皮化も肉芽組織の形成も不良で、かつ膠原線維の吸収も不完全となった癒痕組織である。なお、組織の再構築（修復性線維化）は、膠原線維などの細胞外基質の分解に係わるマトリックスメタロプロテナーゼと、その機能を阻害するメタロプロテナーゼ組織インヒビターの絶妙な機能バランスにより調整されている。

## 2. 皮膚の創傷治癒モデルに出現するマクロファージ

ラットの皮膚にパンチ創傷を作製し、創傷後1日から26日の治癒過程におけるマクロファージの挙動を解析した [2]。炎症相は1-3日、増殖相（写真1：創傷後7日の肉芽組織）は5-12日、その後15-26日は修復相で、26日までに創傷はほぼ治癒した。もちろん、各相は明確に区別できるものではなく、炎症相と増殖相、増殖相と修復相は、それぞれ相互にある程度重なり合っている。なお、肉芽組織の形成は7-12日が最も顕著であり、表皮の再生は15日までに完了した。

### 2-1. M1/M2 マクロファージの特性

CD68 発現 M1 型マクロファージは受創後1日と

3日の炎症相においてすでに最も増加しており、その後増殖相と修復相において徐々に減少するものかなりの出現数が維持されていた。CD163 発現 M2 型マクロファージは、受創後5日と7日の増殖相で一過性に増加する特徴があった。CD68 抗原は、リソソーム膜に位置し、その発現の増加は貪食活性の指標とされ、よって CD68 発現細胞は傷害組織の貪食と排除、そして炎症誘導に係わると考えられている。CD163 抗原は、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体のスキャベンジャーレセプターで、その発現の増加は炎症抑制と修復性線維化に係わる因子の産生に関連すると考えられている（図2）。皮膚の創傷治癒モデルでは、M1 型は、M2 型より先行して出現し、傷害組織残屑の排除と炎症の助長に、M2 型は傷害された組織の修復に必要な肉芽組織の形成に関与している可能性が示された。

なお、二重免疫染色により CD68 と CD163 を共発現するマクロファージが15%程度存在していた。このような M1 型と M2 型の双方の特性を有するマクロファージの存在は、M1 型から M2 型へ、あるいはその逆のシフトが起きている可能性を示唆している。

単球・マクロファージの増殖・活性化因子として知られる CSF-1 の発現は、受創後7日と9日の M2 型の出現時期に一致した。CSF-1 は肉芽組織形成に係わる M2 型の活性化に関与するのかもしれない。また、マクロファージの誘導・遊走に係わる MCP-1 (CCL2) は、創傷後の早期である受創後3

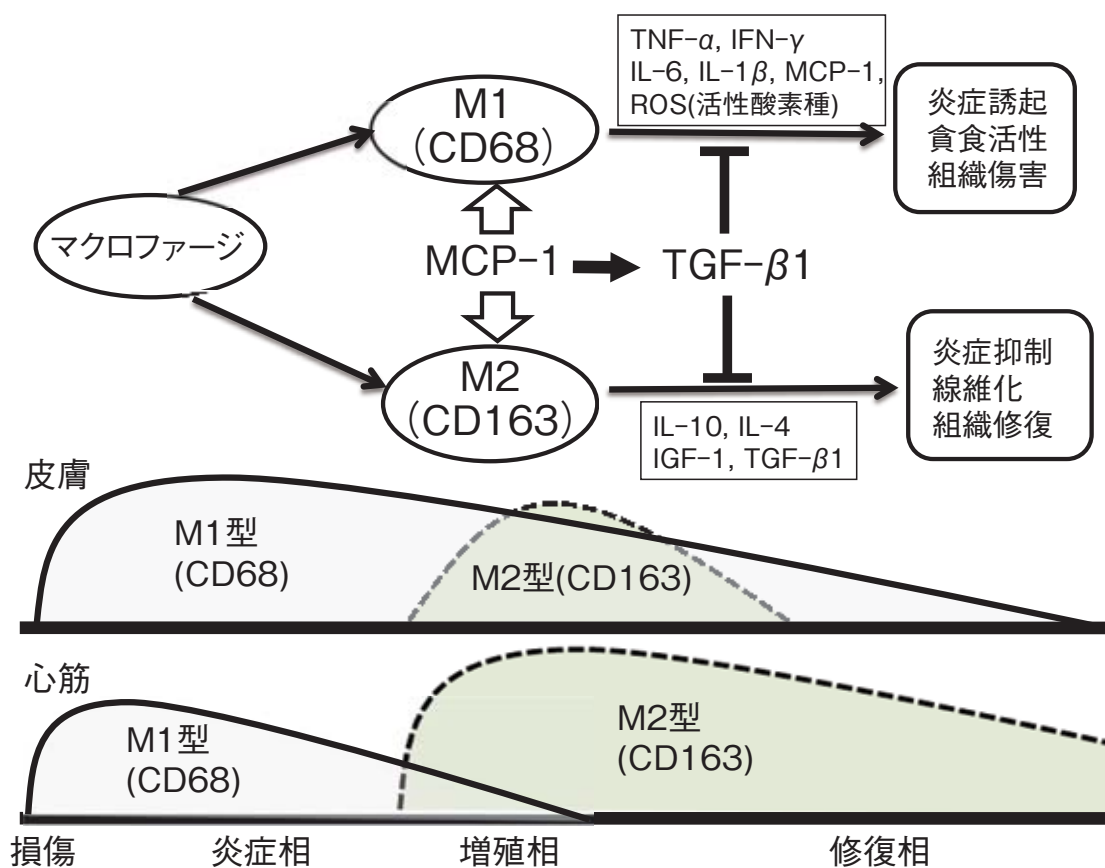


図2 M1/M2 マクロファージの特性と皮膚と心筋の創傷治癒における動態

日の炎症相と7日と9日の増殖相において増加し、それはM1型とM2型の出現時期と一致していた。MCP-1は、受創後早期におけるマクロファージの活性化に係わることが示唆された。そこで、ラットの培養マクロファージ株HS-PにMCP-1を添加したところCD68とCD163の発現が増加した[6]。MCP-1は、M1型やM2型マクロファージの活性化に係わることが分かった。さらにMCP-1を添加したHS-P細胞からは強力な線維原性因子であるTGF-β1の産生が増加した[6]。

線維化での膠原線維を産生する筋線維芽細胞はTGF-β1により誘導されることが知られている[3, 4]。皮膚創傷治癒モデルにおけるTGF-β1の発現は、受創後3日の炎症相から受創後12日の増殖相の間で著しく増加していた。 $\alpha$ -平滑筋アクチン(SMA)を発現する筋線維芽細胞の出現はTGF-β1の発現にほぼ一致した。すなわち、M1型とM2型の誘導に係わるMCP-1は、マクロファージからのTGF-β1の産生を促すこと、さらに産生されたTGF-β1は筋線維芽細胞の誘導を促進することで

肉芽組織における線維化に係わることが示された[4, 6]。なお、TGF-β1をHS-P細胞に添加するとCD68とCD163の発現が減じた[4]。受創後3日の炎症相から受創後12日の増殖相までの間でTGF-β1が増加していたことから、CD68発現M1型が炎症相で最も増加しその後徐々に減少する所見や、CD163発現M2型が増殖相で一過性に増加しその後減少する事象には、炎症の抑制に係わるTGF-β1が関与していると考えられた。なお、TGF-β1は、M2マクロファージからの主要な産生因子で、抗炎症作用と修復性の線維化を導くとされる[1, 7]。

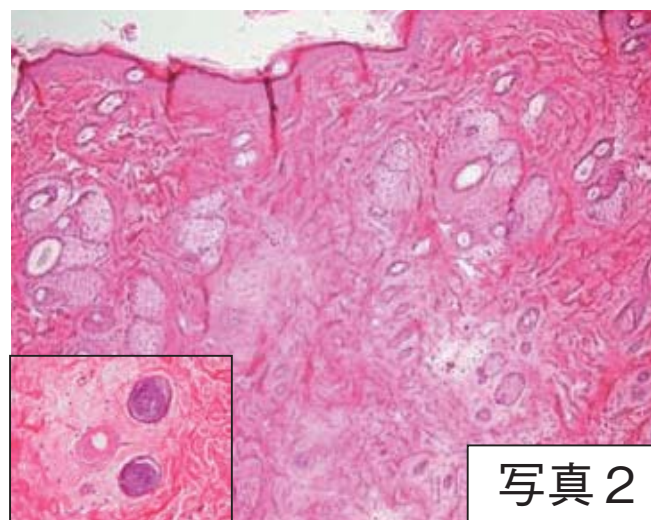
以上の研究成果と、関連する論文に基づいて皮膚の創傷治癒に出現するマクロファージの特性を図2にまとめた。

## 2-2. MHCクラスIIと galectin-3 を発現するマクロファージ

### 2-2-1. MHCクラスII発現マクロファージ：

MHCクラスII発現マクロファージは、受創後3日の炎症相からその後の増殖相、さらには修復相の





26日まで恒常的に増加していた [2]。特に、受創後 15 日の増殖相で最も増加していた。二重免疫染色を行ったところ、CD68 あるいは CD163 発現マクロファージに、MHC クラス II を共発現する細胞が存在していた。MHC クラス II 発現マクロファージは、抗原提示能に加え M1 型と M2 型の特性を併せ持つことが示された。なお、CD68/MHC クラス II 共発現細胞は約 40% で、CD163/MHC クラス II 共発現細胞は約 15% であり、MHC クラス II 発現マクロファージは M1 型に分極化する傾向にあった。

MHC クラス II 発現細胞は MHC クラス II 分子を介し T 細胞に抗原を提示することで、複雑な免疫機能の誘導に係わる。慢性病変にはリンパ球の浸潤がみられることから、傷害組織の残屑を貪食する MHC クラス II 発現マクロファージの慢性病変形成への係わりは今後興味ある研究課題である。

2-2-2. Galectin-3 発現マクロファージ: Galectin-3 は、レクチンファミリーに属する糖結合タンパク質で、様々な細胞から産生されるが、炎症部位では浸潤マクロファージに発現するとされる。皮膚の創傷治癒モデルにおいて、galectin-3 発現細胞は、受創後 1 日の炎症相ですでに著しく増加しており、その後増殖相から修復相にかけて徐々に減少するものの、その発現は高いレベルで維持されていた [2]。この出現パターンは CD68 発現 M1 型とほぼ一致した。二重免疫染色を行ったところ galectin-3 発現細胞の 80% 以上が CD68 を共発現していた。Galectin-3 は、血中単球からのマクロファージへ

の分化誘導や貪食活性に係わる以外に、TGF- $\beta$ 1 介在性の筋線維芽細胞の形成や膠原線維の産生を促すことで線維化において重要な役割を演じるとされる。創傷治癒モデルにおける galectin-3 の恒常的な発現は、皮膚受創後の炎症相、増殖相、そして修復相に係わるマクロファージの機能全般を俯瞰的に規定している可能性がある。

### 2-3. 上皮化、血管新生と筋線維芽細胞の形成に係わるマクロファージ

2-3-1. 上皮化: 損傷した表皮の創縁に存在する基底細胞が基底膜との結合を弛めて、創床面に向かって遊走・増殖・分化することで、表皮が再生する。また、このような上皮化には、創床近接の毛包のバルジに存在する毛上皮の幹細胞も係わるとされる [8]。すなわち、バルジの上皮幹細胞が毛包の狭部から漏斗部を経て傷害された創面を遊走し、分化しつつ創床を覆い表皮が再生すると考えられる。上皮化には、EGF が重要な因子である。EGF は、通常は唾液腺から分泌される因子であるが、傷害部位に浸潤したマクロファージなどの炎症細胞からも産生されると考えられている [5, 9]。

2-3-2. 血管新生: 肉芽組織の構成成分である新生血管は、組織修復に係わる炎症細胞の誘導や栄養成分の供給において重要である。傷害された血管の断端から、基底膜に沿って毛細血管の芽が生じ、分裂・増殖しつつ、遊走することで、新たな血管腔が構築される。bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) と VEGF (血管内皮増殖因子) は、そのレセプター

を有する内皮細胞を誘導することで新生血管の形成に係わる重要な因子である [5]。腫瘍免疫においては、腫瘍の悪性化に係わる血管新生は M2 型が関与するとされる [10, 11]。CD163 発現 M2 型は、肉芽組織相に一致して増加していたことから、血管新生に関与する因子は M2 型から産生されると考えられる。

2-3-3：筋線維芽細胞：肉芽組織の構成成分である筋線維芽細胞は膠原線維を産生することで修復性の線維化に係わる (写真 1 挿入：筋線維芽細胞の増生)。それには M2 型から産生される TGF- $\beta$ 1 が最も強力な線維原性因子とされる。血液凝固に係わる血小板由来の増殖因子である PDGF は、筋線維芽細胞の形成において TGF- $\beta$ 1 の作用を増強させる [12]。また、NGF (神経成長因子) は、既存の線維芽細胞を増殖させることで、筋線維芽細胞の誘導に係わるとされる。この NGF は既存の線維芽細胞から産生されるが、唾液にも含まれており [13, 14]、よって動物が傷口を舐める行為は、その修復においてある意味理にかなっているのかもしれない。この筋線維芽細胞は  $\alpha$ -SMA を有することから拘縮細胞とも呼ばれ、創口に対して直角に配列することで、傷口を力学的に収縮させるように、まさに巾着袋のように、機能しているとされる。

皮膚の創傷治癒モデルにおいて、筋線維芽細胞は、既存の線維芽細胞に加え、間葉系幹細胞マーカーである Thy-1 や A3 抗原を発現する血管周皮細胞や毛根鞘細胞から生ずると考えられている [3]。

#### 2-4. 皮膚硬化症モデルに出現するマクロファージ

抗癌剤であるブレオマイシンは、肺線維症のモデル動物の作製に使用されている。そこで、ブレオマイシンを 4 週間に亘り連日皮下投与することでラット皮膚硬化症モデルの作製を試み成功した [15, 16]。初回投与後 1、2、3 そして 4 週と経時的に病変を採材した。ブレオマイシン投与 1 週後より、皮下組織には、炎症細胞の出現を伴い束状あるいは波状に、かつ肥厚した膠原線維が不規則に配列しつつ、徐々に増加し始めた。興味ある所見として、ブレオマイシンの毒性として毛根構成細胞はアポトーシスに陥り、そのような毛根周囲に膠原線維が異常に増加していた。さらに、3 週や 4 週後では膠原線維の増加

により病変部位は硝子化 (写真 2；投与後 4 週の病変) し、一見ケロイドのような癬痕組織となった (写真 2 挿入：毛根周囲の癬痕)。傷害された毛包は、脱毛し、その周囲には、アポトーシスに陥った細胞を貪食排除するマクロファージが数多く出現していた。マクロファージの動態を解析したところ、CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型は、どちらも投与後 1 週から 4 週の間恒常的に増加していた [15]。なお、マクロファージの誘導・活性化に係わる MCP-1 と CSF-1 や、膠原線維の形成に係わる TGF- $\beta$ 1 などの因子も投与期間中常に増加していた。ブレオマイシン誘発の皮膚硬化症モデルでは、M1 型による組織傷害と同時に M2 型による線維化が進展するものの、それが慢性的に持続するために、傷害から治癒に至る相互の巧みな連携が破綻し、その結果不完全治癒であるケロイド様の癬痕が惹起されたと考えられた。

この皮膚硬化症モデルでは、MHC クラス II 発現マクロファージは、投与後 2 週から 4 週の間増加し続け、特に癬痕化しつつある毛根周囲に分布する特徴があった [15]。さらに、galectin-3 発現細胞は投与後 1 週から 4 週の間恒常的に増加していた。Galectin-3 発現細胞は創傷治癒モデルでは CD68 発現 M1 型に限られていたが、皮膚硬化症モデルでは、CD68、CD163、そして MHC クラス II 発現のほぼ全てのマクロファージに、さらに筋線維芽細胞にも galectin-3 の発現が見られた。Galectin-3 は、マクロファージ機能の活性化や膠原線維の産生に関与することから、ケロイドのような難治性の皮膚硬化症の形成には、多様な細胞から発現している galectin-3 が重要な役割を演じているのかもしれない [15]。

なお、ブレオマイシン誘発皮膚硬化症モデルでは、血管周皮細胞と毛根鞘細胞で間葉系の幹細胞マーカーの強い発現があり、その発現は創傷治癒モデルよりもかなり高度であった。これは、間葉系幹細胞から筋線維芽細胞がより強力に分化・誘導されている所見と考えられた。難治性の皮膚硬化症を誘導する機序として、マクロファージの機能破綻に加え、間葉系幹細胞の関与の重要性が示された [16]。

#### 2-5. 「創にキズあり、傷にキズなし」

皮膚に生じた深い創は創傷と称され、その治癒過

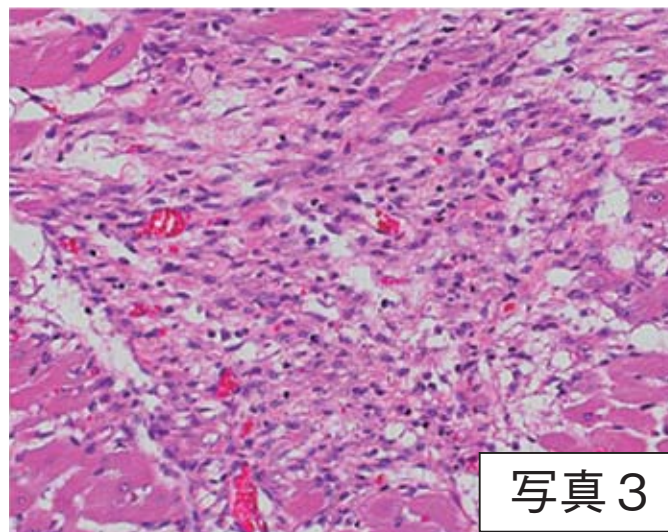


写真 3

程に係わるマクロファージについては上述した。一方、擦り傷や切り傷などの軽度の皮膚のキズならば、漏れ出した血液が凝固し痂皮（かさぶた）を形成し、その下方で周囲の基底細胞が進展することで表皮が再生する。その際、皮膚常在の細菌が凝固した血液を栄養として増殖することがある。そのような病原体は、フィブリンによる被包化や、補体 / 抗体関与のオプソニン化を受け、浸潤してきた好中球やマクロファージなどの食細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれ、リソソーム内で消化酵素や酸素依存性に生成される活性酸素種により無毒化される。皮膚の軽度のキズに出現するマクロファージの多くは機能的に M1 型と考えられる。

### 3. 心筋の創傷治癒モデルに出現するマクロファージ

広範囲の心筋傷害や、刺激伝導系に影響を与えるような心筋傷害であれば急性心不全で死に至る。一方、そうでなければ、心筋に生じる傷害は皮膚の創傷治癒と同様の経過をたどる。イソプロテレノールを投与されたラットでは、その毒性変化として左心室内膜下心筋に凝固壊死が生じ、投与後 1 日より水腫と炎症細胞の浸潤がみられ、3 日と 5 日では炎症細胞の浸潤がより顕著となり血管新生や筋線維芽細胞の形成を伴い肉芽組織が生じ始める。その後、投与後 7 日ごろから、肉芽組織に膠原線維が増生し修復性線維化が進む（写真 3：投与後 7 日の肉芽組織）。膠原線維の増生は投与後 14 日に最も高度となる。

その後投与後 21 日と 28 日にかけては、細胞成分が徐々に消失し、器質化する [7, 17]。程度にもよるが、傷害部位は心筋に置き換わることなく、瘢痕組織として残る。虚血性心筋梗塞は、イソプロテレノール投与の実験モデルと同じ創傷治癒の経緯をたどる代表例である。

このモデルにおけるマクロファージの特性を解析した（図 2） [17]。その結果、CD68 発現 M1 マクロファージは、投与後 1 日ですでに著しく増加しており、3 日でピークとなり、それは 7 日まで続き、その後急に減少した。一方、CD163 発現 M2 マクロファージは、投与後 7 日から出現し始め、その後 28 日まで持続的に増加した。M2 型の出現は傷害組織の肉芽組織・線維化・瘢痕形成の時期に一致していた。マクロファージの誘導に係わる MCP-1 と単球系マーカーである CCR2 の増加が CD68 発現 M1 型の増加し始める時期と一致していた。これは、血中単球が滲出・遊走することで M1 型が誘導・活性化されることを示唆する。なお、CD68 と CD163 を共発現するマクロファージは 3% 以下と極めて少なかった。心筋の創傷治癒では、傷害早期に M1 型が出現し、入れ替わるようにその後 M2 型が出現することが分かった。明らかな M1/M2 分極化があった。

なお、MHC クラス II 発現マクロファージは投与後 3 日から 7 日にかけて、galectin-3 発現マクロファージは投与後 3 日に一過性に増加した [17]。皮膚創傷治癒では、これらマクロファージは損傷か



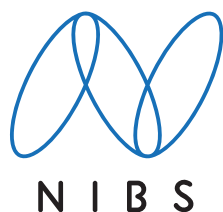
ら治癒まで恒常的に増加しており、その出現動態は心筋の創傷治癒とは異なっていることが示された。皮膚と心筋の創傷治癒における MHC クラス II と galectin-3 発現細胞の機能的な役割の違いについては今後の検討課題である。

### まとめ

皮膚の創傷治癒では、CD68 発現 M1 マクロファージは、傷害後早期に出現し、炎症相において炎症の進展に重要な役割を演じること、CD163 発現 M2 マクロファージはその後遅れて増殖相において出現し、肉芽組織の形成に係わることが分かった。また、心筋の創傷治癒においても、M1 型が早期の炎症時に、そして入れ替わるように M2 型が遅れて出現し肉芽組織や線維化の形成に関与することが示された。皮膚と心筋の組織傷害後の治癒過程において M1/M2 分極化が存在した。また、免疫機能に係わる MHC クラス II や、線維化に係わる galectin-3 を発現するマクロファージの関与も示された。創傷治癒は合目的な生命現象である。そこには、M1 型と M2 型が、それぞれが持つ機能を効果的に発揮しつつ、かつ巧みに連携プレイを演じていることが分かった。まさに多細胞生物の神秘である。一方、皮膚硬化症では、M1 型と M2 型の連携が破綻した病態と捉えることができる。第 3 回においては「マクロファージと肝毒性」を紹介する。

### 参考文献：

1. Golbar Md. and Yamate J. 2012. Review, ISBN : 978-1-6208-162-7. *Nova Scientific Publication Inc.*
2. Juniantito V., et al. 2011. *J Comp Pathol*, 145 : 378-389.
3. Juniantito V., et al. 2012. *Histol Histopathol*, 27 : 515-527.
4. Yamate J., et al. 2001. *Toxicol Pathol*, 29 : 483-491.
5. 高橋潔, 内藤眞, 竹屋元裕. 2001 年. 生命を支えるマクロファージ. 文光堂.
6. Mori Y., et al. 2009. *Toxicol Pathol*, 37 : 463-473.
7. Koga M., et al. 2019. *J Vet Med Sci*, 81 : 127-133.
8. Katou-Ichikawa C., et al. 2020. *Int J Mol Sci*, 21 : 3806.
9. Schaffer C. J. and Nanney L. B. 1996. *Int Rev Cytol*, 169 : 151-181.
10. Yaddanapudi K., et al. 2013. *J Immunol*, 190 : 2984-2993.
11. Bondoc A., et al. 2017. *Cancer Microenviron*, 10 : 9-24.
12. Yamate J., et al. 2005. *Exp Toxicol Pathol*, 57 : 135-147.
13. Schenck K., et al. 2017. *Int J Mol Sci*, 18 : 386.
14. 山手丈至. 2011 年. *Biophilia* (生命科学の未来を考える), 7 巻 : 44-50.
15. Juniantito V., et al. 2012. *Vet Pathol*, 50 : 76-85.
16. Juniantito V., et al. 2013. *Exp Toxicol Pathol*. 65 : 567-577.
17. Koga M., et al. 2021. *Toxicol Pathol*, 49 : 1048-1061.



—— テーマは「生命の連鎖」——  
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和 30 年 9 月 1 日創刊(年 4 回発行)  
 (通巻 622 号) 令和 3 年 12 月 25 日印刷 令和 4 年 1 月 1 日発行(第 68 巻第 1 号)  
 発行所 一般財団法人日本生物科学研究所  
 〒198-0024 東京都青梅市新町 9 丁目 2221 番地の 1  
 TEL : 0428(33)1520(経営企画部) FAX : 0428(31)6166  
 URL : <http://nibs.lin.gr.jp/>  
 発行人 土屋耕太郎

編集室 委員/古澤貴章(委員長)、古賀早織、高橋真理  
 事務/経営企画部  
 印刷所 株式会社 精興社  
 (無断転載を禁ず)