

# 日生研おより

第68巻 第2号(通巻623号) 2022年(令和4年)4月

## 挨拶・巻頭言

ポストコロナへの挑戦  
..... 笹川千尋 (2)

## レビュー

マクロファージ病理学  
第3回: マクロファージと肝毒性(その1)  
..... 山手丈至 (3)

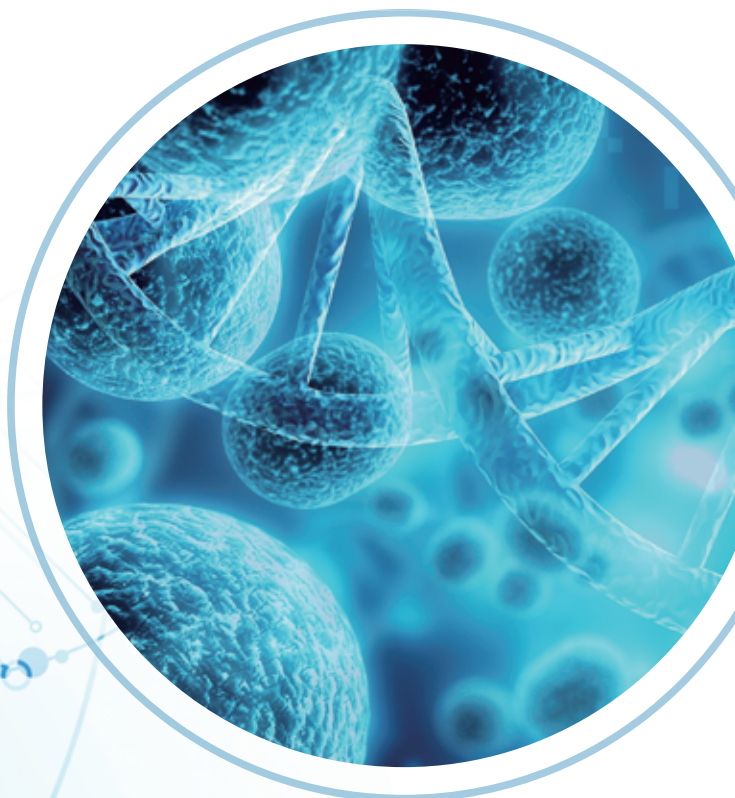
腸内菌叢と感染症研究  
..... 平山和宏 (10)

## 記録

学会発表演題 ..... (16)

## おしらせ

編集後記 ..... (16)



## ポストコロナへの挑戦

笹川千尋

コロナ禍も3年目に入りパンデミックの収束を期待する報道も増えつつありますが、「大自然を見くびってはならない」との教訓を改めて思い知らされる日々が続いています。世界はコロナ禍に加え、今この拙文に筆を入れている最中にも、大国の覇権主義による国際的な抗争（戦禍）の危機が迫り、二つの“禍”に翻弄される日々遭遇している虚しさを感じます。いずれも、人間社会が引き起こした惨禍として歴史に長く記されるでしょうが、世界の人々が互いに助け合い速やかに克服されることを願うばかりです。

“禍”の歴史を見ると、惨禍においては科学・技術の革命的進歩が見られます。過去2年半に及ぶコロナ禍でも、従来の価値基準では予測できなかった破壊的技術、すなわち「破壊的イノベーション」を間近に多く見ることができます。医療に革命をもたらした「破壊的イノベーション」として、新型コロナウイルス mRNA ワクチン（RNA ワクチンと略す）があげられます。世界中の人々に接種され「コロナ禍で神がヒトに与えた宝物」とも言われる RNA ワクチンは、ワクチン学にパラダイムシフトをもたらしましたが、ご存知のようにヒトや動物用ワクチン開発では、基礎研究から20年以上の歳月を費やして開発・承認されることは珍しいことではありません。RNA ワクチン開発もこの例に漏れません。開発者達は、従来のワクチン概念に埋没することなく、一心に「真髄をつく基礎研究は応用に繋がる」の格言を信じて幾多の難関を克服し、安全性と有効性に優れた RNA ワクチンを作り上げ、多くの人命を救ったことには驚嘆させられます。

一方で、コロナ禍の社会活動でも様々なイノベーション（変革・新機軸）が起こり、新たな価値が生み出されていることにも気付かされます。パンデミックで対面会議や打ち合わせが制限され、在宅勤務も増えた結果、Web による会議がすっかり定着しました。即ち、情報やコミュニケーションのアナログからデジタルへの急激なシフトが世界中で起こりました。それに伴い「ニューノーマル（新しい常態）時代」における人と組織のあり方にも急激な変革がもたらされています。同時に製造業界でも「サプライチェーン戦略の抜本的な見直し」や、「カーボンニュートラル（脱炭素社会）に伴うグリーン成長戦略」等、新たな分野においてパラダイムシフトをもたらす破壊的イノベーションがグローバルな規模で、急ピッチに進行していることを見ることができます。さらに第5次産業革命の担い手となる、例えば AI・ビッグデータを駆使したデータサイエンス技術とバイオテクノロジー・医療技術・ゲノム医療の融合、メタバース（バーチャル空間）によるイベントやマーケティング戦略等の到来も、このコロナ禍で一挙に縮まったと言われています。

さて冒頭にも触れたポストコロナの到来までに解決すべき命題でもある「新型コロナウイルスはどこからきてどこに向かうのか？」の研究においても、獣医学、微生物学、疫学、数理統計学、情報生命科学などの新進気鋭の研究者により新たなパラダイムが生まれつつあります。鳥インフルエンザやアフリカ豚熱をはじめとするグローバルな新興・再興感染症の包括的対策につながるイノベーションも、彼らからもたらされることを願ってやみません。

（所長）

## マクロファージ病理学 第3回：マクロファージと肝毒性（その1）

山手丈至（大阪府立大学名誉教授）

### はじめに（毒性とは……）

「日生研たより」の読者の方には、「感染症」・「ワクチン」がキーワードとなる職域の方が多いかと拝察します。「毒性」と聞くと異分野のイメージをもたれるかもしれません。しかし、よくよく考えると、細菌は、LPS（リポポリサッカライド）のような内毒素や、ジフテリア毒素などの外毒素を産生することで、そしてウイルスは感染細胞に侵入・増殖することで

タンパク質や核酸を破壊し、その結果細胞が傷害される。化学物質による細胞毒性は、母化合物やその中間代謝物により細胞の構成成分（膜、核酸、小器官）が傷害されることで生じる（図1）。もちろんそれぞれ複雑なメカニズムは存在するが、微生物も化学物質も細胞を傷害するという点においては同じである。さらに、微生物では、感染するとまず自然免疫が、その後獲得免疫による液性免疫と細胞性免疫が働き、感染防御が機能する。それには、微生物由来の

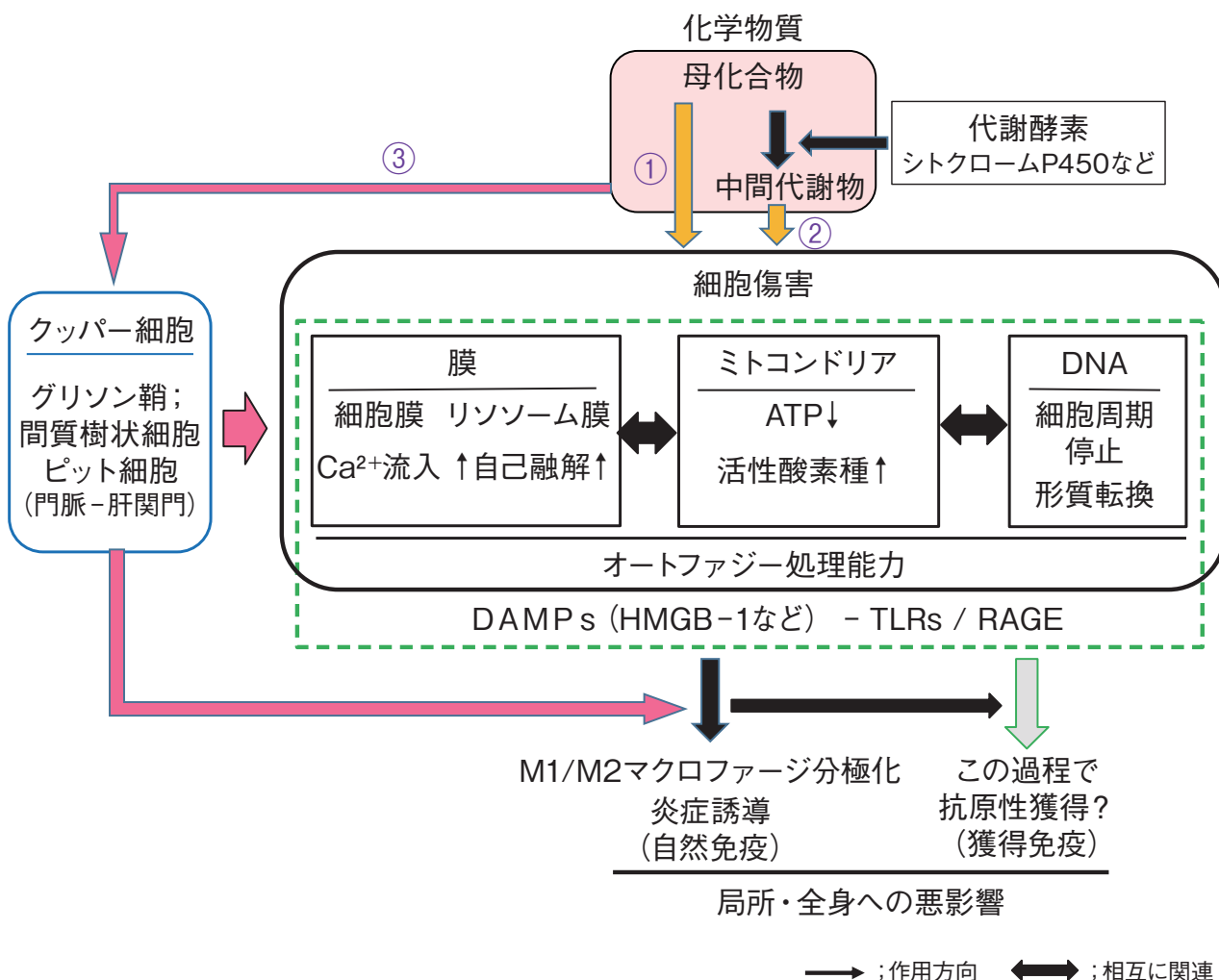


図1 化学物質誘発肝毒性の発現メカニズム（本文参照）

PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) が一役を演じる。一方、化学物質では、その曝露により、傷害された細胞から、DAMPs (damage-associated molecular patterns) が放出される。DAMPs は自然免疫を誘導することで炎症反応を導く。さらには、その機序は未だ不明な点が多いが「薬物アレルギー」が惹起されることがある。特に、ペニシリン系やセフェム系の抗生物質は、獲得免疫に係わるアナフィラキシーを誘起する恐れがある。微生物や化学物質が引き起こすこのような免疫応答は、傷害局所のみならず、さらには、全身に悪影響をもたらすことがある (図1)。

さて、前置きが長くなったが、肝固有のマクロファージ (クッパー細胞やグリソン鞘間質樹状細胞) は肝構成細胞の約 20% を占め、解毒、異物除去、そして増殖因子を産生することで、生体の恒常性維持に係わっている。化学物質の多くは、肝臓で代謝されることから、肝マクロファージの機能異常は恒常性の破綻を招く。しかし、肝毒性の研究の多くは、化学物質の母化合物 (図1の①) やその中間代謝物 (②) の毒作用に焦点が置かれ、化学物質と生体が織りなす現象、すなわち肝マクロファージに係わる生命現象 (③) に基づいた肝毒性の発現機序に関する研究はほとんど行われていない [1]。マクロファージは、自然免疫にも獲得免疫にも係わる細胞群である。

第3回では、肝臓の恒常性維持と、化学物質による肝毒性に関与するマクロファージの機能特性について、M1/M2 分極化の観点で解析した研究成果を基に「その1」と「その2」に分けて紹介する。「その1」では、肝恒常性維持と、化学物質による急性肝障害に係わるマクロファージ機能について、「その2」(次号)では、クッパー細胞を介した肝毒性と、肝硬変などの慢性病変に出現するマクロファージの役割について紹介する。

## 1. 肝発生過程の肝マクロファージの特性

ラットの肝発生過程に出現するマクロファージの特性を解析した。その結果、胎子では、CD68 発現 M1 型 (いわゆる原始/胎生マクロファージ) が数多く出現し、肝造血で役割を終えたアポトーシス小体を貪食することで、肝臓の組織発生に係わることが分かった。また、生後においては、M1 型は減じられるが、代わって CD163 発現 M2 型が出現しはじめ、肝組織が完成する生後 15 日ごろまで増加した。組織形態の形成に伴い CD163 発現 M2 型は、類洞に沿って配列し、いわゆるクッパー細胞として機能しはじめた。なお、クッパー細胞には脂質代謝と関連する CD204 の発現も認められた。MHC クラス II 発現マクロファージも生後出現しはじめるが、その増加は一過性で、肝臓の組織形態が完成するのに伴い減少し、成体の肝臓ではそのほとんどがグリソン鞘に分布した。これは、間質樹状細胞として機能する。新生子期に出現するマクロファージは CSF-1 や IGF-1 を産生することで細胞分化や組織の成熟を促すとされる [2, 3]。

すなわち、肝発生過程で出現するマクロファージは、胎生期には貪食活性の高い CD68 発現 M1 型が、新生子期には、クッパー細胞となる CD163 発現 M2 型と、樹状細胞として機能する MHC クラス II 発現抗原提示細胞が機能し、肝臓のモデリングが進展することが示された。肝発生過程に依存してマクロファージ機能が異なることが分かった [2, 3]。

## 2. 肝マクロファージと恒常性維持

ラットに毒性のないリポソームを投与すると、それを貪食した CD163 発現クッパー細胞は増数し、細胞質が肥大化した。一方、リポソーム包含クロドロネートを投与するとそれを貪食したクッパー細胞は、クロドロネートの毒性でアポトーシスにより枯



渴した。興味ある所見として、肝逸脱酵素である AST と ALT の値は、リポソームによるクッパー細胞活性化状態では低下し、クロドロネート投与によるクッパー細胞枯渇下では増加した。どちらの状態（クッパー細胞の活性あるいは枯渇）においても、肝細胞には形態学的な異常はみられなかった。すなわち、肝マクロファージ、特にクッパー細胞は、肝逸脱酵素のクリアランスに係わることが示された [4, 5]。クッパー細胞の機能状態を把握しておくことは肝毒性における血液生化学的な解析結果を評価する上で重要である。

### 3. 化学物質誘発肝障害に出現するマクロファージの特性

3-1. チオアセトアミド (TAA) 誘発ラット肝障害；TAA は、薬物代謝酵素である CYP2E1 や flavin-containing monooxygenase (FMO3) により生成された中間代謝物が肝毒性を惹起する。投与後 10 時間では異常はみられないが、投与後 1 日で肝小葉中心性の凝固壊死を誘起 (写真 1) し、1 日と 2 日で炎症細胞が浸潤し、3 日と 5 日には線維化が生じ、7 日までには肝細胞は再生し、修復した [6-8]。

3-1-1. M1/M2 型マクロファージの出現；この病態推移において、CD68 発現 M1 型 (写真 2) と CD163 発現 M2 型 (写真 3) は、どちらも投与後 1

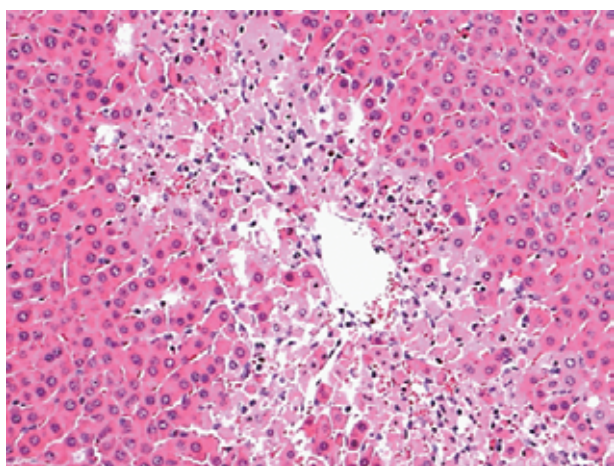


写真 1 肝小葉中心性凝固壊死 (HE 染色)

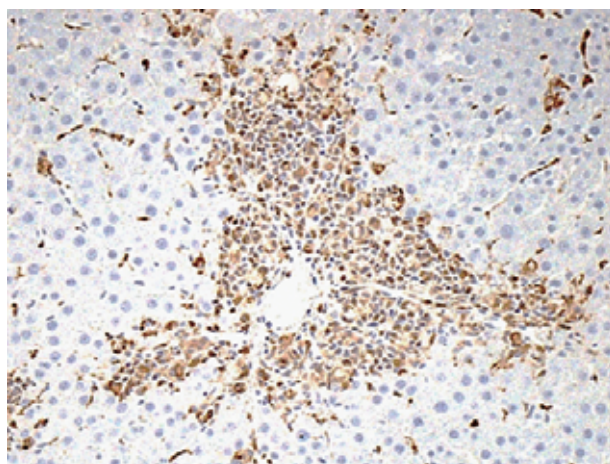


写真 2 M1 型 CD68 免疫陽性細胞

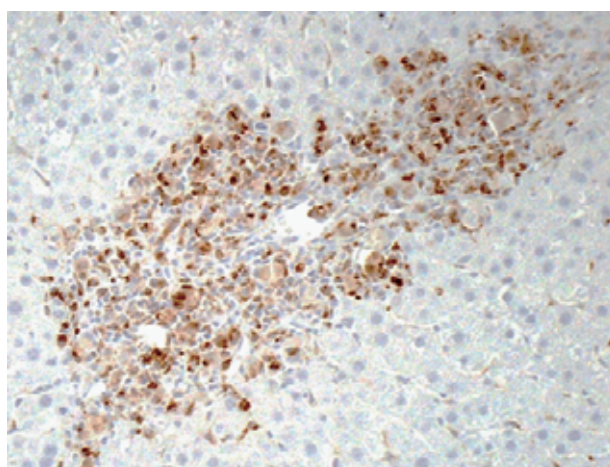


写真 3 M2 型 CD163 免疫陽性細胞

日と 2 日で増加した。TAA 誘発肝障害では、M1 型と M2 型が同時に出現していた。CD68 は、リソソーム膜に位置し、その発現の増強は活発な貪食活性の指標とされる。貪食能に加え、CD68 発現 M1 型は、炎症誘導に係わるとされる。CD163 は、ヘモグロビン-ハプトグロビン複合体のスカベンジャーレセプターで、それを発現する M2 型は抗炎症作用と修復性線維化に関与するとされる (図 2)。

さらに、傷害部位に出現するマクロファージの機能特性を二重免疫染色で解析したところ、MHC クラス II と Iba-1 を発現するマクロファージは M1 型に、CD204 と galectin-3 発現マクロファージは M2 型に、それぞれ優位に分極していることを見出した。MHC クラス II 発現は抗原提示能と関連し、Iba-1 はアクチン架橋に基づく細胞の遊走能に係わる。また、CD204 はスカベンジャーレセプタータ

イプAで、マクロファージの泡沫化（脂質の取り込みと代謝）に係わるとされ、**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、マクロファージへの分化誘導や、**TGF- $\beta$**  介在性の筋線維芽細胞の形成と膠原線維の産生を促すとされる。M1型あるいはM2型のマクロファージには多彩な機能が備わっていること、そしてその機能特異性は免疫組織化学的に評価できることが示された [6-8]。

3-1-2. 「門脈-肝関門」と肝毒性；TAA 誘発肝障害では、投与後1日で小葉中心部に肝細胞の凝固壊死が誘起されるが、投与後10時間では組織学的な異常は未だ生じていない。実際、小葉中心部にはM1/M2型マクロファージの浸潤も認められない。しかし、詳細な解析を進めたところ大きなイベントがグリソン鞘を中心に生じつつあることが分かった。それは、グリソン鞘と門脈周囲領域において、投与後10時間で、CD68発現M1型やCD163発現M2型のマクロファージの出現はみられないにも拘わらず、MHCクラスII発現マクロファージとCD204発現マクロファージ、さらにgranzyme B発現の

NK細胞（肝固有のピット細胞）が、顕著に増加し活性化していることが示された。また、M1型とM2型の誘導に係わるそれぞれIFN- $\gamma$ とIL-4の発現が、投与後10時間のポイントですでに有意に増加していることも示された。肝臓の血行動態において、門脈血はグリソン鞘にある小葉間静脈を経て、類洞を経由し、中心静脈に流入する。すなわち、投与された化学物質は、グリソン鞘とその周辺にある既存の間質樹状細胞（MHCクラスII発現）やCD204細胞、そしてピット細胞により異物としてまず認識されている可能性が示された。その結果、活性化したそれら細胞からIFN- $\gamma$ やIL-4が産生され、その後続く小葉中心性の肝細胞傷害部位にCD68発現M1型とCD163発現M2型のマクロファージをそれぞれ誘導していると考えられた（図2）。

グリソン鞘にはMHCクラスII発現マクロファージやピット細胞が通常存在している。これら細胞は「門脈-肝関門」として自然免疫の機能を果たしている可能性が考えられた（図1）。また、投与後10時間では、M1型因子であるTNF- $\alpha$ や

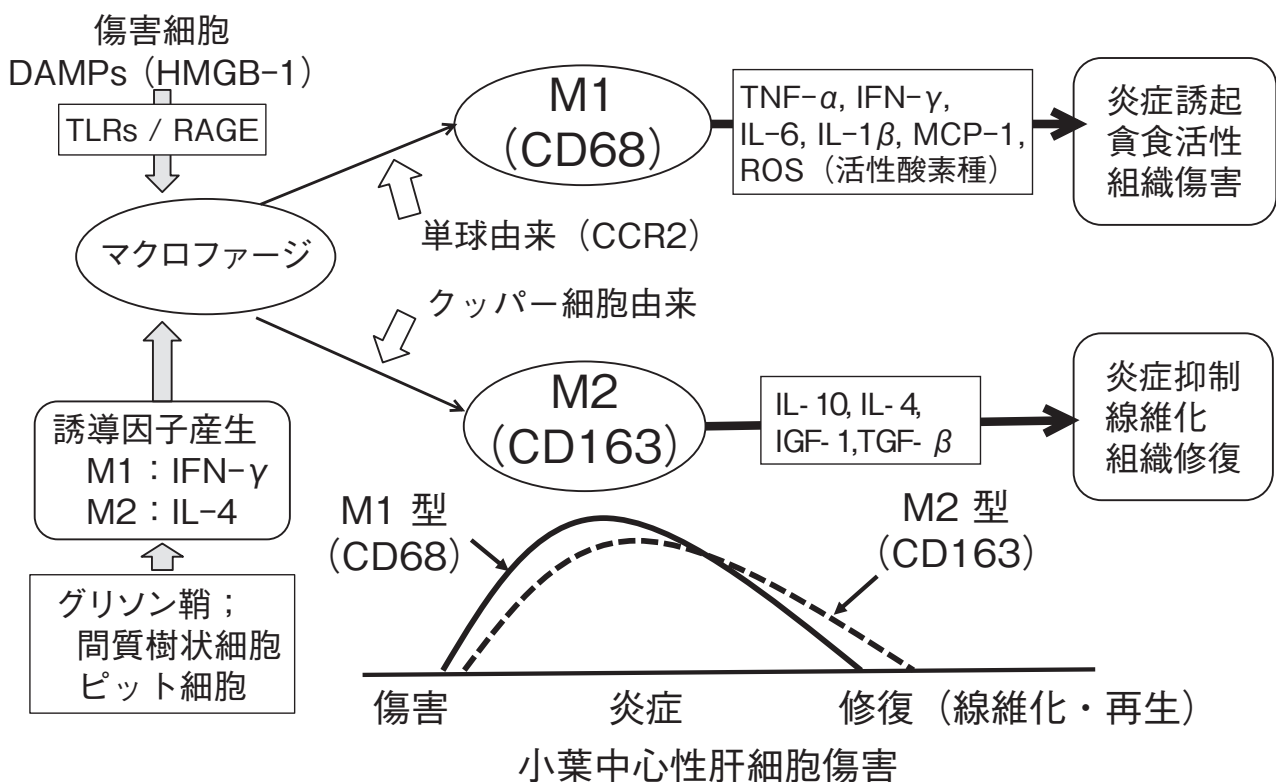


図2 小葉中心性肝細胞傷害部位に出現するマクロファージの特性 (本文参照)



IL-6 もすでに増加しており、MHC クラス II 発現マクロファージが M1 型として機能しはじめている可能性がある。一方、抗炎症作用や線維化に係わる M2 型因子である IL-10 や TGF- $\beta$  の発現は、CD163 発現 M2 型の増加に伴い投与後 2 日と 3 日に上昇しており、その後の修復性の線維化を誘導していると考えられた (図 2) [8]。

3-1-3. マクロファージ枯渇条件下での肝障害；クロドロネートの投与は、クッパー細胞やグリソン鞘間質樹状細胞など、肝マクロファージのほとんどを枯渇させる [6, 9]。クロドロネート前処置による肝マクロファージの枯渇状態での TAA 誘発肝障害の病態を解析した。その結果、TAA により生じる肝小葉中心性の凝固壊死が遷延し、その部位に出現すべき CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型のマクロファージは、どちらもほとんど観察されなかった。すなわち、クロドロネート投与により傷害部位の炎症反応が抑制されていた。さらには、遷延した凝固壊死部位に異栄養性石灰沈着が生じ、肝細胞は再生できず元の組織に復することはなかった (写真 4)。これは M1 型の枯渇による傷害組織の異物除去作用の欠失と、M2 型が機能していないことによる線維原性因子の産生低下による修復性線維化の欠如が、肝細胞傷害後の治癒帰転を阻害していると考えられた。すなわち、M1 型と M2 型が適切な時期に

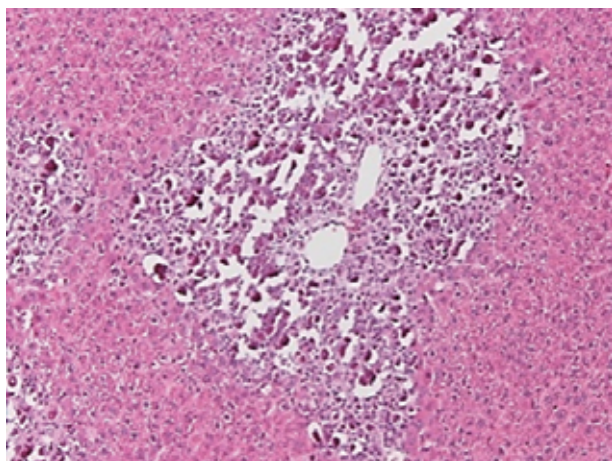


写真 4 異栄養性石灰沈着 (HE 染色)

効果的に機能することが肝細胞傷害後の組織修復において重要であることが分かった。これは、また、マクロファージ機能に依存し肝毒性の病態が修飾されることを意味する (図 1 の③) [10]。

3-1-4. ダメージ関連分子パターン (DAMPs) と肝毒性；DAMPs は、生理的状态の細胞内に存在する低分子の総称で、細胞が傷害されることで細胞外に放出され TLRs などの自然免疫に係わる受容体を介して炎症を誘導すると考えられている。DAMPs には high mobility group box (HMGB-1 と -2)、S100 proteins や heat shock proteins などがある [11]。そこで、TAA 誘発肝障害で増加することを確認した HMGB-1 に注目して解析したところ、正常肝細胞では HMGB-1 は核内に位置しているが、TAA 投与後 10 時間においては核から細胞質に移行しはじめ、投与後 1 日では傷害された肝細胞の細胞質に数多く認められた。また、TLR-4 の発現増加も確認された [11]。これら所見は、放出された HMGB-1 が TLRs を介して炎症誘導に係わっている可能性を示唆する [11, 12]。そこで、TAA 投与直後に、HMGB-1 中和抗体を処置することで TAA 誘発の肝毒性の病態を解析したところ、中和抗体投与群において、TAA 投与の中和抗体非投与群に比較し、肝逸脱酵素の低下、マクロファージ反応の軽減、M1 型炎症性サイトカイン (IL-6) の減少がみられ、さらには、初期の炎症細胞として誘導される好中球やその遊走因子であるケモカイン CXCL1 の発現も抑制されていた。すなわち、HMGB-1 中和抗体の投与により炎症反応が減ることによって TAA 誘発肝障害の程度が軽減されたことが示された。傷害肝細胞から放出される HMGB-1 は炎症誘導のトリガーとして機能している可能性がある (図 1 と図 2)。

3-2. アセトアミノフェン (APAP) 誘発ラット肝障害；上述するように TAA 誘発肝障害の形成にはマクロファージが重要な役割を演じること、そして、M1/M2 分極化によりその病態を評価できるこ

とを明らかにした。そこで、肝毒性を有する別の化学物質である APAP を用いてマクロファージ機能のさらなる解析を加えた。

3-2-1. APAP 投与による肝障害；APAP は解熱鎮痛剤として臨床的に広く利用されているが、誤って過剰に摂取すると肝障害を惹起する。APAP は、CYP2E1 により代謝された中間代謝物の *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) がタンパク質成分と共有結合することで肝細胞傷害を惹起する。NAPQI はグルタチオンの欠乏状態で毒性が増強することから、グルタチオン機能が低下する絶食状態のラットに APAP を投与することで肝障害を誘発することに成功した。これまで、APAP 肝障害は感受性の高いマウスモデルが利用されていたが、ラットで有用な肝病変を作製できたのはこれが初めてである [13]。

APAP 投与によるラットの肝病変は、投与後 10 時間では著変はないが、投与後 1 日に肝逸脱酵素の上昇を伴う小葉中心性の肝細胞凝固壊死と炎症細胞浸潤がみられ、2 日には炎症反応がより進み、投与後 3 日では修復性線維化が生じ、5 日までには回復した。肝小葉に生じる病態の推移は TAA 誘発肝病変と同様であった [13]。

3-2-2. M1/M2 型マクロファージの出現；CD68 発現 M1 型は投与後 1 日と 2 日に、M1 型関連因子 (IFN- $\gamma$ 、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-6) の増加を伴い出現した。CD163 発現 M2 型は投与後 2 日と 3 日に増加した。M2 型は M1 型よりやや遅れて増加していたが、M2 型関連因子である IL-4、IL-1 $\beta$  と TGF- $\beta$  は投与後 1 日と 2 日にすでに増加していたことから、APAP 誘発肝障害では、TAA 誘発肝障害と同様に、M1 型と M2 型がほぼ同時に機能していることが示された。

なお、CD68 発現 M1 型は、そのほとんどが CCR2 (単球系マーカー) を共発現しており、かつそのリガンドである MCP-1 (CCL2) や CCL7 の増加が

あった [6, 13]。一方、CD163 発現 M2 型では、CCR2 を共発現する細胞は少なく、CD163 発現 M2 型の多くは元来 CD163 を発現するクッパー細胞に由来すると考えられた。また、二重免疫染色により、TAA 誘発肝障害と同様に、MHC クラス II と Iba-1 発現マクロファージは M1 型に、CD204 発現マクロファージは M2 型に分極していた [13]。

3-2-3. HMGB-1 とオートファジー；HMGB-1 のタンパク質発現は投与後 10 時間で増加した。実際、投与後 10 時間と 1 日では肝細胞の核から細胞質に移行する HMGB-1 顆粒が観察された。DAMPs の受容体としてよく知られている TLR-2 と TLR-4 には大きな変動はなかったが、投与後 10 時間において、TLR-9 と、TLRs のシグナル系列のアダプターである MyD88 の発現が増加した。TAA 誘発肝障害と同様に HMGB-1 が起炎因子として起動していることが示された。オートファジーは、細胞内に生じた DAMPs 等の不要物を処理することで、細胞の恒常性維持に係わる [13, 14]。そこで、APAP 誘発肝障害でのオートファジーの特性を解析した。その結果、投与後 10 時間において、オートファゴゾームのマーカーである LC3B と、HMGB-1 をリガンドとしてオートファジーを促進する受容体 RAGE (糖化最終産物受容体) が増加していた。また、LC3B 免疫染色陽性のオートファゴゾームは、通常は肝細胞質において微細顆粒状に検出されるが、傷害肝細胞では大型で空胞状の異様な形態のオートファゴゾームが散見された。これは、オートファジーの機能破綻を示唆する所見かもしれない [13]。

3-2-4. APAP 誘発ラット肝障害の発現機序；TAA と同様に、APAP 誘発肝障害においても、肝小葉中心性に生じた凝固壊死部位に、CD68 発現 M1 型が出現し傷害細胞の貪食と炎症誘導が、そして CD163 発現 M2 型による抗炎症作用と修復性線維化が進むことで、肝組織が再生した (図 2)。また、これらマクロファージの出現に先立ち HMGB-1 と



その受容体である TLR-9 と RAGE の発現上昇がみられた。HMGB-1 は、TAA 誘発肝障害と同様に炎症のトリガーとして機能している可能性がある。また、HMGB-1 の出現に伴い、オートファジーが起動していることが分かった。神経変性疾患や免疫疾患など様々な病態においてオートファジーは重要な役割を担うことが報告されている [14]。肝毒性の初期誘導におけるオートファジーの詳細な役割はさらなる研究が必要であるが、異常な形態を示すオートファゴソームが観察されたことから、「DAMPs (HMGB-1) -オートファジー-M1/M2 マクロファージ分極化」を軸にした生体反応が、APAP 誘発肝毒性の発現メカニズムに関与していると考えられた (図 1)。

#### 4. プロメテウスの肝臓

ギリシャ神話に登場するプロメテウスは岩山で磔の刑に処せられ、その際に鷲エトンに生きながらにして肝臓を啄まれるが、不死である彼の肝臓は夜中には再生したとされる。肝組織の強い再生力は紀元前より知られていたようである。前号 (第 68 巻・第 1 号) で紹介した皮膚と心筋の創傷治癒 (マクロファージ病理学第 2 回) では、組織傷害後 M1 型がまず現れ、その後数日遅れて M2 型が誘導されるとともに肉芽組織が形成されはじめ、器質化による線維化が生じつつその構成細胞が減じ、組織が修復される。傷害の程度や範囲にもよるが、この皮膚と心筋の創傷治癒の過程には数週間を要する。この過程で、M1 型と M2 型のマクロファージは、出現時期に応じ、明確な役割分担 (分極化) (図 2) を担い、それらが効果的に機能することで組織が復する。今回紹介した TAA と APAP 誘発の肝障害では、「細胞傷害⇒炎症⇒線維化⇒修復」が数日以内で完了した。まさに「プロメテウスの肝臓」である。これは、肝細胞傷害部位に、単球から動員される CD68 発現

M1 型と、クッパー細胞から誘導される CD163 発現 M2 型が、瞬時に効率よく機能することで良好なリモデリングが成立するものと考えられた (図 2)。

#### 5. 肝毒性評価手法の緻密化 (図 1)

化学物質の多くが肝臓で代謝される。クッパー細胞は肝逸脱酵素のクリアランスに係わっていることから、肝細胞自体に影響を与えない化学物質であっても、クッパー細胞に直接的な影響を及ぼし、その結果肝逸脱酵素が変動する可能性がある。化学物質の特性として、クッパー細胞への影響があるのか否かを把握する試験が必要となる。また、これまでの毒性試験では、母化合物 (図 1 の①) やシトクローム P450 などの薬物代謝酵素により生成される中間代謝物 (②) により惹起される肝細胞への毒作用のみが評価されていた。しかし、クロドロネート前処置により M1 型と M2 型のマクロファージを枯渇させると TAA 誘発肝病変が増悪したように、化学物質による病態は、出現するマクロファージの状態 (機能) に依存し大きく修飾される (③)。この M1/M2 型マクロファージの病変部位への初期誘導には「門脈-肝関門」として機能しているグリソン鞘既存の間質樹状細胞 (MHC クラス II 発現) やピット細胞に係わっている可能性がある。また、傷害細胞から放出される DAMPs、特に HMGB-1 が炎症のトリガーとなっている可能性も示され、それには、オートファジーの機能異常が関与していると考えられる (図 2)。生体反応としての「DAMPs (HMGB-1) -オートファジー-マクロファージ M1/M2 分極化」を軸にした新たな解析手法の構築は、肝毒性評価の緻密化に繋がると考える [15]。

#### まとめ

肝マクロファージは、肝臓の組織発生や恒常性維

持に重要であること、そして化学物質誘発の肝病変はマクロファージの M1/M2 分極化に基づいて評価できることを示した。また、そのようなマクロファージの起動には、「門脈-肝関門」構成細胞や、傷害肝細胞から放出される DAMPs、特に今回紹介した HMGB-1 が、そのトリガーとして関与している可能性が示された。このような肝マクロファージの反応には自然免疫が関わっている。しかし、この過程で抗原性を獲得するような物質（非自己）が生じれば、獲得免疫が誘導され、薬物アレルギーが惹起される可能性がある（図 2）。肝マクロファージ（クッパー細胞や間質樹状細胞）は多種多様な機能を有することから、肝毒性に係わるマクロファージの機能特性についてはさらなる解析が必要である。次号では、「その 2」として、肝固有のマクロファージであるクッパー細胞への影響を介した肝毒性と、肝硬変や胆管線維症に関与するマクロファージ機能について紹介する。

## 参考文献

1. Golbar Md. and Yamate J. 2012. Review, ISBN : 978-

1-6208-162-7. Nova Scientific Publication Inc.

2. Golbar Md., et al. 2012. *Exp Toxicol Pathol*, 64 : 1-8.

3. Matsuyama S., et al. 2018. *J Toxicol Pathol*, 31 : 207-212.

4. Pervin M., et al. 2016. *J Toxicol Pathol*, 29 : 139-44.

5. Pervin M., et al. 2016. *Exp Toxicol Pathol*, 68 : 113-124.

6. Mori Y., et al. 2009. *Toxicol Pathol*, 37 : 463-73.

7. Wijesundera K. K., et al. 2013. *Exp Toxicol Pathol*, 65 : 799-808.

8. Wijesundera K. K., et al. 2014. *Histol Histopathol*, 29 : 497-511.

9. Pervin M., et al. 2018. *Toxicol Pathol*, 46 : 540-552.

10. Golbar Md., et al. 2016. *Toxicol Pathol*, 44 : 246-58.

11. Kuramochi M., et al. 2016. *Exp Toxicol Pathol*, 68 : 471-477.

12. Kuramochi M., et al. 2021. *J Vet Med Sci*, 83 : 390-396.

13. Tsuji Y., et al. 2020. *Int J Mol Sci*, 21 : 8998.

14. Wu M. and Lu J. 2020. *Cells*, 9 : 70.

15. Yamate J., et al. 2016. *Food Saf (Tokyo)*, 4 : 61-73.

## レビュー

# 腸内菌叢と感染症研究

平山和宏（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医公衆衛生学教室）

## はじめに

我々の腸内には膨大な数の細菌が住んでいる。特に大腸には内容物 1g 当たり  $10^{11}$  個以上の多様な細菌がおり、互いに複雑に関係しあいながら安定した

生態系、すなわち腸内菌叢を構成している。腸内菌叢は宿主の代謝を上回るといわれる活発な代謝活性を有し、我々宿主とも密接な相互関係を持ちながらその健康や疾病、生理機能などに様々な影響を与えている。その影響は、宿主にとって有益な場合もあ

れば、有害な場合もある。近年では、免疫系の正常な発達に重要な役割を持つことや、肥満や糖尿病への関与など、腸管以外の全身への影響についての報告もみられる。行動や脳の機能への影響にも注目が集まっている。本稿では、腸内菌叢の宿主の感染防御に対する影響をご紹介します。

腸内菌叢が腸管における病原菌の感染を抑制する能力を持っているということは、非常に古くから言われていた。腸内菌叢の感染防御における役割は、これまで主として腸管における細菌感染に対する効果が研究されてきたが、最近ではウイルスなど細菌以外の感染に対する腸内菌叢の影響に関する研究もみられる。また、宿主の免疫系への影響を介して、肺など腸管以外の組織における感染防御についても腸内菌叢の重要な役割について報告がされている。

### 腸内菌叢の感染防御効果

経口的な抗菌性物質の投与による治療中あるいは治療直後に、抗菌薬耐性菌による感染が見られることがある。これは、抗菌性物質によって正常な腸内菌叢の構成がかく乱されると、本来腸内菌叢が持っている腸管感染に対する防御効果が失われることを示している。腸内菌叢の感染防御効果は、一般に「Colonization Resistance」とも呼ばれる。抗菌性物質の投与により、外来の病原菌に対する感受性が上昇するだけでなく、通常は腸内で低い菌数に抑制されている菌が過剰に増殖して感染を引き起こす例も知られている。例えば、抗菌性物質の投与による腸内菌叢のバランスの崩れに伴って *Clostridioides difficile* (2016年に *Clostridium* 属から *Clostridioides* 属に分類が変更になった) が大腸で増殖することによって起こる *C. difficile* 感染症は時として重篤な大腸炎を引き起こす。緑膿菌やブドウ球菌あるいは真菌などの感染力が弱いいわゆる日和見菌が、過剰に増殖して感染を引き起こすこともある。

感染防御における腸内菌叢の重要性は、動物実験でも証明されている。抗生物質処置によって腸内菌叢を抑制すると、マウス腸管への *Salmonella Typhimurium* の定着と消化管病変が引き起こされる [2]。腸内菌叢の総菌数が減少していなくても、そのバランスが乱れると *S. Typhimurium* 腸炎に対する感受性は上昇し、腸内菌叢のかく乱が大きいはら、*S. Typhimurium* の菌数が高く、腸炎も激しくなることが報告されている [17]。

無菌動物には腸内菌叢が全く存在していないため、腸内菌叢を持った通常の動物では感染や発症が起こらない病原菌でも、容易に感染が成立する。抗菌性物質を投与する必要がないので、薬剤耐性を持たない細菌についても感染症研究を行うことができる。無菌動物を利用することにより、感染症起因菌以外の菌株を同時に定着させ、特定の菌株 (菌種) の感染防御効果あるいは促進効果を調べることも可能になる。

近年では、ウイルスをはじめとする細菌以外の病原体による感染の防御にも腸内菌叢が関与していることが明らかになりつつある。そのような腸内菌叢の感染に対する影響は、腸管局所の感染にとどまらず、呼吸器などの消化管以外における感染にも及んでいる。例えば、無菌マウスは通常マウスに比べてインフルエンザ A ウイルスやコクサッキー B ウイルス、フレンドマウス白血病ウイルスなどの各種ウイルス感染に対する感受性が高いことが報告されており、マウスの常在腸内菌叢がウイルスの感染防御に対して何らかの効果を持っていることは明らかである [16]。また、様々な抗菌性物質でマウスを処置した研究では、インフルエンザ A ウイルスの感染防御に関与する菌群がネオマイシンに感受性のあるグループであることが示されている [10]。ヒトを対象とした臨床研究においては必ずしもすべての研究で明快な結果が得られているわけではないが、プロバイオティクスによる腸内菌叢への介入が呼吸



器感染症の症状を軽減することも報告されている。

逆に腸内菌叢の存在がウイルス感染を促進する場合があることも報告されている。抗菌性物質によって腸内菌叢を除菌したマウスでは、抗菌性物質で処理していないマウスに比べてポリオウイルスの感染が抑制され、ポリオウイルスが複製や感染の成立に何らかの形で腸内菌叢を利用していることが示唆された [14]。また、無菌マウスや抗生物質処置マウスでは、マウス乳腺腫瘍ウイルスが新生子に感染しないことから、レトロウイルスの感染成立における腸内菌叢の重要性が示唆されている [13]。腸内菌叢の存在はマウス乳腺腫瘍ウイルスの感染持続も促進する [12]。腸内菌叢の直接の影響ではないが、ヒト免疫不全ウイルス感染において腸管から体内移行した腸内菌叢構成菌由来のリポ多糖 (LPS) が、AIDS への進行を促進することも報告されている [4]。

さらに、寄生虫の感染にも腸内菌叢が関与していることが示唆されている。マウスの消化管上皮に侵入する線虫である *Trichuris muris* の虫卵からの孵化が、*in vitro* において腸内菌叢由来菌株の存在下で促進され、*in vivo* においても抗生物質による腸内菌叢の除菌によって *T. muris* のマウスへの寄生数が減少することが報告されている [9]。

## 腸内菌叢が感染防御に関与するメカニズム

### 直接作用

外来病原菌よりも先に腸内に存在している腸内菌叢は腸管の表面を覆うように定着しており、定着の場を競合することにより外来菌の腸管上皮細胞への到達に対する物理的な障害となる。また、多種の菌からなる腸内菌叢は多彩な代謝活性を有しており、栄養を競合することによっても外来菌の定着や感染の成立を阻害する。

腸内菌叢が産生する有機酸や過酸化物質、生体界面

活性剤などの代謝産物の中には、病原菌の増殖を抑制するものがある。有機酸は腸内の環境を酸性側に傾け、いわゆる有害菌の増殖を妨げる。一般に有機酸は無機酸に比べ、同じ pH の低下でも菌の抑制効果が大きい。腸内細菌の代謝の結果として生じる過酸化物質や生体界面活性剤も病原菌の宿主への定着阻害に関与している。これらの代謝産物は、直接にあるいは他の物質の抗菌作用を増強することにより、腸内菌叢の感染防御作用に寄与していると考えられる。

バクテリオシンのような抗菌性物質を分泌する腸内細菌もいる。バクテリオシンは、細菌が分泌する抗菌性のタンパク質またはペプチドで、主として近縁の菌に作用するものであるが、抗菌スペクトルが広いものもある。例えば、*Lactobacillus salivarius* には *Listeria monocytogenes* などの病原菌に対して殺菌能を持つバクテリオシンを産生する菌株があり、マウスを用いた *in vivo* の実験でも *L. monocytogenes* 感染から宿主を防御することができると報告されている [5]。

### 宿主の免疫を介した効果

近年、腸内菌叢が宿主の免疫システムの発達と維持、調節に重要な役割を果たしていることが明らかになってきており、腸内菌叢は免疫系を介しても宿主の感染に影響を与えている。特に、ウイルス感染に対する効果には、免疫系を介した影響が重要であると考えられる。腸内菌叢が宿主の免疫系に与える影響は腸管粘膜局所だけでなく、全身の自然および獲得免疫の発達と維持、調節にも重要な役割を持っている。

腸内菌叢に由来する細菌シグナルは、宿主の腸管における抗菌性タンパク質の分泌を誘導することにより、宿主の感染に影響を与える。腸内細菌由来の抗原は、TLR2 を誘導し、Reg III  $\beta$  C-type レクチンの発現を増加させる。この作用は、マウスにおいて *Yersinia pseudotuberculosis* の排除および感染抑制に

関与しており、腸内菌叢を抗生物質で乱しておく、マウスは *Y. pseudotuberculosis* に対する反応を起こすことができずに正常な腸内菌叢を持つマウスに比べて、より速やかに感染が成立してしまう [6]。マウスに対する抗生物質投与は、腸管の Reg III  $\beta$  C-type レクチン、すなわちグラム陽性菌に対する抗菌活性を持った C-type レクチンの発現も低下させるため、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の腸管への定着が成立しやすくなってしまふ [3]。アデノウイルスは、宿主が産生する抗菌ペプチドであるディフェンシンによって複製が阻害されるが、ディフェンシンは腸内菌叢に対する宿主の反応として産生される [8]。

腸内菌叢の菌体あるいは菌体抗原だけでなく、腸内細菌の代謝産物も抗菌ペプチドの発現を上昇させる。酪酸やリトコール酸などの代謝産物は、上皮細胞株において抗菌ペプチドの発現を上昇させることが報告されており、腸内菌叢の代謝の結果として宿主の感染防御能を誘導する可能性が示唆されている。

腸内菌叢は宿主の適切な粘膜免疫システムの成立に貢献しており、例えば *Bacteroidetes* 門の菌数が高いと IL-17 産生ヘルパー T 細胞が発達し [11]、*Lactobacillus* は菌種によって異なるものの、樹状細胞を活性化し、ナチュラルキラー (NK) 細胞を活性化して、消化管免疫を強化する [7]。マウスの腸内に常在するセグメント細菌 (Segmented filamentous bacteria; SFB) は腸管の IgA 誘導に関与しており、上皮内リンパ球の活性化や腸管上皮細胞の MHC クラス II 発現の誘導にも関与している [19]。SFB は腸管における Th17 の発達にも不可欠である。腸内菌叢に由来する細菌シグナルは、Th1 : Th2 バランスの調節や骨髄系およびリンパ系細胞の腸管への招集にも影響を与える。

## 炎症

宿主の病原体に対する反応のひとつに炎症がある。炎症は本来病原体を排除するための反応であるが、

炎症が正常な腸内菌叢の構成を乱し、かえって病原体の定着や病態を促進してしまう場合もある。マウスを抗生物質で前処置した *S. Typhimurium* 感染モデルでは、サルモネラ菌によって引き起こされる腸管の炎症が宿主の腸内菌叢構成を変化させ、*S. Typhimurium* が腸内に定着することを可能にしている。炎症を起こさない変異株の *S. Typhimurium* はマウス腸管に定着できないが、前もって腸管に炎症を起こさせておくと定着が可能になる [18]。*S. Typhimurium* は炎症によって腸管から放出される物質を栄養素として利用することもできるらしい。

一方、腸内菌叢は宿主の過剰な炎症反応を抑制することによって、感染防御に貢献する場合もある。*S. Typhimurium* 腸炎のモデルにおいてプロバイオティクスを投与すると、過剰な NF- $\kappa$ B 活性化が抑えられ、宿主の炎症反応が抑制されて、*S. Typhimurium* 感染の症状を軽減できる [15]。腸内菌叢の一部である *Clostridium* 属の菌群には、結腸における制御性 T 細胞を誘導することにより、過剰な炎症反応が起こることを防ぎ、宿主の免疫状態を調節する作用を持つものがある [1]。炎症は宿主が感染に対処するための反応であるが、過剰に起これば宿主にとって害となる。腸内菌叢は、その正しいバランスを保つための宿主の免疫システムの調節に貢献している。

## おわりに

感染症の成立やその制御には、宿主の健康状態や遺伝的背景などの要因や、用いる治療法など様々な要因が関係する。その一つとして、腸内菌叢は重要である。個人がもともと持っていた腸内菌叢の構成やその安定性の違いや、治療に用いる抗菌性物質などを含めた腸内菌叢に影響を及ぼす様々な要因が、直接あるいは宿主の免疫反応などを介して間接的に感染の成立や進展に影響を与えている。病原体に

よっては、宿主または腸内菌叢との相互作用によって腸内菌叢をかく乱することを感染成立に利用するものもある。

このような宿主と病原体と腸内菌叢の間の複雑な相互関係を正しく理解し、その背景にあるメカニズムを解明していくことは、効果的な感染症の治療法あるいは予防法を開発していくことに貢献するであろう。将来的には、患者個人個人の腸内菌叢構成の違いに対応した治療法が開発される日が来るかもしれない。

## 文献

- Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I. I., Umesaki, Y., Itoh, K. and Honda, K. 2010. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* **331** : 337–341.
- Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla–Martinez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer, K., Rüssmann, H. and Hardt, W.–D. 2003. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun.* **71** : 2839–2858.
- Brandl, K., Plitas, G., Mih, C. N., Ubeda, C., Jia, T., Fleisher, M., Schnabl, B., DeMatteo, R. P. and Pamer, E. G. 2008. Vancomycin–resistant enterococci exploit antibiotic–induced innate immune deficits. *Nature* **455** : 804–807.
- Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B. R., Rodriguez, B., Teixeira–Johnson, L., Landay, A., Martin, J. N., Hecht, F. M., Picker, L. J., Lederman, M. M., Deeks, S. G. and Douek, D. C. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* **12** : 1365–1371.
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O’Toole, P. W., Hill, C. and Gahan, C. G. M. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the anti–infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104** : 7617–7621.
- Dessein, R., Gironella, M., Vignal, C., Peyrin–Biroulet, L., Sokol, H., Secher, T., Lacas–Gervais, S., Gratadoux, J.–J., Lafont, F., Dagorn, J.–C., Ryffel, B., Akira, S., Langella, P., Nùñez, G., Sirard, J.–C., Iovanna, J., Simonet, M. and Chamaillard, M. 2009. TLR2 is critical for induction of REG3  $\beta$  expression and intestinal clearance of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Gut* **58** : 771–776.
- Fink, L. N., Zeuthen, L. H., Christensen, H. R., Morandi, B., Frøkiær, H. and Ferlazzo, G. 2007. Distinct gut–derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell–mediated NK cell responses. *Int. Immunol.* **19** : 1319–1327.
- Gropp, R., Frye, M., Wagner, T. O. and Bargon, J. 1999. Epithelial defensins impair adenoviral infection : implication for adenovirus–mediated gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **10** : 957–964.
- Hayes, K. S., Bancroft, A. J., Goldrick, M., Portsmouth, C., Roberts, I. S. and Grencis, R. K. 2010. Exploitation of the intestinal microflora by the parasitic nematode *Trichuris muris*. *Science* **328** : 1391–1394.
- Ichinohe, T., Pang, I. K., Kumamoto, Y., Peaper, D. R., Ho, J. H., Murray, T. S. and Iwasaki, A. 2011. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** : 5354–5359.
- Ivanov, I. I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D. B., Sartor, R. B., Finlay, B. B. and Littman, D.



- R. 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* **4** : 337–349.
12. Jude, B. A., Pobeziinskaya, Y., Bishop, J., Parke, S., Medzhitov, R. M., Chervonsky, A. V. and Golovkina, T. V. 2003. Subversion of the innate immune system by a retrovirus. *Nat. Immunol.* **4** : 573–578.
13. Kane, M., Case, L. K., Kopaskie, K., Kozlova, A., MacDermid, C., Chervonsky, A. V. and Golovkina, T. V. 2011. Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science* **334** : 245–248.
14. Kuss, S. K., Best, G. T., Etheredge, C. A., Pruijssers, A. J., Frierson, J. M., Hooper, L. V., Dermody, T. S. and Pfeiffer, J. K. 2011. Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. *Science* **334** : 249–252.
15. O'Mahony, C., Scully, P., O'Mahony, D., Murphy, S., O'Brien, F., Lyons, A., Sherlock, G., MacSharry, J., Kiely, B., Shanahan, F. and O'Mahony, L. 2008. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF- $\kappa$ B activation. *PLoS Pathog.* **4**, e1000112.
16. Pang, I. K. and Iwasaki, A. 2012. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome. *Immunol. Rev.* **245** : 209–226.
17. Sekirov, I., Tam, N. M., Jogova, M., Robertson, M. L., Li, Y., Lupp, C. and Finlay, B. B. 2008. Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect. Immun.* **76** : 4726–4736.
18. Stecher, B., Robbani, R., Walker, A. W., Westendorf, A. M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A. J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., von Mering, C. and Hardt, W.-D. 2007. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **5** : 2177–2189
19. Umesaki, Y., Okada, Y., Matsumoto, S., Imaoka, A. and Setoyama, H. 1995. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol. Immunol.* **39** : 555–562.

## 学会発表演題 (2021年4月～2022年3月)

## ●第164回日本獣医学会学術集会

会 期：2021年9月7日～2021年9月13日

開催方法：リモート方式(酪農学園大学)

発表演題：Prohibitin-1はMAPK/ERKシグナル経路を介してHSV-1の細胞間感染に寄与する

○渡邊瑞季<sup>1</sup>、有井潤<sup>2</sup>、竹島功高<sup>3</sup>、福井文望<sup>3</sup>、丸鶴雄平<sup>3</sup>、小柳直人<sup>3</sup>、加藤哲久<sup>3</sup>、川口寧<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>日生研(NIBS)製品開発部、<sup>2</sup>神戸大学大学院医学研究科 附属感染症センター、  
<sup>3</sup>東大医科研 感染・免疫部門 ウイルス病態制御分野)

発表演題：実験室内における鶏コクシジウム弱毒2価生ワクチンの安全性及び有効性評価

○上野晃聖、張国宏、小野浩輝、棚橋えりか、児島広枝、渋谷一元  
(日生研(NIBS)研究部)

発表演題：野外農場における鶏コクシジウム弱毒2価生ワクチンの安全性及び有効性の評価

○張国宏、上野晃聖、小野浩輝、棚橋えりか、児島広枝、渋谷一元  
(日生研(NIBS)研究部)

## ●第9回日本獣医病理学専門家協会学術集会

会 期：2022年3月30日～2022年3月31日

開催方法：Web開催

発表演題：ニワトリの心臓

○小野浩輝(日生研)

## 編集後記

桜花満開の美しい春の日がやってまいりました。皆様におかれましてはいかがお過ごしでしょうか。今号をもって令和3年度の編集委員で行ってまいりました編集作業は終了となります。関係者の皆様には多大なご協力を賜りましたこと、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。さて、今年度より編集委員長を高橋真理に引き継ぎ、編集委員は河島奈悠と古澤貴章が担当いたします。

読者の皆様におかれましては、時節柄どうかご自愛ください。今後とも、引き続き日生研たよりをご愛読賜りますよう、よろしくお願い申し上げます(FT)。



——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623号) 令和4年3月25日印刷 令和4年1月1日発行(第68巻第2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/高橋真理(委員長)、古澤貴章、河島奈悠  
事務/経営企画部

印刷所 株式会社 精興社  
(無断転載を禁ず)