

日生研たより

第68巻 第4号(通巻625号) 2022年(令和4年)10月

挨拶・巻頭言

リーダーシップの絶好の機会

.....古我知史(2)

レビュー

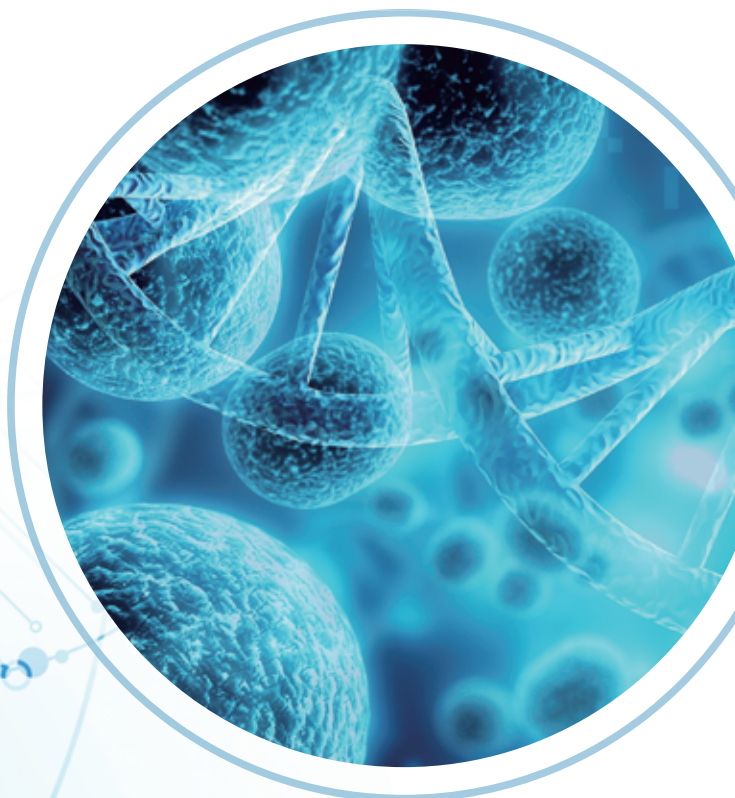
マクロファージ病理学

第4回:マクロファージと腎線維化

.....山手丈至(3)

ワクチンによる鶏コクシジウム感染症の予防

.....張 国宏 上野晃聖(11)



リーダーシップの絶好の機会

古我知史

経営学ではこの半世紀、リーダーシップ論が百花繚乱だ。解が爆発する系の其処此処の経験知がリーダーシップの多様な解釈となり理論となる。人も組織も世の中も複雑系だからだ。解は爆発するもののリーダーシップ論が目標とする共通のベクトルは、人間と組織と社会のさらなる進化と成長である。

現代のVUCA (VUCA: Volatility (変動性)、Uncertainty (不確実性)、Complexity (複雑性)、Ambiguity (曖昧性)を内在する社会情勢を意味する)の状況にあって、リーダーシップはいよいよ渴望されている。外部環境が混迷を極める時代において、従来の常識が通じなくなるばかりか、惰性の常態と怠惰なる慣性が、あらゆる進化を阻害するボトルネックとなっているからだ。

振り返れば昭和の常態と慣性で過ごした平成、高度成長期の延長線上の成熟停滞経済下での企業経営は、優秀な多くの組織マネジャーたちによって充足されてきた。

しかし足元で進行する第四次産業革命へのシフト、DX寡占化経済、感染症のパンデミック、地政学リスクの顕在化など激変する外部環境は、いずれの個人や組織や社会に対しても、待ったなしの創造的破壊、非連続的でエクスポネンシャルなイノベーションを要求する。

残念ながら優秀な組織マネジャーたちは従来の常態と慣性を既定の規範に沿って上手に管理運用できるだけで、それらを破壊して、新しい常識やルールを独自に考え、自律主体的に変革することはできない。有事においては優秀な組織マネジャーたちは混乱を助長する動きしかできない。手をこまねいている間に組織は早晚崩壊してしまう。既存の仕組みや規範を壊して創造的戦略を実行できるリーダーの出現が切望される所以だ。

現代のVUCAはリーダーシップの絶好の機会となる。リーダーが立ち現れる時機だ。

VUCAが実は世の中の常態であることを知っているリーダーは、それが劇的に顕在化した世の有事にあって、従前の常態と慣性を正々堂々と否定し、非常識と新機軸の旗を翻して強烈な推進力を打ち出す。独自の未来図を描き、意図的なエラーや逸脱を、リスクを取って実行する主体となるのだ。

そもそも経営現場において誤解されているのは、マネジャーはリーダーではないのにもかかわらず、リーダーであることを期待されている。組織におけるマネジャーに求められているのは複雑性を管理によって安定性と持続性に変えるルールに基づいた運営力だ。優秀なマネジャーは連続的な改善の卓越性を業務目標としている。

一方で経営現場におけるリーダーは、誰もが怖気づく非連続の変革と創造の実現を目指す。複雑性をゼロベースから打破するための革新的な戦略やルールを構想し、果敢に実行に移す。而して活躍の機会が常にあるわけではない。外部環境の大きな変化や想定外の事態が生じたとき、その賑やかな有事にこそ、リーダーシップの絶好の機会が顕われる。

現代は事前の非常識が事後の常識となる時代の転換期、パラダイムシフトの時機にある。伏龍鳳雛たるリーダーは水を得た魚となり、未知の未来を観て、俯瞰的にファクトフルネスの事象を独自に解釈し、身体性のある実践をもって道なき道を切り拓く。

人類も世界も、日本国家も、旧態依然としている産業界も伝統的企業も、リーダーシップの絶好の機会を驚愕む次世代の力のあるリーダーの出現を、強く期待しているのだ。

私事で恐縮ながら、初夏に私的リーダーシップ論のエッセイを上梓した。還暦を過ぎれば本稿を書き下ろしても諸先輩にご容赦願えるかと思った。独立系ベンチャーキャピタリストを志し体験した多くの事業育成の修羅場や、時に不条理がまかり通る現場で揉まれてきたからこそ吐き出すことができたリーダーシップ私論である。原理原則の根源的な骨太さを持ち、先見先覚力を発揮し、人心収攬をもって、行動実現を果たせる強烈なリーダーの出現を、あらゆる組織や企業、社会が待望していることを確信し、そのリーダーシップ実装の考え方や方法論を事例を交えて提言させて頂いた。

本稿の真意は、リーダーに覚醒する機会、リーダーシップの機会は、全ての人に公平に開かれている、ということだ。人間であれば誰も何かしらリーダーを目指すものである。(評議員)

マクロファージ病理学 第4回：マクロファージと腎線維化

山手丈至 (大阪府立大学名誉教授)

はじめに

腎線維化は、糸球体や尿細管の傷害後に生じる細胞外基質の異常な蓄積として特徴付けられる。慢性腎臓病 (CKD: chronic kidney disease) は、組織学的には、その腎線維化の病態で、線維化の程度により CKD の進行が評価できるとされる [1]。糖尿病や高血圧症は CKD の代表的な素因である。CKD は、現在、日本国内では、1,330 万人いるとされ、透析が必要な患者数は 33 万人とされる。そのため国民病とも称される。CKD は、進行すれば萎縮腎 (終末腎) に至り、尿毒症が生じる。

組織が傷害されると、早期に細胞残屑を貪食する M1 マクロファージが浸潤し、続いて出現する M2 マクロファージにより線維原性因子が放出されることで膠原線維を産生する筋線維芽細胞が誘導され線維化が導かれる。有益な修復性線維化には、マクロファージの M1/M2 分極化の効果的な作動が重要である。肝臓では、マクロファージ系細胞であるクッパー細胞や、筋線維芽細胞に形質転換できる肝星細胞が常在するが、一方、腎臓にはそのような細胞は存在しない。「マクロファージ病理学」の最終稿である第4回においては、腎臓の組織発生に加え、腎線維化に係わるマクロファージの細胞特性を M1/M2 分極化の観点で解析した成果と筋線維芽細胞の起源を追究した研究内容を紹介する。

1. 腎臓の組織発生に出現するマクロファージの特性

哺乳類の腎臓は後腎から発生する。後腎を構成する後腎芽細胞は、間葉系の細胞で、この細胞は腎組織の構築に伴い糸球体足細胞や尿細管などの上皮系細胞に分化する。これは間葉-上皮転換 (MET: mesenchymal epithelial transition) と呼ばれ、腎臓の組織発生の重要な要素である [2]。ラットでは、胎子期の後半において後腎芽から未熟な糸球体 (S 字体) や尿細管が形成され始め、生後 21 日の 3 週齢ごろには成熟した腎組織がほぼ完成する。

ラットの 18 日齢の胎子から 21 日齢の新生子の発生過程の腎組織と、5 週齢以降の成体の腎組織を用いてマクロファージの出現を解析した [3]。その結果、CD68 発現 M1 マクロファージは、胎生期においてすでに数多く出現し、その後さらに増加し続け、生後 8 日の新生子においてピークとなった。その後は生後 21 日まで減少した。一方、CD163 発現 M2 マクロファージは胎生期にはほとんど観察されず、生後 8 日の新生子から出現し始め増加し、生後 15 日にピークとなった。その後は減少するものの組織構築が完成する生後 21 日まで認められた。

CD68 発現 M1 型は、原始 / 胎生マクロファージの特性があり、高度の貪食活性を示す。腎臓の発生において、胎生期には組織を構築する上で不要となった細胞がアポトーシスで消失するが、CD68 発現 M1 型にはアポトーシス小体を貪食する像が観察された。一方、生後の組織構築には、マクロファージから産生される IGF-1 や CSF-1 等の因子が細

胞の分化や成熟に係わるとされる [4, 5]。これらの因子は胎子期に比べると生後の新生子期に増加していた。生後増加し始めた CD163 発現 M2 型はこれら因子を産生することで、腎構成細胞の分化・成熟に係わっている可能性が示された [3]。腎組織発生の過程においてマクロファージの M1/M2 分極化が機能していることが示された。

肝臓の発生過程において、M1/M2 マクロファージの分極化により肝臓の組織構築が進むこと、加えて、生後の新生子期において、CD163 発現マクロファージの動態と同調するように MHC クラス II 発現マクロファージが出現するとの報告がある [6]。そこで、腎臓の組織発生における MHC クラス II 発現マクロファージの動態を観察したところ、やはり CD163 発現 M2 型と同様に、胎子期では認められず、生後に出現した。それは、生後 4 日以降に増加し、生後 21 日まで認められた。MHC クラス II 発現マクロファージも腎構成細胞の分化と成熟に係わっている可能性が示された [3]。

腎臓と肝臓の組織発生（モデリング）において、マクロファージの M1/M2 分極化が機能していることが分かった [3, 6]。皮膚の創傷治癒（リモデリング）では、貪食活性のある M1 型がまず出現し、修復性線維化を促す M2 型が遅れて現れることで、M1/M2 分極化が効果的に機能し治癒する [7]。モデリングとリモデリング、どちらにおいてもマクロファージの M1/M2 分極化が重要な役割を演じることが示された。

2. イヌの腎線維化病変に出現するマクロファージの特性

15 例のイヌの腎線維化の剖検例を用いて、出現するマクロファージの特性を解析した [8]。腎線維化は、その膠原線維の蓄積状態によりグレード 1（軽度）、2（中等度）、3（高度）に分けて評価した。線維化部位には α -平滑筋アクチン（ α -SMA: α -smooth muscle actin）陽性の筋線維芽細胞が出現しており、グレードに伴い増加した。この研究成果

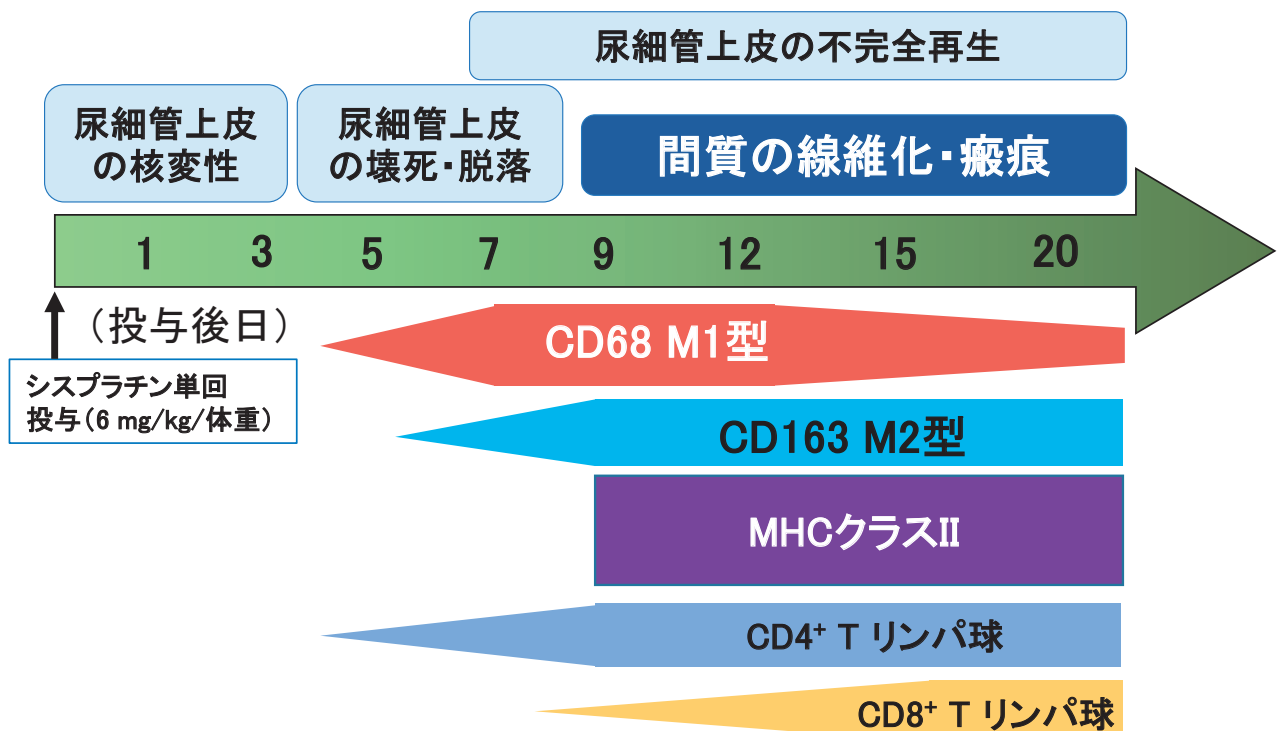


図1 シスプラチン誘発ラット腎線維化の推移とマクロファージ・リンパ球の動態（本文参照）

を発表した2001年、イヌのマクロファージを認識する有用な抗体が存在していなかったことから、単球由来浸潤マクロファージや組織在在マクロファージが有するリゾソーム酵素であるリゾチームに対する抗体を用いて免疫組織化学的に解析したところ、線維化の進行に伴い、リゾチーム陽性のマクロファージが増加することが分かった。また、当時ヒトのマクロファージを抗原として開発された抗体AM-3Kがイヌのマクロファージに適用できることを確認し [9]、その抗体を用いてイヌの腎線維化病変を解析したところ、腎線維化のグレードに伴いAM-3K陽性のマクロファージが増加することが分かった [8]。その後の研究でAM-3Kが認識するマクロファージはM2型であることが示された [10]。

以上より、イヌの腎線維化において、グレードが進むにつれてリゾチームを発現するマクロファージが増加するとともに、線維原性因子を産生するAM-3K認識M2型マクロファージが腎線維化の進展に係わることを明らかにした [8]。

3. シスプラチン誘発ラット腎線維化に出現するマクロファージの特性

3-1. 実験的誘発ラット腎線維化モデル

シスプラチンは、プラチナムを有する抗癌剤で、タンパク質やDNAを傷害することで腫瘍細胞に対し細胞毒性を発揮するとされる。また、シスプラチンは、腎臓の近位尿細管のP3セグメントの上皮細胞を傷害することで、副作用として腎障害を惹起する。

シスプラチンをラットに単回投与し、投与後1日から20日の観察期間に得た材料を解析に用いた [11] (図1)。シスプラチン投与後1日と3日において皮髄境界部の尿細管上皮に核変性 (アポトーシス様の変化を含む) が現れ、投与後5日と7日にお

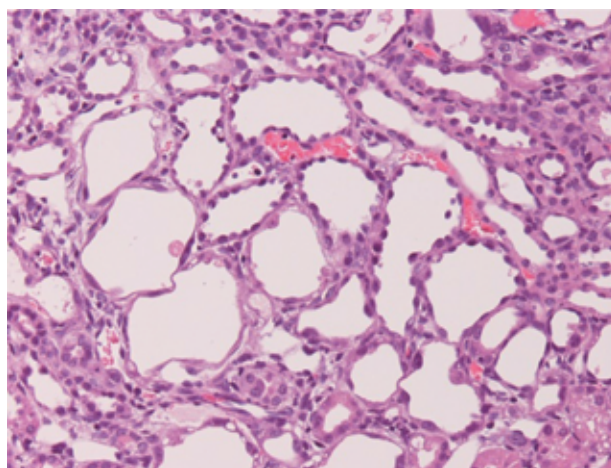


写真1 傷害された尿細管の拡張と扁平から立方状の尿細管上皮の再生、そして間質に生じつつある線維化 (投与後9日)

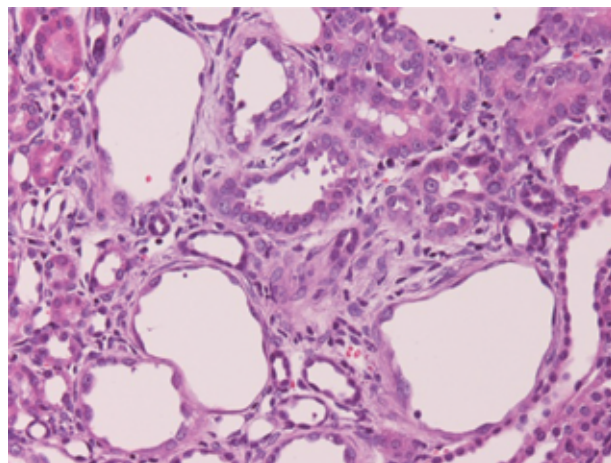


写真2 傷害された尿細管周囲の高度の線維化と瘢痕化 (投与後20日)

いては、尿細管の上皮細胞は壊死・剥離し、尿細管腔に脱落した。投与後9日以降において、傷害の程度により尿細管は様々な大きさに嚢胞状に拡張したり、時には萎縮したりしていた (写真1)。この時期、傷害を受けた尿細管には、扁平から立方状を呈する上皮が形成され再生が始まった。また、傷害された尿細管の管腔やその周囲の間質には炎症細胞が認められ、線維化が生じ始めた。この線維化は、投与後12日以降さらに増加し、投与後15日と20日では腎組織の本来の構築が消失するまでに増悪しており、膠原線維の蓄積による瘢痕化も観察された (写真2)。なお、腎機能障害の血清マーカーであるBUNとクレアチニンの値は投与後3日以降に有意に増加し、

その後20日まで正常に復することはなかった。また、腎尿細管の傷害マーカーとして知られているKim-1 (kidney injury molecule-1) は、投与後5日以降傷害された尿細管上皮に発現が認められた[11]。

以上のように、シスプラチン誘発の腎病変は、投与後1日から7日では尿細管が傷害され、投与後9日においては傷害された尿細管に再生上皮が認められ始め、周囲の間質には線維化が生じた。その線維化の程度は投与後20日まで進展することが分かった(図1)。この病態は、尿細管傷害後のCKDのモデルとして利用できる。

3-2. 出現するマクロファージの特性

3-2-1. CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型のマクロファージ (図1) : シスプラチン誘発腎線維化モデルにおいて、CD68 発現 M1 型は、尿細管の上皮が壊死・剝離し、傷害が顕著となる投与後5日から有意に増加し始め、その後9日でピークとなり投与後20日まで徐々に減少した。M1 型のサイトカインである IFN- γ 、TNF- α 、そして IL-6 は CD68 発現 M1 型が出現し始めた時期にほぼ一致し投与後5日と7日に増加した。すなわち、CD68 発現 M1 型は、傷害組織の貪食・処理や、さらなる炎症誘導に係わることが示された。実際、CD68 発現 M1 型は傷害された尿細管の管腔内に数多く出現しており(写真3)、細胞質が泡沫状を呈し細胞残屑を貪食していると思われた。一方、筋線維芽細胞は、CD163 発現 M2 型が産生する TGF- β 1 により誘導される。シスプラチン誘発腎線維化モデルでは、CD163 発現 M2 型は投与後5日以降に増加し始め、投与後9日にピークとなり、投与後20日までその高い出現数は維持されていた。また、TGF- β 1 は投与後7日以降に、 α -SMA 発現の筋線維芽細胞は投与後9日以降に、それぞれ増加し始め、投与後20日まで高い出現が維持されていた。すなわち、

「CD163 発現 M2 型出現 \Rightarrow TGF- β 1 産生 \Rightarrow 筋線維芽細胞の誘導 \Rightarrow 線維化の進行」の関連性が示され、M2 型が腎線維化の形成に重要な役割を演じていることが明らかとなった(図1)。

皮膚の創傷治癒におけるマクロファージの M1/M2 分極化では、CD68 発現 M1 型は早期に出現し、一方、CD163 発現 M2 型は、M1 型に遅れて出現することで修復性の線維化を誘導する[7]。シスプラチン誘発の腎線維化においても、上述のように M1 型は尿細管傷害時に、遅れて M2 型が線維化の進展時期に出現しており、マクロファージの M1/M2 分極化が機能していた。しかし、シスプラチン誘発腎線維化モデルでは、肝線維化や皮膚創傷治癒に生じる線維化[7,12]とは異なり、病態が改善することなく、線維化が増悪した。これは、後述するように MHC クラス II 発現マクロファージと、MHC クラス II 発現マクロファージにより誘導される CD4⁺や CD8⁺の T リンパ球が深く係わっていることが分かった[11]。

3-2-2. MHC クラス II 発現マクロファージと T リンパ球 (図1) : 肝線維化や皮膚の創傷治癒における線維化において、MHC クラス II 発現マクロファージが観察されている[7,12]。そこで、シスプラチン誘発腎線維化における MHC クラス II 発現マクロファージの特性を解析した[11]。MHC クラス II 発現マクロファージは、投与後1から7日ではほとんど観察されなかったが、線維化が生じ始める投与後9日に急に出現し、その高い出現数は投与後20日まで続いた。その出現数は、CD68 発現 M1 型や CD163 発現 M2 型に比べると数倍多かった。興味ある所見として、CD68 発現 M1 型は細胞残屑を貪食するために拡張した尿細管の管腔内(写真3)に、CD163 発現 M2 型は膠原線維を産生する筋線維芽細胞を誘導するために拡張あるいは萎縮した尿細管周囲の間質や線維化部位に散見された

(写真4) のに対し、MHCクラスII発現マクロファージは傷害された尿細管周囲の線維化が顕著な部位に集簇して出現する特徴があった(写真5)。このような分布から、MHCクラスII発現マクロファージの役割は、CD68発現M1型あるいはCD163発現M2型のマクロファージとは異なることが示唆された。

さらに、MHCクラスII発現マクロファージは抗原提示細胞としてT細胞に作用する[13]ことから、リンパ球の動態を観察した。その結果、CD20⁺B細胞の出現には特異性はなかったが、CD4⁺Tリンパ球は投与後3日以降に観察され、特に投与後9日からMHCクラスII発現マクロファージと同様に急に増加し始め、線維化が進行する投与後20日までその高い出現数が維持された(図1)。さらに、CD8⁺Tリンパ球は、CD4⁺Tリンパ球ほどには出現数は多くはなかったが、やはり投与後9日以降増加し始め、投与後20日まで増加し続けた(図1)。CD4⁺(写真6)とCD8⁺(写真7)のTリンパ球の分布は、MHCクラスII発現マクロファージと同様に、傷害された尿細管周囲の線維化が顕著な部位に集簇して出現する傾向にあった。これら所見から、MHCクラスII発現マクロファージと、CD4⁺とCD8⁺のTリンパ球は相互に関連して出現していると考えられた。

3-3. 腎線維化におけるマクロファージの機能的役割に関する一考(図1)

シスプラチン誘発ラット腎線維化において、マクロファージのM1/M2分極化が機能していることが分かった[11]。特に、CD68発現M1型は、傷害組織の残屑を貪食することで自然免疫として働いていると考えられた。加えて、上述するように、MHCクラスII発現マクロファージが、この腎線維化の進展に深く係わることが示された。二重蛍光免疫染色では、MHCクラスII発現マクロファージの

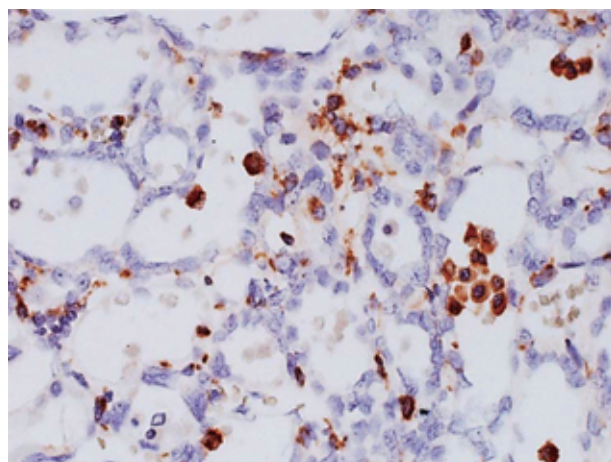


写真3 傷害され拡張した尿細管の管腔に認められるCD68発現M1マクロファージ(投与後7日)

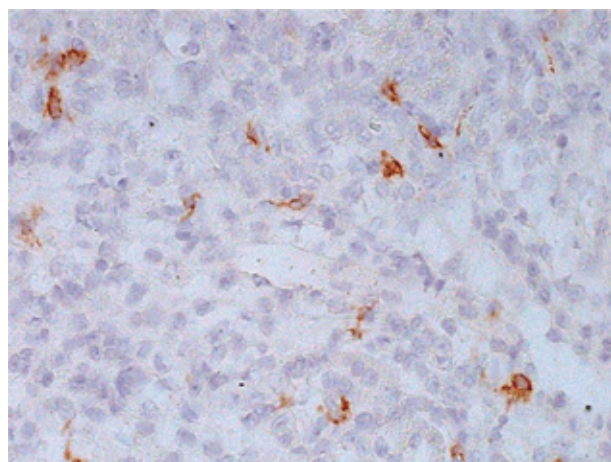


写真4 傷害された尿細管周囲の線維化部位に散見されるCD163発現M2マクロファージ(投与後9日)

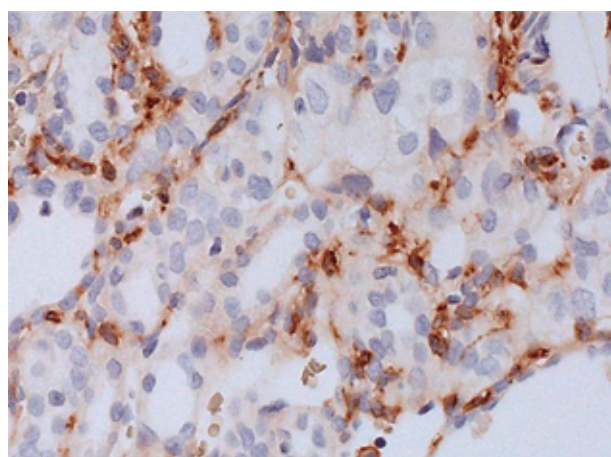


写真5 傷害された尿細管周囲の線維化部位に数多く認められるMHCクラスII発現マクロファージ(投与後9日)

10%程度がCD163を共発現していたのに対し、CD68を共発現するMHCクラスII発現マクロ

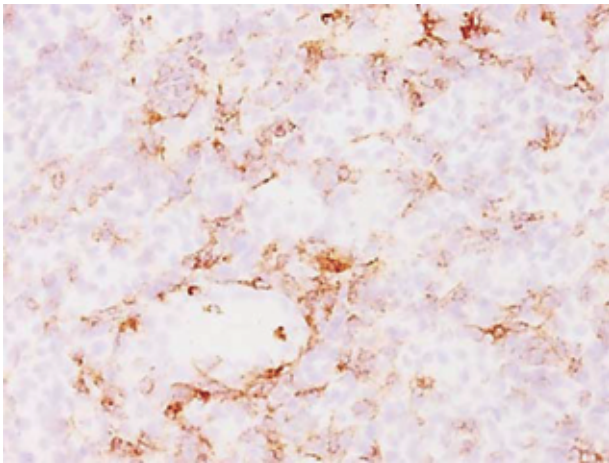


写真6 傷害された尿細管周囲の線維化部位に集簇する $CD4^+$ T リンパ球 (投与後 20 日)

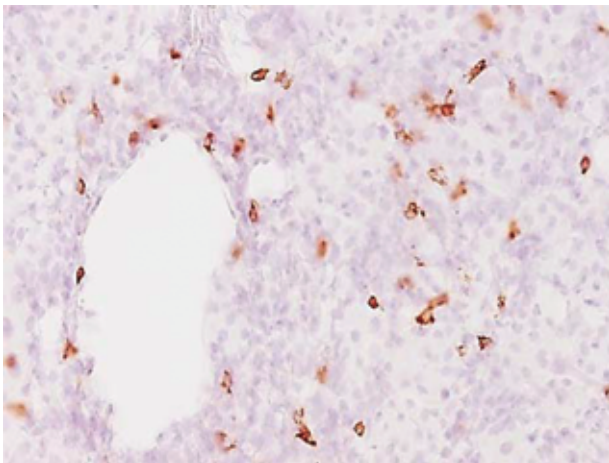


写真7 傷害された尿細管周囲の線維化部位に出現する $CD8^+$ T リンパ球 (投与後 20 日)

ファージは投与後 12 日で 30%、投与後 20 日では 80%にも達した。MHC クラス II 発現マクロファージは、M1 型として機能することが知られている [12] が、腎線維化では、それが顕著であった。

獲得免疫において、抗原提示能を有する樹状細胞やマクロファージは、 $CD4^+$ T リンパ球を導き、その結果 $CD4^+$ T リンパ球はヘルパー T 細胞として機能することで細胞傷害性のある $CD8^+$ T リンパ球を誘導する [13]。尿細管傷害後に自然免疫として機能していた $CD68$ 発現 M1 型の多くが、その後 MHC クラス II を発現する抗原提示能を有するマクロファージへと機能がシフトし、その結果獲得免疫が作動することで $CD4^+$ と $CD8^+$ の T リンパ球が誘

導されたと考えられた。すなわち、投与後 9 日以降の腎線維化は、 $CD163$ 発現 M2 型が組織を修復するために機能しているものの、一方で MHC クラス II 発現マクロファージ介在による $CD4^+$ ヘルパー T 細胞誘導の $CD8^+$ T リンパ球が強い細胞傷害性を示し対峙することで、不完全な修復状態が続き、その結果線維化が徐々に増悪すると考えられた [11]。

実際、細胞傷害性 $CD8^+$ T リンパ球は抗炎症作用のある M2 マクロファージに抗うように作動するとの報告がある [14]。また、 $CD8^+$ T リンパ球を誘導する $CD4^+$ ヘルパー T リンパ球の出現は、腎線維化を促進させる細胞とみなされている [15]。シスプラチンをラットに 7 週間に亘り反復投与することで作製したより重度な腎線維化では、リンパ球の集簇がしばしば観察される (写真 8)。そこには MHC クラス II 発現マクロファージとともに、 $CD4^+$ と $CD8^+$ の T リンパ球が集簇している [16]。それでは、なぜ、T リンパ球の誘導に係わる MHC クラス II 発現の抗原提示能のあるマクロファージが腎線維化病変に特異的に出現するのかが重要となる。それには、おそらく、傷害された腎組織から放出されるダメージ関連分子パターン (DAMPs: damage-associated molecular patterns) が関わっていると考えている [17]。DAMPs は炎症や線維化を誘導する内在性因

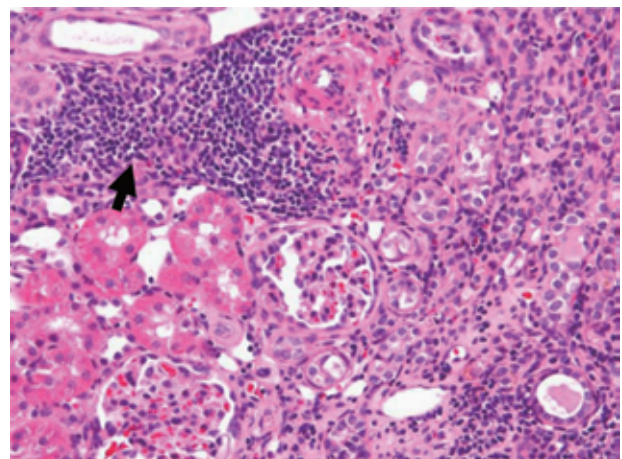


写真8 より高度に進行した線維化部位に集簇するリンパ球 (矢印)

子である。シスプラチン誘発腎病変では、線維化の進展時期に、細胞外基質である laminin、fibronectin や biglycan などが DAMPs として放出され、加えて Toll 様受容体である TLR-4 の発現増加も観察されている。さらなる研究が必要であるが、 $CD4^+$ と $CD8^+$ の T リンパ球を導く MHC クラス II 発現マクロファージが有する抗原提示能の獲得には、このような DAMPs が内因性リガンドとして関与しているのかもしれない。

3-4. 腎線維化における筋線維芽細胞の起源

筋線維芽細胞は、M2 マクロファージが産生する強力な線維原性因子である TGF- β 1 により誘導される。その形成過程において、ビメンチン、デスミンや α -SMA などの細胞骨格を種々の割合で発現する。その中で、 α -SMA を発現する筋線維芽細胞が最も分化した状態と考えられている [18]。これらに加え、腎線維化における筋線維芽細胞は、細胞収縮に係わるカルポニンも発現することが報告されている [19]。筋線維芽細胞は、一般的には、間質の線維芽細胞から形成されるが、肝線維化では肝星細胞、腎線維化では腎星細胞、皮膚では毛包結合繊維細胞などの間葉系細胞にもその起源があるとされる。腎線維化における筋線維芽細胞の起源について追究した。

3-4-1. Thy-1 (CD90) 発現の腎髄質間質細胞と血管周皮細胞由来の筋線維芽細胞；Thy-1 は、骨髄の間葉系幹細胞や血管周皮細胞などの体性幹細胞に発現する [18]。シスプラチン誘発腎線維化において、ビメンチンやデスミン発現の筋線維芽細胞の多くは Thy-1 を発現していたが、一方、 α -SMA 発現の筋線維芽細胞には Thy-1 の発現は軽度であった。そこで、Thy-1 を発現する血管周皮細胞の特徴があるラットの未分化間葉系細胞株 MT-9 に TGF- β 1 を添加したところ、Thy-1 の発現が低下し、逆に α -SMA の発現が増加した。ま

た、ラットの腎間質細胞株 NRK-49F に TGF- β 1 を添加したところ α -SMA の発現が増加した。成体のラットでは、Thy-1 は、髄質間質細胞と血管周皮細胞に発現している。腎発生過程の後腎芽細胞は Thy-1 を発現しており、よって、この髄質間質細胞は、血管周皮細胞と同様に体性幹細胞の特徴があると思われる [20]。要するに、腎線維化に出現する筋線維芽細胞は、このような間葉系の体性幹細胞に由来すると考えられる [18]。なお、腎線維化においては TGF- β 1 以外に、オステオポンチンや骨形成タンパク質 (BMP: bone morphogenetic proteins) である BMP-6 も、体性幹細胞から筋線維芽細胞を誘導する線維原性因子となることが報告されている [21]。

3-4-2. 不完全な再生尿細管の上皮-間葉転換 (EMT: epithelial mesenchymal transition) を介した筋線維芽細胞の形成；ラット (NRK-52E 株) やブタ (LLC-PK1 株) の尿細管上皮細胞株に TGF- β 1 を添加すると、上皮細胞の特性である E-カドヘリンの発現が減じ、代わって α -SMA を発現する筋線維芽細胞へと形質転換することが報告されている [22, 23]。実際、シスプラチン誘発腎線維化病変において、傷害後に再生しつつある尿細管に α -SMA の発現が認められる (写真 9) [24]。傷害さ

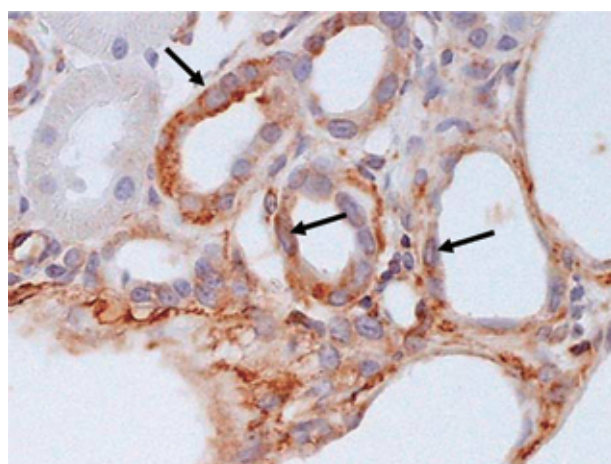


写真 9 傷害され不完全に再生する尿細管上皮の α -平滑筋アクチン陽性所見 (矢印)

れた尿細管の上皮は、壊死やアポトーシスに陥り脱落するが、その後再生が始まる。順調な再生過程にある尿細管上皮には、増殖活性があり、加えて上皮細胞の増殖・分化を規定する Wnt シグナルを介した細胞内伝達に関与する β -カテニンの発現も観察される。一方、増殖活性に乏しく β -カテニンが発現していない尿細管は、E-カドヘリンの発現が低下しており、代わって α -SMA が発現する。尿細管の再生能は、基底膜の破壊の程度に依存するとされる。EMT は基底膜が破壊された不完全な再生状態にある尿細管に生じ易いと考えられた。後腎芽細胞は、Thy-1 を発現する体性幹細胞の特徴に加え、ビメンチンや α -SMA を発現する筋線維芽細胞の特性も兼ね備えている [18, 20]。この後腎芽細胞が腎発生において MET により尿細管へと分化・成熟する。転じて考えると、腎線維化における不完全再生の尿細管の EMT は、後腎芽細胞への遡及現象と捉えることができるかもしれない [2, 18, 20]。なお、シスプラチン誘発腎線維化では、シクロオキシゲナーゼ (主に COX-1) の発現増加により誘導される PGE2 が EP4 レセプターを介して傷害された尿細管上皮のアポトーシスや EMT を抑制することで、尿細管に良好な再生を促すとする報告がある [25]。腎臓は再生し難い臓器とされるが、再生医療において傷害された尿細管を良好に再生させる技術の開発は、腎線維化の軽減に繋がると考える。

おわりに

腎線維化では、早期に CD68 発現 M1 マクロファージが出現し尿細管の傷害と炎症を助長するが、その後 CD163 発現 M2 マクロファージが出現することで修復性の線維化が生じる。マクロファージの M1/M2 分極化は組織傷害後の線維化の合目的な生命現象である。しかし、腎線維化では、CD163

発現 M2 型の出現時期に一致し、抗原提示能のある MHC クラス II 発現マクロファージとそれにより誘導される CD4⁺ と CD8⁺ の T リンパ球が特異的に現れることが分かった。特に、CD8⁺ T リンパ球は、細胞傷害性があることから、CD163 発現 M2 型の修復機能と対峙することで、腎線維化の病態増悪に関与する可能性が示された。M1/M2 マクロファージ分極化に加え、MHC クラス II 発現マクロファージと CD4⁺ と CD8⁺ T リンパ球の役割、そして膠原線維を産生する筋線維芽細胞の起源の追究は、CKD の病態である腎線維化を改善する手法の開発に資すると考える。

参考文献

1. Hodgkins KS. and Schnaper HW., *Pediatr Nephrol*, 27 : 901-909, 2012.
2. Tennakoon AH, *et al.*, *Review, J Clin Med*, 5 : 4, 2015.
3. Matsuyama S, *et al.*, *J Toxicol Pathol*, 31 : 207-212, 2018.
4. Jones CV, *et al.*, *Respir Res*, 14 : 41, 2013.
5. Gow DJ, *et al.*, *J Leukoc Biol*, 88 : 475-481, 2010.
6. Golbar HM, *et al.*, *Exp Toxicol Pathol*, 64 : 1-8, 2012.
7. Juniantito V, *et al.*, *J Comp Pathol*, 145 : 378-389, 2011.
8. Ide M, *et al.*, *J Comp Pathol*, 124 : 60-69, 2001.
9. Yamate J, *et al.*, *Vet Pathol*, 37 : 168-176, 2000.
10. Komohara Y, *et al.*, *J Histochem Cytochem*, 54 : 763-771, 2006.
11. Nakagawa M, *et al.*, *Cells*, 10 : 257, 2021.
12. Golbar Md. and Yamate J., *Review, Nova Scientific Publication Inc.* 2012.
13. Halpert MM, *et al.*, *FASEB J*, 34 : 8082-8101, 2020.
14. Wang Y. and Harris DC., *J Am Soc Nephrol*, 22 : 21-27, 2011.

15. Liu L, *et al.*, *Am J Nephrol*, 36 : 386–396, 2012.
16. Matsuyama S, *et al.*, *J Vet Med Sci*, 83 : 1435–1442, 2021.
17. Zindel J. and Kubes P., *Annu Rev Pathol*, 15 : 493–518, 2020.
18. Yuasa T, *et al.*, *Exp Toxicol Pathol*, 65 : 651–659, 2013.
19. Yuasa T, *et al.*, *J Toxicol Pathol*, 27 : 97–103, 2014.
20. Yuasa T, *et al.*, *J Toxicol Pathol*, 23 : 1–10, 2010.
21. Yano R, *et al.*, *Exp Toxicol Pathol*, 67 : 99–107, 2015.
22. Zhang Y, *et al.*, *Mol Med Rep*, 16 : 8891–8899, 2017.
23. Yamate J, *et al.*, *Exp Toxicol Pathol*, 57 : 135–147, 2005.
24. Terada N, *et al.*, *Clin Exp Nephrol*, 22 : 1240–1250, 2018.
25. Yamamoto E, *et al.*, *Histol Histopathol*, 25 : 995–1007, 2010.

謝辞

「日生研たより」の紙面をお借りし4回にわたり「マクロファージ病理学」と題し、特に肝臓と腎臓を中心とした線維化への係わりをマクロファージのM1/M2分極化の観点から紹介させていただいた。この研究には、大阪府立大学（2022年4月から大阪公立大学）の獣医病理学教室の桑村充教授と井澤武史准教授の多大なるご協力をいただき、かつ研究に興味を持ち積極的に取り組んでいただいた大学院生と学部学生によるところが大きい。筆を擱くにあたり、教室の皆様方に心より感謝いたします。また、このような機会を与えていただきました「日生研たより」の発行責任者の土屋耕太郎理事をはじめ、いつも丁寧に校閲していただいた編集室の皆様にお礼申し上げます。

（評議員）

レビュー

ワクチンによる鶏コクシジウム感染症の予防

張 国宏 上野晃聖

はじめに

鶏コクシジウム感染症は、*Eimeria* 属原虫の腸管寄生による水様性ないし粘血性の下痢を主徴とする疾病である。本症は肉用鶏や種鶏などの平飼い鶏に発生することが多く、育成率、飼料要求率及び産卵率などの生産成績を悪化させる。本症の発生による養鶏産業での経済的損失及びその予防と治療に必要な費用を合わせると、その額は世界全体で年間約

2,000億円に上るとされる¹⁾。本症への対応策としては、鶏舎消毒及びオールイン・オールアウトの徹底、抗菌性飼料添加物の添加、サルファ剤による治療に加えて、ワクチン投与による予防がある。近年では抗菌性飼料添加物などに対する耐性株の出現への懸念や、抗菌性物質に頼らない食品生産を求める消費者ニーズから、ワクチン免疫による対策への期待が高まっているものの、様々な事情から広く普及するまでには至っていない。本稿では、鶏コクシジ

ウム感染症に対する生ワクチンについて概説する。

鶏コクシジウム感染症について

鶏コクシジウム感染症は、*Eimeria* 属原虫の寄生による鶏の腸炎を主体とする疾病であり、現在9種の *Eimeria* 属原虫が鶏の寄生種として報告されている²⁾。なかでも *E. acervulina*、*E. maxima*、*E. tenella*、*E. necatrix* 及び *E. brunetti* の5種は病原性が強いことから、養鶏産業においてその対策が必須と考えられている³⁾。

Eimeria 属原虫の寄生は腸管に局限し、種ごとに特異的な感染部位が異なる。寄生した原虫によって腸管粘膜の物理的破壊による血便や下痢便の排泄、栄養分及び水分の吸収不足による元気消失や体重減少等を引き起こして死亡に至る場合もある。寄生部位では、出血性若しくはカタル性の炎症が認められ、上皮細胞が壊死及び脱落する²⁾。病原性の強い種の感染では著しく組織が傷害され、絨毛の脱落や萎縮が認められることもある。

腸管に寄生した *Eimeria* 属原虫の虫体は、宿主である鶏の消化管内で無性生殖と有性生殖を繰り返し、最終的にオーシストとして糞便中に排泄される。体外に排泄された未成熟のオーシストは感染性を示さない。しかし、一般的な床敷き鶏舎ではオーシストの成熟に必要な適度な酸素濃度、温度（26℃～30℃）及び湿度（25%～35%）の条件が整うため、成熟オーシストとなり、感染能を得る。この成熟オーシストを鶏が経口摂取することで鶏舎内での感染サイクルが成立する。排泄されたオーシストは野外でも極めて安定で、条件さえ整えば1年以上も生残する³⁾。また、鶏舎内に侵入した小動物や昆虫、器具類及び塵埃に付着したオーシストは、機械的伝播で汚染エリアを拡大することもある。このような感染・伝播機序を取ることから、本症は糞便と絶え

ず接触する平飼い鶏舎で問題となりやすい。また、ケージ飼育であっても直立多段式ケージの様に、偶発的に糞便に接する機会が生じてしまう飼育形態においては本症が散発すると報告されている⁴⁾。

Eimeria 属原虫の鶏への蔓延は養鶏産業が発展した国々で問題となっており、我が国における調査でも農場への浸潤度が極めて高いことが報告されている。2007年に実施された41都道府県297戸の養鶏農家を対象として行われた調査では、肉用鶏農家の72%、採卵鶏農家の49%で *Eimeria spp.* のオーシストが検出されている⁵⁾。また、2017年から2018年にかけて21都道府県の37種鶏場を対象として行われた調査では、調査対象となった37農場中33農場でいずれかの *Eimeria* 属原虫が確認されている⁶⁾。

対策の現状

鶏コクシジウム感染症への対策として、1) 飼育環境におけるオーシストの低減又は消毒、2) 抗菌性飼料添加物の給与、3) 鶏コクシジウム症発生鶏群に対するサルファ剤系治療剤の投与、4) 生ワクチンの投与が行われている。各対策方法の現状及び問題点を以下に列挙した。

- 1) 感染オーシスト数の低減又は消毒のため一定の空舎期間（オールイン・オールアウト）を設けて鶏舎環境を洗浄、乾燥、消毒処理する方法が用いられている。しかし、十分な空舎期間を得られないこと、鶏舎構造自体が複雑であること、オーシストが物理的・化学的に極めて安定なため有効な消毒薬の種類に限りがあることなどが影響して、徹底できていないのが現状である。
- 2) 抗菌性飼料添加物としてポリエーテル系抗生物質に属するサリノマイシン、ナラシン及びラサロシドなどが用いられ、低コストで安定的に有効性を示すことから対策の中心的役割を果たし

ている。しかし、使用できる日齢等に制限があり、肉用鶏では出荷7日前まで、肉用鶏以外の鶏では10週齢までにその使用が限定されている。そのため、少なくとも抗菌性飼料添加物を使用できない期間は、本症の発生に対して無効である。

- 3) 鶏コクシジウム感染症に対する治療剤として、サルファ剤単体あるいはST合剤と呼ばれるサルファ剤とトリメトプリムの合剤が汎用されている。しかし、これらの薬剤は広域の *Eimeria* 属原虫に対して有効性を示すものの、壊死性腸炎などを併発した場合はこれら治療剤だけでは十分な対応ができずその被害が甚大となることも報告されている。また、休薬期間として、と殺前5日間が設定されていることから出荷前の発生に対しては適用できない。産卵鶏については、対象動物から除かれていることに加えて、これらの投与によって産卵低下が起こるとした報告もある。
- 4) 鶏コクシジウム感染症に対するワクチンとして、早熟化弱毒株オーシストを用いた生ワクチンが一般的である。早熟化弱毒株は鶏体内での増殖環が速まったことから原虫自体の増殖能力や組織侵襲性といった病原性が低下している。早熟化弱毒株は長期間にわたって継代を繰り返すことで早熟性状が安定し、病原性が復帰しにくくなることが確認されている。ワクチンによる免疫は種特異的であって、異種間での交差免疫は成立しない。また、ワクチンによる免疫の成立には繰り返し感染が必須とされており、免疫が完全に成立するまでには3回程度の感染が必要である。ワクチンによって強い免疫が誘導できた時点では野外株の感染自体を抑制することや腸管内の増殖を抑制することも可能であるが、通常は感染や増殖を抑制するのではなく、発症

の抑制を効能効果としている。

鶏コクシジウム感染症生ワクチンについて

1) 海外で市販されている鶏コクシジウム感染症生ワクチン

鶏コクシジウム感染症生ワクチンは強毒株生ワクチンと弱毒株生ワクチンの2つのカテゴリーに分類される。現在、強毒株生ワクチンとして、CocciVac[®] (MSD, UK)、Immucox[®] (Ceva, USA)、Inovocox[®] (Huvepharma, Bulgaria) 等が40カ国以上で販売・使用されている³⁾。しかしながら、強毒株生ワクチンは投与後の管理が非常に難しく、しばしば投与鶏における発症の危険性を孕んでいる。1980年代以降、鶏コクシジウム原虫を早熟化させて弱毒化する実用的な技術が確立され、より安全性を高めた弱毒株生ワクチンが開発され始めた⁴⁾。現在、弱毒株生ワクチンとしてParacox[®] (MSD, UK)、Livacox[®] (Biopharma, Czeck)、Eimeriavax[®] (Bioproperties, Australia) 等が世界各国で販売・使用されている。それぞれの鶏コクシジウム感染症生ワクチンは、含有する種(3種~7種)、投与方法(飼料添加、点眼、噴霧、飲水、卵内)において、それぞれ特色を有している。短期間飼育のプロイラーを対象とする場合、*E. acervulina*、*E. maxima*、*E. tenella*などを含有した製品が一般的に用いられる。一方、種鶏や採卵鶏等の長期飼育鶏を対象とする場合、上述した3種に加え、*E. necatrix*、*E. brunetti*等を混合した多価製品が用いられる^{3,4)}。

2) 日本で使用されている鶏コクシジウム感染症ワクチン及び開発中のワクチン

日本では、現在3製剤の弱毒生ワクチンが承認及び販売されており、いずれも早熟化弱毒株を使用している(表1)。

これら3種類の生ワクチンのうち、日生研鶏コク

表1 日本で販売されている鶏コクシジウム感染症生ワクチン

製品名	製造販売業者名	含有するコクシジウム種	用法
日生研鶏コクシ弱毒3価生ワクチン(TAM)	日生研	<i>E. acervulina</i> <i>E. maxima</i> <i>E. tenella</i>	混餌 散霧
日生研鶏コクシ弱毒生ワクチン(Neca)	日生研	<i>E. necatrix</i>	混餌
パラコックス-5 (Paracox®-5)	科学飼料研究所	<i>E. acervulina</i> <i>E. maxima</i> (2株) <i>E. mitis</i> <i>E. tenella</i>	混餌

シ弱毒3価生ワクチン(TAM)及びパラコックス-5については、肉用鶏の中でも抗菌性物質等を一切使用しない無薬飼養鶏の生産において普及している。一方、日生研鶏コクシ弱毒生ワクチン(Neca)は長期飼育する平飼い鶏の採卵鶏で使用されている。産卵極期における*E. necatrix*による鶏コクシジウム症の発生による被害が深刻な問題となっていた肉用種鶏の養鶏場のほとんどでNecaが導入された結果、疾病の発生制御が可能となった^{4,5)}。

このような状況下で、我が国では被害の報告がほとんどなかった*E. brunetti*による鶏コクシジウム感染症の発生及びその検出の報告が、全国的な種鶏場で増加してきた。前述の37種鶏場を対象とした調査では、*Eimeria*属が検出された33種鶏場のうち、肉用種鶏場及び採卵種鶏場を合わせた17農場で*E. brunetti*の浸潤が認められた。これらの報告から、我が国の種鶏場において既に広範囲に*E. brunetti*が確認されている^{6,7)}。*E. brunetti*感染による鶏コクシジウム感染症は中雛期以降に発症することが多く、種鶏などの長期飼育鶏でしばしば問題となる。*E. brunetti*による鶏コクシジウム感染症が発生した場合、増体重や育成率に多大な影響を及ぼし、その後の生産性を著しく低下させることから、種鶏場を中心として*E. brunetti*対策に有効なワクチンの開発が強く要望された。そこで弊所では、鶏コクシジウム

原虫を弱毒化する手段として実績のある早熟化継代法を用いて*E. brunetti*国内分離株から生ワクチンに適した弱毒株を作出し、*E. necatrix*との混合ワクチンの開発を試みた。その結果、実験室内における安全性試験及び様々な有効性試験において、その安全性及び有効性が確認された⁹⁾。本試作ワクチンは従来の製品と同様に混餌投与によって免疫を賦与し、*E. necatrix*と*E. brunetti*のそれぞれの攻撃試験で死亡率又は症状を低減させた。また、従来製品とは異なり、3価生ワクチンとの同時投与が可能となるよう改良した。この試作ワクチンを野外飼養の肉用鶏及び採卵鶏に用いたところ、臨床試験においても有用性を示す成績が確認された^{9,10)}。

3) 次世代の鶏コクシジウム感染症ワクチン

種特異的に限定された有効性や、製品としての保存性に難がある生ワクチンの問題を解消するため、既に新たな製剤の開発が試みられている。その一つとして*E. maxima*ガメートサイト由来タンパク質を種鶏に接種して免疫し、移行抗体によりヒナをコクシジウム感染症から防御する製品CoxAbic®(Abic biological laboratories, USA)がある。この製品はオーシストの形成を阻害することで感染を阻止するという作用機序を持つ。しかし、本ワクチンは、攻撃試験における感染防御が十分でない、大量製造が難しい、価格が高いといった理由から、今のところ

普及していない^{3,11)}。また、遺伝子工学技術を応用したサブユニットワクチンの開発も試みられており、候補抗原として鶏コクシジウム原虫のミクロネム、ロプトリー又はガメートサイトなどが同定されている。これらの発現タンパク質又は遺伝子組換えDNA、あるいはそれら遺伝子を挿入したベクターを免疫原としたワクチンは、オーシスト排泄量及び腸病変スコアを30%～90%程度減少させ、飼料効率及び体重増加などを改善することが報告されている^{3,11)}。最新の研究では、サルモネラベクター、酵母ベクター、ウイルスベクターなどを応用することに加え、遺伝子組換えコクシジウム原虫を用いて、発現抗原を局所に効率的にデリバリーする研究が進められている¹¹⁾。これらの技術の進捗次第では、複数種に有効性を示すだけでなく、他の病原体にも有効な多価遺伝子組換えコクシジウム原虫ワクチンが開発される可能性もある。

おわりに

ワクチンによって鶏コクシジウム症を予防する試みは未だ途上にある。今後ワクチンをより広く普及させるためには、第一義的には生産性に影響を与える *Eimeria* 種の全てに適応した有効性を示すこと、費用対効果を含めて抗菌性飼料添加物との価格差を小さくすること、免疫成立までの期間を短縮させること、より簡便な方法で確実に投与できることなど改善すべき事案は多くある。ただ、これまで予防策として依存してきた抗菌性飼料添加物という選択肢が今後拡大する方向にはなく、より縮小していくことが予想される。そこで、ワクチンそのものを改良し、鶏コクシジウム感染症のコントロールに深く寄与させていく事が命題である。

参考文献

1. Blake DP, Clark EL, Macdonald SE, et al. (2015), *A Population, genetic, and antigenic diversity of the apicomplexan Eimeria tenella and their relevance to vaccine development*, Proc Natl Acad Sci., 112 (38), E5343–E5350.
2. Hector M.C., Larry RM, Mark CJ, (2019), *Coccidiosis, Diseases of Poultry 14th Edition*, 1193–1212, Wiley–Blackwell.
3. Tarek A., Bassant A, Laila H. (2016), *Development of immunization trials against Eimeria spp.*, Trials in Vaccinology 5 (C), 38–47.
4. 川原史也, (2012), 鶏コクシジウム症の対策および今後の戦略, 鶏病研究会報, 48, 185–192.
5. 坂井利夫, (2009), 採卵鶏のコクシジウム症：最近の発生状況と対応策, 動物の原虫病, 24 (1), 22–29.
6. 中村義男, 金平克史, 磯部尚ら, (2011), 鶏コクシジウム浸潤状況の全国調査 (2007年1～3月), 動衛研研究報告, 第117号, 1–10.
7. Matsubayashi M, Shibahara T, Matsuo T, et al. (2020), *Morphological and molecular identification of Eimeria spp. in breeding chicken farms of Japan*, J Vet Med Sci. 82 (5), 516–519.
8. Kawahara F, Zhang G, Suzuki T, et al. (2014), *Characterization of Eimeria brunetti isolated from a poultry farm in Japan*, J Vet Med Sci. 76 (1), 25–29.
9. 上野晃聖, 張国宏, 小野浩輝ら, (2021), 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, 第164回日本獣医学会学術集会, CO-27.
10. 張国宏, 上野晃聖, 小野浩輝ら, (2021), 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, 第164回日本獣医学会学術集会, CO-28.

11. Mesa-Pineda C, Navarro-Ruiz JL, Lopez-Osorio S, et al. (2021), *Chicken Coccidiosis: From the Parasite Lifecycle to Control of the Disease*, Front Vet Sci. Dec 21 (8), Article 787653.

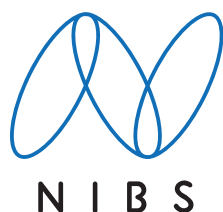
(本記事は、動物用ワクチン-バイオ医薬品研究会のニュースレター 25号 2022年6月(令和4年6月17日発行)に掲載された「ワクチンによる鶏コクシジウム感染症の予防(張国宏、上野晃聖; 16頁~20頁)」を同研究会の許可を得て転載したものです。)

お詫びと訂正

日生研たより第68巻第3号(通巻624号、令和4年7月1日発行)の記載に誤りがございました。正しくは以下のとおりです。

P.18 (誤) 杉浦 勝明 非常勤理事
(正) 杉浦 勝明 常務理事

読者の皆様並びに関係者の皆様にご迷惑をおかけしましたこととお詫び申し上げますとともに、訂正いたします。



—— 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625号) 令和4年9月25日印刷 令和4年10月1日発行(第68巻第4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)