

称号及び氏名 博士（獣医学）川島 牧

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 31 日

論文名 「Studies on Biological Characteristics of Macrophages in Cetaceans: Particular Reference to Distribution and Morphological Features of Pulmonary and Hepatic Resident Macrophages in Odontoceti（鯨類のマクロファージの生物学的特性に関する研究：特にハクジラ亜目における肺と肝臓の在
住マクロファージの分布と形態学的特徴）」

論文審査委員 主査 教授 小谷 猛夫
副査 教授 佐々木文彦
副査 教授 児玉 洋
副査 助教授 山手 丈至

論文要旨

緒言

最近、鯨類の座礁が増加しており、社会的にも注目されている。座礁の原因については諸説あるが、感染症や海洋汚染の影響も原因の一角であると考えられている。しかしながら、解剖学・生理学を初めとする鯨類の生物学的特性の多くは明らかではなく、死亡原因の解明は困難であることが多い。近年、宿主の免疫動態を知る目的から、鯨類のリンパ球抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体が開発され、またヒトやウシのリンパ球抗体の鯨類への交差性が調べられている。マクロファージもまた、病原体を含む外来性異物や老廃細胞の処理さらに抗原提示作用など、広く生体防御に携わる細胞群である。しかし、鯨類のマクロファージに関する研究はほとんど無く、その解剖学的な分布も生理学的、病態生理学的な役割も明らかではない。本研究では、鯨類のマクロファ

ージの解剖学的分布と形態学的特徴について解析し、その役割について解明することを目的とした。

本研究では、独立行政法人・遠洋水産研究所の協力を得て、沿岸小型捕鯨業または突棒漁業で捕獲されたハクジラ亜目 2 科 6 種のサンプルを用いた。

1. マイルカ科：コビレゴンドウ南方型マゴンドウ(*Globicephala macrorhynchus*)、ハナゴンドウ(*Grampus griseus*)、ハンドウイルカ(*Tursiops truncatus*)、マダライルカ(*Stenella attenuata*)、スジイルカ(*Stenella coeruleoalba*)
2. アカボウクジラ科：ツチクジラ(*Berardius bairdii*)

第 1 章 免疫組織化学を用いたマクロファージの検出法の確立と生体内分布

1-1. ハクジラ亜目のマクロファージ検出に有用な抗体の探索

鯨類のマクロファージを組織学的に検出する特異抗体が確立されていないことから、初めに抗体の選別を行った。抗ヒトマクロファージ抗体として知られる 4 抗体 [SRA-E5 (抗原: CD204、 macrophage scavenger receptor type I protein)、AM-3K (抗原: CD163、 hemoglobin/haptoglobin complex receptor)、EBM11 (抗原: CD68、 lysosomal-associated membrane protein, class D macrophage scavenger receptor)、 anti-lysozyme (抗原: lysozyme)] の鯨類での交差性を調べた。これらの抗体は多岐の動物種で広く交差性が認められている。

コビレゴンドウ 5 例、ハナゴンドウ 2 例から得られた脾、リンパ節、肝、肺、腎、腸、皮膚をサンプルとして用いた。サンプルは 10% 中性緩衝ホルマリンまたはザンボニ液で固定し、パラフィン包埋組織切片を作製後、上記の一次抗体

を用いて免疫組織化学的染色を行った。その結果、SRA-E5、AM-3K、anti-lysozyme 抗体の交差反応性が確認された。二重免疫染色により、SRA-E5 と AM-3K はほぼ同一の細胞群を検出した。しかし、anti-lysozyme 抗体はごく一部のマクロファージとしか反応せず、AM-3K はホルマリン固定サンプルでは安定した染色性を示さなかった。よって、最も一般的で簡便なホルマリン固定サンプルで、確実なマクロファージ検出が可能な SRA-E5 を以下の研究で用いることにした。

また新たにサンプルの得られた 4 種の鯨類でも同様の結果が得られ、ハクジラ 亜目 6 種までこれらの抗体の有用性を確認した。

1-2. リンパ器官、非リンパ器官におけるマクロファージの分布

上記の免疫組織化学的手法で解析した結果、リンパ器官では、リンパ節リンパ洞の洞マクロファージ、脾赤脾髄の脾索内マクロファージ、腸のリンパ濾胞内マクロファージ、非リンパ器官では肝の Kupffer 細胞、肺の肺胞マクロファージ、腸粘膜のマクロファージ及び、腎や皮膚を含む種々の臓器・組織の間質に分布する組織球（在住マクロファージ）が確認できた。以上の観察から、陸棲哺乳類と同様、鯨類の主要臓器・組織の随所にマクロファージが存在し、その基本分布は陸棲哺乳類と一致することが分かった。

第 2 章 肺および肝在住マクロファージの分布と形態学的特徴

肺と肝は共に外部からの侵入物にさらされており、最も多くの在住マクロファージが存在する臓器である。よって、両臓器のマクロファージを形態学的に調

べ、その役割について検討した。

2-1. 肺の在住マクロファージの分布と形態学的特徴：特に肺血管内マクロファージの発見

6種42頭の肺在住マクロファージについて形態学的に評価した。その結果、肺胞マクロファージと間質のマクロファージは、陸棲動物と同様、盛んな endocytosis と異物貪食により肺胞内の清掃を行っていることが示された。また、鯨類で初めて肺血管内マクロファージ (pulmonary intravascular macrophage: PIM) を発見した。PIM は偶蹄目と奇蹄目に属する一部の動物種とネコで確認されている肺在住マクロファージである。鯨類の PIM は肺胞毛細血管内に認められ、電顕観察では、cell junction で肺胞毛細血管の内皮細胞と接着していた。細胞質内には盛んな飲作用による細胞膜陥入により生じた micropinocytosis vermiformis 管状構造や消化過程の赤血球を含む食胞が確認された。以上のように、末梢循環と接して存在し、盛んな endocytosis が観察されたことから、PIM は Kupffer 細胞と同様に血液の清掃を行っていると考えられた。

PIM はグラム陰性細菌の LPS を結合することで急性肺障害を誘導するため、PIM を持つ動物種の肺はグラム陰性細菌への感受性が高いことが知られている。よって、鯨類の肺においても PIM による同様の作用が推察された。感染症における鯨類の肺の病態生理は明らかになっておらず、PIM の発見はこの分野の研究の進展を促すと考えられる。

2-2. 肝の在住マクロファージの形態学的特徴と分布

スジイルカを除く5種31頭の肝の在住マクロファージについて形態学的に評価した。その結果、Kupffer 細胞と小葉間結合組織のマクロファージが確認できた。

Kupffer 細胞の細胞質には、ヘモジデリンとは異なる黄色～黒色顆粒が豊富に確認された。顆粒を持つ Kupffer 細胞の多くは小葉中心帯 (zone 3) に分布していた。同質の顆粒は小葉間結合組織のマクロファージにも観察され、Kupffer 細胞での蓄積量と正の相関関係を示した。組織化学、蛍光顕微鏡観察、電顕観察の結果、それらの顆粒はリポフスチンが主成分であることが示された。zone 3 の肝細胞にもリポフスチン顆粒が豊富に見られたことから、同部位では、自己食食不良によるリポフスチン形成が起りやすい可能性と、肝細胞から exocytosis により排出されたりリポフスチンを Kupffer 細胞が食食して蓄積している可能性が考えられた。

マクロファージのリポフスチン顆粒の沈着は、成熟動物で多い傾向が見られたが、年齢層を問わず全動物で見られたことから、本研究のマイルカ科鯨類で通常認められる所見であると考えられた。

2-3. コビレゴンドウの肝星細胞の細胞骨格発現と類洞拡張、及び Kupffer 細胞との関連

鯨類の肝微小循環調節について調べるため、コビレゴンドウ 21 頭の肝星細胞 (HSC) について形態学的に評価した。HSC の検出には抗デスミン抗体と抗 α -平滑筋アクチン (α -SMA) 抗体を用いた。その結果、両細胞骨格を有する HSC は肝小葉の zone 3 に偏在していた。また、81% の動物で小葉中心性の類洞拡張が見られ、zone 3 の類洞面積率とデスミン陽性 HSC 数の間に相関が見られた。一方で α -SMA 陽性 HSC 数は細胞外基質 (ECM) の面積率と相関が見られた。相関は、デスミン陽性 HSC 数と α -SMA 陽性 HSC 数の間、類洞面積率と ECM 面積率との間にも認められた。また、デスミン陽性 HSC 数と α -SMA 陽性 HSC 数は SRA-E5 陽性 Kupffer 細胞数とそれぞれ相関が見られた。

以上の結果から、デスミン陽性 HSC は類洞拡張により刺激を受け、血管周囲細胞として類洞を収縮させていると考えられた。HSC の α -SMA 蛋白発現の増加は HSC の活性化と ECM 産生能の増加を示唆する所見であり、類洞拡張により HSC が活性化し、ECM 産生が生じていると考えられた。また、HSC の両細胞骨格の発現には Kupffer 細胞の関与が考えられた。共に調べたラットでも類洞拡張が見られたが、対応した HSC の細胞骨格発現は見られず、コビレゴンドウの HSC は血液のうっ滞に対し、著しく反応する可能性が示唆された。また、ラットでの報告とは異なり、コビレゴンドウでは血液の退路である zone 3 の類洞の調節が重要であると考えられた。潜水動物では、潜水に伴い除脈が起こることが知られており、除脈に伴う肝の zone 3 における生理的な血液のうっ滞とそれに対する防御応答の存在が推察される。本研究の結果は、それらを反映する肝微小血液循環と HSC による調節を示唆すると考えられた。

総括

ハクジラ亜目 6 種のマクロファージの生物学的特性について形態学的に解析し、以下の成績を得た。

1. マクロファージの免疫組織化学的検出には、ホルマリン固定サンプルでの検出が可能な SRA-E5 が有用である。
2. 肺血管内マクロファージ (PIM) の存在を明らかにした。PIM は、効率の良い血液の清掃と肺障害の誘導という二面的な作用を有する可能性が推察された。
3. 肝の在住マクロファージの細胞質には多量のリポフスチン顆粒が存在する特徴があった。これは、鯨類では通常認められる所見であり、重大な疾患を示唆するものではない。

4. デスミンを持つ肝星細胞が小葉中心帯に偏在しており、その細胞数は同部位の類洞拡張と相関していた。この結果から、肝星細胞は、類洞の血管周囲細胞として肝微小循環を調節していると考えられた。また、肝星細胞のデスミン発現には Kupffer 細胞が関与すると考えられた。

5. 本研究成果には海棲哺乳類である鯨類のマクロファージ特性に関する新たな知見を含んでおり、鯨類の生理学的、ひいては病態生理学的な研究を進める上で有用な情報を提示している。

審査結果の要旨

マクロファージは、病原体などの外来性異物や老廃細胞の処理、抗原提示作用など、広く生体防御に携わる細胞群である。しかし、鯨類のマクロファージに関する研究はサンプルの確保が困難であることから、その基礎的知見すら未だ明らかにされていない。本研究では、鯨類のマクロファージの生物学的特性、特にその解剖学的分布と形態学的特徴について解析し、その役割について解明することを目的とした。本研究では漁業にて捕獲された以下に示すハクジラ亜目 2 科 6 種のサンプルが用いられた。

- ・マイルカ科：コビレゴンドウ南方型マゴンドウ(*Globicephala macrorhynchus*)、ハナゴンドウ(*Grampus griseus*)、ハンドウイルカ(*Tursiops truncatus*)、マダライルカ(*Stenella attenuata*)、スジイルカ(*Stenella coeruleoalba*)

- ・アカボウクジラ科：ツチクジラ(*Berardius bairdii*)

これらの材料を用いて、鯨類のマクロファージを免疫組織化学的に検出できる抗体を探索し、鯨類の全身諸臓器におけるマクロファージの基本分布を調べ、さらに多くの在住マクロファージにより防御されている臓器である肺と肝の在住マクロファージの分布と形態学的特徴について詳細に調べた。得られた成果は以下のとおりである。

1. 鯨類のマクロファージを検出するための特異抗体を探索するため、多種の動物と交差反応性を示す 3 種類の抗ヒト・マクロファージ抗体の鯨類での有用性を調べた。コビレゴンドウとハナゴンドウの脾、リンパ節、肝、肺、腎、腸及び皮膚を用いて解析した結果、SRA-E5 (CD204)、AM-3K (CD163)、anti-lysozyme 抗体の 3 種類全ての抗体が鯨類で交差反応性を示した。しかし、anti-lysozyme 抗体はごく一部のマクロファージとしか反応せず、AM-3K はホルマリン固定サンプルで安定した染色性を示さなかった。SRA-E5 は、簡便で一般的なホルマリン固定で安定した結果が得られたことから、最も有用な抗体であることが判明した。また、同様の免疫染色結果は他の 4 種の鯨類でも認められ、本研究の検索に用いたハクジラ亜目 6 種におけるこれらの抗体の有用性が確認された。

2. 上記 3 種のマクロファージ抗体を用いた免疫組織化学的手法で鯨類のマクロファージの全身諸臓器・組織における基本分布を調べた結果、鯨類の主要臓器・組織の随所にマクロファージが存在し、その基本分布は陸棲哺乳類と基本的には一致することを明らかにした。

3. ハクジラ亜目 6 種全ての肺で肺血管内マクロファージ(PIM)が存在することを明らかにした。これは鯨類では初めての報告である。PIM には、組織学的に盛んな endocytosis が観察されたことから、鯨類の PIM は肝 Kupffer 細胞と同様に血液の清掃を行っていることを示すものである。PIM はグラム陰性細菌の LPS と結合することで急性肺障害を誘導する

ため、この発見は小型鯨類の主な死因である肺感染症における PIM の病態生理学的研究の進展に繋がるものと考えられる。

4. マイルカ科の肝在住マクロファージの細胞質には多量のリポフスチンが存在することを明らかにした。リポフスチン保有在住マクロファージの近接部位の肝細胞にもリポフスチンが豊富に見られたことから、同部位では自己貪食の機能低下によるリポフスチン蓄積が生じやすい可能性と、肝細胞から exocytosis により排出されたリポフスチンをマクロファージが貪食して蓄積している可能性が考えられた。マクロファージのリポフスチンの沈着は、年齢層を問わず全ての動物で見られたことから、マイルカ科鯨類で通常認められる所見であることを示した。

5. コビレゴンドウの肝では、細胞骨格のデスミンを持つ肝星細胞が小葉中心帯に偏在し、そのデスミン陽性肝星細胞数は同部位の類洞面積率と相関していた。これは、デスミン陽性肝星細胞が、類洞の血管周囲細胞として肝微小循環を調節していることを示すものである。また、デスミンを発現する肝星細胞数と Kupffer 細胞数との間に相関関係が見られたことから、Kupffer 細胞は、肝星細胞のデスミン発現と類洞の微小循環調節に中心的な役割を演じている可能性がある。これは海棲哺乳類である鯨類にはユニークな循環調節機構が備わっている可能性を示唆する成果である。

審査委員会の所見

以上のように、本研究は、水環境に適応した鯨類のマクロファージの生物学的な特性に関し新たな知見を明らかにした。本研究で得られた成果は、水中で生活する鯨類の生体防御メカニズムや病態生理学的研究の進展に繋がるとともに、野生動物医学や比較動物病理学の発展に大きく貢献するものである。よって、本論文の審査及び最終試験の結果を併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。