

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19088

研究課題名(和文) ヒロズキンバエ遺伝子改変による新規マゴットセラピー法の開発

研究課題名(英文) Toward the establishment of more suitable strain of *Lucilia sericata* for maggot debridement therapy.

研究代表者

青沼 宏佳 (Aonuma, Hiroka)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60451457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マゴットセラピーとは、ヒロズキンバエ幼虫(マゴット)が患者の壊死組織だけを摂食する性質を利用し、人体の難治性創傷を治療する方法である。マゴットセラピーの大きな特徴として、壊死組織の除去、殺菌、肉芽組織増生の促進、が挙げられる。本研究では、適用範囲が広く短期間で高い効果を上げるマゴットセラピー開発に向け、マゴットのデブリードマン能力評価系の構築、非蛹化により機能性を向上させたマゴットの確立を実施した。このような付加価値の高いマゴットの確立は、患者のQOLを高め、また院内の環境衛生面においても、マゴットセラピーの普及に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Maggot debridement therapy (MDT) is one of biotherapy that involves the application of green bottle fly, *Lucilia sericata*, larvae (Maggot) to the necrotic wounds. Maggot application to the wound promotes removal of necrotic tissues, disinfection, and healing. Toward the establishment of more suitable strain of fly for MDT, a measure to evaluate the ability of maggot for debridement has been developed. Controlling maggot pupation by reducing acdysteroids was also examined, which could be lead to the extension of days between each treatment. Establishment of more suitable maggot strain could potentially improve therapeutic effect and patient outcome with MDT.

研究分野：衛生動物学

キーワード：創傷治癒 マゴットセラピー ヒロズキンバエ

1. 研究開始当初の背景

(1) マゴットセラピー (Maggot Debridement Therapy: MDT)

マゴットセラピーとは、ヒロズキンバエ幼虫 (マゴット) が患者の壊死組織だけを選択的に摂取する性質を利用した、非侵襲的潰瘍治療法のひとつである。古くは、古代マヤ文明や、ピルマでの伝統医療などでも利用されていた記録があり、数千年の歴史をもつ。マゴットセラピーの大きな特徴として、壊死組織の除去、殺菌、肉芽組織増生の促進、が挙げられる。その治療効果は、報告によってさまざまではあるが、概ね 80%~90% の症例で効果があるとされている。

MDT は、1930 年代には欧米で 100 報以上の文献報告があったが、各種抗生物質の利用や外科的手術の発達により、使用される機会は減少していた。しかし、1990 年代になり抗生物質の多用・乱用により、これらに抵抗性を示す感染性潰瘍が出現した。加えて、糖尿病、動脈硬化など潰瘍の原因となる疾患が増加し、重症化に至る難治性潰瘍も増加している。これにより、MDT が改めて脚光を浴びており、現在では世界 40 カ国で取り入れられている。我が国では、2004 年に初めて MDT がおこなわれ、前医で肢切断もしくは治療法が無いと診断された症例において、88% 以上が MDT により治癒するといった良好な結果が得られている。MDT の利点として、1) 外科的デブリードマンの及ばない部分の生物学的デブリードマンができる、2) 治療侵襲が少ない、3) 麻酔を必要としない、4) 従来治療 (抗生物質や外科治療) より安価である、5) 欧米で治療に対する長い歴史と充分なエビデンスがある等が挙げられる。

(2) ヒロズキンバエ (*Lucilia sericata*)

ヒロズキンバエは、クロバエ科 (*Calliphoridae*) に属するハエの一種である。成虫の体表は金緑色の金属光沢を呈し、幼虫は動物の死骸などで成長する。国内全土に生息しており、腐敗物に集まり、その体表に菌などを付着させて移動することから、衛生害虫としても知られる。

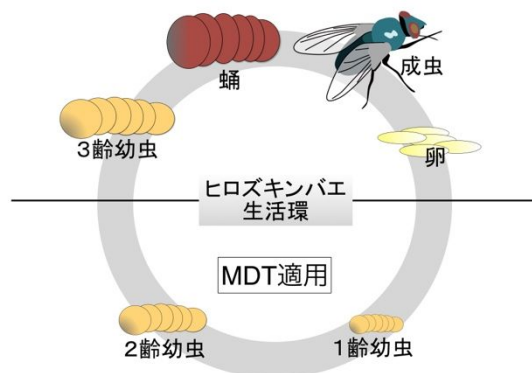


図1 ヒロズキンバエの生活環と MDT の適用ステージ

ヒロズキンバエは完全変態昆虫であり、卵、1 齢~3 齢幼虫、蛹を経て、成虫として羽化する。成虫は 50~150 個産卵し、18~24 時間で幼虫が孵化する。幼虫は腐肉を摂食して成長し、7~10 日で蛹となる。その後 6~14 日の蛹の期間を経て、成虫が羽化する。

ヒロズキンバエの成虫は、屍に集まり産卵する性質から、法医学・法医昆虫学分野においても利用されている。ヒロズキンバエは、屍の第一入植者であることが多く、成虫はその鋭敏な嗅覚を用いて、死亡からわずか数十分で数キロメートル先からでもターゲットにたどり着く。

一方幼虫は、壊死組織だけを選択的に摂食し、正常組織には影響を及ぼさないことが知られている。幼虫は、唾液線および消化管から分泌液を排出し、壊死組織を融解し、摂食する。さらにこの分泌液中には、ルシフェンシンのような抗菌ペプチドが含まれ、これにより幼虫周辺を殺菌し、また周辺の pH をアルカリに保つことにより、菌の増殖を抑制する。この幼虫の性質を医療に適用したのが MDT である。

2. 研究の目的

本研究は、高い治癒効果をもつ MDT の現在の弱点に着目し、多くの細菌と壊死組織を積極的に摂食するマゴット系統を確立することにより、より短期間で効率的な難治性創傷治療への応用を目指すものである。

前述のとおり、MDT は様々な特徴をもち、多くの症例で効果を上げてきた。しかし一方で、一部の潰瘍には効果が少ないまたは効果が無いことや、炎症増悪する症例が存在することも報告されている。また、MDT がもつ特徴について、そのメカニズムはほとんど解明されていない。殺菌効果をもつとされているマゴットの抗菌ペプチドについても、実際の有効性については明らかではなく、摂食によって壊死組織が減少し、結果的に菌が減少しているとする意見もある。そこで本研究では、これらのケースに焦点を当て、ヒロズキンバエ幼虫 (マゴット) の摂食行動をコントロールすることによって、治療効果の増強を図るという着想に至った。具体的には、マゴットの壊死組織摂食量の増進、細菌全般に対する積極的摂食、などの機能を付与し、高性能マゴットを確立するものである。

また MDT において、マゴットは壊死組織だけを選択的に摂食し、正常組織には影響を及ぼさない。この重要な事実、DMT 最大の特徴であるとともに、治療において壊死組織と正常組織の境界を明らかにするというメリットも与えている。しかし、このときのマゴットによる壊死組織と正常組織を識別するメカニズムも、未解明のままである。本研究では、マゴットの摂食能力と MDT におけるデブリードマン効果の関係に着目し、デブリー

ドマン能力がより高い系統の確立を目指した。

さらに、改良 MDT を目的とし、頻回交換が不要なマゴットの作出も試みた。ヒロズキンバエを含むハエ類では、その蛹化にエクジステロイド合成経路が重要であることが知られている。このエクジステロイドを阻害することにより、蛹化阻止が可能となる。MDT では、ハエの生活環に伴い、患部に処置したマゴットを 24 時間～48 時間で交換することが必要である。つまり、患部のマゴットが蛹化する前に取り除き、若齢のマゴットを改めて患部に置くこととなる。従って、マゴットの蛹化を防ぐ事ができれば、交換回数を減らすことが可能である。また、ハエの逃亡、羽化を防ぐことにもつながり、患者の QOL 向上、院内の環境衛生面においても、MDT の普及に寄与するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒロズキンバエ飼育

ヒロズキンバエは、医療用標準系統の幼虫を購入した。これを、飼料である牛肉と豚肉を混ぜた挽肉の上に載せ飼育した。成長し蛹となったヒロズキンバエを回収し、ケージに入れて羽化させた。ケージ内に飼料を入れて産卵させ、卵を回収して孵化させた。上記方法を繰り返すことにより継代した。

(2) ヒト組織の採取

東京慈恵会医科大学付属病院形成外科でおこなわれたデブリードマン手術・処置で廃棄された組織を採取した。採取した組織は、組織ごとに分け、保存した。

(3) ヒロズキンバエ幼虫の体重と幼虫齢の測定

ヒロズキンバエ幼虫各個体の、体重、幼虫齢の 2 点を元に、発育の測定をおこなった。体重は、幼虫 1 個体をアルミホイル上もしくはチューブに入れて、微量天秤で計測した。幼虫齢は、各幼虫を顕微鏡下で観察し、気門の数を指標として決定した。

(4) ヒロズキンバエ幼虫へのエクジステロイド不活性化酵素の微量注入

神村学博士（独立行政法人農業生物資源研究所）から供与された、糸状菌由来のエクジステロイド不活性化酵素である ecdysteroid-22-oxidase (E220) を、幼虫に微量注入した。幼虫の齢に合わせ、マイクロインジェクターおよびシリンジを用いて注入した。

4. 研究成果

(1) ヒロズキンバエ大量飼育系の確立

ヒロズキンバエは、通常動物の腐肉を用いて飼育する。しかし、その際の腐臭が大量飼育の妨げとなっていた。そこで、成虫には動物の腐肉ではなく、植物性タンパク質と糖を

含む飼料を与えることにより、この問題を解決した。これにより、常時 5000 匹以上のハエの飼育が可能となった。

(2) ヒト組織を用いたマゴット評価系の構築

MDT に使用するマゴットの機能では、壊死組織の摂食、殺菌作用、肉芽組織の増生が重要である。しかし、現在 MDT に使用されているマゴットでは、これらについて詳細な評価はおこなわれておらず、MDT に適した系統についての検討もなされていない。そこでまず、ヒト組織を用いたマゴット評価系の構築を実施した。

東京慈恵会医科大学付属病院形成外科でおこなわれた手術において廃棄された組織を採取し、幼虫に摂食させた。この手法により、MDT を用いた治療におけるマゴットの壊死組織の摂食と同様の状態とした。手術廃棄組織を組織ごとに分け、各組織に孵化直後の幼虫を載せた。飼育中は、幼虫の体重を毎日計測し、摂食量の評価をおこなった。

通常の牛肉豚肉飼料を摂食した幼虫と比較した結果、ヒト組織の組成によりマゴットの成長が異なることを明らかにした。つまり、MDT に使用するマゴットの評価は、MDT を用いた治療時に摂食するヒト壊死組織を用いておこなうことが必要であることが示された。

さらに、ヒト組織を摂食した幼虫を顕微鏡下で観察し、その発育を評価した。ヒロズキンバエの幼虫は、脱皮により 1 齢～3 齢まで発育する。それぞれの齢によって気門の数は決まっていることから、これを指標として齢を決定した。これにより、飼料の組成による成長速度の差を明らかにした。

これらの結果から、ヒト組織を用いた MDT 用マゴットの評価系を構築した。この評価系は、MDT に使用するヒロズキンバエ系統のスクリーニングおよびその機能評価の基盤となるものである。

(3) ヒロズキンバエの蛹化抑制

MDT は、マゴットに壊死組織を摂食させるものであり、効果があるのはヒロズキンバエが幼虫の期間のみである。従って、患部に処置したマゴットは、蛹化する前に取り除く必要がある。このため現在の MDT では、24 時間～48 時間ごとにマゴットを交換する必要がある。治療を完遂するのに平均 2～3 回の処置が必要である。また、この処置が遅れた場合にはマゴットが脱走し、病院内の衛生面でも問題となる。そこで、このような頻回交換が不要で、治療効果が持続するマゴットの作出を試みた。

ヒロズキンバエを含むハエ類では、蛹化には変態ホルモンであるエクジステロイドの合成経路が重要であることが明らかとなっている。さらに、真菌由来の Ecdysteroid-22-oxidase (E220) はステロイ

ド代謝酵素阻害剤として働き、ヒロズキンバエ3齢幼虫に注入すると、その直後の蛹化を抑制することが知られている (Kamimura *et al.*, J Bio Chem 287, 16488-98(2012))。

本研究では、MDT に適用となるヒロズキンバエの各ステージの幼虫に E220 を微量注入し、それらの発育と変態を観察した。その結果、幼虫早期に E220 を注入した場合においても、その後の蛹化が抑制できることを明らかにした。つまり、MDT に使用するマゴットのエクジステロイド合成経路を阻害することにより、蛹化せず、長期間患部に適用できる医療用マゴットを開発できる可能性が示された。

このような付加価値の高いマゴットの確立は、患者の QOL を高め、また院内の衛生環境面においても MDT の普及に寄与するものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

吉田拓磨、青沼宏佳、宮脇剛司、嘉糠洋陸 「マゴットセラピーに用いる医療用ウジの改良に向けた試み」 第59回日本形成外科学会総会・学術集会 (2016年4月15日 福岡市)

吉田拓磨、青沼宏佳、宮脇剛司、嘉糠洋陸 「マゴットセラピーに用いるヒロズキンバエ (*Lucilia sericata*) 幼虫の改良に向けた試み」 第68回日本衛生動物学会大会 (2016年4月16日 宇都宮市)

吉田拓磨、青沼宏佳、宮脇剛司、嘉糠洋陸 「創傷治療に用いる医療用ウジの改良に向けた試み」 第8回創傷外科学会総会・学術集会 (2016年7月21日 豊島区)

吉田拓磨、青沼宏佳、宮脇剛司、嘉糠洋陸 「ヒト組織を用いたマゴットセラピー評価系の構築」 第4回日本マゴットセラピー症例検討会 (2016年12月3日 京都府京都市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

青沼 宏佳 (AONUMA, Hiroka)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60451457