

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670203

研究課題名(和文) 遺伝子改変による高効率化マゴットセラピー法の開発

研究課題名(英文) Artificial control of development of *Lucilia sericata* larvae in maggot debridement therapy

研究代表者

嘉糠 洋陸 (KANUKA, HIROTAKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50342770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マゴットセラピーは、主としてヒロズキンバエの幼虫が壊死組織を選択的に摂食する作用を用いた難治性創傷に対する治療法で、ヒル治療と並び数少ないバイオセラピーの一つである。主にデブリードマン効果、抗菌効果、肉芽増生効果の3つの効果があり、糖尿病性壊疽や褥瘡等に効果を上げる。本研究では、蛹化・羽化の人為的制御、デブリードマン能力の向上等を目的とした医療用ウジ系統の改良を試みた。その結果、真菌由来の酵素での蛹化阻止、および野外採集による新規ヒロズキンバエ系統の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：The larvae of the green bottle fly *Lucilia sericata* have been employed for maggot debridement therapy (MDT). Depending on the size and depth of wound, larvae are applied 2-4 times per week and left on for a period of 24-72 h. After each period of treatment, larvae on wound should be removed because larvae pupate to be adult. Larval molting and pupation are governed by the ecdysteroids. We employed Ecdysteroid-22-oxidase (E220), an ecdysteroid-inactivating enzyme from the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*, to control larval period and onset of pupation. E220 has been known to reduce ecdysteroid titer and thereby control development of several insect species. We examined inhibitory effects of E220 on pupation of *L. sericata* larvae. The larval stage was prolonged and pupation decreased when recombinant E220 protein was injected into second stage larvae. The data suggested that E220-based developmental control might be potentially applicable to enhanced MDT.

研究分野：衛生動物学

キーワード：マゴットセラピー 難治性創傷 褥瘡 ヒロズキンバエ バイオセラピー

1. 研究開始当初の背景

1999年代になり、抗菌薬の多用により抗菌薬に抵抗性を示す感染性潰瘍が出現した。加えて、糖尿病、動脈硬化症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が増加している。また、事故等による四肢の外傷では、開放骨折や軟部組織損傷などに加え、化膿性骨髄炎や難治性皮膚潰瘍などを併発することも少なくない。循環障害のため外傷部位が壊死および感染を起こし、切断せざるを得ないケースもある。そのため、治療の長期化や傷害の遷延化により、社会復帰に時間を要する場合や、転職を余儀なくされることがあり、患者の QOL を極めて大きく左右する。

そのため治療法のひとつとして医療用ウジ治療 (Maggot Debridement Therapy: MDT) が注目されてきている。その特徴として、①壊死組織の除去、②健康肉芽増生、③感染制御、④殺菌などの効果が挙げられている。治療効果は諸家の報告によりさまざまであるが、概ね 80~90% に治療効果があるとされ、特に難治性創傷の治療に応用されている。

MDT にはヒロズキンバエ (*Lucilia sericata*) 幼虫が主に使用されている。この種はクロバエ科に属するキンバエの一種で、全世界の温暖な地域に生息している。

MDT の標準的方法は以下の通りである。MDT 用の幼虫 (ウジ) を潰瘍部に置き、幼虫の逃亡を防止しつつ呼吸可能な程度にカバーをかける。創傷面積 1 平方センチメートルあたり 5~10 匹が適している。幼虫は、腐敗組織に特異的に作用する分泌液 (タンパク質分解酵素等を含む) により組織を溶かして食べ、健全な組織は食害しない。これにより、壊死組織のみが患部から除去される。また、同時に幼虫が分泌する抗菌物質群によって、殺菌もおこなわれる。この分泌液は、MRSA などの薬剤耐性菌を含む様々な病原菌に殺作用があることが知られている。これらの幼虫による活動によって潰瘍の改善がもたらされる。幼虫は蛹になる前に除去され、治療を継続する場合は新たな幼虫群により処置する。

我が国では2004年に初めて MDT が行われ、世界40か国以上にて取り入れられている。その利点は、1) 外科的デブリの及ばない部分の生物学的デブリができる、2) 治療侵襲が少ない、3) 麻酔を必要としない、4) 禁忌症例がない、5) 従来の治療 (抗生物質や外科治療) より安価である、6) 欧米で治療に対する長い歴史と十分なエビデンスがある等が挙げられる。

2. 研究の目的

近年、症例解析により、MDT の効果が少ないまたは無効な潰瘍があることが明らかになった。MDT は、組織血流が十分でない潰瘍などでは効果が認められず、血行再建術などの前処置を必要とする。また、MDT は幼虫を用いるため、その幼虫が蛹化すると治療効果は無くなる。そのため、少なくとも3回の新鮮ウジへの交換が必要とされている。

MDT は、ヒロズキンバエの生活環に従い蛹化が避けられないため、留置後は 24~48 時間に 1 回、被覆交換が必要である。マゴットの分泌液による周囲の皮膚炎を防ぐため、まず創傷縁に沿って正常皮膚の防御被覆を行い、次にマゴットを創部へ留置し、最後にマゴットが脱走しないように厳重な被覆を行うため、交換は煩雑かつ、治療には平均3回の被覆交換が必要である。また、稀にマゴットが被覆から脱走する。院内で羽化した場合衛生面が問題となる。蛹化対策としてメッシュ状の袋にウジを入れるバッグ法が主流となってきているが、患部に直接ウジが触れるフリー法と比べると治療成績が劣ることが明らかになっている。被覆交換の煩雑さと羽化による衛生面の問題点を解決するため、蛹化を人為的に制御可能なヒロズキンバエを作出するという発想に至った (図1)。

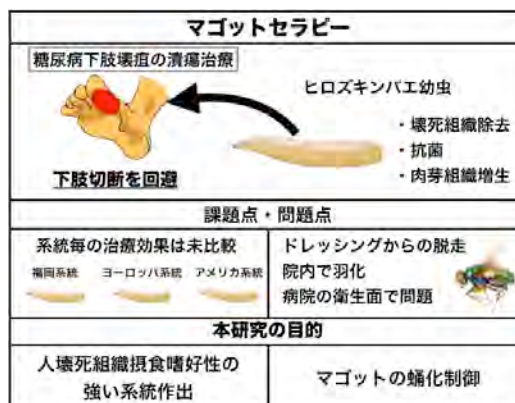


図1 本研究の概念図

また、世界で約9万種にのぼるハエ目の中で、ヒロズキンバエ幼虫の人体への安全性と治療効果は過去の研究で確立されてきたが、ヒロズキンバエの中で人壊死組織のデブリードマンに最適な系統の検討は行われていない。蚊やショウジョウバエでは系統間における摂食嗜好性が解明されつつあり、人壊死組織摂食嗜好性の強い系統の作出を実施する (図1)。

3. 研究の方法

(1) ステロイド代謝酵素阻害剤注入による非蛹化マゴットの作出

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 E22O を1齢幼虫、2 齢幼虫、3 齢幼虫に注入し、非蛹化ヒロズキンバエの作成を行う。人体廃棄組織を用いて蛹化と脱皮についての評価を行う。

(2) 人壊死組織嗜好性の高い系統の作出

西多摩地区法医学検体のうちウジの発生した検体が出現した際、慈恵医大法医学講座でウジの採取を行なう。採取したウジは羽化した際に顕微鏡下で形態学的種同定を行い、ヒロズキンバエであれば交配して系統化する。系統化したヒロズキンバエは COI 配列、28S rRNA 配列、period 配列で遺伝子的種同定を行う。

4. 研究成果

(1)ステロイド代謝酵素阻害剤はヒロズキンバエ幼虫の蛹化を抑制する

ハエ類に代表される双翅目は、成長の制御にエクジステロイドが重要で、エクジステロイドの急激な増加がスイッチとなり蛹化が起こることが分かっている(図2)。エクジステロイド合成経路をステロイド代謝酵素阻害剤の幼虫への直接注入で阻害し、蛹化制御可能なヒロズキンバエ作出を試みる。真菌由来のステロイド代謝酵素阻害剤をヒロズキンバエ幼虫に注入すると、蛹化がほぼ完全に抑制され、幼虫のまま10~20日程度生存することが報告されている(Kamimura *et al.*, *J Bio Chem* 287, 16488-98(2012))。この方法を用いてマゴツの蛹化阻害を試みた。

エクジステロイド-22-オキシダーゼ(ecdysteroid-22-oxidase: E22O)は真菌(*Nomuraea rileyi*)由来のステロイド代謝酵素阻害剤で、エクジステロイドを失活させることが知られている。このE22Oを、ヒロズキンバエ1齢幼虫~3齢幼虫にガラスニードルを用いて微量注入したところ、各幼虫において蛹化阻害、形態異常、致死などの影響が確認された。

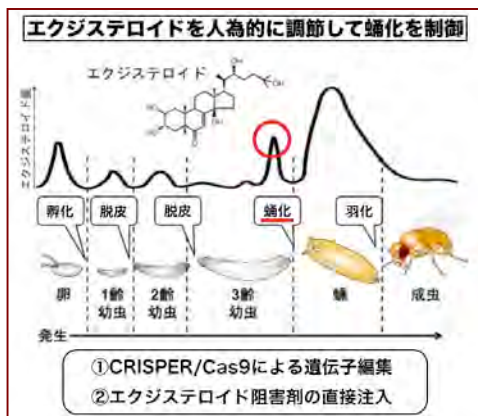


図2 蛹化の人為的制御の概念図

(2)人壊死組織嗜好性ヒロズキンバエ系統の作出

また、MDTに用いる治療効果の高いヒロズキンバエの系統確立を目的として、法医解剖の遺体からウジを採集後、飼育・継代を試み、新規のヒロズキンバエ系統化を実施した。

調査期間は2015年5月~11月、その期間の該当法医解剖症例数は15例、ハエ種が同定された症例数は11症例だった。系統化されたヒロズキンバエの系統数は3系統であった。

*L. sericata*は、4例とも町田市や府中市など住宅地域の遺体に発生し、*C. pinguis*では4例中3例が奥多摩地域などの山中で発見された遺体から発生した。*L. sericata*は人為的環境下に広く分布することが多く、*C. pinguis*は森林地域で発生することが多い。症例数は少ないが*L. sericata*と*C. pinguis*の発生地域は一般的な分布地域と近い傾向を示した。

今回の調査において、*Sarcophaga*属の*Sarcophaga crassipalpis*(シリアカニクバエ)、*Sarcophaga similis*(ナミニクバエ)、

Sarcophaga peregrina(センチニクバエ)の3種のニクバエの発生を確認した。

今回新たに系統化に成功した3系統のヒロズキンバエと、現在治療に用いられている既存系統のヒロズキンバエを用いて、摂食量や摂食嗜好性等の評価を実施する予定である。

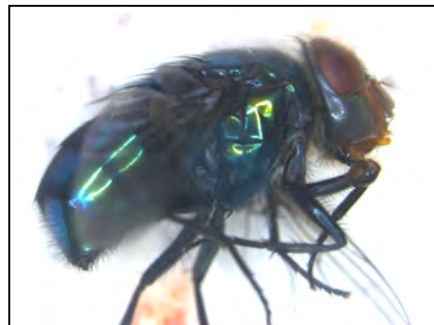
図3 今回の調査で同定されたハエ種一覧

・*Lucilia sericata*(ヒロズキンバエ)



形態:体長5~9mm 体は金緑色で金属光沢がある。分布・生態:全世界に分布し日本全国に在る。ゴミ、処分場内など人為的環境下で発生することが多い。その他:マゴツセラピーに用いられる。

・*Chrysomya pinguis*(ホホグロオビキンバエ)



形態:体長8~9.5mm 体は緑色または青藍色で強い金属光沢がある。緑色で金属光沢がある。頭部が比較的大きい。分布・生態:市街地よりはむしろ河川流域や森林近傍などで発見された死体より採集されることが多い。

・*Sarcophagidae*(ニクバエ科)



形態:体長9~11mm、体は灰色で前胸背に3本の黒い縞模様がある。腹部は市松模様である。分布・生態:日本では全国に分布。人畜の糞、

畜舎、動物の屍体などから発生し、肉も好む。ニクバエ類は胎生で、雌成虫は卵ではなく1齢幼虫を産出する。蛹で越冬し、盛夏に活動のピークがある。

・*Phoridae*(ノミバエ類)



形態:体長 2~3mm で、背中が丸く、後脚腿節が太い。分布・生態:日本全国に分布。多くは野外に生息するが、一部の種類は屋内で発生する主要なコバエ類としても知られる。幼虫は腐敗植物質、漬物、堆肥、動物死体、腐肉などから発生する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

①吉田拓磨、青沼宏佳、岡戸清、宮脇剛司、内田満、嘉糠洋陸 創傷治療における医療用ウジの改良に向けた試み 第7回創傷外科学会 2015.7.24(東京)

②吉田拓磨、青沼宏佳、宮脇剛司、嘉糠洋陸 Artificial control of development of *Lucilia sericata* larvae in maggot debridement therapy. International Wound & Biotherapy Conference 2015 2015.10.16(マレーシア)

③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 2016.4.16(宇都宮)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://jikei-tropmed.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

嘉糠 洋陸(KANUKA HIROTAKA)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号:50342770

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し