

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08812

研究課題名(和文) ヒト創傷治療に適した高機能マゴットセラピー法の開発

研究課題名(英文) Toward the establishment of high-performance blowfly strain 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) 3,700,000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取する性質を利用し、難治性創傷を治療する方法である。多くの症例で成果を上げているが、最適系統の選択や評価がおこなわれず、治療に使用されているのが現状である。本研究では、より治療に適した系統を確立する目的で、野生由来の新規系統を樹立した。新規系統と現在の治療用標準系統について壊死組織の除去能力、創傷再生能力の比較と、それに関連する網羅的な遺伝子発現解析をおこない、系統の評価を実施した。新規系統は治療用標準系統と異なる遺伝的背景をもち、その壊死組織除去能力、および外分泌液による創傷治癒能力がより高い可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト創傷治療に高い適性をもち短期間で高い効果を上げるマゴットセラピー開発を目的とし、新規ヒロズキンバエ系統の樹立と解析を実施した。新規系統は、治療用標準系統とは異なる遺伝的背景を持ち、その壊死組織能力や外分泌液による創傷治癒能力がより高い可能性が示された。この新規系統を臨床治療に応用することにより、より創傷治癒効果が高く、効率的な治療をおこなうことができると期待される。

研究成果の概要(英文)：Maggot debridement therapy (MDT) is one of biotherapy that involves the application of larvae (Maggot) of blowfly to the necrotic wounds. The strain used for therapy has neither selected nor evaluated for its efficacy. To establish high-performance blowfly strain for MDT, novel strains derived from wild blowflies were collected. Novel strains were evaluated based on their ability to remove necrotic tissues by feeding, ability to stimulate healing, and gene expression, in comparison to the currently available strain for medical treatment. The results showed that the novel strains, which showed different genetic background, have potential to be more suitable strains for MDT due to their higher ability of debridement and growth stimulation.

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 デブリードマン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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。その歴史は古く、マヤ文明やオーストラリアのアボリジニ、ミャンマーの一部地域などで使われていたとされ、伝統医療として人類の歴史とともに利用されてきたと推測されている。マゴットセラピーの大きな特徴として、①壊死組織の除去、②殺菌、③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。

マゴットセラピーは、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、マゴットセラピー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年に本邦初の臨床試験が実施され、その後大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%以上が治癒するといった良好な結果が得られている。マゴットセラピーの利点として、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) 従来の治療 (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十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*)

マゴットセラピー (MDT) には、安全で適した種であるとしてクロバエ科 (*Calliphoridae*) ヒロズキンバエが最も多く使用されている。ヒロズキンバエ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。

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。

ヒロズキンバエの特徴は、この幼虫期の腐肉食性にある。マゴットセラピーに用いられるのは、摂食が盛んな1齢と2齢の幼虫である (図1)。3齢幼虫の摂食能力は著しく低下する。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。また、摂食時には唾液線および消化管から分泌液を排出し、壊死組織を融解する。この分泌液中には、ルシフェンシンなどの抗菌ペプチドが含まれる他、線維芽細胞の増殖と浸潤を促進することも明らかにされている。この特徴こそが、マゴットセラピーの成立要因であり、創傷に生じた壊死組織の除去と創傷治癒の促進を可能にしている。

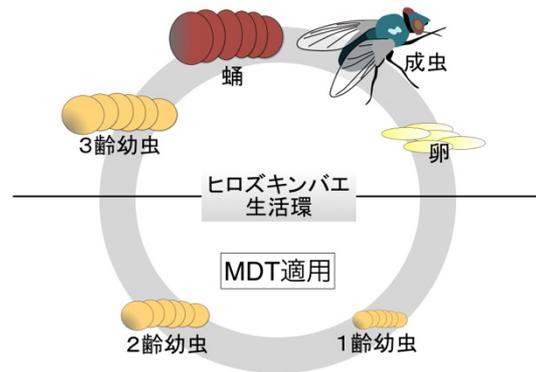


図1 ヒロズキンバエの生活環とマゴットセラピー (MDT) の適用ステージ

2. 研究の目的

本研究は、より多くの壊死組織を積極的に除去し、創傷治癒促進効果が高いマゴットを作出することにより、効率的な難治性創傷治療への応用を目指すものである。

マゴットセラピーは高い治療効果をもつことが知られているが、使用する治療用マゴットについて、これまでに十分な検討はされていない。各国において、入手可能な自国産もしくは輸入のマゴットをそれぞれ使用しているのが現状であり、治療に適した系統のスクリーニングやその機能解析はおこなわれていない。我が国では現在、国内採取系統、オーストラリア系統の2系統のマゴットがマゴットセラピーに使用されているが、この2系統間についても、それぞれの特徴および治療効果の違いについて明らかではない。また、前述のマゴットセラピーがもつ様々な特徴についても、メカニズムはほとんど解明されておらず、系統間による違いも不明のままである。つまり、適切なヒロズキンバエ系統の樹立および機能解析は、より短期間で効果的なマゴットセラピーへの基盤となると考えられた。そこで本研究では、ヒロズキンバエ系統および摂食対象に焦点を当て、創傷面を積極的に摂食し、創傷再生能力が高い、ヒト難治性創傷に適したヒロズキンバエ系統を樹立することによって、治療効果の増強を図ることを計画した。具体的には、①ヒト組織への嗜好性が高い野生由来の新規系統を樹立し、この系統と治療用標準系統について②創傷再生能力の比較をおこない、③それに関与する網羅的な遺伝子発現解析を実施する。

マゴットセラピーに主に用いられる種であるヒロズキンバエ (*Lucilia sericata*) の成虫は、動物の死骸に集まり産卵する性質から、法医学・法昆虫学分野において、死後経過時間推定の重要な指標としても利用されている。遺体に産卵された卵から孵化した幼虫は、壊死組織を積極的

に摂食して成長する。摂食対象の匂いの記憶による動物の摂食嗜好性は、これまでさまざまな動物で広く知られてきた。つまり、ヒト壊死組織を摂食したヒロズキンバエ系統は、マゴットセラピーへの適応性も高いことが期待される。そこで、法医解剖検体に着目し、それらから得られるヒロズキンバエ系統を確立する計画を立案した。これらの新規ヒロズキンバエ系統の摂食量と、外分泌物が与える創傷治癒促進作用を評価することにより、マゴットセラピーによる難治性創傷の再生機序の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 法医解剖検体由来系統の樹立

東京慈恵会医科大学法医学講座が担当した法医解剖検体のうち、ハエのウジ発生が認められた検体から幼虫の採取をおこなった。幼虫は蛹化させた後に羽化させ、ヒロズキンバエ成虫のみを交配して継続飼育することにより樹立した。種同定は、顕微鏡下における形態観察と遺伝子配列の解析によりおこなった。

(2) ヒロズキンバエの飼育

治療用標準系統、法医解剖検体由来系統のヒロズキンバエ (No. 28, No. 36) は、常時 27°C で飼育した。幼虫は牛肉と豚肉の合挽肉上で飼育し、蛹を回収した。羽化した成虫は水およびプロテインパウダーを与えて飼育した。ケージ内に肉を少量置いて産卵させ、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。

(3) ヒロズキンバエの摂食後体重評価

ヒロズキンバエの体重評価は、以下の方法により実施した。牛豚合挽肉の上にヒロズキンバエ卵を静置し、5 日後に 3 齢に成長した幼虫を集めた。幼虫の体重はマイクロ天秤を用いて一匹ずつ計量した。

(4) マゴットの創傷治癒促進作用の評価

① マゴット外分泌液の抽出と濃縮

各系統のヒロズキンバエが産卵した卵を、超純水、1% 次亜塩素酸溶液、70% エタノール、超純水の順に、緩やかに洗浄し、その後プラスチックチューブ内で孵化させた。孵化した幼虫を PBS 溶液に浸かる状態にし、室温下で外分泌液分泌 (excretions and secretions: ES) を促した。得られた外分泌液は濃縮し、タンパク質量を測定後、実験に使用した。

② 培養細胞

ヒト包皮線維芽細胞 (HFF: Human foreskin fibroblasts) は、DMEM 培地にて継代培養し、37°C の CO₂ インキュベーター内で維持した。

③ 細胞増殖性測定

PBS を用いて各系統の外分泌液を各濃度に希釈した。HFF 細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに同数播種し、24 時間培養した。各ウェルに、各濃度の外分泌液希釈溶液または PBS を加え、さらに 48 時間培養した。Cell Counting kit-8 (Dojindo) とマイクロプレートリーダーを用い、吸光度の値から細胞増殖率を求めた。

④ スクラッチアッセイ試験

24 ウェルプレートに細胞を播種し、細胞が単層で相互接着状態になるまで培養した。細胞層に、滅菌済のピペットチップを用いて創傷 (細胞間ギャップ) を作成した。創傷作成によって剥離した細胞の破片を培地ごと除去後、洗浄し、各ウェルへ DMEM 培地を添加した。続けて、各系統の外分泌液を PBS 溶液を用いて各濃度に希釈し、各ウェルへそれぞれ添加した。コントロールは、同量の PBS 溶液を添加した。添加後、各ウェルの 0 時間の状態を顕微鏡下で撮影した。24 時間培養後、6 時間毎に顕微鏡下で観察と撮影をおこなった。撮影した画像の細胞間の距離は画像解析ソフトウェア (NIH Image-J) を用いて測定し、その差から移動距離を算出した。

(5) RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析

マゴット外分泌液抽出と同様の手順でヒロズキンバエの卵を回収、洗浄した。洗浄した卵は、一晚室温で孵化を促し、1 齢幼虫を回収した。これらの幼虫から、総 RNA を抽出した。RNA における発現遺伝子の解析は、北海道システムサイエンス社に委託しておこなった。次世代シーケンサーにより得られたデータから、各系統の遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

(1) 法医検体由来新規ヒロズキンバエ系統の樹立

法医解剖で取り扱う遺体には、死亡後暫く放置され、ハエ目昆虫種が産卵し、そこから孵化したウジが認められるものが存在する。これらのウジを採集し、系統化することで、治療用標準系統よりも機能的に優れたヒロズキンバエ系統を作出することを試みた。

法医解剖に供された検体のうち、ウジの発生が確認された例を対象とした。遺体からウジを回収し、実験室条件にて成育させるところ、複数のハエ目成虫を得た。種同定を実施し、得られたハエ目昆虫がヒロズキンバエ (*Lucilia sericata*) であることを確認した。それぞれの検体由来の成虫のうち、雌雄が認められたものについて交配を試み、4 例由来の系統 (No. 28, No. 34, No. 35, No. 36) の樹立に成功した。

(2) 新規ヒロズキンバエ系統の摂食能力評価

新たに樹立した 4 系統の摂食能力について、摂食後の体重変化により評価した。マゴットセラピーに使用される治療用標準系統を対照として、樹立した系統を合挽肉飼料にて飼育し、ミクロ

天秤を用いて個体別体重増加量を測定した。4系統のうち、最も成績が良好だったNo. 28系統では、治療用標準系統と比べ摂食後体重が1.86倍に達した。また、No. 36系統も、体重比で1.51倍となった。これらの結果は、これらの系統をマゴットセラピーに用いることで、治療用標準系統と比べ、短期間に効果的なデブリードマンを実施できる可能性を示している。

(3) マゴット外分泌液の細胞増殖促進能力の比較

マゴットセラピーにおいて、効率的な肉芽形成は創傷の予後を規定する重要な要因となる。他の外科的なデブリードマン法と比較して、マゴットセラピーの肉芽形成能力は高いとされている。しかしその作用機序は不明のままである。そこで、No. 28系統とNo. 36系統のマゴット外分泌液を対象に、ヒト包皮線維芽細胞の増殖性試験をおこなった。治療用標準系統、No. 28系統、No. 36系統それぞれの1齢幼虫から外分泌液を抽出・濃縮した。外分泌液をヒト包皮線維芽細胞の培養液中に添加し、細胞増殖を調べた。その結果、25 µg/mlのマゴット外分泌液由来のタンパク質溶液を添加した場合において、治療用標準系統(Lab)の増殖割合に比して、No. 28系統とNo. 36系統の外分泌液添加群では細胞増殖がより促進される結果が得られた(図2)。

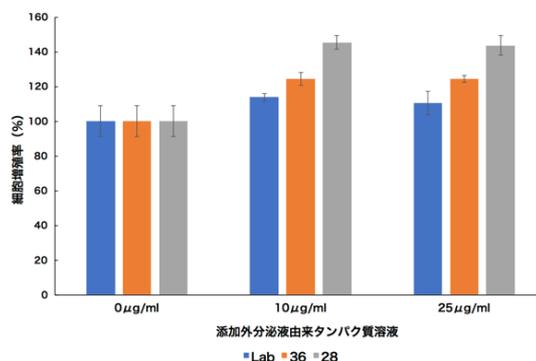


図2 ヒロズキンバエ系統から抽出した外分泌液の細胞増殖促進能力の評価

(4) マゴット外分泌液の培養細胞における創傷治癒能活性の比較

No. 28系統とNo. 36系統のマゴット外分泌液は細胞増殖刺激活性が高いことから、創傷治癒に対する能力を評価することを試みた。培養細胞系を用いた創傷治癒活性測定系として、スクラッチアッセイが用いられている。これは、細胞同士が接触状態にある線維芽細胞などに人為的に擬似的創傷(スクラッチ=ひっかき傷)を入れ、細胞が無い創傷部位に移動した細胞数を測定し、創傷治癒活性とみなす方法である。スクラッチ処理を施したヒト包皮線維芽細胞に対し、治療用標準系統(Lab)、No. 28系統、No. 36系統由来の各種濃度のマゴット外分泌液を添加し培養した。その結果、12時間後の細胞の移動距離は、どの系統のマゴット外分泌液由来のタンパク質添加した場合においても、有意差は無かった。

(5) RNA-seqによる遺伝子発現比較解析

法医検体由来の2系統(No. 28およびNo. 36系統)は、治療用標準系統と比較して、高いデブリードマン能力と肉芽形成能を持つことが示唆された。それらの違いを支える分子基盤を把握する目的で、RNA-seqによるNo. 28系統と治療用標準系統間の網羅的遺伝子発現解析を試みた。

次世代シーケンサー(next generation sequencer: NGS)を用いたトランスクリプトーム解析(RNA-seq)は、未同定遺伝子の個別の配列情報に加え、それらの遺伝子発現量を同時に明らかにできる。No. 28系統と治療用標準系統の1齢幼虫のmRNAを対象としたRNA-seqと遺伝子発現量の比較解析およびアノテーション付けを実施した。ヒロズキンバエは非モデル生物であり参照配列が無い。そこで、各遺伝子のアノテーション付けは、ショウジョウバエおよびイエバエ等ハエ目の生物種の遺伝子情報を参照にしながらおこなった。

解析の結果、治療用標準系統と比較して、No. 28系統の1623個の遺伝子が高く発現していること、1370個の遺伝子発現量は逆に低いことが明らかとなった(図3)。これらの結果から、新たに樹立したNo. 28系統は、治療用標準系統とは異なった遺伝子発現パターンを有することが明らかとなった。

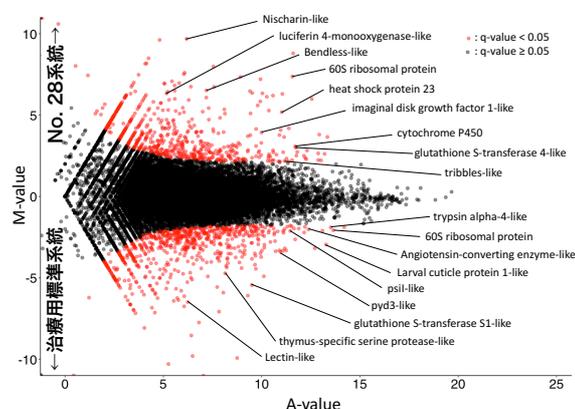


図3 RNA-seqによるヒロズキンバエ系統の遺伝子発現比較解析

本研究結果から、新規に樹立したヒロズキンバエ系統は、現在の治療用標準系統と異なる遺伝子発現パターンをもち、マゴット外分泌液による細胞増殖刺激活性がより高いことが示された。このことから、臨床治療における系統の選択と評価の必要性が示唆された。さらに、新規系統を臨床治療へ応用することで、より創傷治癒効果が高く、効率的な治療をおこなうことができる可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本晃生、吉田拓磨、大塚沙緒里、青沼宏佳、嘉糠洋陸
2. 発表標題 ヒロズキンバエ系統改良による新規マゴットセラピー法の開発
3. 学会等名 日本昆虫学会第78回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本晃生、吉田拓磨、青沼宏佳、西嶋暁生、松本紗里、大塚沙緒里、岩楯公晴、宮脇剛司、嘉糠洋陸
2. 発表標題 東京都下のヒロズキンバエ地域個体群におけるヒト組織摂食量変異と大型化
3. 学会等名 第6回日本マゴットセラピー症例検討会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田拓磨、青沼宏佳、松本紗里、大塚沙緒里、岩楯公晴、宮脇剛司、嘉糠洋陸
2. 発表標題 デブリードマン効果の高い新規医療用ウジ系統の樹立
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田拓磨、青沼宏佳、松本紗里、大塚沙緒里、岩楯公晴、宮脇剛司、嘉糠洋陸
2. 発表標題 デブリードマン効果の高い新規医療用ウジ系統の機能評価
3. 学会等名 第5回日本マゴットセラピー症例検討会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----