

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659083

研究課題名（和文） 多包条虫に関する非開腹的治療法への挑戦と評価法の開発

研究課題名（英文） Novel approaches for the establishment of non-invasive therapy tools of alveolar echinococcosis

研究代表者

伊藤 亮 (ITO AKIRA)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：70054020

研究成果の概要（和文）：実験動物ラットの肝臓の特定部位に局限される多包虫病巣を実験的に確実に作出できる実験系を確立した。この実験系は非開腹的治療法である温熱療法、光線熱力学療法のみならず、外科的肝切除による新しい治癒判定評価法の確立を可能にすると期待される。予備実験で、多包虫の粗抗原と、診断抗原として国際的な評価を得ている遺伝子組換え Em18 抗原（WHO エキノコックス症非公式作業部会・部会長の研究グループ（ドイツ）、WHO 臨床エキノコックス症研究協力センター（フランス）、その他の国際共同研究による）、2 種類の抗原に対する実験感染後の抗体応答動態を経過観察中であり、治療実験を始める時期設定に取り組んでいる段階である。本研究を展開している時に、関連病院において外科的に肝病巣を完全切除した全症例で、周術期から rEm18 に対する抗体応答の著減が確認されている。外科的切除直後からの抗体応答の著減機序はおそらく初めての観察である。本研究で確立した感染実験系は新しい治療法ならびに病態自体の新しい研究の糸口になる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：We have established a novel experimental tool to implant alveolar echinococcosis (AE) lesion in the liver of rats. This animal model to establish experimental hepatic AE lesion enables us to introduce new approaches for evaluation of non-invasive tools such as hyperthermia and photodynamic therapy, and traditional invasive, surgical resection of the hepatic AE lesion. As AE infection is chronic, we have been doing a preliminary experimental work using this new animal model system and analyzing the size of the hepatic lesion by computed tomography (CT) and antibody responses to both crude antigens and recombinant Em18 antigen. The latter has been expected to be highly useful for monitoring of progression of AE through international collaboration projects including the coordinator of the WHO informal working group of echinococcosis in Germany, and WHO collaboration center for clinical echinococcosis in France. Antibody responses to crude antigens became positive much faster than those to rEm18. It may suggest immunobiological characteristics of Em18. From human AE cases, we have found that antibody responses to rEm18 immediately decrease even during the surgical treatment. Therefore, the new system to establish experimental hepatic AE lesion in rats is highly expected to become useful tools for comparative studies of antibody responses to both crude and rEm18 antigens, immunopathologic information after non-invasive and invasive treatments. This novel animal model may open a novel study of immunobiology in AE infections in the animal models and human cases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：蠕虫

1. 研究開始当初の背景

エキノコックス症（多包虫症）は肝細胞癌との鑑別が困難な難治性寄生虫疾患であり、北半球、特にロシア、モンゴル、中国から中央アジア、トルコに至る山岳地帯、ヨーロッパアルプスを中心とする山岳地帯で流行している。国内では毎年 20 例前後の新規患者が報告されているが、全例が進行期以降の病態症例である。また、地球規模で患者発生数が増加傾向にある。悪性腫瘍同様に外科的切除が唯一の治療法となっており、早期診断に関する免疫診断学的研究、画像診断学的研究が展開されているが、早期診断法は確立されていない。近年、肝癌に対する新しい非侵襲性の治療法として温熱療法、光線熱力学療法が導入されており、肝臓病である多包虫症に対してもこれらの治療法が有効ではないかという予測から本研究を開始した。

2. 研究の目的

非侵襲性の治療法の評価研究を実施するために必要な多包虫感染実験動物モデル開発を第一の目的とした。モデル開発では治癒判定マーカーとして国際的に評価されている遺伝子組換え Em18 (rEm18) 抗原に対する特異抗体応答の経時的動態観察 (Ishikawa Y et al. 2009. J Clin Microbiol 47; Tappe D et al. 2009. Am J Trop Med Hyg 80; Tappe D et al. 2010. Clin Vaccine Immunol 17) に基づき治療実験開始時期を決定し、治療効果の評価法の確立を試みることを目的とした。

rEm18 に対する抗体応答は多包虫症人症例の進行期以降症例のほぼ全例で確認され、他の疾患との鑑別が最も容易な多包虫症に特有の抗体応答であること (Ito A et al. 2007. Future Microbiol 2; Ito A et al. 2012. In: Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens, CRC Press; Li T et al. 2010. Clin Vaccine Immunol 17)、この抗体応答動態を予後判定モニタリングに使えることが WHO エキノコックス症非公式作業部会・部会長であるドイツの P.Kern 教授の研究グループ (Tappe et al. 2009, 2010; Sako Y et al. 2010. Clin Vaccine Immunol 17; Sako Y et al. 2011. J Clin Microbiol 49; Sako Y et al. 2009. J Clin Microbiol 47)、フランスの WHO 臨床エキノコックス症協力センター (Bart J et al. 2007. Diagn Microbiol Infect Dis 59; Knapp J et al. 2009. Emerg Infect Dis 15, in prep.; Bresson-Hadni S et al. 2011. Liver Transplant 17) その他との国際共同研究から確認されている (Ito et al. 2007;

Ito et al. 2012)。しかし、rEm18 に対する抗体応答は感染初期では観察されない可能性が予見されることから、感染初期における新規の特異抗体確認候補抗原検索をも想定し、粗抗原に対する抗体応答も比較観察の対象とした。

3. 研究の方法

①肝臓の特定部位に多包虫病巣を作製する実験動物感染系の開発と導入、②粗抗原と遺伝子組み換え Em18 に対する特異抗体応答の経時的観察、③非侵襲性の治療法の導入と評価、④対照研究として、これまで国際的に第一選択肢として確立されている外科的切除法の導入と評価が可能な感染動物実験系の開発と方法論の確立自体を本研究の方法とした。

4. 研究成果

①これまで実施されてきた門脈内への多包虫破碎組織の注入法では、肝臓の特定の部位に病巣を作製することは不可能であること、また肝臓直接接種法ではほとんどの個体で肝臓以外、腹腔内、肺にも病巣が形成されること、抗体応答は特に肺に病巣が形成された個体で高い傾向があることが判明した (Yamashita et al. in prep.1)。また、肺病巣形成機序を肝臓からの転移とみなすべきか？という古典的な問題提起がなされ、この解を得るための追加研究の必要性が論議されている。②多包虫病巣を肝臓の特定部位に移植する新しい感染法を導入し、ほぼ 100% 我々が望む部位にのみ限局される病巣を形成させることに成功し (図 1 ならびに図 2)、CT, MRI 等の画像所見からも確認できること (図 3) が判明した (Yamashita et al. in



図 1. 肝臓の特定部位に形成された多包虫病巣



図2. 多包虫の他臓器への未転移

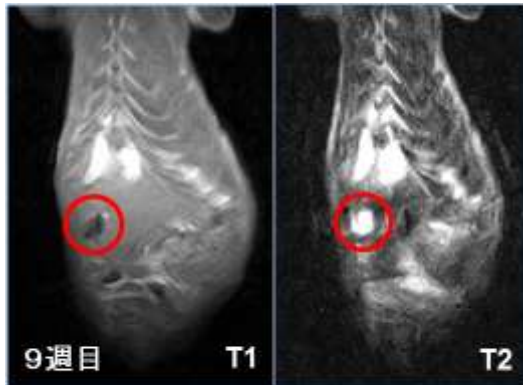


図3. 実験感染後9週目の肝臓の画像所見

prep.2)。③上記②の実験動物感染系で感染後の抗体応答動態を観察した結果、rEm18 抗原に対する抗体応答よりも粗抗原に対する抗体応答のほうが感染早期から検出されることが判明した(Yamashita et al. in prep.2)。それ故、④rEm18 に対する抗体応答が十分に上昇した時点で、非侵襲性の新しい治療法と、その比較のための肝切除を実施し、治癒効果を画像と抗体応答の減衰動態から評価する実験系を現在、準備している段階である。さらに、⑤関連病院で外科的に肝切除された多包虫症例(図4, 5および6)について周術期

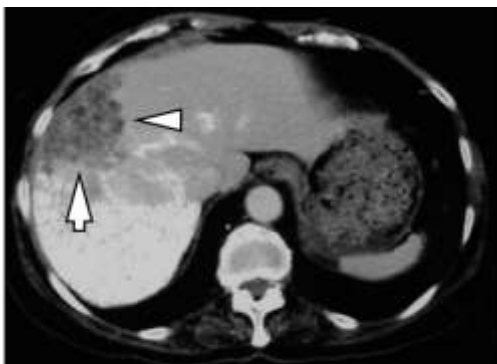


図4. 多発性病変を示す術前のCT画像

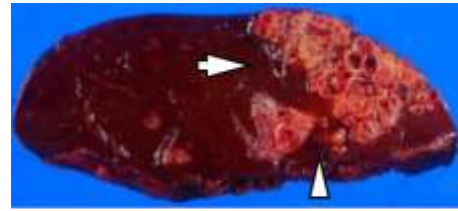


図5. 手術により摘出した病変



図6. 術後6ヶ月のCT画像

から抗体応答を解析する機会があり、全く予測していなかった現象として完全に病巣が切除できた症例では周術期から rEm18 に対する抗体応答が著減すること(図7および8)が判明した(赤羽ほか, 2011; Ito et al. in

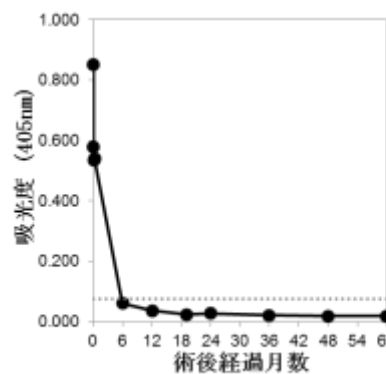


図7. 組換えEm18抗原に対する血清中抗体価の推移



図8. イムノプロットによる特異抗体の検出

prep)。現在、粗抗原に対する抗体応答解析を計画中である。

以上の成果から⑥本研究で確立できた実験感染モデルを用いることにより、侵襲性、非侵襲性の治療法の評価と抗体応答の経時的観察が可能であることが期待できる。すなわち、多包虫症の治療法として、非侵襲性の

治療法の評価が初めて可能になると期待される。また⑦外科的切除直後から抗体応答が著減する、これまでの免疫学の概念では理解できない不思議な現象についての解析が可能になると期待できる。⑧粗抗原と rEm18 抗原に対する抗体応答動態の相違は、感染初期の抗体応答解析に有用な新規抗原の探索の必要性を示唆している。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

赤羽弘充、中野詩朗、稲垣光垣、柳田尚之、正村裕紀、工藤岳秋、庄中達也、折茂達也、及川 太、相山 健、柴木泰一郎、迫 康仁、伊藤園予、伊藤 亮、旭川厚生病院における肝エキノコックス症手術症例に関する画像および血清診断を用いた術後経過とその評価、北海道農村医学会雑誌 44 巻、3 月号、1-7、2012.

[学会発表] (計 1 件)

伊藤 亮：第 59 回日本寄生虫学会小泉賞受賞講演「人獣共通条虫症（囊虫症、エキノコックス症）に関する免疫診断研究」、2012 年 3 月 25 日（兵庫医科大学）

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 亮 (ITO AKIRA)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：70054020

(2) 研究分担者

岡本 宗裕 (OKAMOTO MUNEHIRO)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：70177096

岡本 芳晴 (OKAMOTO YOSHIHARU)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50194410

今川 智敬 (IMAGAWA TOMOHIRO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20232605

中谷 和宏 (NAKAYA KAZUHIRO)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70109388

(3) 連携研究者

なし