

学位論文要旨

氏名 山下 真路

題目 : **Establishment of an alveolar echinococcosis rat model with a single hepatic lesion and serological analysis.**
(単発性肝病変を有する多包虫症ラットモデルの作製と血清学的解析)

論文要旨 :

Echinococcus multilocularis は食肉目を終宿主とし、げっ歯類を中間宿主にしている寄生虫であり、ヨーロッパからアジアにかけての広い範囲の野生動物で感染が確認されている。*E. multilocularis* の虫卵を誤飲することによって人が罹患する多包虫症は、主に肝臓に病変を形成し、適切な治療が行われなかった場合、肝機能障害を引き起こし、死に至る疾患である。多包虫症の研究には人と同じ中間宿主であるげっ歯類に虫卵を経口感染させる方法が用いられ、人の感染とほぼ同じ感染経路による病態を再現することができる。また、人への感染の恐れがある虫卵ではなく比較的安全に用いることができる *E. multilocularis* の幼虫のホモジェネートを腹腔、肝臓、または血管内などに注入して多包虫病巣を形成させる二次包虫症感染モデルも非常に多く用いられてきた。しかしながら、人多包虫症の多くは肝臓の一カ所に病変が形成され、その病変は無症状のままゆっくりと増大するという特徴があるのに対し、これまで作製されてきた多包虫症モデルでは、肝臓や腹腔内に多数の多包虫病変が形成され、病変の増殖も速いという問題点がある。そのため虫卵を用いた自然な感染様式であっても人の病態を完全に再現できていない。本研究では、*E. multilocularis* の幼虫の小胞を肝臓に移植することによって、肝臓の任意の部位一カ所に病変が局限した、転移や腹腔内播種が起こらない新たな多包虫症モデルの作製を試みた。また、作製したモデルラットの血清学的解析を行い、人や他のモデル動物との差異を明らかにし、本ラットモデルの有用性について検討した。

Chapter I

目的 : 肝臓の任意の部位一カ所に多包虫病変を形成するモデルラットを作製することを目的とした。**方法 :** *E. multilocularis* の幼虫を顕微鏡下で小胞まで分離した。ラットの肝臓表面に小切開を加え、小胞を移植し、サージセルで被覆した。移植後、経時的に MRI を用いて病変を確認した。移植後 12 週で安楽殺を行い、病変を肉眼・組織学的に観察した。**結果 :** 移植した小胞は MRI で漸次増大していくのが観察された。また、肉眼・組織学的観察において、胸腔、腹腔や他臓器への病変の転移や浸潤は認められなかった。**考察 :** 本モデル作製法を用いることで、これまでの虫卵経口感染モデルやホモジェネート注入モデルで認められた多数の病変や転移・播種などの病変は認められなかった。また、肝臓の任意の部位に病変を形成することができることから病変の切除などの治療を容易に行うことができるため、周術期の血清学的観察が可能であると考えられた。

Chapter II

目的: 肝臓単独感染モデルラットの移植後から病変切除後までの宿主の *E. multilocularis* 特異抗原に対する抗体反応を解析し、人多包虫症やこれまでの実験動物モデルとの差異を明らかにし、肝臓単独感染モデルラットの有用性について検討した。**方法:** 移植直前から約 1 か月間隔で *E. multilocularis* の粗抗原と特異抗原 recombinant Em18 (RecEm18) に対する抗体反応の測定と MRI による病変の観察を行った。病変の増大と RecEm18 に対する抗体反応の増大が確認された段階で病変の切除を行い、切除後 1、3、5、7、21、60 日に採血を行い粗抗原と RecEm18 に対する抗体反応を調べた。**結果:** 移植後の粗抗原に対する抗体反応の推移はこれまでのモデル動物の抗体反応の推移と類似していた。また、Em18 に対する抗体価反応は他のモデル動物に比べ上昇が遅かった。病変切除後の Em18 の抗体反応は人で報告されている抗体反応の推移と類似していた。また、病変の増大は他の多包虫モデルと比較して明らかに遅かった。**考察:** 移植後、または病変切除後の抗体反応の推移はこれまでのモデルよりも人の抗体反応の推移に類似していた。また、病変の増大はこれまでのモデル動物に比べ非常に遅く、病変の増大が遅いとされる人多包虫症に類似していた。これらの結果から、本研究で作製した肝臓単独病変モデルは自然な感染様式はとらないものの、人多包虫症と同じように病変の増大が遅く、人多包虫症のモデル動物として病変の再現性が高いと考えられた。さらに、感染後や病変切除後の多包虫に対する抗体反応の推移も人と類似していることが確認された。人多包虫症では治療後に画像診断と血清学的なフォローアップが行われるが、近年、病変切除後数日から数週間以内に Em18 に対する抗体反応が急減する現象が報告されている。今回の実験でも病変切除後 1 - 2 週間以内に Em18 に対する抗体反応が半減している個体が認められた。今後、今回のモデルを使用することによって、人症例で認められた病変切除後の抗体反応急減に再現性があることを確認することができると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	山下 真路
審 査 委 員	主 査：鳥取大学 教授 森田 剛仁
	副 査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査：鳥取大学 教授 奥 祐三郎
	副 査：鳥取大学 教授 竹内 崇
	副 査：鳥取大学 准教授 柄 武志
題 目	Establishment of an alveolar echinococcosis rat model with a single hepatic lesion and serological analysis (単発性肝病変を有する多包虫症ラットモデルの作製と血清学的解析)
審査結果の要旨： 山下真路氏の博士課程における研究は、人の多包虫症の病態に類似した新しいモデルラットの作製を行い、そのモデルにおける血清学的検査、画像解析等を実施し、本モデルの有用性について詳細に検討したものである。 <i>Echinococcus multilocularis</i> は食肉目を終宿主とし、げっ歯類を中間宿主にしている寄生虫であり、ヨーロッパからアジアにかけての広い範囲の野生動物で感染が確認されている。 <i>E. multilocularis</i> の虫卵を誤飲することによって人が罹患する多包虫症は、主に肝臓に病変を形成し、適切な治療が行われなかった場合、肝機能障害を引き起こし、死に至る疾患である。これまで本症に対する幾つかの多包虫症モデル動物が作製されてきたが、肝臓や腹腔内に多数の多包虫病変が形成され病変の増殖も速く、虫卵を用いた自然な感染様式であっても人の病態を完全に再現できていないという問題点があった。 第 1 章では、 <i>E. multilocularis</i> の幼虫の小胞を肝臓に移植することによって、肝臓の任意の部位一カ所に局限し、腹腔内転移が生じない新たな多包虫症モデルの作製を試みた。具体的に、 <i>E. multilocularis</i> の幼虫塊を顕微鏡下で小胞まで分離し、ラットの肝臓表面に小切開を加え小胞を移植しサージセルで被覆した。小胞を移植後 2、4、6、8、10 および 12 週間後に Magnetic resonance imaging (MRI) を用いて経時的に病変を確認した。移植後 12 週間後に安楽死処分を行い、肉眼的および組織学的に病変を観察した。その結果、肝臓において移植した小胞が局所病変として緩徐に増大していくことが確認された。また、これまで報告されている虫卵経口感染モデル等で観察されている腹腔や胸腔あるいは他臓器への浸潤や転移は認められなかった。このように、本作製方法では肝臓の任意の部位に局所病変を形成することができることから、病変の切除などの治療を容易に行うことが可能であり、その後の周術期の血清学的観察が	

可能であると考えられた。

第 2 章では、第 1 章で作製された多包虫症モデルラットにおいて小胞移植後から病変切除後までの宿主の *E. multilocularis* 特異抗原に対する抗体レベルを ELISA 法により解析し、人の多包虫症やこれまでのモデル動物との差異を比較・検討を行い、本モデルラットの有用性について詳細に検討した。具体的に、移植直前から 1 ヶ月間隔で *E. multilocularis* の粗抗原と特異抗原 recombinant Em18 (以下、RecEm18) に対する抗体レベルの測定と MRI による病変の観察を実施した。病変の増大と RecEm18 に対する抗体レベルの増大が確認された段階 (366 日後) で外科的に病変の切除を行い、切除後 1、3、5、7、21 および 60 日後に採血を行い粗抗原と RecEm18 に対する抗体レベルを調べた。その結果、本研究で作製したモデルでは、病変の増大は他のモデル動物と比較して明らかに緩徐であることが示された。小胞移植後の粗抗原に対する抗体レベルの推移は、これまでのモデル動物のその推移と類似していたが、RecEm18 に対する抗体レベルの上昇は他のモデル動物のそれに比較して緩徐であった。病変切除後の RecEm18 の抗体レベルの推移は人の症例で報告されているものに類似していた。すなわち、病変切除後数日から数週間以内に RecEm18 に対する抗体反応が急減する現象が人で報告されているが、本研究においても病変切除後 1~2 週間以内に RecEm18 に対する抗体反応が半減している個体が認められた。一方、粗抗原に対する抗体の減少は人と同様に緩徐であった。以上の結果より、本研究で作製したモデルは自然感染様式とは異なるものの、人の多包虫症と同様に病変の増大が緩徐であり、さらに、感染後や病変切除後の多包虫に対する RecEm18 抗体レベルの推移が人の多包虫症のそれに類似していることが確認された。

以上の結果は、人の多包虫症の病態に類似した新しいモデルラットを作製したことを示しており、将来、人の多包虫症における肝臓の病変および血液学的検査値の推移等の情報蓄積、さらに、本症の新規治療方法の開発の一助として寄与するものと考えられる。

以上より、本論文は博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があると認める。