

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25年4月22日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2012

課題番号：20591205

研究課題名（和文）慢性肺アスペルギルス感染症の病態解析、新規診断法、治療法の開発と確立

研究課題名（英文）Pathogenesis and establishment of new diagnosis and treatment of Chronic pulmonary aspergillosis

研究代表者

泉川 公一（IZUMIKAWA KOICHI）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：20404212

研究成果の概要（和文）：

慢性肺アスペルギルス症の病態は複雑で診断の遅れが治療導入の遅れと関連している。本研究で、慢性肺アスペルギルス症のマウスモデルを開発することで、新規診断法、新治療の開発をめざした。COPDを作成したマウスモデルで、アスペルギルスが3週間継続して定着し、COPDのないマウスよりも肺内静菌が増加することを確認した。新治療としては、アムホテリシン B リポソーム製剤による吸入治療が効果を発揮することを証明した。

研究成果の概要（英文）：

Pathogenesis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA) and complex and related to delayed diagnosis followed by delayed treatment. Aim of this study to establish the mouse CPA model and develop newer diagnosis method and treatment. CPA mouse model developed in COPD mice revealed the longer existence of *Aspergillus fumigatus* for three weeks compared to non-COPD mice (less than a week). Inhalation of liposomal amphotericin B was proved to be effective in pulmonary aspergillosis mouse model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：日和見感染症

1. 研究開始当初の背景

(1) 増加傾向にある深在性真菌症

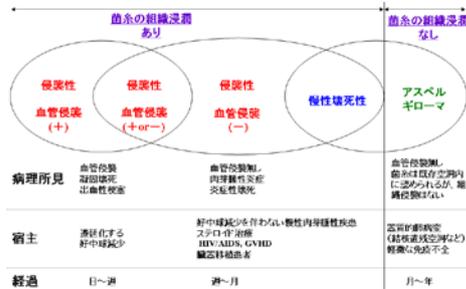
深在性真菌症の3大原因真菌は、アスペルギルス、カンジダ、クリプトコックスである。日本剖検輯報によると剖検症例からの真菌検出は著明な増加傾向にあり、肺からの検出

が他臓器に比較すると圧倒的に多く、中でもアスペルギルス属は最もよく検出される真菌で、肺の日和見感染症においては重要な原因真菌である（Epidemiology of visceral mycoses in patients with leukemia and MDS - Analysis of the data in annual of pathological

autopsy cases in Japan in 1989, 1993, 1997 and 2001. Kume H, et al. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 47:15-24, 2006)。

(2) 肺アスペルギルス症の分類 (図)

肺アスペルギルス症は、感染する宿主の状態に応じて病型が異なり、大まかに以下のように分類されるが、これらの病型が重複することも特徴の一つである。



Hope WW et al. Medical Mycology 43: S297-238, 2005.1.15引用。一部改変

侵襲性肺アスペルギルス症：好中球減少が遷延するような重篤な状態において、日～週単位で急激に進行する、きわめて予後不良の病態。

慢性肺アスペルギルス症（慢性壊死性肺アスペルギルス症・肺アスペルギローマ）：結核遺残空洞、慢性閉塞性肺疾患（COPD）などの肺の器質的病変を有する患者で、さらに、糖尿病などの軽度な日和見感染の危険因子～ステロイド投与、HIV/AIDS、臓器移植患者などにいたる中等度の日和見感染危険因子が加わった場合に、週～月、あるいは月～年単位で進行する病態。病理学的には、慢性壊死性肺アスペルギルス症と肺アスペルギローマは、アスペルギルスの菌糸が空洞壁や周囲の組織への浸潤の有無で区別されるが、臨床的には、厳密な鑑別が困難であり、図3のように、空洞壁内の菌球とその周囲の浸潤影を伴う場合も多く存在する。

(3) 慢性肺アスペルギルス症の問題点

① 患者数の増加

喫煙に起因すると思われる肺癌やCOPD患者をはじめ、結核罹患歴のある高齢者が多い本邦においては、慢性肺アスペルギルス症に罹患する可能性がある患者予備軍は多い。さらに、ステロイド投与や、移植技術の向上、化学療法剤の進歩に伴う日和見感染罹患因子が増加している現状においては、今後、慢性肺アスペルギルス症は増加する可能性がきわめて高い。

② 未解明な発症機序と診断の困難さ

近年、慢性肺アスペルギルス症に対し、その成因と分類が提唱されている（Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. Denning DW, et al. Clin Infect Dis. 37: S265-80, 2003）が、空洞などの

肺の器質的病変部に、アスペルギルスがどのように侵入、定着、増殖、菌球形成するかについては不明である。また、局所における宿主の免疫応答についても解明されていない。一方、臨床的には、アスペルギルスが広く環境中に存在することや、培養が困難であること、信頼に足りうる血清診断が存在しないことなどから、診断が困難な点も問題である。

③ 治療における問題点

慢性肺アスペルギルス症に対する治療について、治療開始のタイミング、抗真菌薬の選択、中止基準などは明確でない。現在のところ、抗真菌薬の選択に関し無作為化試験などのレベルの高いエビデンスはなく、ほとんどが臨床観察研究にとどまる。我々の臨床研究において、micafunginの有用性を報告(Clinical efficacy of micafungin for chronic pulmonary aspergillosis. Izumikawa K, et al. Med Mycol. 45:273-8, 2007)し、voriconazoleの有用性も報告(Treatment of chronic pulmonary aspergillosis by voriconazole in nonimmunocompromised patients. Camuset J, et al. J. Chest. 131:1435-41, 2007)されているが、いずれも対象数が少なく、エビデンスに基づく適切な治療法は確立されていない。これらの報告にもあるが、一般的に、慢性肺アスペルギルス症の治療には、抗真菌剤を長期間投与する必要がある、高価な抗真菌薬を効率よく使用し、入院期間を可能な限り短縮し、医療費削減を目指すことも肝要である。治療初期には、併用療法も含む注射剤により強力な治療を行い病勢をコントロールし、速やかに、内服薬による外来治療に移行するといった、医療経済的側面を考慮した治療法も確立すべきである。一方、抗真菌薬にのみ依存しない新しい治療法も注目される。侵襲性肺アスペルギルス症においては、IFN- γ 、IL-12、TNF- α などが、その感染コントロールに重要な役割を果たしているとされ、IFN- γ を用いた免疫療法についても症例報告がある。慢性肺アスペルギルス症における局所免疫応答については不明であるが、このような免疫療法も治療のオプションと考えられる。

2. 研究の目的

慢性肺アスペルギルス症の病態解析を目指したマウス感染モデルを作成し、病態解析、診断法開発、治療法の確立をめざした研究を行う。実際の臨床病態に則したモデルを目指し、肺の器質的病変（COPD）マウスを作成、アスペルギルスを経気道的に感染させ、慢性感染モデルとする。到達目標として、①アスペルギルスの慢性感染に必要な因子、増悪因子の解明、②肺局所における宿主の免疫応答（炎症性サイトカイン、免疫担当細胞の動態解析）、③局所におけるアスペルギルス感染特異タンパクの検出とプロテオミクス解析

による新規診断マーカーの検索、④抗真菌薬の治療効果の検討(併用療法も含む)、⑤IFN- γ などを用いた免疫療法の有用性に関する検討を行い、病態解明、診断、治療にいたるまでを総合的に解析する。

3. 研究の方法

(1) COPD マウスモデルの作成

ICR マウス、6 週齢、雌を使用する。経気管的に porcine pancreatic elastase (PPE: ブタ膵エラスターゼ) を投与し、マウス肺に肺気腫様病変を作成する (Impaired pulmonary inflammatory responses are a prominent feature of streptococcal pneumonia in mice with experimental emphysema. Inoue S, et al. Am J Respir Crit Care Med. 167:764-70, 2003)。

(2) アスペルギルス感染 COPD マウスモデルの確立

COPD の病変を惹起したマウスに、経気道的に、臨床分離株 *Aspergillus fumigatus* の conidia を投与する。投与量 (conidia 量)、投与方法 (経鼻、経気管、エアロゾル) については、侵襲性肺アスペルギルス症のマウスモデルの条件 (Standardization of an experimental murine model of invasive pulmonary aspergillosis. Sheppard DC, et al. Antimicrob Agents Chemother. 50:3501-3, 2006) を参考にし、条件設定を行う。局所の感染については、病理学的に確認し、経時的な変化を肉眼的かつ、病理学的に観察を行う。病理学的に感染の確認を行えた場合は、生存期間についても検討する。

①発症に関し、ステロイド投与下、あるいは免疫抑制剤使用下における感染の状態について検討するために、*A. fumigatus* 投与前にこれらの薬剤を前投与し、病理学的な所見の比較を行う。

②肺の器質的病変部に *A. fumigatus* が腐生することが確認できた場合、その時点よりステロイド投与、免疫抑制剤投与を行い、肺組織の病理学的変化、生存期間について検討する。

(3) 病態解析実験

①マウス気管支肺胞洗浄液における免疫担当細胞、炎症性サイトカインの動態測定
肺局所のアスペルギルスに対する免疫応答を検討するために、アスペルギルスの感染が確認できた COPD マウスの気管支肺胞洗浄を行い、得られた検体中における免疫担当細胞の動態、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、IL-4、IL-12) について測定を行う。

②マウス気管支肺胞洗浄液におけるアスペルギルス特異タンパクの検討

上記で得られた検体中のタンパクのプロファイリングをプロテインチップシステムにて解析する。アスペルギルス非感染コントロ

ールマウスより得られた検体のプロファイリングと比較し、特異ピークについて、分離精製を行い MS/MS 法や peptide mass fingerprint (PMF)法により解析、また、アミノ酸シーケンスにより同定する。本特異抗原に対する特異抗体を作成し、ELISA 法による抗原検出法を開発する。

(4) 治療実験

①micafungin+voriconazole、micafungin+amphotericin B の併用治療による検討(急性期療法)

アスペルギルスに抗真菌活性を有し、かつ、作用機序の異なる voriconazole と micafungin、amphotericin B と micafungin の併用効果について、アスペルギルス感染 COPD マウスにおいて検討する。投与方法は、経静脈あるいは腹腔内投与にて行い、治療効果の評価は、生存期間、ならびに肺局所におけるアスペルギルスの生菌数、病理学的所見にて判定する

②. voriconazole、itraconazole の内用液による治療効果の比較検討 (メンテナンス療法)
現在、経口投与可能で、かつ、アスペルギルスに抗真菌活性のある voriconazole と itraconazole について、その治療効果について、アスペルギルス感染 COPD マウスにおいて検討する。治療効果の評価は、生存期間、ならびに肺局所におけるアスペルギルスの生菌数、病理学的所見にて判定する。

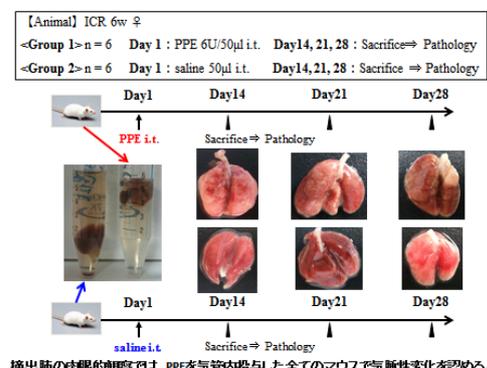
③IFN- γ 投与による治療効果の検討

アスペルギルス感染 COPD マウスにおいて IFN- γ を皮下投与し検討する。治療効果の評価は、生存期間、ならびに肺局所におけるアスペルギルスの生菌数、病理学的所見にて判定する。

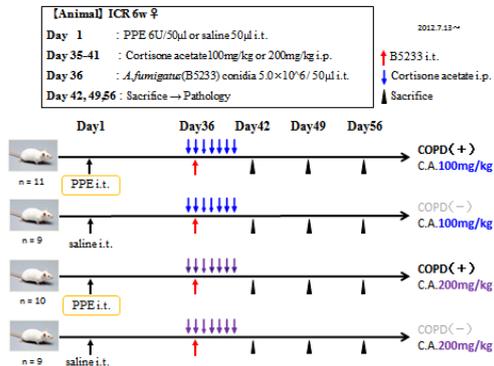
4. 研究成果

(1, 2) アスペルギルス感染 COPD マウスモデルの確立

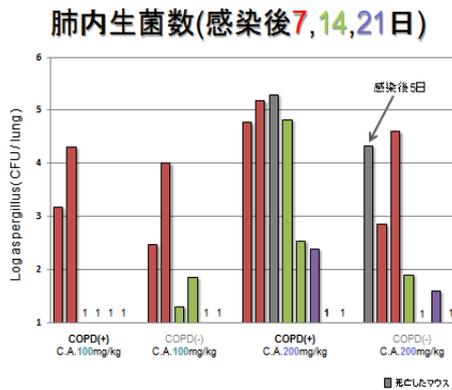
6 週齢の ICR マウスを用いて、6U の PPE を用いることで、2-4 週間にて COPD に類似した気腫性変化を認めることができた(下図)。



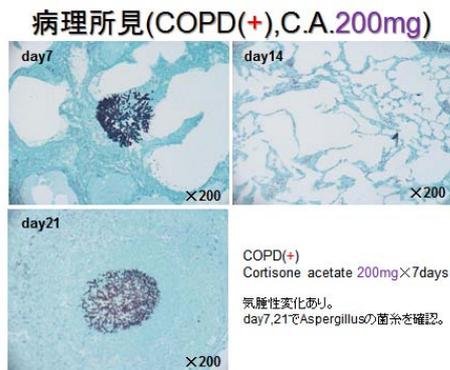
この COPD マウスを用いて、cortisone acetate を 100-200mg/kg 投与し、免疫不全状態を陥らせたうえで、*A. fumigatus* を感染させる下図の実験系を確立した。



その結果、cortisone acetate を 200mg/kg を 1 週間投与し、感染をさせたモデルでは、下図のように、感染後 2-3 週間にわたり、*Aspergillus* が肺に定着し、感染が維持できることが証明された。



さらに下図の様に、病理学的にも気腫化した気腔内に *Aspergillus* の菌塊が認められ、比較的長期の感染、定着が認められることが判明した。



(3) 病態解析

COPD マウスをベースとした慢性肺アスペルギルス症モデルは作成できたが、病態解析までにいたる実験には至らなかった。

(4) 治療実験

侵襲性肺アスペルギルス症のマウスモデルを使用し、micafungin と liposomal amphotericin B の併用療法について検討した。

6 週齢の ICR マウスを用いて、cortisone acetate と cyclophosphamide を用いて免疫抑制し、*A. fumigatus* を感染させた。

治療法としては、micafungin の腹腔内投与、liposomal amphotericin B の吸入、ならびに、micafungin の腹腔内投与 + liposomal amphotericin B の吸入の併用と 3 群の治療群で比較した。下図のように、それぞれにおいて生存率の有意な改善を認め、特に併用群では、単独群に比較して生存率の改善を認めた。liposomal amphotericin B の吸入治療による有効率向上の可能性を示すことができた。

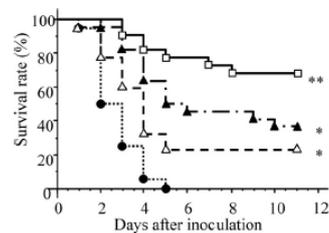


FIG. 1. Survival curves for mice with IPA (Kaplan-Meier plot). Groups of 11 mice were treated with a combination of intraperitoneal administration of MCFG (1 mg/kg/day) and inhalation of aerosolized L-AMB (8 ml at 1.2 mg/ml [open squares]), inhalation of aerosolized L-AMB (8 ml at 1.2 mg/ml [filled triangles]), intraperitoneal administration of MCFG (1 mg/kg/day [open triangles]), and no therapy (control [filled circles]). *, $P < 0.05$ versus the control; **, $P < 0.05$ versus the control group, intraperitoneal-MCFG group, or aerosolized-L-AMB group (log rank test). The survival times for all treatment groups were longer than that for controls ($P < 0.05$). The survival time for the combination treatment group was significantly longer than those of the intraperitoneal-MCFG group and the aerosolized-L-AMB group ($P < 0.05$).

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 13 件)

- Izumikawa K, Tashiro M, Kohno S. Management of chronic pulmonary aspergillosis. Ann N Y Acad Sci. 2012 Dec;1272:40-8. 査読有
- Kohno S, Izumikawa K, Yoshida M, Takesue Y, Oka S, Kamei K, Miyazaki Y, Yoshinari T, Kartsonis NA, Niki Y. A double-blind comparative study of the safety and efficacy of caspofungin versus micafungin in the treatment of candidiasis and aspergillosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Oct 3. 査読有
- Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, Takazono T,

- Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S. Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother. 2012 56(9):4870-5. 査読有
4. Izumikawa K, Yamamoto Y, Mihara T, Takazono T, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yanagihara K, Mine M, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S. Bronchoalveolar lavage galactomannan for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. Med Mycol. 2012 Nov;50(8):811-7. 査読有
 5. Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, Hirano K, Iwanaga N, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Kurihara S, Imamura Y, Miyazaki T, Nishino T, Tsukamoto M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Tashiro T, Kohno S. Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in Nagasaki, Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2012 56(1):584-587. 査読有
 6. Gyotoku H, Izumikawa K, Ikeda H, Takazono T, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Nishino T, Miyazaki T, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Yaguchi T, Ohno H, Miyazaki Y, Kamei K, Kanda T, Kohno S. A case of bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus udagawae* and its mycological features. Med Mycol. 2011 Dec 13. 査読有
 7. Kohno S, Izumikawa K, Kakeya H, Miyazaki Y, Ogawa K, Amitani R, Niki Y, Kurashima A. Clinical efficacy and safety of Micafungin in Japanese patients with chronic pulmonary aspergillosis: a prospective observational study. Med Mycol. 2011; 49(7):688-93. 査読有
 8. Tashiro T, Izumikawa K, Tashiro M, Takazono T, Morinaga Y, Yamamoto K, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Yasuoka A, Kohno S. Diagnostic significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory samples in an adult pneumology ward. Med Mycol. 2011 49(6):581-7. 査読有
 9. Kohno S, Izumikawa K. Posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis: The next strategy against the threat of azole-resistant *Aspergillus* infection. Clin Infect Dis. 2010 51(12):1392-4. 査読有
 10. Izumikawa K, Takazono T, Kohno S. Chronic aspergillus infections of the respiratory tract: diagnosis, management and antifungal resistance. Curr Opin Infect Dis. 2010; 23(6):584-9. 査読有
 11. Kohno S, Izumikawa K, Ogawa K, Kurashima A, Okimoto N, Amitani R, Kakeya H, Niki Y, Miyazaki Y. Intravenous micafungin versus voriconazole for chronic pulmonary aspergillosis: a multicenter trial in Japan. J Infection. 2010; 61(5):410-8. 査読有
 12. Izumikawa K, Nakano K, Kurihara S, Imamura Y, Yamamoto K, Miyazaki T, Sakamoto N, Seki M, Ishimatsu Y, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tsuchiya T, Yamasaki N, Tagawa T, Mukae H, Nagayasu T, Kohno S. Diffuse alveolar hemorrhage following itraconazole injection. Intern Med. 2010; 49(5):497-500. 査読有
 13. Takazono T, Izumikawa K, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Kohno S. Efficacy of combination antifungal therapy with intraperitoneally administered micafungin and aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Aug; 53(8):3508-10. 査読有
- 〔学会発表〕（計 18 件）
1. 泉川公一、河野 茂: The Frontline of Respiratory Fungal Infections in JAPAN, 第 52 回日本医真菌学会総, 2008/9/11, 長崎
 2. Izumikawa K, Kohno S: Fungal infections in non-neutropenic patients Chronic Pulmonary Aspergillosis, ISHAM 2009, 2009/5/26, 東京
 3. 泉川公一、河野 茂: 深在性真菌症の診断・治療を再考する 慢性肺アスペルギルス症 第 57 回日本化学療法学会西日本

- 支部総会・第 52 回日本感染症学会中日
本支部総会, 2009/11/28, 名古屋
4. Takahiro Takazono, Koichi Izumikawa, et al. Development of murine chronic aspergillus colonization model. 4th Advances against Aspergillus and Aspergillosis, 2010/2/4, Rome, Italy
 5. Koichi Izumikawa, Takahiro Takazono, et al: Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis, 4th Advances against Aspergillus and Aspergillosis, 2010/2/4, Rome, Italy
 6. 泉川公一:慢性肺アスペルギルス症の新知見, 第 58 回日本化学療法学会総会, 2010/6/4, 長崎
 7. 高園貴弘、泉川公一:慢性肺アスペルギルスマウスモデル作成の試み 2010, 第 4 回アスペルギルス研究会, 2010/7/24, 千葉
 8. 泉川公一: 慢性肺アスペルギルス症 up to date, 第 54 回日本医真菌学会総会, 2010/10/16, 東京
 9. 泉川公一: 呼吸器真菌症の病態、診断、治療の up to date~日本から何が発信できるか~, 第 80 回日本感染症学会西日本地方会, 2010/11/20, 松山
 10. Koichi Izumikawa, Takahiro Takazono, et al: Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. APSR2010, 2010/11/26, Manila, Philippine
 11. Izumikawa K, Kohno S: Chronic pulmonary aspergillosis ~new treatment evidence and emergence of azole-resistant Aspergillus fumigatus in Japan~, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011/9/9, 札幌
 12. Izumikawa K, Kohno S: Management of chronic pulmonary aspergillosis 5th Advanced against Aspergillosis, 2012/1/26, Istanbul, Turkey
 13. Ide S, Izumikawa K, Kohno S: Bronchial Aspergillosis due to Aspergillus udagawae: a rare case report, 5th Advanced against Aspergillosis, 2012/1/26, Istanbul, Turkey
 14. Tashiro M, Izumikawa K, Kohno S: Antifungal susceptibility of Aspergillus fumigatus and relationship with azole exposure in Nagasaki, JAPAN, 5th Advanced against Aspergillosis, 2012/1/26, Istanbul, Turkey
 15. Hirano K, Izumikawa K, Kohno S: A case of chronic pulmonary aspergillosis due to itraconazole low-susceptible Aspergillus fumigatus of which resistance acquired during long-term administration of itraconazole. 5th Advanced against Aspergillosis, 2012/1/26, Istanbul, Turkey
 16. 田代将人、泉川公一、河野茂: 当科で収集された Aspergillus fumigatus の臨床的抗真菌薬暴露歴と薬剤感受性の解析 第 5 回アスペルギルス研究会, 2011/9/3, 東京
 17. 井手昇太郎、泉川公一、河野茂: 気管支拡張を伴ったアスペルギルス症の 3 例~病理学的検討を加えて~, 第 5 回アスペルギルス研究会, 2011/9/3, 東京
 18. 平野勝治、泉川公一、河野茂: 慢性肺アスペルギルス症に対するイトラコナゾール長期投与中に、イトラコナゾール低感受性 Aspergillus fumigatus が出現した症例, 第 5 回アスペルギルス研究会, 2011/9/3, 東京
- 〔図書〕(計 1 件)
泉川公一, 最新医学社 真菌性肺炎, 2011, 506
- 〔その他〕
ホームページ:
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/intmed-2/index.html>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
泉川 公一 (IZUMIKAWA KOICHI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号 : 20404212
 - (2)研究分担者
河野 茂 (KOHNO SHIGERU)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 80136647