

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790572
研究課題名 (和文) アスペルギルスによるバイオフィームモデルの開発

研究課題名 (英文) Development of Aspergillus biofilm model

研究代表者

今村 圭文 (IMAMURA YOSHIFUMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90467960

研究成果の概要 (和文): アスペルギルスは肺に重篤な慢性感染を引き起こす病原性真菌である。本研究では、アスペルギルスが試験管内でバイオフィームと呼ばれる構造物を形成すること、バイオフィームを形成させたチューブをマウスの気管内に留置することによって、通常では困難であるアスペルギルスの慢性肺感染モデルを作成した。

研究成果の概要 (英文): Aspergillus is a pathogenic fungus, which cause severe chronic pulmonary infection to human. In this study, we showed that Aspergillus could form biofilm in vitro. By placing a biofilm formed plastic tube into the lungs, we could develop a chronic mouse model of pulmonary aspergillosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
2009年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000円	540,000円	2,340,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器感染症、アスペルギルス症、動物モデル、バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

アスペルギルスは肺に重篤な感染を引き起こす病原性真菌である。我が国では肺結核罹患後の空洞に慢性的に感染し菌塊を形成する肺アスペルギローマが特に重要であるが、現在用いられている抗真菌薬による治療は有効性が十分ではなく予後不良の疾患である。したがって肺アスペルギローマに対す

る有効な治療薬の開発が急務であるが、開発に必須の慢性肺アスペルギルス感染症の動物モデルは未だ確立されていない。

2. 研究の目的

肺アスペルギローマとの関与が示唆されているアスペルギルス性バイオフィームに注目し、バイオフィームを利用したアスペル

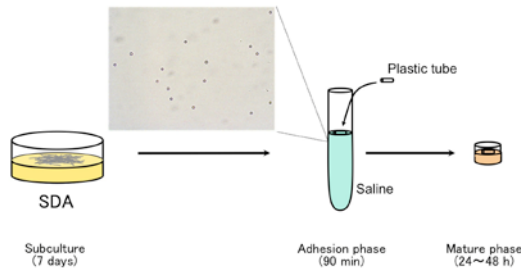
ギルス肺慢性感染症動物モデルを開発する。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* アスペルギルス性バイオフィルムの作成。

アスペルギルス菌をサブロー寒天培地上で 35°C で 1 週間発育させ、培地上から分生子のみを回収した。この分生子を 1.0×10^7 個/ml の濃度に生理食塩水で調整し、この分生子溶液にバイオフィルムの土台となる 5mm 大に切断した静脈内留置用カテーテルを浸し、チューブ上に 37°C で 120 分自然接着させた。次にこのチューブを 1% YPD 液体培地液体培地へ移動し、37°C で 48 時間培養し、チューブ

図1 アスペルギルスバイオフィルムの作成

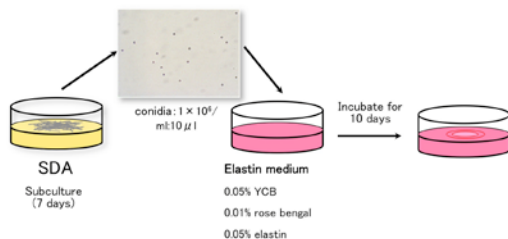


上にバイオフィルムを形成させた (図 1)。

(2) *in vivo* 慢性肺アスペルギルス感染症動物モデルの作成。

アスペルギルスは一般的に弱毒性であるために、より毒性の強い株を用いるために、成長速度、およびエラスターゼ活性の高い株を臨床株の中から選別した。エラスターゼ活性の測定は、エラスチンを含む寒天培地上に菌を発育させ、エラスチンが溶解した径を測定することにより行った (図 2、JCM 2002; 40:

図2 Elastin medium を用いたエラスターゼ測定

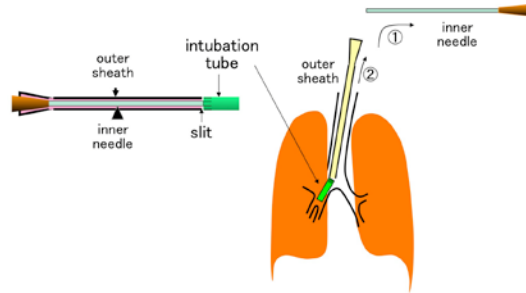


1811-1813)。

またマウスは一般的にアスペルギルス感染に対して抵抗性を示すために、複数種 (ICR, Balb/c, C57/BL6, DBA) のマウスに感染を試み、この中で最も良い感受性を示した DBA マウスを感染に用いた (データ提示なし)。

感染モデルの作成のため、(1) で作成したチューブを麻酔下でマウスに経気管的に挿

図3 マウス慢性肺アスペルギルス症モデルの作成



管・留置した (図 3)。

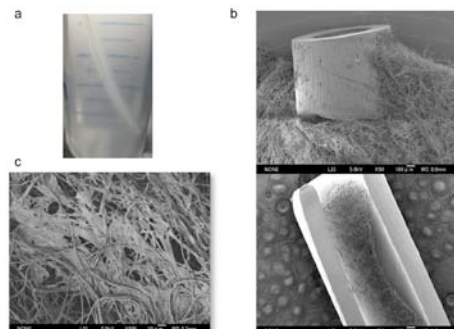
4. 研究成果

(1) *in vitro* アスペルギルス性バイオフィルム。

上記の方法を用いることにより、プラスチックチューブ上にアスペルギルスによるバイオフィルムを形成させることが出来た (図 4a、肉眼所見)。形成されたバイオフィルムの量は XTT アッセイで定量化が可能であり、XTT アッセイにより、上記の様々な条件、すなわち分生子溶液の濃度、液体培地の種類と濃度、分生子のチューブへの接着時間、バイオフィルム形成までの培養時間を最適化した (データ提示なし)。

また形成されたバイオフィルムを電子顕微鏡で観察し、チューブの外壁、内腔にアスペルギルスによる網目状の構造と (図 4b)、菌糸間にマトリックス構造を確認することができた (図 4c)。これはアスペルギルスがバイオフィルムを形成していることを示唆する重要な所見である。

図4 アスペルギルスバイオフィルム



(2) in vivo 慢性肺アスペルギルス感染症動物モデル。

エラスターゼアッセイにより、成長速度 (Growth diameter, GD) とエラスターゼ活性 (Elastase diameter, ED) を測定し (図 5)、MF903, MF684, MF770, MF13 を感染実験に用いた (図 6)。

図5 エラスターゼ活性の測定

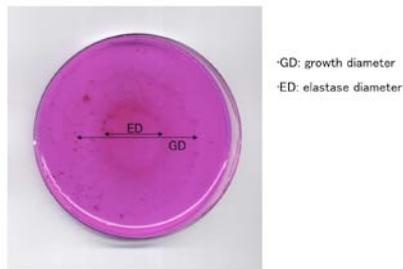
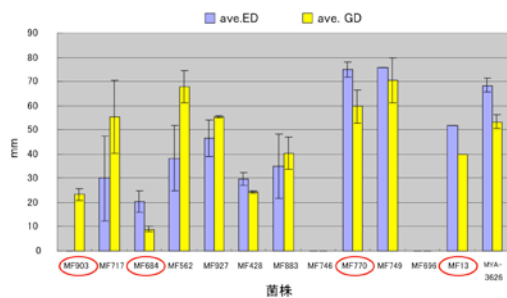
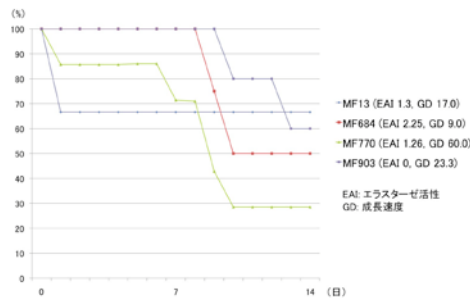


図6 菌株の選択



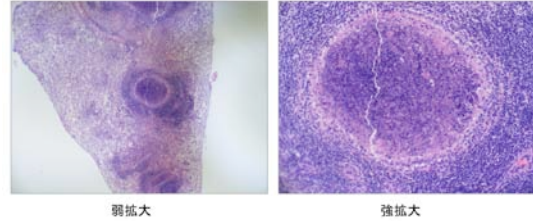
アスペルギルスバイオフィルムチューブをマウスに留置・感染させたところ、MF770株が最も強い病原性を示し、経過観察中 (2週間) に約7割が死亡した。

図7 生存曲線



生存したマウスの肺を病理学的に検討したところ、末梢気道内に菌塊様病変の形成を確認することができた (図 8)。

図8 マウス慢性肺アスペルギルス症の組織所見



一般的にアスペルギルスは弱毒性であるために、免疫正常のマウスに感染させても数日で肺内から排除されてしまう。今回新たに開発したアスペルギルスバイオフィルムチューブの留置による感染により、マウス慢性肺アスペルギルス症モデルを作成することが出来た。

今後このモデルを利用して、慢性肺アスペルギルス症の病態解析と、治療法の開発が推進されることが望まれる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

今村圭文、他：慢性肺アスペルギルス症マウスモデル作成の試み。第3回アスペルギルス研究会、2009年

[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

今村圭文 (YOSHIFUMI IMAMURA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90467960

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：