

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591963
 研究課題名 (和文) 細菌バイオフィルムの慢性皮膚潰瘍創における形態の分析とその制御に関する研究

研究課題名 (英文) The study of the biofilm in the chronic skin ulcer.
 研究代表者
 鳥谷部 荘八 (TORIYABE SOHACHI)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：90375006

研究成果の概要：近年、細菌感染症の難治化要因のひとつとして、生体表面や組織内に形成するバイオフィルムが注目されている。ラット皮膚潰瘍モデル(PA01 株)を用いてバイオフィルムを観察し、更に Quorum-sensing 機構の構成遺伝子欠損株を観察し、比較した。また血流不全状態を作成しバイオフィルム形成について検討を加えた。遺伝子欠損株は PA01 株に比べて細菌定着が少なく、上皮化が比較的早く、バイオフィルム形成は少ない傾向にあった。今後この Quorum-sensing 機構を阻害することがバイオフィルム形成を阻害し、創傷治癒促進につながる可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,000,000	0	2,000,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：創傷治癒、バイオフィルム、難治性皮膚潰瘍、細菌

1. 研究開始当初の背景

近年、細菌感染症の難治化要因のひとつとして、生体表面や組織内に形成するバイオフィルムが注目されている。バイオフィルムに関連して、既に口腔外科領域、泌尿器科領域、呼吸器科領域では種々の発表がなされており、慢性感染症の要因の一つであると注目さ

れてきている。創傷治癒においてもバイオフィルムの形成により難治化が予想されている。in vitro における人工バイオフィルム形成モデルの報告は散見されるが、実際の動物皮膚潰瘍モデルにおけるバイオフィルムの研究は少数である。

本研究はラット皮膚潰瘍におけるバイオフ

フィルムを観察し、難治性潰瘍の治療に必要な基礎的事項を確認することにある。

2. 研究の目的

ラット皮膚潰瘍モデル(緑膿菌 PAO1 株)を用いて、潰瘍面に存在する緑膿菌バイオフィルムの観察し、本モデルを発展させ、さまざまな条件下においてバイオフィルムを観察し、創傷治癒への影響を検討する。ラット皮膚潰瘍モデル(PAO1 株)を用いてバイオフィルムを観察し、更に Quorum-sensing 機構の構成遺伝子欠損株(Las I、Rhl I 遺伝子欠損)を観察し、比較する。また血流不全状態を作成しバイオフィルム形成について検討する。

3. 研究の方法

雄の S-D ラット(430~470g)を対象として、右図に示したようにラット背部に皮弁と皮膚潰瘍創を作成した。背側に単茎皮弁を皮筋上に作製 6mm パンチで分層欠損層を作製した。

細菌播種は、GFP(green fluorescent protein)の発現プラスミドを組み込んだ緑膿菌 PAO1 株、Las I、Rhl I 遺伝子欠損株をそれぞれ

5 × 10⁵cfu/wound を播種し、閉鎖環境においた。細菌播種しない群をコントロールとした。組織標本は細菌播種 8 時間後、1、3、7、10 日後の組織を摘出して作製した。細胞数の測定(細菌播種 24 時間後)は 70%エタノールで表面を洗浄後、重量測定。ホモジネー

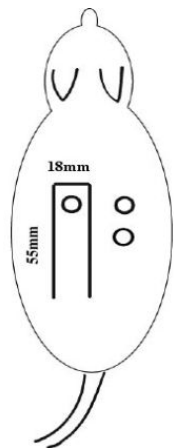


図1 皮弁および皮膚潰瘍創の作製

ト後、希釈法にて血液寒天培地上でコロニー数をカウントした。

摘出標本は常法に従い固定、脱水後、エポジン樹脂に包埋後、準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で観察した。包埋、凍結した標本は 5 μm 切片として rhodamine-conjugated ConA にて染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。さらにこれらを共焦点レーザー顕微鏡にて分析した。

観察項目は I. バイオフィルムの経時的観察、II. 遺伝子欠損株におけるバイオフィルムの状態。III. 虚血潰瘍でのバイオフィルムの状態である。

4. 研究成果

(1) バイオフィルムの経時的観察

図2には肉眼所見を示す。写真上が非虚血部、下が虚血性の潰瘍である。肉眼的には虚血潰瘍の方で浸出液が多い傾向にあった。また組織内細胞数をカウントすると、統計学



↑ : 皮膚潰瘍創 : 浸出液

図2 非虚血部と虚血部の皮膚潰瘍創の肉眼的所見

的な有意差は認められなかったものの、緑膿菌 PAO1 株虚血群が最も多い結果となった(表1)。

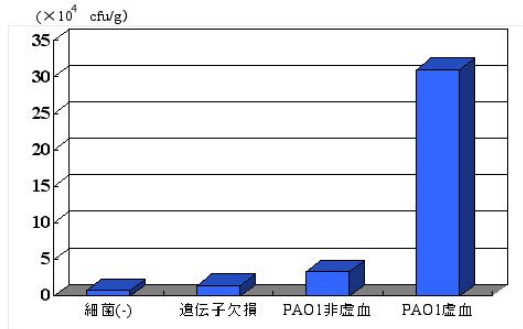


表1 組織内細菌数

細菌播種40時間後の光学顕微鏡像であるが、緑膿菌PAO1株では虚血群に比べて非虚血群で明らかに炎症生細胞浸潤、すなわち好中球を含んだ細胞浸潤が多く認められた(図3)。

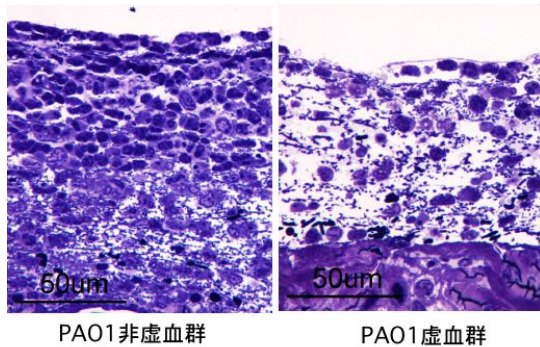


図3 緑膿菌PAO1株の細菌播種40時間後の光学顕微鏡像(トルイジンブルー染色)

経時的なバイオフィルム観察では、細菌播種8時間後の顕微鏡像では、GFPが組み込まれているので緑色に認められている細菌に一致して rhodamine 染色でも赤色にバイオフィルムが認められているのが証明された(図4)。

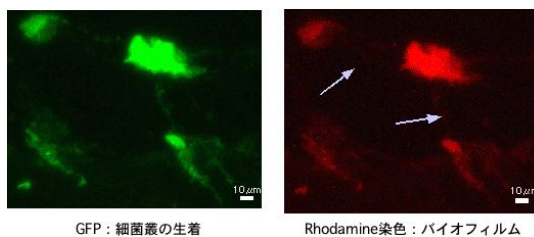


図4 細菌播種8時間後のバイオフィルム

細菌播種1日後の顕微鏡像(図5)では、潰瘍面を観察すると GFP での細菌叢に一致した rhodamine 染色でのバイオフィルムの形成が認められる。さらに細菌播種3日後、7日後の顕微鏡像を経時的に観察すると、細菌播種1日後と比べバイオフィルムが徐々に増大している傾向が認められた。細菌播種7日後では上皮の形成が観察されていてもバイオフィルムはまだ表面に残存していた。

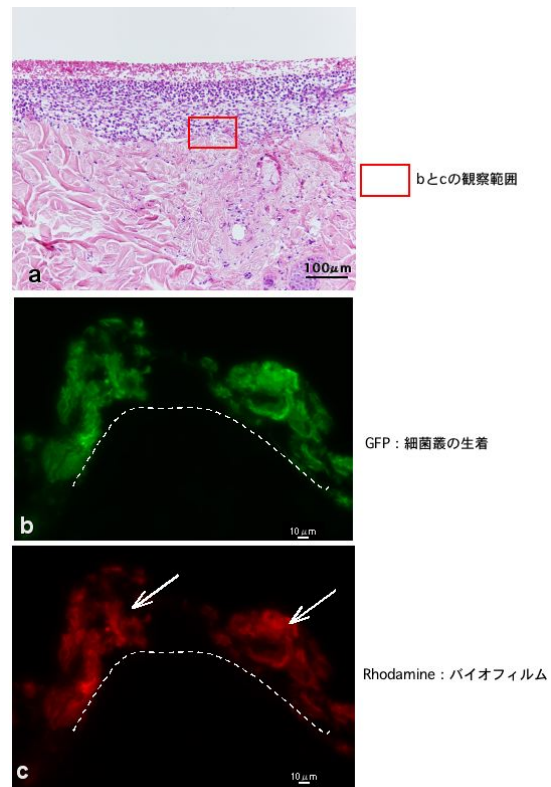


図5 細菌播種1日後のバイオフィルム

皮膚表面のバイオフィルムに関するこれまでの報告には、leucocyopenic mice に MRSA を接種した Akiyama らの研究、specific pathogen-free pig に *P. aeruginosa* を接種した Serralta らの研究があるが、今回のように経時的にバイオフィルムを観察した研究はこれまで認められていない。今回の研究により経時的な観察が可能であることが証明された。

(2) 遺伝子欠損株におけるバイオフィルム

Quorum-sensing 機構の構成遺伝子を欠損させた緑膿菌をラット皮膚潰瘍創に播種し、播種7日後のバイオフィルムの形成や創傷治癒に与える影響について検討した。Quorum-sensing 機構をブロックしてあるため、バイオフィルム生成ができにくいものと予想された通り、遺伝子欠損ではない PAO1 群に比べて、遺伝子欠損群の緑膿菌ではバイオフィルムの形成能が乏しい傾向にあった (図6)。

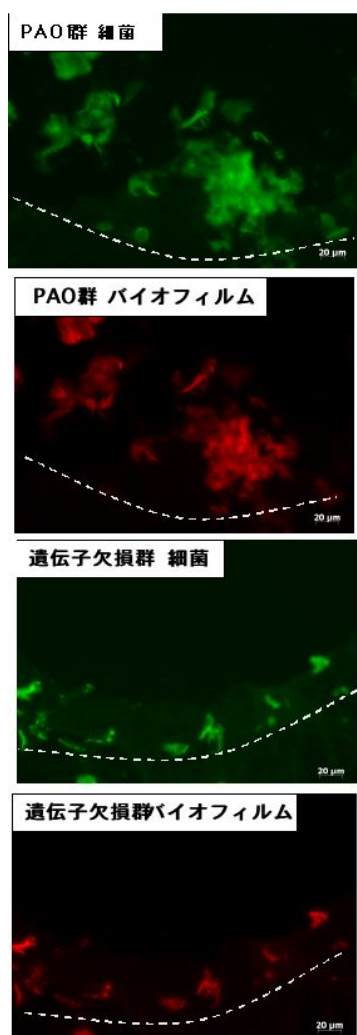


図6 遺伝子欠損におけるバイオフィルム

文献によると遺伝子欠損の緑膿菌株を用いた肺モデルの研究では、ラット肺に遺伝子欠損緑膿菌を播種した場合、肺炎の程度、致死率は軽度であったと報告されている。われわ

れの実験でも、皮膚潰瘍において Quorum-sensing 機構がブロックされることにより、バイオフィルム形成能が阻害されることが証明された。呼吸器分野ではすでに Quorum-sensing 機構をブロックすることでバイオフィルム形成能を低下させる薬剤が開発されてきており、皮膚潰瘍においても同様の作用機序で創傷治癒効果がある薬剤の開発が期待される。

(3) 虚血潰瘍でもバイオフィルム

細菌播種8時間後の顕微鏡像では、虚血群に比べ非虚血群のほうでバイオフィルムの形成が比較的多く認められている (図7)。文献によると、*in vitro* の実験では好中球とバイオフィルムの関係が予想されており、緑膿菌 PAO1 を用いた Jesaitis らは「好中球が枯渇した状態ではバイオフィルムは形成されにくい」と報告し、また同様に緑膿菌 PAO1 を用いた Walker らは「好中球の存在が緑膿菌バイオフィルムの発達を高める」と報告している。我々の今回の研究では、虚血群で明らかに炎症生細胞浸潤 (好中球) 浸潤が少なく、加えて非虚血群ではバイオフィルムの発達傾向があることを考えると、創傷の炎症生細胞浸潤、特に好中球浸潤が何らかの形でバイオフィルムの形成に関与しているものと予想された。今回の研究によりバイオフィルムの実態に迫り、その制御の糸口となり、将来の慢性皮膚潰瘍治療に寄与することとなった。

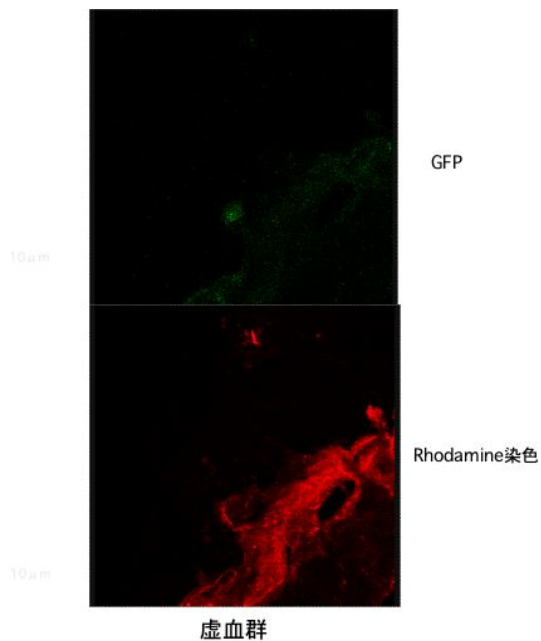
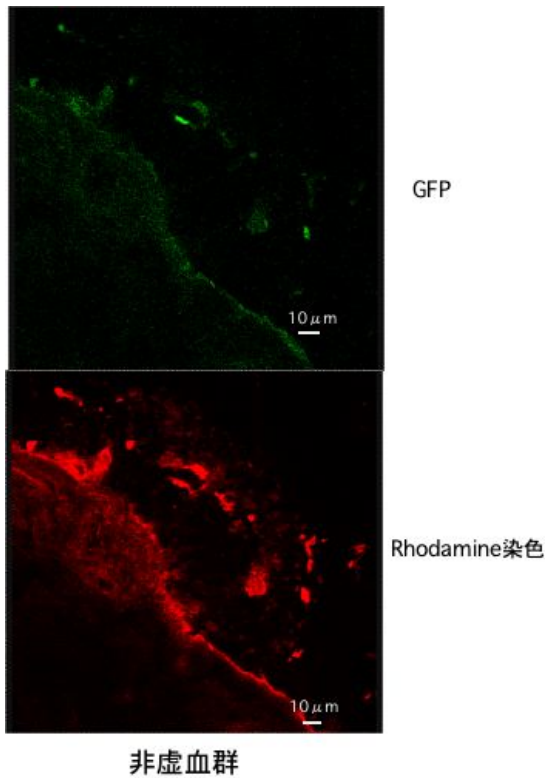


図7 細菌播種8時間後の虚血性潰瘍でのバイオフィーム

(4) 研究のまとめ

- 1) 本実験により皮膚潰瘍における細菌バイオフィーム形成の経時的な観察が可能となった。
- 2) Quorum-sensing 機構阻害遺伝子欠損の緑膿菌ではバイオフィーム形成能が低く、本機構を制御する薬剤開発につながった。
- 3) 虚血性皮膚潰瘍においては好中球浸潤が少ないために、虚血状態ではバイオフィームの形成がされにくい傾向にあり、バイオフィームと好中球との関連性が重要であるとの考えがもたらされた。

4)

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)

- ① 菅野恵美、鳥谷部 荘八、館正弘：ラット皮膚潰瘍創における緑膿菌バイオフィームの微細構造、形態・機能 第6巻第2号 111-118、2008、査読有

[学会発表] (計3件)

- ①鳥谷部 荘八、ラット皮膚潰瘍における緑膿菌バイオフィーム形成、第14回ケロイド・肥厚性瘢痕研究会、平成20年3月8日、東京
- ②鳥谷部 荘八、皮膚潰瘍におけるバイオフィームの観察、第16回日本形成外科学会基礎学術集会、平成19年10月12日、神戸
- ③鳥谷部 荘八、ラット皮膚潰瘍における緑膿菌バイオフィームモデルの作製、第36回日本創傷治癒学術集会、平成18年12月5日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

鳥谷部 荘八 (TORIYABE SOHACHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90375006

(2)研究分担者

館 正弘 (TACHI MASAHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50312994

(3)連携研究者

今井 啓道 (IMAI YOSHIMICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80323012

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書