

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17009

研究課題名(和文) バイオフィームを取り巻く創傷環境の解明および制御効果の高い治療法の開拓

研究課題名(英文) Elucidation of environment in wound with biofilms and development of efficient therapies

研究代表者

高木 尚之 (Takagi, Naoyuki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30569471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性創傷にはバイオフィームが関与していることは広く知られるようになってきているが、全ての慢性創傷にバイオフィームを認めるわけではない。本研究にて、慢性創傷においてバイオフィームを調べたところ、33%の創傷でバイオフィーム形成を認めた。加えて、虚血状態においてはバイオフィーム形成が阻害されること、バイオフィーム形成には好中球が関与することを明らかにした。各種バイオフィームに対する治療法の中で洗浄型局所陰圧閉鎖療法(NPWT-id)がバイオフィーム形成を効果的に阻害することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷治癒におけるバイオフィーム形成は抗菌薬に抵抗性を示し、慢性化、難治化の原因となる。バイオフィームに着目した創傷管理については、抗菌作用のある外用剤や被覆材を使用し漠然と対処しているのが現状である。本研究により、バイオフィームの形成しやすい条件について明らかとなり、加えて、バイオフィーム制御法として、洗浄型局所陰圧閉鎖療法が効果的にバイオフィームを制御しうる治療法ということが示唆された。更なる検討が必要であるものの、本研究の結果より、新たな難治性創傷管理のストラテジーが樹立・普及しうると考えられ、社会的な貢献をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The involvement of biofilms in chronic wounds is becoming widely known, but all chronic wounds don't have biofilms. In this study, biofilm formation in chronic wounds was 33%. In addition, it was found that biofilm formation in ischemic conditions was inhibited, and that biofilm formation and neutrophils were involved. The possibility of inhibiting the biofilm formation by negative pressure closure therapy (NPWT-id) among the therapies for various biofilms was indicated.

研究分野：形成外科

キーワード：創傷治癒 バイオフィーム 慢性創傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な感染症の難治化、慢性化にバイオフィルムの関与が指摘されている。バイオフィルムは細菌が産生した細胞外多糖体であり、これが細菌表面を覆い、生体に接着する。細菌はバイオフィルムの中では、抗菌薬に抵抗性を示し、白血球からの貪食、殺菌効果からも守られる。加えて、バイオフィルム形成には Quorum-sensing 機構が関与し、細菌密度などの情報を共有し、細菌密度が一定以上になると菌塊から細菌が分散し、critical colonization や進展性感染が惹起されると考えられている。現段階でバイオフィルム制御に有効な創傷管理法は確立していない。

2. 研究の目的

本研究は、臨床研究によりバイオフィルム形成に関与する創部環境条件を明らかにするとともに、これまでバイオフィルム形成抑制に効果があると報告される種々の治療法をバイオフィルム形成患者に施行し臨床的に効果的な治療を検証し、その制御メカニズムについて解明することを目的とする。

3. 研究の方法

慢性創傷のヒト臨床検体からバイオフィルムを同定し、その頻度、患者背景などの因子を検証する。また、種々の治療法によるバイオフィルム形成抑制効果を検証する。

同時に、一定の条件下での動物実験モデルによるバイオフィルム形成に影響を与える因子についての解析を行う。

(1) サンプル採取、バイオフィルム同定

糖尿病性皮膚潰瘍、褥瘡、下腿潰瘍などの創面からデブリードマン時に得られる組織を凍結固定する。薄切後、live and dead 染色にて生菌を染色、ConcanavalinA にて多糖体を染色し、共焦点のレーザー操作顕微鏡(LSM800)にて検鏡、同定した。

(2) 病理組織検証用には 10%ホルマリンで組織を固定し、各種染色を行った。

(3) 採取組織をホモジネートし、上清を血液寒天培地に接種し細菌数を定量化した。同時に、スワブ法による細菌培養検査も施行した。

(4) バイオフィルム抑制をはかった治療前後でのバイオフィルム抑制効果を検証した。

4. 研究成果

慢性創傷 25 検体を採取した。慢性創傷の種類としては、褥瘡が最多(50%)で、次いで糖尿病性足潰瘍(28%)であった。

基礎疾患としては、糖尿病、高脂血症、高血圧を有し、脊髄損傷の割合も比較的高かった。検出細菌の割合は、MSSA の頻度が最も高く、次いで *Corynebacterium sp.*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Coagulase(-)Staphylococcus* の順であった。

本研究における慢性創傷患者 25 検体中 6 例でバイオフィルムが検出され、バイオフィルム検出率は 33%であった(表 1、図 1)。

慢性潰瘍患者は虚血疾患を有していることも多いため、緑膿菌感染虚血マウスモデルを用いて、創部のバイオフィルム形成を確認した。その結果、創部のバイオフィルム形成の低下、好中球の減少を認めた。このことから、バイオフィルム形成には血流ならびに好中球遊走が必要と考えられた。また、バイオフィルム検出創部の病理組織像では、好中球が増加している症例が多く、ヒト検体においても同様の傾向がみられた。これにより、創部好中球制御におけるバイオフィルム抑制も示唆された。バイオフィルムを認めた創部での検出細菌は、*Pseudomonas aeruginosa*、*Coagulase(-)Staphylococcus* が最多で、*Staphylococcus aureus*(MSSA)、

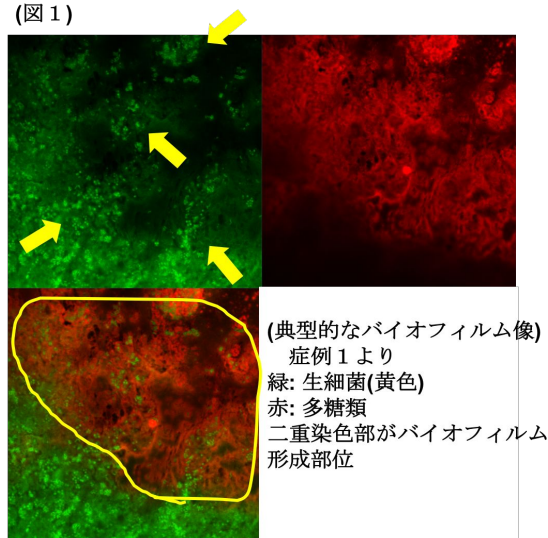
Corynebacterium sp. Staphylococcus aureus(MRSA)とつく結果であった。これらから、臨床上の慢性創傷の注意すべき菌としては黄色ブドウ球菌、緑膿菌であると考えられた。

最後にバイオフィーム制御効果として、周期的注入機能付き陰圧閉鎖療法 (NPWTid) を評価した。NPWTid 使用により、使用前に検出されたバイオフィームが使用中には消失し、使用後までその状態が維持された(図 2)。NPWTid 使用後では使用前よりも細菌数の減少を認めた。しかし、使用開始前にデブリードマンが不十分と考えられる症例では感染を誘発した、これらからデブリードマン後の洗浄が不可欠と考えられた。

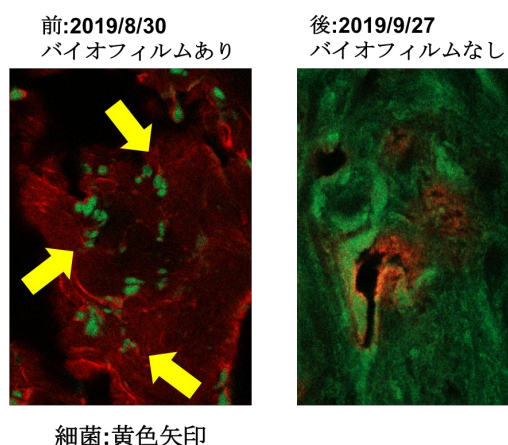
(表 1)

症例	性別(年齢)	創傷の種類	創傷部位	バイオフィームの有無
1	M(42)	糖尿病性潰瘍	右足	○
2	F(80)	褥瘡	背部	×
3	F(59)	糖尿病性潰瘍	右足	×
4			左足	×
5	F(65)	褥瘡	背部	×
6	F(45)	糖尿病性潰瘍	右足	○
7	F(66)	静脈性潰瘍	左足	×
8	M(64)	虚血性潰瘍	右足	×
9	M(48)	褥瘡	坐骨部	○
10	M(42)	褥瘡	坐骨部	×
11	F(55)	軟部組織感染	右大腿	2019/3/14 ×
12				2019/4/16 ×
13	M(60)	糖尿病性潰瘍	右踵部	○
14	F(55)	褥瘡	坐骨部	×
15	M(37)	褥瘡	坐骨部	×
16	F(62)	褥瘡	坐骨部	×
17	F(55)	褥瘡	坐骨部	2019/8/30 ○
18				2019/9/13 ×
19				2019/9/20 ×
20				2019/9/27 ×
21	M(58)	壊死性筋膜炎	背部	×
22	F(71)	褥瘡	坐骨部	○

(図 1)



(図2) NPWT-id使用前後の評価



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kanno E, Kawakami K, Tanno H, Aiko S, Sato N, Masaki A, Imamura A, Takagi N, Miura T, Yamamoto H, Ishii K, Hara H, Imai Y, Maruyama R, Tachi M: Contribution of CARD9-mediated signaling to wound healing in skin. *Experimental Dermatology*, 26: 1097-1104, 2017 doi: 10.1111/exd.13389 (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大, 山口賢次, 館正弘

創傷感染管理の最前線 Biofilm-based wound therapy バイオフィルムに対する治療・ケア

第 47 回日本創傷治癒学会 2017 年 11 月 27-28 日, 京都

丹野博大, 菅野恵美, 山口賢次, 川上和義, 館正弘
緑膿菌接種創の治癒過程と菌排除における NKT 細胞欠損の影響

第 20 回日本褥瘡学会学術集会 2018 年 9 月 28-29 日, 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.prs.med.tohoku.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

館 正弘 (TACHI, Masahiro)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50312004

川上 和義 (KAWAKAMI, Kazuyoshi)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 10253973

菅野 恵美 (KANNO, Emi)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 10431595