

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09621

研究課題名(和文) 難治性インプラント感染に対して炎症再生と抗菌の治療戦略で局所投与を行う基礎研究

研究課題名(英文) Basic research on local administration of inflammation-regenerating and antimicrobial treatment strategies for refractory implant infections.

研究代表者

黒田 隆 (Kuroda, Yutaka)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：20616099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究目的は局所投与に適した抗菌薬を選択し、組織修復と局所投与を同時に行う新たな薬物治療の開発を行うことである。バイオフィルムの成熟には段階があり、バイオフィルム成熟後では抗菌薬の有効性はないかもしれないが、未成熟な段階では抗菌薬全身投与の有効性が考えられる。局所環境を改善するとともに局所に高濃度の抗菌薬を投与することが有効である。局所投与に必要な抗菌薬濃度を検討する基礎的実験を行った。ステンレススクリューに*in vitro*でバイオフィルムを形成させ、複数の抗菌薬を使用しminimal biofilm eradication concentration (MBEC)を分析し、有効な濃度を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨軟部のインプラント手術後の感染症は治療に難渋し、抗菌薬長期投与とインプラント再置換を含む多数回手術が必要になることが多い。この場合、組織欠損や血流不全が存在し、死腔のための細菌叢の形成や血流不全による抗菌薬の局所濃度不足が懸念される。インプラントを残しての治療が困難な理由として、インプラント上にバイオフィルムが形成され抗菌薬治療に抵抗性となることや、抗菌薬の骨・関節への組織移行が悪く、抗菌薬の組織濃度が十分に上がらないことが原因と考えられる。これらのことから組織修復が感染制御に大きな役割を果たすことが予想され、組織修復と血流増加を図ることにより、抗菌薬投与による効果が増すことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to select antimicrobial agents suitable for local administration and to develop a new drug therapy that combines tissue repair and local administration. Biofilm maturation has stages, and while antimicrobial agents may not be effective after biofilm maturation, systemic administration of antimicrobial agents may be effective in the immature stages. Improving the local environment and administering high concentrations of antimicrobials locally may be effective. We conducted a basic experiment to examine the antimicrobial concentration required for local administration. Biofilms were formed on stainless steel screws *in vitro*, and minimal biofilm eradication concentrations (MBEC) were analyzed using several antimicrobial agents to obtain effective concentrations.

研究分野：整形外科

キーワード：黄色ブドウ球菌 抗菌薬 局所投与 骨髓炎 FGF 骨折 偽関節

1. 研究開始当初の背景

骨軟部の感染症、特にインプラント手術後の感染症はしばしば治療に難渋し、抗菌薬長期投与とインプラント再置換を含む多数回手術が必要になることが多い。この場合、組織欠損や血流不全が存在し、死腔のための細菌叢の形成や血流不全による抗菌薬の局所濃度不足が懸念される (Gustilo RB, J Bone Joint Surg Am. 1990;72:299-304)。開放骨折においても組織欠損が問題となり感染治療と同時の組織修復が重要となる。インプラントを残しての治療が困難な理由として、インプラント上にバイオフィームが形成され抗菌薬治療に抵抗性となることや、抗菌薬の骨・関節への組織移行が悪く、組織欠損や組織の血流が乏しいことと相まって、抗菌薬の組織濃度が十分に上がらないことが原因と考えられる。これらのことから組織修復が感染制御に大きな役割を果たすことが予想され、組織修復と血流増加を図ること(炎症再生)により、抗菌薬投与による効果が増すことが期待される。

我々はインプラント感染におけるバイオフィーム形成を詳しく検討して、*in vitro*と同様に、*in vivo*のバイオフィーム形成においても、細菌の接着、細菌の増殖、バイオフィームマトリックスの増殖、成熟、そして成熟したバイオフィームからの細菌の分離というダイナミックなステップをたどることを同定した(Nishitani K, et al. J Orthop Res. 33:1311-9, 2015)。

他にインプラント感染が難治性になる原因として骨髄内や軟部組織内の *Staphylococcus abscess community* (SAC)があり、これは黄色ブドウ球菌がコアグラゼなどの酵素を分泌してフィブリン偽膜であり、広義のバイオフィームに含めることができる。SACが成熟すると、免疫細胞は膿瘍の中心の細菌に到達することができず、膿瘍内で細菌にとって安全な環境となる (Varrone JJ, J Orthop Res. 2014;32:1389-96)。また、我々は先行研究によって、骨細管内 (osteocyte-lacuno canalicular network)への細菌の浸潤も難治性感染の大きな要因となり得ることを報告した。(Bentley KL de M, et al. J Bone Miner Res 32:985-90, 2017)。骨細管内へは宿主の免疫細胞が侵入することができないため、インプラント感染が難治性となる原因だけでなく、数十年経過後に突如再発する骨髄炎の原因の一つとして考えられている。骨細管は骨髄とは骨セメントで隔絶されているため、抗菌薬が骨細管まで達するかどうかは未知である。狭義のインプラント上のバイオフィームの存在と、周囲の組織の炎症、炎症組織内のSAC形成、また腐骨や皮質骨内への骨細管への細菌の浸潤など、インプラント感染が難治性となる原因については研究が盛んに行われているところである (Masters EA, Nishitani K, et al. Bone Research. 7:20-18, 2019)。

低濃度の抗菌薬はバイオフィーム形成を促し治療に逆効果であるため治療域の抗菌濃度を局所において保つ必要がある。バイオフィームが形成されると治療に必要な抗菌薬濃度は格段に上昇すると考えられるが、高濃度の抗菌薬は細胞毒性・組織毒性を及ぼす可能性があり、全身投与のみでは困難である。様々な抗菌薬の細胞毒性は報告されているが、治療濃度との関連は殆ど検証されていない。また、バイオフィーム感染に対応するために必要な抗菌薬濃度は、最小発育阻止濃度の100~1000倍とも言われているが、実験室でのプラスチックプレートを用いた検討にとどまっており、整形外科手術に用いられるインプラント上に付着した、生体内で形成されたバイオフィーム感染に対して有効な抗菌薬濃度についてはこれまで検討されていない。そのような必要濃度がわかった上で、細胞毒性濃度と治療有効濃度の差が大きい抗菌薬ほど安全域が広いと言えるが、このような観点からの抗菌薬の検証が不足している。

2. 研究の目的

本研究の目的は局所投与に適した抗菌薬を選択し、組織修復と局所投与を同時に行う新たな薬物治療の開発を行うことである。バイオフィームの成熟には段階があり、バイオフィームが成熟した後では抗菌薬の有効性はないかもしれないが、未成熟な段階では抗菌薬全身投与の有効性が考えられる。バイオフィームが成熟した感染症の治療は抗菌薬の全身投与のみでは十分ではないとすれば、局所環境を改善するとともに局所に高濃度の抗菌薬を投与することが有効である可能性がある。しかし、どの程度の濃度まで抗菌薬の局所濃度を高める必要があるのかはわかっていない。そして、抗菌性と局所環境の改善という両者を達成するために、組織修復を促進させる Fibroblast growth factor-2 (FGF2) と抗菌薬を同時に投与する。FGF2による組織修復、血管新生と抗菌薬による細菌治療のシナジー効果が期待される。これはこれまで行われていなかった全く新たな試みである。

3. 研究の方法

(1) 抗菌薬含有ゼラチンハイドロゲルの開発

ゼラチンハイドロゲルに抗菌薬を含有させる実験を行う。抗菌薬単独、抗菌薬 + ポリ乳酸結合、抗菌薬 + ハプテン結合などの条件を用いてゼラチンハイドロゲルに抗菌薬を含有させる。ゼラチンハイドロゲルをコラゲナーゼを用いて分解し、抗菌薬の徐放性を HPLC 法で検討する。

(2) *in vivo*での抗菌薬のインプラント感染への効果の検討

マウス脛骨骨髓炎モデルを用いて実験を行う。C57BL/6 マウスに感染時、感染後3日後、から薬剤を投与し、走査電子顕微鏡でインプラント上のバイオフィーム、マイクロCTで骨破壊抑制効果、組織学実験で炎症と骨破壊の検討を行う。またコロニー形成単位試験を用いて、残存細菌数を検討し抗菌効果を検討する。次に感染成立後7日後、上記と同様の薬剤を投与しすでに成立した感染に対する治療効果をみる。

(3) in vitro, in vivo バイオフィーム感染を抑制に必要な局所濃度の検討

実際のインプラントを用いて、まず in vitro バイオフィームをインプラント上に形成させて、インプラント上の in vitro バイオフィームに対する最小バイオフィーム根絶濃度：minimum biofilm eradication concentrations (MBEC)が、MIC やプラスチックプレート上の MBEC とどの程度異なるのかを、複数の抗菌薬に対して検討する。次にインプラント感染動物モデルを用いて、インプラント感染を起こし、生体内においてインプラント上に in vivo バイオフィームが形成されるのを待ち、インプラントを抜去した上でインプラントに付着したバイオフィームに対する MBEC を検討する。

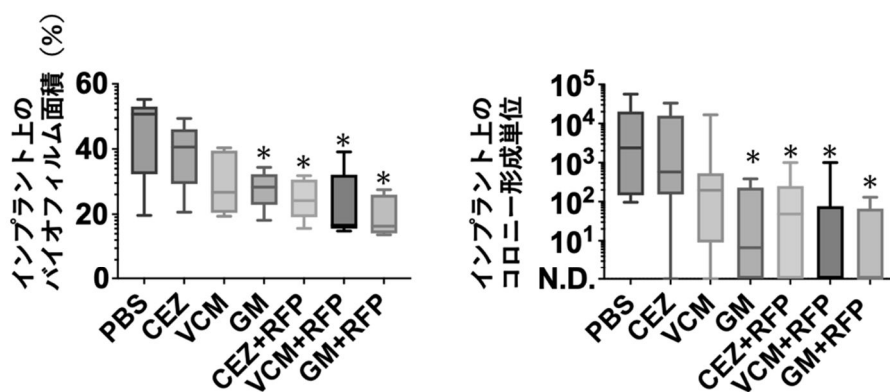
4. 研究成果

(1)

ゼラチンハイドロゲルに抗菌薬を含有させる実験を行い、バンコマイシン、ゲンタマイシンをゼラチンハイドロゲルに含有させ、2日間徐放することができた。抗菌薬徐放ゼラチンハイドロゲルを用いて、試験管内で黄色ブドウ球菌の増殖抑制実験を行い、培養液中にハイドロゲルを入れることにより、黄色ブドウ球菌の発育を阻止していることを確認した。

(2)

マウス脛骨インプラント黄色ブドウ球菌感染に対する抗菌薬全身投与の検討では、感染前に投与したもの、バイオフィームが成熟していない感染3日目に投与を開始したものでは、効果のある抗菌薬、もしくは抗菌薬の組み合わせが存在した。具体的には、術前投与ではバンコマイシン単剤、ゲンタマイシン単剤、およびリファンピシンとセファゾリン、バンコマイシン、ゲンタマイシンの組み合わせでバイオフィームの形成を有意に抑制していた。3日目投与ではゲンタマイシン単剤、およびリファンピシンとセファゾリン、バンコマイシン、ゲンタマイシンの組み合わせでバイオフィームの形成を有意に抑制していた。さらに、インプラント上や感染した骨・軟部組織からのコロニー形成単位においても、ゲンタマイシン単剤、もしくは上記の組み合わせにおいて、細菌コロニー数の有意な減少を認めた。さらに、全くコロニー形成を認めない個体もあり、バイオフィーム成熟前においては抗菌薬全身投与でも有効性があることが確認された。



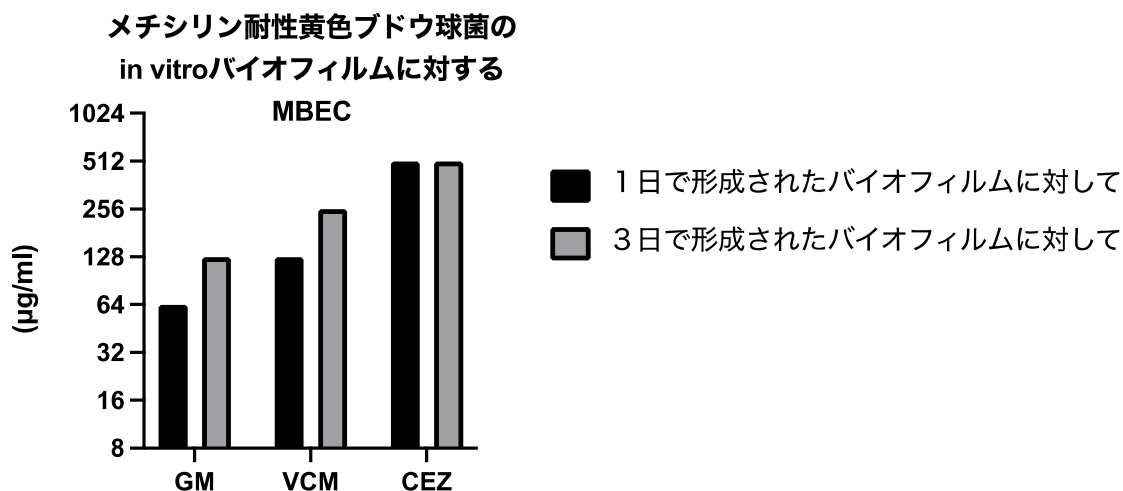
マウス脛骨インプラント黄色ブドウ球菌感染モデルでの感染3日目に抗菌薬を投与した場合のインプラント上にバイオフィームが形成された面積と、インプラント上のコロニー形成単位。PBS：リン酸緩衝生理食塩水、CEZ：セファゾリン、VCM：バンコマイシン、GM：ゲンタマイシン、RFP：リファンピシン、*：PBSに対して有意な減少

しかし、バイオフィームの成熟が進んだ術後7日目に抗菌薬投与を開始した場合は、いずれの抗菌薬単剤、もしくは組み合わせにおいても全く有効性を見出せなかった。よってバイオフィームが完成した後は、抗菌薬の全身投与がバイオフィーム感染に対しては無効であることが確認された。

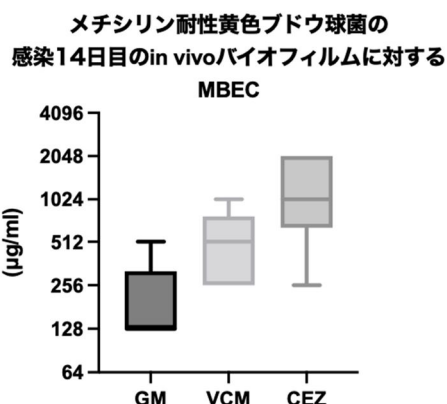
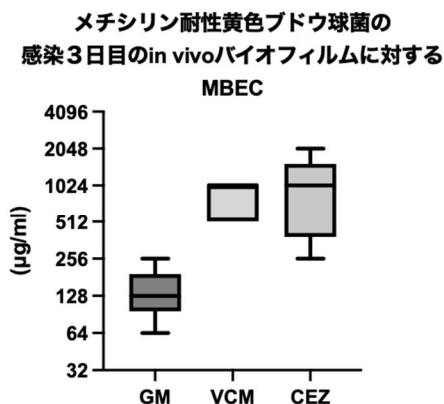
(3)

実際の整形外科インプラントに近いものを用いて MBEC を検討するために、ステンレススクリューを用いての検討を行なった。まずステンレススクリュー上の in vitro バイオフィームに対する検討を行った。メチシリン感受性黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に何れに対してもゲンタマイシンが最も低い MBEC を示した。バンコマイシンの MBEC はメチシリン耐性黄

色ブドウ球菌に対してにおいても、ゲンタマイシンのそれより低いものであった。また、セファゾリンの MBEC はメチシリン感受性黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌何れに対しても最も高い結果となった。セファゾリンのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の MIC (128 μ g/ml) を除いて、各 MIC は 0.5~2 μ g/ml であり、ステンレスインプラント上のバイオフィルムに対しても、MBEC は MIC に比べて非常に高いものであることがわかった



in vitro バイオフィルムより遥かに複雑な構造と考えられる in vivo バイオフィルムに対する MBEC を検討するため、ラット大腿骨骨折感染に対するプレート固定モデルを確立した。同モデルは骨幹部の横骨折をポリエーテルエーテルケトン樹脂プレートと、4本のステンレススクリューにより固定するモデルである。ラットをメチシリン耐性黄色ブドウ球菌で感染後に3日目、14日目にスクリューを抜去して形成されたバイオフィルムに対する感受性を検討した。



in vivo で形成されたバイオフィルムに対してもゲンタマイシンが最も有効であり、セファゾリンが最も有効性が低かった。その必要とする濃度は in vitro の MBEC の 5~10 倍程度、MIC の 200~2000 倍程度と、非常に高濃度を要することがわかった。これを受けて、この程度の高濃度において骨芽細胞、繊維芽細胞、間質性幹細胞に対する細胞毒性を検討中であり、安全性と有効性を担保できる濃度において、FGF 含有ハイドロゲルでの動物実験により、確立できた大腿骨骨折感染モデルを用いて、感染の治療と局所環境の改善によるシナジー効果により骨癒合の促進が得られるかの検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomizawa Takuya, Nishitani Kohei, Ito Hiromu, Okae Yu, Morita Yugo, Doi Kohei, Saito Motoo, Ishie Shinichiro, Yoshida Shigeo, Murata Koichi, Yoshitomi Hiroyuki, Kuroda Yutaka, Matsuda Shuichi	4. 巻 39
2. 論文標題 The limitations of mono and combination antibiotic therapies on immature biofilms in a murine model of implant associated osteomyelitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 449 ~ 457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24956	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saeed Kordo, Sendi Parham, Arnold William V., Bauer Thomas W., Cora?a Huber D?bora C., Chen Antonia F., Choe Hyonmin, Daiss John L., Ghert Michelle, Hickok Noreen J., Nishitani Kohei, Springer Bryan D., Stoodley Paul, Sculco Thomas P., Brause Barry D., Parvizi Javad, McLaren Alex C., Schwarz Edward M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Bacterial toxins in musculoskeletal infections	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 240 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岡江 優, 西谷 江平, 富澤 琢也, 斉藤 元央, 坂本 昭夫, 黒田 隆, 松田 秀一
2. 発表標題 ステンレスインプラント上でのminimum biofilm eradication concentration(MBEC)の検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西谷 江平
2. 発表標題 [バイオフィルムを撲滅するために] インプラント感染が難治性となる病巣はどこに存在するのか バイオフィルムを中心に
3. 学会等名 第44回日本骨・関節感染症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富澤 琢也, 西谷 江平, 伊藤 宣, Schwarz Edward, 松田 秀一
2. 発表標題 インプラント関連骨髄炎のマウスモデルでの, 未成熟バイオフィルムに対する, 単剤および併用抗生物質療法の検証
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomizawa T, Nishitani K, Ito H, Morita Y, Saito M, Yoshida S, Schwarz EM, Matsuda S.
2. 発表標題 Efficacy of mono and combination antibiotic therapy on immature versus mature biofilm in a murine model of implant associated osteomyelitis.
3. 学会等名 2020 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富澤 琢也, 西谷 江平, 石川 正洋, 伊藤 宣, Schwarz Edward, 松田 秀一
2. 発表標題 マウスモデルでの表皮ブドウ球菌インプラント感染では, 明らかな骨破壊なくゆるみを生じる
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishitani K.
2. 発表標題 Elucidating the Immune Proteome of PJI via Multiplex Luminex (Protective vs. Susceptible).
3. 学会等名 Biofilm symposium, Stavros Niarchos Foundation Complex Joint Reconstruction Center, Hospital for Special Surgery, New York (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田畑 泰彦 (TABATA Yasuhiko) (50211371)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 (14301)	
研究 分担者	西谷 江平 (NISHITANI Kohei) (70782407)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------