

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09863

研究課題名(和文) 糖尿病性足潰瘍の骨髄炎の発症には終末糖化産物による微小血管障害が関与するか

研究課題名(英文) Does microangiopathy due to advanced glycation end products play a role in the development of osteomyelitis in diabetic foot ulcers?

研究代表者

藤井 美樹 (Fujii, Miki)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80444602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：足趾潰瘍により断端形成術を施行した64名64趾に対し、抗AGE抗体を用いた足趾腱の免疫組織化学染色を施行し、52趾の腱の栄養血管内皮細胞にAGEの沈着を確認した。次に骨髄炎を合併した12名の糖尿病性足潰瘍患者から、足趾切断術の際に摘出した15趾について研究した。グラム染色を確認できた部位は骨髄9趾、軟部組織14趾、腱12趾、骨端11趾、腱付着部10趾、骨幹2趾であった。2つの研究からAGEの微小循環障害による腱の脆弱性により細菌感染が生じやすくなり、腱をつたって運ばれた細菌が付着部である骨端部から骨髄内へ侵入し骨髄炎を生じることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣の変化に伴い日本でも糖尿病患者は増加し、それに伴い糖尿病性足潰瘍を発症する患者も増加している。糖尿病性足潰瘍が骨髄炎を合併すると切断になる危険性は非常に高くなり、患者のADLの低下だけでなく医療経済的にも大きな問題となる。骨髄炎発症のメカニズムが解明されれば、骨髄炎を予防する方法の解明やより効果的な抗生剤の投与方法に繋がる可能性があり社会的意義は大きい。AGEによる腱の栄養血管の微小血管障害が骨髄炎発症の一要因であることが判明すれば、AGE形成阻害薬が骨髄炎の新たな治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We retrospectively performed an immunohistochemical examination of 64 tendons from toes of 64 patients (50 males, 14 females, aged 69.7 ± 11.1 years, 48 patients with diabetes) who underwent toe resection due to foot ulcers. Significant AGE stains were identified in vascular endothelial cells. The degree of AGE accumulation in vascular endothelial cells was classified into 4 stages: 0 (negative stain), +1 (weak or partially positive), +2 (clear or whole perimeter positive), and +3 (strong and thick positive). The findings were (diabetes vs non-diabetes): 9 (18.8%) vs 2 (12.5%) in stage 0, 20 (41.7%) vs 10 (62.5%) in stage 1, 16 (33.3%) vs 4 (25%) in stage 2, and 3 (62.5%) vs 0 in stage 3. AGE positivity rates (stages +1, +2, +3) of the patients <69 years with diabetes ($n=21$) was 80.7%, and those of patients without diabetes ($n=2$) was 66.7% ($p=0.52$). Our study indicates that tendon fragility may be caused by microangiopathy due to AGE accumulation in the vascular endothelial cells.

研究分野：創傷治癒

キーワード：糖尿病性足潰瘍 骨髄炎 AGE 腱

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アジアにおける糖尿病患者数は世界で最も急速に増加しており、日本でもこの10年で倍近く増加している。その合併症の一つである糖尿病性足潰瘍は、非外傷性下肢切断の最大の原因であり、患者のQOLの低下のみならず医療経済的に大きな負担となる。特に骨髄炎を生じた場合は足趾切断となる可能性が高くなるが、現時点において有効な予防法や治療法は確立されていない。糖尿病性足潰瘍の骨への感染経路を解明すれば、今後の下肢救済に大きく寄与することは必須である。我々はこれまでの研究で、趾骨における骨髄炎は骨端から始まることを確認した。同部は腱の付着部であるが、予備実験で腱の栄養血管の内皮細胞で終末糖化産物 (advanced glycation end products; AGE) の沈着を確認し、AGEによる微小血管障害が腱及びパラテノンの易感染性を生じ、腱の付着部位である骨端から細菌感染が生じると予測した。

2. 研究の目的

糖尿病患者において(1) 腱の脆弱性は、腱自体へのAGEの蓄積ではなく、腱を栄養する微小血管の内皮細胞へのAGEの蓄積による微小血管障害 (microangiopathy) により生じること(2) 障害された腱、パラテノンにより細菌が繁殖し易くなり、腱に沿って移行した細菌がその付着部である骨端の血管孔(骨幹端動脈の遺残)から骨内へ拡大することで骨髄炎が発症すること を証明することが目的である。

3. 研究の方法

(1) 足趾に付着する腱におけるAGEの局在を明らかにする

予備実験ではAGEは腱細胞ではなく、腱束の間の loose connective tissue にある微小栄養血管の内皮細胞に蓄積を認めた。血管は腱束に沿って長軸方向に走行する傾向にあったため、血管の断面を長軸方向と短軸方向両方から観察する。

方法)

糖尿病患者と非糖尿病患者の腱を採取する。糖尿病患者は、糖尿病性足潰瘍で足趾切断術を行う際に得られた比較的損傷の少ない腱を使用し、非糖尿病患者は末梢動脈疾患により足趾潰瘍を生じた重症下肢虚血患者の足趾切断術で得られた腱および小児の多合趾症手術で切断した余剰趾から採取する予定である。

採取した腱を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、腱を半分割にする。半分は腱の長軸方向の4 μ mの切片を作成し、もう半分はさらに分割して骨への付着部位、中央、骨から離れた部位の短軸の断面の切片を作成し、パラフィン包埋切片を作成する。

それぞれに対し、抗AGE抗体 (ab23722, Abcam, Cambridge, UK) を用いて免疫組織化学染色を行う。また血管内皮細胞であることを確認するために、CD31でも免疫染色を行う。

胃癌、乳癌に対して行うHER2法に準じて、染色強度と陽性細胞の割合から4段階(0, 1+, 2+, 3+) で評価する。

(2) 糖尿病性足潰瘍患者の足趾標本における細菌の感染経路を確認する。

糖尿病性足潰瘍の感染の原因菌の約半数はMRSAを含む黄色ブドウ球菌である。潰瘍感染により足趾切断を行なった足趾標本に対しグラム染色及び抗黄色ブドウ球菌抗体を用いて染色を行い、細菌がどの様に骨内へ侵入するか直接観察する。

方法)

糖尿病性足潰瘍の手術の際に採取した足趾を10%中性緩衝ホルマリン液で固定する。

脱灰をEDTAで行なったのち、パラフィン包埋切片を作成する。

グラム染色及び抗黄色ブドウ球菌抗体; Anti-Staphylococcus aureus mouse monoclonal 抗体 (ab37644, abcam, Cambridge, UK) を用いた免疫染色を行う。

胃癌、乳癌に対して行うHER2法に準じて、染色強度と陽性細胞の割合から4段階(0, 1+, 2+, 3+) で評価する。

4. 研究成果

(1) 足趾に付着する腱におけるAGEの局在の研究 (図1)

足趾潰瘍により断端形成術を施行した64名64趾(男性50、女性14、平均年齢69.4歳、糖尿病患者48名)に対し、抗AGE抗体 (ab23733 Abcam, Cambridge, UK) を用いた足趾腱の免疫組織化学染色を施行し、52趾腱束の間の結合組織内に存在する腱の栄養血管内皮細胞にAGEの沈着を確認した。AGE陽性患者の割合は糖尿病患者と非糖尿病患者ではほぼ同じであったが、69歳以下では糖尿病患者の方が非糖尿病患者より陽性率が高い傾向にあった($p=0.5153$)。これまで腱の脆弱性は腱への直接的なAGEの蓄積が原因と言われてきたが、本研究により、AGEによる微小血管障害が原因の一つであることが示唆された。

(2) 糖尿病性足潰瘍患者の足趾標本における細菌の感染経路の解明 (図2)

骨髓炎を合併した12名の糖尿病性足潰瘍患者(男性8、女性4、平均年齢69歳)から、足趾切断術の際に摘出した15趾について研究した。13趾でグラム陽性染色陽性であり全例で組織培養でもグラム陽性菌を確認した。6趾でグラム陰性染色陽性であったが、組織培養でグラム陰性菌を確認したのは4趾であった。

グラム染色を確認できた部位は骨髓9趾、軟部組織14趾、腱12趾、骨端11趾、腱附着部10趾、骨幹2趾であった。骨端部は成長期の急性化膿性骨髓炎の好発部位として知られているが、成長軟骨板の消失した成人ではどこでも骨髓炎を生じると考えられている。我々の研究において骨幹部でグラム染色陽性だったのは2趾のみであり、腱を伝ってきた細菌が付着部から骨端部から骨髓内へ侵入することが示唆された。

2つの研究からAGEの微小循環障害による腱の脆弱性により細菌感染が生じやすくなり、腱をつたって運ばれた細菌が付着部である骨端部から骨髓内へ侵入し骨髓炎を生じることが強く示唆された。

図1 足趾標本の血管内皮細胞におけるAGE抗体陽性の状況

Diabetes	≤69 y.o	%	≥70y.o	%
AGE Negative (0)	5	19.2	4	18.2
AGE Positive (+1,2,3)	21	80.7	18	81.8

Non-Diabetes	≤69 y.o	%	≥70y.o	%
AGE Negative (0)	1	33.3	1	7.7
AGE Positive (+1,2,3)	2	66.7	12	92.3

(P=0.5153)

図2 足趾標本における細菌の局在 (グラム染色、培養結果)

no.	Case	age,sex	DM	toe	趾骨	Gram染色		localization of gram staining						グラム陽性菌	グラム陰性菌
						陽性染色	陰性染色	骨髓	軟部組織	腱	骨端	腱附着部	骨幹		
1	1	68, F	+	Lt II	distal,middle,proximal phalanx	+	-	+	+	+	+	+	+	MRSA, Bifidobacterium spp.	Serratia marcescens
2	2	66, F	+	Rt III	middle, proximal phalanx	+	+	+	+	+	+	-	S epidermidis MRS		
3	2	66, F	+	Rt II	distal,middle phalanx	+	-	+	+	+	+	-	S aureus		
4	3	46, M	-	Rt V	middle phalanx	+	-	-	+	-	-	-	MRSA		
5	3	46, M	-	Lt III	distal phalanx	+	-	+	+	+	+	-	MRSA		
6	3	46, M	-	Lt II	distal phalanx	+	+	+	+	+	+	-	MRSA		
7	4	81, F	+	Rt III	middle phalanx	+	-	+	+	-	+	-	S aureus, S epidermidis MRS, Enterococcus faecalis	Proteus mirabilis	
8	5	95, F	-	Lt II	distal,middle phalanx	-	+	-	+	+	-	-		Morganella morganii	
9	6	73, M	-	Rt III	distal, middle phalanx	+	-	-	+	+	+	-	S aureus, Streptococcus agalactiac (GroupB)		
10	7	73, M	+	Lt II	distal,middle,proximal phalanx	+	-	-	+	+	+	-	Enterococcus faecalis, Corynebacterium spp, Streptococcus constellatus,		
11	8	71, M	+	Rt III	distal phalanx	-	-	-	-	-	-	-		E coli	
12	9	91, M	+	Rt V	distal, proximal phalanx	+	-	-	+	+	+	-	Corynebacterium spp., S lugdunensis MRS		
13	10	50, M	+	Lt I	distal, proximal phalanx	+	+	+	+	+	-	+	MRSA, Enterococcus faecalis, Enterococcus avium,	Pseudomonas asarginosa, Bacteroides spp	
14	11	84, M	+	Rt I	distal, proximal phalanx	+	+	+	+	+	+	-	MRSA	Providencia rettgeri, Bacteroides fragilis, Myroides spp	
15	12	78, M	+	Rt IV	middle, proximal phalanx	+	+	+	+	+	+	-	S aureus, Streptococcus anginosus	E coli, Fusobacterium spp	
						13	6	9	14	12	11	10	2		

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Fujii M, Terashi H, Yokono K, Armstrong DG.	4. 巻 111
2. 論文標題 The degree of blood supply and infection control needed to treat diabetic critical limb ischemia with forefoot osteomyelitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Am Podiatr Med Assoc	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Fujii M, Yamada A, Yamawaki K, Tsuda S, Miyamoto N, Gan K, Terashi H.	4. 巻 Sep
2. 論文標題 Predictive factors for limb salvage and foot ulcer recurrence in patients with chronic limb-threatening ischemia after multidisciplinary team treatment: a six year Japanese single-center study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Low Extrem Wounds	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Maeshige N, Uemura M, Hirasawa Y, Yoshikawa Y, Moriguchi M, Kawabe N, Fujii M, Terashi H, Fujino H.	4. 巻 July
2. 論文標題 Immediate effects of weight-bearing calf stretching on ankle dorsiflexion range of motion and plantar pressure during gait in patients with diabetes mellitus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Low Extrem Wounds	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ichihashi S, Takahara M, Fujimura N, Shibata T, Fujii M, Kato T, Tsubakimoto Y, Iwakoshi S, Obayashi K, Kichikawa K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Changes in Skin Perfusion Pressure After Endovascular Treatment for Chronic Limb-Threatening Ischemia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Endovasc Ther	6. 最初と最後の頁 208-214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 藤井美樹	4. 巻 23
2. 論文標題 踵部褥瘡を識(し)る.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本褥瘡学会誌	6. 最初と最後の頁 26-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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24件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 藤井美樹
2. 発表標題 糖尿病性足潰瘍の感染拡大に終末糖化産物による微小血管障害が関与するか
3. 学会等名 第52回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井美樹
2. 発表標題 糖尿病性足潰瘍の感染拡大に終末糖化産物による微小血管障害が関与するか
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fujii M, Tanaka R and Mizuno H.
2. 発表標題 Novel therapeutic apheresis 'Rheocarna' for the no-option patients with chronic limb-threatening ischemia. Free papers& Awards.
3. 学会等名 DFcon2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M.
2. 発表標題 Session2: D-foot international. Diabetic foot ulcer debridement and local flaps.
3. 学会等名 7th Annual Conference of IADFS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M.
2. 発表標題 Session8: IADFS PROGRAMME: CASE DISCUSSIONS AND TAKE HOME MESSAGE. Conservative Treatment Cases
3. 学会等名 7th Annual Conference of IADFS, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M.
2. 発表標題 MRI-FOOT MASTERCLASS.
3. 学会等名 The Diabetic foot society of India annual conference2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M.
2. 発表標題 Predictive factors for limb salvage and foot ulcer recurrence in patients with chronic limb-threatening ischemia after a multidisciplinary team treatment: a 6-year Japanese single-center study.
3. 学会等名 Diabetic Limb Salvage Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M, Tanaka R and Mizuno H.
2. 発表標題 CLINICAL EXPERIENCE WITH COLLAGEN FOR THE MANAGEMENT OF CHRONIC LIMB-THREATENING ISCHEMIA
3. 学会等名 Plastic Surgery The Meeting 2021, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹、田中里佳、水野博司、寺師浩人
2. 発表標題 糖尿病性足潰瘍の骨髄炎は骨端の血管孔への細菌感染から生じる
3. 学会等名 第51回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹、田中里佳、水野博司、寺師浩人
2. 発表標題 糖尿病性足潰瘍の感染拡大に終末糖化産物による微小血管障害が関与するか
3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会,
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M, Hayashi T, Yamashiro K, Terashi H
2. 発表標題 Multidisciplinary team treatment for the patients with chronic limb threatening ischemia.
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹
2. 発表標題 第2章 足病発症から完治まで
3. 学会等名 第2回日本フットケア・足病医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹 林 知子 山城憲二郎 寺師浩人
2. 発表標題 糖尿病性足潰瘍の感染拡大に終末糖化産物による微小血管障害が関与するか
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹 林 知子 山城憲二郎 寺師浩人
2. 発表標題 エビデンスに基づく下肢救済治療
3. 学会等名 第13回日本創傷外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹
2. 発表標題 病院と在宅の創傷治療 - その違いと使い分け -
3. 学会等名 第2回日本フットケア・足病医学会年次学術集会, (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹
2. 発表標題 脱細胞化組織「OASIS」～創傷治療における新たな選択肢としての可能性について考える～
3. 学会等名 第13回日本創傷外科学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹
2. 発表標題 創傷管理の新時代を切り拓く超音波デブリードマン機器 国内初の「超音波デブリードマン装置」見参！
3. 学会等名 第13回日本創傷外科学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井美樹
2. 発表標題 透析患者の足病に対する集学的治療
3. 学会等名 第11回中四国臨床工学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fujii M, Terashi H
2. 発表標題 DIABETIC FOOT OSTEO MYELITIS IS CAUSED BY BACTERIAL INVASION THROUGH THE NUTRIENT FORAMEN IN THE EPIPHYSIS
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会・学術集会（名古屋）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujii M, Terashi H
2. 発表標題 Diabetic Foot Osteomyelitis is Caused by Bacterial Invasion through the Nutrient Foramen in the Epiphysis
3. 学会等名 THE Diabetic Foot Study Group 2020 VIRTUAL MEETING(web) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujii M, Terashi H
2. 発表標題 Diabetic Foot Osteomyelitis is Caused by Bacterial Invasion through the Nutrient Foramen in the Epiphysis
3. 学会等名 DFcon2020(web) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujii M, Terashi H
2. 発表標題 Diabetic Foot Osteomyelitis is Caused by Bacterial Invasion through the Nutrient Foramen in the Epiphysis
3. 学会等名 Virtual Plastic Surgery The Meeting 2020(web) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井美樹 寺師浩人
2. 発表標題 糖尿病性足潰瘍の骨髄炎は骨端の血管孔への細菌感染から生じる
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会(横浜)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujii M, Terashi H
2. 発表標題 DIABETIC FOOT OSTEO MYELITIS IS CAUSED BY BACTERIAL INVASION THROUGH THE NUTRIENT FORAMEN IN THE EPIPHYSIS
3. 学会等名 EWMA2020(web) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 藤井美樹、田中里佳	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 臨床整形外科	

1. 著者名 藤井美樹、寺師浩人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 WOC Nursing	

1. 著者名 藤井美樹、寺師浩人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 金原出版株式会社	5. 総ページ数 14
3. 書名 形成外科診療ガイドライン3	

1. 著者名 藤井美樹、寺師浩人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 7
3. 書名 診療指針	

1. 著者名 藤井美樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メヂカルフレンド社	5. 総ページ数 5
3. 書名 第1特集「連携」が支えるフットケア 多職種・病診・地域連携における看護師の役割	

〔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	榊原 俊介 (Sakakibara Shunsuke) (50444592)	神戸大学・医学研究科・客員准教授 (14501)	
研究分担者	寺師 浩人 (Terashi Hiroto) (80217421)	神戸大学・医学部附属病院・教授 (14501)	

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
---------	---------