

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791309

研究課題名（和文） MRSA DNAワクチンによる人工血管感染予防

研究課題名（英文） The prevention of MRSA prosthetic vascular graft infection by using a DNA vaccine.

研究代表者

水野 吉雅（MIZUNO YOSHIMASA）

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60397354

研究成果の概要（和文）：

MRSA に対する DNA ワクチン合成と、MRSA 重症感染症モデルと人工血管感染モデルの作成を行った。申請書に記載した David M らの方法ではワクチン合成確立に至らず、Hu DL らの方法に変更したが、安定合成に至っていない。一方で細菌学的手技は上達し、MRSA の菌量を調整する手技は確立しており、MRSA 縦隔炎モデルを完成させ、バイオフィーム形成人工血管（細菌含有層性）の作製中である。感染性人工血管移植モデルは、当科では確立しているので、速やかに作成する。DNA ワクチンの安定供給を実現する必要がある。

研究成果の概要（英文）：

I constructed DNA vaccine for the MRSA, and made an MRSA serious infectious disease model (mediastinitis caused by MRSA) and MRSA prosthetic vascular graft infection model. I failed to construct DNA vaccine by the method of the David M. Therefore I changed the means to the method of Hu DL. The new experimental plan goes, but I do not reach the stable composition of DNA vaccine. On the other hand, the bacteriological maneuver improved and I completed an MRSA mediastinitis model. I have been making the biofilm formation prosthetic vascular graft. The prosthetic vascular graft model is established at our department. It is necessary to realize stable supply of the DNA vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：心臓血管外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：MRSA、DNA ワクチン、人工血管感染

1. 研究開始当初の背景

人工血管感染の予防法や治療法の開発は、その予後の悪さから血管外科領域では従来から大きな関心事となっている。特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA: Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus) 感染症は治療抵抗性であり予後が悪いため、MRSA の人工血管感染を予防することができれば画期的である。

1999 年に David M らは Staphylococcus aureus が人間や動物に感染した時に菌の表面にできる synthesized N-succinyl B-1-6 glucosamine (PNSG) を、感染した患者の肺組織などから分離、精製してマウスとウサギに投与し免疫能を獲得したと報告した。これにより有意に感染率を減少することに成功した。その後 2003 年と 2006 年に Roth DM らが、DNA ワクチンについて報告した。この DNA ワクチンにより、MRSA 感染症、特に人工血管感染についての予防効果が得られるか検証することに意義が大いにあったと考えた。

2. 研究の目的

術前 MRSA ワクチン投与による人工血管感染の予防効果を明らかにすることである。

具体的には、

- (1) MRSA ワクチンの作製法および投与の方法(体内導入法)の確立
- (2) 術前に投与した家兎について MRSA に対する感染防御の強さの評価を行う。

3. 研究の方法

- (1)MRSA ワクチンの合成方法の確立
- (2)MRSA ワクチンの体内導入法の確立
- (3)MRSA ワクチンを用いる人工血管感染の予防効果の評価
- (4)実施条件の最適化と感染予防のための新技術の開発を予定した。

(1)MRSA ワクチンの合成方法の確立として、MRSA に感染したヒトの肺より抽出した組織の一部より poly-N-succinyl β -1-6 glucosamine (PNSG) を抽出し、これをワクチンとして用いる。PNSG は、S. aureus の 70% 以上に存在する capsular polysaccharides (CP) の特に CP5 および CP8 から血清学的に抽出する、という David M らの方法に倣って行うことを想定していたが、抽出サンプルの入手や、抽出技術の煩雑さから、Hu DL らの方法に変更して行うこととした。

すなわち、

- ①MRSA 菌株は岐阜大学医学部微生物学教室から譲り受けた、MRSA (GTC1188) を使用する。
- ②無毒化 SEC 遺伝子 (dmSEC) をコードするプラスミド DNA (pcDNA_{dmSEC}) を構築する。
- ③DNA ワクチン (pcDNA_{dmSEC}) を大量精製する。という手順で行うこととした。

(2) MRSA ワクチンの体内導入法の確立として、当初は腎臓の重症感染症モデルを計画していたが、MRSA 縦隔炎モデルがより研究計画に沿っていると考え変更した。

すなわち、

- ①0.5McFarland の MRSA (GTC1188) 懸濁液 2×10^7 colony-forming units (CFU) / ml を作成する。さらに感染ステンレス糸を、2% グ

ルコース加 TSB 液体培地 2ml に 2×10^9 CFU/ml の MRSA 懸濁液 50 μ l 加えたものにステンレス糸を入れ培養することで作成する。

②マウスの縦隔内に、作成した懸濁液 (0.2ml) および感染ステンレス糸を投与し MRSA 縦隔炎モデルとする。

③コントロール群と DNA ワクチン投与群の 2 群に分け、それぞれ生存率の評価を行う。死亡した場合はその時点で、生存が得られた場合は、手術の 1 週間後に、血液検査の炎症反応、ステンレス糸、縦隔組織内の病理学的評価を行う。

(3)MRSA ワクチンを用いる人工血管感染の予防効果の評価、(4)実施条件の最適化と感染予防のための新技術の開発として、バイオフィーム形成人工血管の作製と感染性人工血管移植モデルの作製を行うこととした。

① 2×10^9 CFU/ml の MRSA 懸濁液に人工血管を 37°C 下で 48 時間浸し、バイオフィーム形成 (細菌含有層性) 人工血管を作製する。

②腹部大動脈を露出し、パッチ縫合予定部の上下で大動脈を遮断後メスで切開をいれ、5×3mm の人工血管を、ポリプロピレンを用いて縫着する。

③非感染-DNA ワクチン非投与群、感染-DNA ワクチン非投与群、感染-DNA ワクチン投与群の 3 群を作成し、効果判定を行う。効果判定は生存割合、人工血管摘出前の目視観察 (腹腔内および吻合部の膿瘍、縫合不全、人工血管周囲の貯留液の有無)、感染の有無 (人工血管周囲ぬぐい液および動脈血の培養試験)、細菌の同定 (走査電子顕微鏡での観察)、菌塊の有無で行う。

4. 研究成果

(1) 当初予定していた、David M らの合成方法から、Hu DL らの方法に変更したため、研究進行に遅延が生じた。MRSA 菌株は岐阜大学医学部微生物学教室から譲り受けた、MRSA (GTC1188) を使用することで均一で安定した MRSA を得ることができた。文献通り、無毒化 SEC 遺伝子 (dmSEC) をコードするプラスミド DNA (pcDNA_{dmSEC}) を構築し、DNA ワクチン (pcDNA_{dmSEC}) を大量精製する段階で研究が進行中となっている。ただし、研究の根幹となる DNA ワクチン作成に遅延が生じたため、実験計画全体の予定変更を余儀なくされた。

(2)MRSA 縦隔炎モデルが完成した。当講座での新たな感染症モデルである。まず MRSA 懸濁液とステンレス糸の作成を行った。 2×10^7 CFU/ml と 2×10^9 CFU/ml に調整した MRSA 懸濁液を作成した。 2×10^9 CFU/ml に調整した MRSA 懸濁液から感染ステンレス糸を作成した。感染ステンレス糸の培養で、定着菌量の測定を行った。その後 MRSA 懸濁液と感染ステンレス糸をマウスの縦隔内に植え、1 週間後に血液・ステンレス糸・胸腺・縦隔内組織をサンプリングした。血液は 1.15×10^3 CFU/ml、ステンレス糸は 1.67×10^3 CFU/ml、胸腺は 6.86×10^6 CFU/g、 4.62×10^6 CFU/g が検出され、縦隔内の MRSA 感染が確認された。開創のみを行ったコントロール群では感染が無いことも確認した。

(3) 2×10^9 CFU/ml の MRSA 懸濁液に人工血管を 37°C 下で 48 時間浸し、バイオフィーム形成 (細菌含有層性) 人工血管を作製した。また、人工血管移植モデルの手技を確立している段階である。

MRSA ワクチンの合成に難渋しているが、MRSA ワクチンの効果判定に用いる、縦隔炎モ

デルと人工血管移植モデルの手技に関しては確立されてきている。MRSA ワクチンの安定供給ができれば、MRSA ワクチンの効果に関して速やかに検討できるものと考えており、研究を継続している。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 吉雅 (MIZUNO YOSHIMASA)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60397354

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：