

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592073

研究課題名(和文)人工血管感染機序に関する研究

研究課題名(英文)The in vitro research of bacterial infection of prosthetic vascular grafts.

研究代表者

渡邊 善則 (WATANABE, Yoshinori)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：90210963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：人工血管外側からの細菌感染をテーマに研究を開始した。人工血管の外側から内側に菌が侵入するメカニズムを解明するために人工血管感染モデルを用いた研究を行った。細菌には可動性があることと生食中で長時間生存可能であることより緑膿菌を選択した。さらに人工血管壁への細菌の侵入を調査するために電子顕微鏡を用いた人工血管壁断面の観察も行った。

最近、RT-PCR法でゼラチンコーティング人工血管に対する細菌の蛋白分解酵素遺伝子の発現量を測定する実験を行っている。これに関してはパイロットスタディーを行っている。

研究成果の概要(英文)：Bacterial infection from outer surface of prosthetic vascular graft is a subject of our study. The research was done with the models of contaminated vascular graft to investigate the mechanism of bacterial invasion into prosthetic vascular graft from outer surface. *Pseudomonas aeruginosa* was selected as the model bacterium for its mobility and ability to thrive in physiological saline. Furthermore, a cross section of the vascular grafts were observed with scanning electron microscopy to confirm the bacterial invasion into vascular grafts. Recently, we perform the experiment to measure the amount of gene of protease from bacteria contacted with gelatin-coated Dacron vascular graft by RT-PCR method. Its pilot study is now ongoing.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：人工血管感染 緑膿菌 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) <人工血管感染モデルを使用した実験>人工血管感染はきわめて重篤な合併症であり心臓血管外科学領域に於いて解決すべきテーマである。今までの人工血管感染に関する in vitro の研究としては各人工血管素材への細菌付着度 (Adherence) の研究 (Schmitt DD, et al. J Vasc Surg 1986;3(5):732.) や各人工血管素材への抗菌薬コーティング (Kuehn C, et al. J Surg Res 2010;164:e185.) の研究がなされてきた。しかし、われわれのように細菌の人工血管内への通過性という観点で研究した報告はない。また近年、日本でのみ販売されているエラストマーシールドダクログラフトは有孔度が低く血液が漏れにくい (Tabata M, et al. Ann Thorac Surg 2011;91:899.)、細菌の通過性も低いことが予測される。今回、われわれは in vitro の研究で従来のゼラチンコーティングダクログラフトと新しいエラストマーシールドダクログラフトを用いて細菌の通過性に関して比較検討することにした。また、実験には運動性があり、生食中でも長期間生存可能な緑膿菌 (PA01 株) を用いた。緑膿菌は多剤耐性化が話題となっており (Soderstrom M, et al. J Vasc Surg 2009;50(4):806.)、今後、大血管疾患末梢血管疾患の外科的治療のハイリスク症例への適応拡大に伴い、今以上に問題となる可能性が高いことを考慮し緑膿菌を選択した。

(2) <電子顕微鏡による細菌汚染された人工血管の観察実験>細菌汚染された人工血管表面を電子顕微鏡で観察した報告 (Schmitt DD, et al. J Vasc Surg 1986;3(5):732.) は僅かながら認めるが、細菌汚染された人工血管壁断面を観察した報告は認められない。人工血管感染機序を探る上で補助となりうるため in vitro で実験を計画した。

(3) <Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR 法) による研究>緑膿菌は臨床感染の経過中に、その病原性に関与する様々な酵素 (alkaline protease, elastase, exotoxin A, exoenzyme S, hemolysin) を放出し、感染拡大していく (Stehling EG et al. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 2008;12(1):86.)。そして、緑膿菌の病原性は細胞外プロテアーゼ産生を含む多彩なメカニズムに影響されている。プロテアーゼには elastase A, elastase B, alkaline protease, protease , Modified elastase, PASP (Pseudomonas aeruginosa small protease) などがあり (Tang A et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2009;50(8):3794-3801.)、プロテアーゼの発現を介して人工血管感染が増悪すると考えられている。そのためゼラチンコーティング人工血管とノンコーティングの人工血管を細菌で汚染し、プロテアーゼ発現量を比較する実験を計画した。

2. 研究の目的

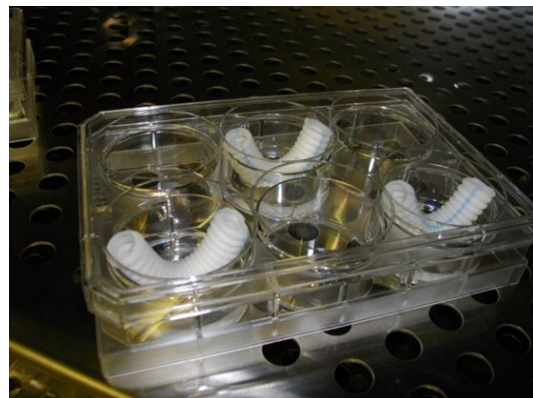
(1) <人工血管感染モデルを使用した実験>人工血管感染は重篤な合併症であり感染人工血管の治療が困難のみでなく、細菌の血管内への侵入により敗血症を引き起こす致死的な病態である。本研究では2種類の人工血管素材で感染モデルを作成し、人工血管外側からの高濃度の細菌汚染に対する抵抗性と血流感染の原因となる人工血管内に進展する機序を解明することを目的とした。

(2) <電子顕微鏡による細菌汚染された人工血管の観察実験> In vitro の環境で、細菌の物理的な人工血管壁への通過を観察することを目的とする。

(3) <Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR 法) による研究>ゼラチンコーティング人工血管に緑膿菌が感染した場合、ノンコーティングの人工血管にくらべてプロテアーゼの発現量が増加することが推測される。プロテアーゼ産生を介し人工血管への付着力が増加することや、ゼラチンコーティングを溶解することで通過力が増大し敗血症に至りやすくなるのではないかと推測される。2種類の人工血管を緑膿菌で汚染し、RT-PCR 法を用いてプロテアーゼの発現量を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) <人工血管感染モデルを使用した実験>本実験では人工血管壁の外表面から内側へ細菌が侵入する過程を解明することを目的とした。人工血管素材として従来から使用されているゼラチンコーティングダクログラフト (GCDVG) と日本でのみ販売されている新しい人工血管で、その壁の低い通過性が特徴のエラストマーシールドダクログラフト (ESDVG) を選択しデータを比較した。細菌は緑膿菌を選択し約 1.0×10^8 CFU/ml の生食懸濁液として使用した。以下のようにして人工血管感染モデルを作成した。



8mm ストレートの人工血管を 6cm 長に切断し 6-well culture plate に U 字にして挿入、人工血管内側に清潔な生食 2ml を、外側に緑膿菌生食懸濁液を 5ml 注入した。60 時間までの 9 つのタイムポイント (0、6、12、18、24、30、36、48、60 時間後) で人工血管内側の生食を採取し寒天培地に塗布、培養することで

各時間の細菌数を直接カウントした。人工血管感染モデルは ESDVG で 18 個、GCDVG で 12 個作成した。

両群間の各時間帯での細菌数の比較には Mann-Whitney U-test を、人工血管内に細菌が出現するまでの時間を Kaplan-Meier curve で比較した。P<0.05 で有意差ありと判定した。

(2) <電子顕微鏡による細菌汚染された人工血管の観察実験>

人工血管感染モデルで 60 時間細菌に汚染された人工血管を電子顕微鏡で観察できるように処理した。緑膿菌生食懸濁液で 60 時間汚染された人工血管を 2% グルタルアルデヒドに 48 時間以上浸漬後、2% 四酸化オスミウムに 1 時間浸漬しエタノールで段階的に脱水処理施行。t-ブタノールを加えて凍結後、ドライヤー(HITACHI ES-2030 Freeze Dryer)で乾燥させた。試料を観察したい角度にトリミングし観察用の台の上におきイオン Sputter (HITACHI E-1030 Ion Sputter)を用いて白金バナジウムでコートする。できた試料を走査型電子顕微鏡(HITACHI S-3500N)で観察した。

正常時の壁構造も確認するために清潔な人工血管に関しても同様に処理を行い観察した。

(3) <Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR 法)による研究>

(実験モデル作成、検体採取)

緑膿菌の生食懸濁液を約 1.0×10^8 CFU/ml の濃度で作成した。ノンコーティング人工血管(T 群)とゼラチンコーティング人工血管(G 群)を 3cm 長に切断し、それぞれを 6-well culture plate の内に入れた。その中へ人工血管が完全に漬かる様に緑膿菌生食懸濁液を 8ml 注入した。直後、0.5、4、2、4、8、12、24、48、72 時間後の 9 ポイントで Well 内の緑膿菌生食懸濁液を 100 μ l ずつ採取した。72 時間後の検体採取終了までの間、Well は 35 の保温庫で管理した。各時間で採取した検体に RNA protect Bacteria Reagent を注入し遠心分離の後、上澄み液を破棄した。コントロールとして人工血管を浸漬していない緑膿菌生食懸濁液も同様の方法で直後のみ検体採取を行った。結局、検体は G 群:N=1 で 9 ポイント分、T 群:N=1 で 9 ポイント分、コントロール:N=2 で 1 ポイント分となった。

(RNA の抽出)

各検体にリゾチーム含有 TE バッファーを入れ攪拌した後、Buffer RLT を加え振盪し、100%エタノールを添加した。コレクションチューブにスピカラムをセットしスピカラム内に処理中の検体を注入する。Buffer RW1 をスピカラム内に加え遠心分離を行い、Buffer RPE を注入し遠心分離を行った。その度、下澄み液を破棄した。緑膿菌の RNA が付着していると考えられるスピカラムを新しいコレクションチューブにセットしスピカラムに RNase Free Water を入れ遠心分離を行い、下澄み液内に RNA を抽出した。

(RNA に含まれている DNA を分解し cDNA へ変換)

抽出した検体に TURBO DNase buffer、TURBO DNase を加え 35 で 30 分培養後、DNase inactivation を入れ遠心分離を行い、その上澄み液を採取した。RNA 濃度を測定し濃度の最も少ないものを 10 μ l 採取し、200 μ l の PCR チューブに入れ、High-Capacity Transcription Kits を 10 μ l 加えた。その他の検体はこれと同濃度になるように、さらに RNase Free Water を加え調節した。出来た検体を GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems にセットし cDNA を作成した。

(RT-PCR 法で発現遺伝子量の測定)

測定するプライマーは 3 つ(PASP、Ias A、apr A) とし、それぞれの反応液を作成した。抽出した cDNA 20 μ l に滅菌水 80 μ l を加えて希釈、攪拌した。反応液を FAST 用 MicroAmp 96well に 18 μ l ずつ注入し、各 cDNA を 2 μ l 加え、それぞれのプライマーと反応させ FAST 用 Optical Adhesive Cover を Well 上に貼付し、測定用コンピューターに挿入しそれぞれのプライマーにおける発現遺伝子量を計測した。

4. 研究成果

(1) <人工血管感染モデルを使用した実験>ゼラチンコーティングダクロン人工血管(G 群:n=12)において、人工血管感染モデル作成直後には人工血管内側の検体から細菌の検出はなく、6 時間後から徐々に菌の検出を認め、30 時間後にはすべての人工血管内側の検体で菌の検出を認めた。G 群で人工血管内側に菌が検出されるまでの平均時間は 15.5 ± 7.0 時間であった。

エラストマーシールドダクロン人工血管(T 群:n=18)においては人工血管感染モデル作成直後に既に 2 つの人工血管内側の検体から細菌の検出を認めた。経時的に人工血管内側に菌を認めるモデルが増えていったが、60 時間を経過しても人工血管内側の検体から菌を認めないモデルが 1 つあった。T 群で人工血管内側に菌が検出されるまでの平均時間は 22.0 ± 19.7 時間であった。

両群での各時間帯での人工血管内側および外側の菌量に有意差を認めなかった(Mann-Whitney U-test にて $P > 0.05$)。また、人工血管内側に菌が検出されるまでの時間を Kaplan-Meier Curve で示したが両群間に有意差は認められなかった(log-rank test にて $P > 0.05$)。

G 群では直後では人工血管内側に菌の検出は認めなかったが、時間経過とともに徐々に菌の検出を認め 30 時間後までにすべての人工血管内側から菌の検出を認めたのに対し、T 群では直後より菌の検出を認めたものもあれば 60 時間後でも菌の検出が認められなかったモデルもあった。これには人工血管壁の構造が関連していると考えられ、次の実験で電子顕微鏡にて観察することとなった。

(2) <電子顕微鏡による細菌汚染された人工血管の観察実験>人工血管感染モデルを用いた実験で60時間細菌汚染された人工血管の壁構造を観察した。さらに人工血管素材の違いも検討するため細菌汚染されていない人工血管も観察した。細菌汚染されていないゼラチンコーティング(G群)の人工血管壁はダクロン繊維が平織りとなった構造をしており、エラストマーシールド(T群)の人工血管壁はダクロン繊維が綾織りとなった間に血液通過性の低いエラストマーが挟まれた構造となっていた。また、通過性が低いといわれているエラストマーの層は均一ではなく薄い部分や内部に欠損のある部分もあった。細菌汚染後のゼラチンコーティングダクロン人工血管、エラストマーシールド人工血管の壁の断面にはともに細菌を認めた。

(3) <Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR法)による研究>簡易核酸測定キットでのRNA測定結果をもとに実験をすすめ、cDNAを作成した。その後、相対的定量法で遺伝子量を測定した。プライマーPASPではすべての検体で測定不能となった。プライマーIas Aにおいてコントロール群は2つとも測定不能で、ノンコーティング人工血管(T群)では0.5、2、12、24、48、72時間後が測定不能であったが、0時間後=47.5、4時間後=5.34、8時間後=3.94で、ゼラチンコーティング人工血管(G群)では0.5、8時間後が測定不能で、0時間後=1.0、2時間後=0.97、4時間後=18.6、12時間後=0.48、24時間後=0.19、48時間後=17.61、72時間後=0.23であった。プライマー(apr A)においてコントロール群の1つは測定不能であったがもう一方は1.86であった。ノンコーティング人工血管(T)、ゼラチンコーティング人工血管(G群)ともにすべての検体が測定可能でT群において0時間後=1.2、0.5時間後=4.76、2時間後=4.86、4時間後=5.30、8時間後=0.94、12時間後=1.24、24時間後=6.59、48時間後=1.25、72時間後=0.46で、G群では0時間後=1.0、0.5時間後=2.07、2時間後=3.28、4時間後=2.74、8時間後=0.76、12時間後=1.56、24時間後=4.55、48時間後=10.21、72時間後=12.74であった。

遺伝子量が測定できない検体が多々認められた原因のひとつとして簡易核酸測定キットでのRNA測定結果でOD260/280が低値のものがありRNAの純度の問題があった可能性がある。検体作成手技や試薬、機械的な問題を見直す必要があると考えられた。またPASPのみ全く測定できなかったが、そのプライマーが長かったことが関与していると考えられる。PASPのプライマーを作成しなおすか、実験から外すか再考する。プライマーIas A、apr Aは一部を除き測定可能であった。今回は2群間のN=1ずつで行った実験であり統計学的な考察を加えることはできないが、時間経過に伴いG群の遺伝子量が増加していく印

象を受けた。今後も検体数を増やして検討する必要があると考えられる。

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1件)

Sasaki Y: The in vitro research of bacterial invasion into prosthetic vascular grafts: Comparison of elastomer-sealed and gelatin-coated Dacron vascular grafts. *Surgery Today* 44(8):1542-7, 2014. 査読あり。IF=1.2

[学会発表](計3件)

佐々木雄毅、渡邊善則、舘田一博、木村聡一郎、宮崎修一、塩野則次、藤井毅郎、小澤司、原真範、片柳智之、大熊新之介、小山信彌。人工血管壁への細菌侵入に関する研究: エラストマーシールドダクロングラフトとゼラチンコーティングダクロングラフトにおける検討。第112回日本外科学会総会。幕張メッセ、千葉県千葉市、2012. 4/13. (ポスタープレゼンテーション)

Sasaki Y, Watanabe Y, Tateda K, Kimura S, Miyazaki S, Shiono N, Fujii T, Koyama N. THE BASIC RESEARCH OF BACTERIAL INVASION INTO VASCULAR GRAFT: A STUDY OF ELASTOMER-SEALED DACRON VASCULAR GRAFT. The 20th Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery. In Bali, Indonesia. March 8 2012. (ポスタープレゼンテーション)

Sasaki Y, Watanabe Y, Tateda K, Kimura S, Miyazaki S, Shiono N, Fujii T, Ozawa T, Hara M, Katayanagi T, Okuma S, Koyama N. The 12th Asian Society for Vascular Surgery. In Taipei, Taiwan. Sep 30 2011. The Research of Bacterial Penetration into Gelatin-Coated Dacron Vascular Grafts. (ポスタープレゼンテーション)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 善則 (WATANABE, Yoshinori)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号: 90210963

(2) 研究分担者

佐々木 雄毅 (SASAKI, Yuki)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号: 40385729

藤井 毅郎 (FUJII, Takeshiro)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号: 80287531