

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06906

研究課題名(和文) バイオフィームに着目した、整形外科術後インプラント感染の治療法の検討

研究課題名(英文) Treatment of biofilm formation in an implant associated osteomyelitis

研究代表者

西谷 江平(Nishitani, Kohei)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：70782407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌薬を用いた整形外科バイオフィルム感染の抑制の研究を行った。黄色ブドウ球菌脛骨インプラント感染モデルを使用した。術前からの投与ではバンコマイシン、ゲンタマイシンによりバイオフィルム形成の抑制が見られたが、セファゾリンの抑制効果は弱かった。抗菌薬によりバイオリウム形成予防効果に差があることがわかった。術翌日からの投与でセファゾリンではバイオフィルム形成抑制がほとんどできなかった。バンコマイシン、ゲンタマイシンではある程度の抑制効果を認めた。術後14日目からの投与では何の薬剤も抑制効果は認めなかった。以上のことからバイオフィルム感染の単剤での治療は難しく多剤併用の検討を行う必要が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effect of antibiotics for the prophylaxis and treatment of biofilm formation in murine tibial implant associated osteomyelitis was studied. The inhibitory effect of biofilm formation differed among antibiotics. Although vancomycin and gentamycin showed strong effect for the prophylaxis for biofilm formation, cefazolin showed weaker potential. For the treatment, the trend was similar, that is cefazolin was almost invalid for the treatment of biofilm. On the other hand, vancomycin or gentamycin reduced biofilm formation, if administrated one day after infection. No antibiotics was useful if administrated after 14 day. Treatment of biofilm infection with single antibiotics was not effective enough, and usage of multiple antibiotics should be studied in the future.

研究分野：整形外科学

キーワード：バイオフィルム 骨髓炎 インプラント 化学療法

## 1. 研究開始当初の背景

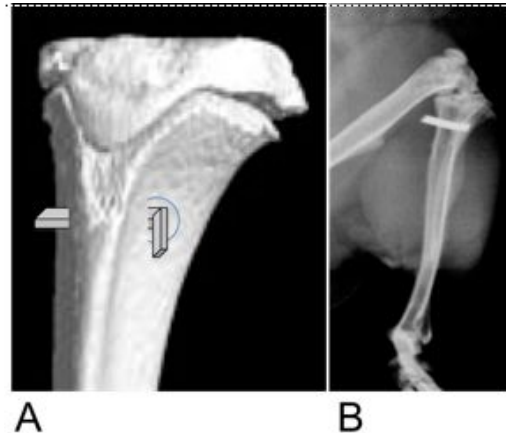
人工関節手術は変形性関節症患者の QOL 向上に寄与するところ大であり、本邦でも世界でも増加の一途をたどる。日本では 2011 年では 40000 件以上の人工股関節置換術と 70000 件以上の人工膝関節置換術が行なわれていると推測されており (J Orthop Sci, 17, 348-69, 2012)。米国では 2015 年で約 150 万件の人工膝・股関節置換術が行なわれると報告されている (J Bone Joint Surg Am, 96, 624-30, 2014)。これまで清潔操作の徹底、ドレーピングテクニック、抗生物質の適切な使用など術後感染を減少させるための様々な工夫がなされてきたが、初回人工膝関節置換術の術後 30 日以内の感染率は約 0.4% 程度とここ 20 年優位な減少はなく、再置換術の感染率は約 3% 程度と患者の高齢化と合併症の増加により増加している (JAMA, 308, 1227-36, 2012)。この結果、人工関節術後感染の総数は増加してきており 2015 年には米国では約 40000 件の人工関節術後感染が発症していると推定され、大きな経済学的な負担となっている (J Arthroplasty 27 (8 Suppl), 61-5, 2012)。治療としては抗生物質治療には抵抗性であり、多くの場合インプラント抜去とその後の抗生物質治療となるが、通常長期間の治療を要し再感染を起こすこともしばしばある。インプラント感染が他臓器の感染と異なり抗生物質治療に抵抗性である主要因として細菌がインプラント上にバイオフィルムを形成し、バイオフィルムが抗生物質に対してバリアとなり慢性感染に移行するということがあげられる。このバイオフィルムについては術後抜去したインプラント上での走査電子顕微鏡 (SEM) での報告や *in vitro* での報告が多数あったが *in vivo* での経時的な詳細な検討はなされてこなかった。応募者らは米国において整形外科術後感染の約半数を占める黄色ブドウ球菌を用いて、既存のマウスインプラント感染モデルを用いて、SEM によるインプラント上のバイオフィルムの形態的、定量的に詳細な検討を行った形態的には感染 3 日目には細菌の周囲にバイオフィルムが形成され始めており、7 日目には細菌はほぼバイオフィルム内に埋まり表面からはほとんど観察できない。細菌は最終的にバイオフィルムから巣立ち、別の場所へ移って新たな感染を起こすと *in vitro* の実験からは報告されていたが、*in vivo* においても 14 日目以降ではバイオフィルムから細菌が巣立った痕跡と考えられる無数の孔を発見し Empty lacunae と命名した。定量的にも 14 日目にはプラトーに達することから黄色ブドウ球菌によるインプラント感染は 14 日目にはバイオフィルムの成熟を見ることが確認されていた。

## 2. 研究の目的

これまでバイオフィルムを破壊、除去するための殆どの研究は *in vitro* で行われてきたが、*in vitro* のバイオフィルムが細菌由来からのみ成り立つのに対して、*in vivo* のバイオフィルムは細菌と宿主の因子のハイブリッド構造となっている。インプラント感染は再置換術を要することが多いが、初期のインプラント感染は洗浄手術及び抗生物質点滴などインプラント温存が可能であることがある。本研究の目的は整形外科インプラント感染の初期治療のために、感染後どの時期までなら抗生物質によりバイオフィルム形成を阻害しインプラント温存の可能性があるかの検討と、バイオフィルム形成を阻害させる理想的な抗生物質の組み合わせの探究である。

## 3. 研究の方法

ステンレスインプラントを用いた、マウス脛骨骨髓炎モデルを用いて実験を行う。(下図)



化学療法の薬剤として整形外科術後感染によく使用されるセファゾリン (CEZ)、バンコマイシン (VCM)、およびバイオフィルム貫通効果があるとされるリファンピシン (RFP) などを単剤もしくは組み合わせて使用する。(CEZ, VCM, RFP, CEZ+RFP, VCM + RFP など)

- 1) 術前からの化学療法によりバイオフィルム形成を抑制できるかどうかを確認する。
- 2) 術後に化学療法を開始しどの段階での感染ならばバイオフィルム形成を阻害、もしくはバイオフィルムを破壊できるかを検討する。

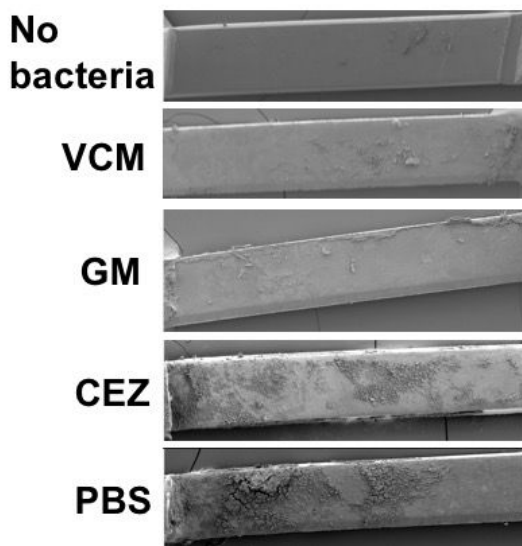
具体的な方法としてはバイオフィルムの定量は摘出したインプラントを走査電子顕微鏡で観察して行う。インプラントの上に  $0.5 \times 2 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$  の関心領域 (ROI) を設定する。ROI をデジタル画像上で二値化を行い、元々のステンレスインプラント表面よりも明るい部分及び暗い部分をバイオフィルムと定義する。バイオフィルム面積を ROI で除しそのインプラントの%バイオフィルム面積として定量する。

## 4. 研究成果

まずインプラント感染モデルを再現し in vivo バイオフィルムを再現することを行った。MSSA を用いて C57BL/6 マウスの脛骨骨髓炎モデルを作成した。自施設において走査電子顕微鏡撮影を行い、%バイオフィルムエリアの再現ができることを確認した。

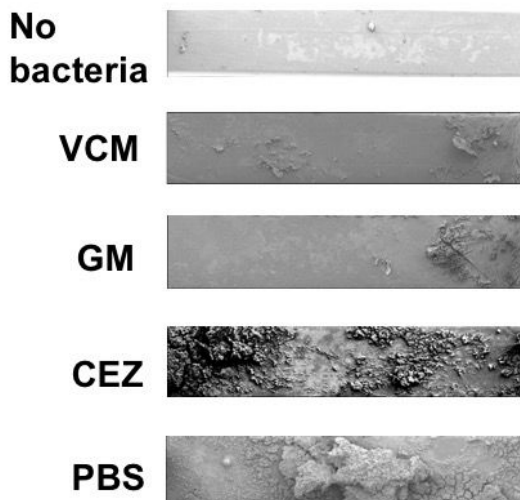
使用する黄色ブドウ球菌の検討を行った。SH1000 株の MIC は CEZ で明らかに低く、使用する薬剤濃度によりかなり差があったのに対して、骨髓炎より得られた株である UAMS-1 が CEZ、VCM、GM でほぼ同等の MIC を得られていたことから、実験には UAMS-1 株を使用することとした。

それにより抗菌薬の投与実験にうつった。術前からの投与では VCM と GM ではバイオフィルムは非常に少ないことが外観上からわかったが、CEZ 投与ではある程度のバイオフィルム形成が見られた(下図)。



全ての抗菌薬に感受性のある菌を用いたが、抗菌薬によりバイオフィルム形成に対する予防効果が異なる可能性が示唆された。

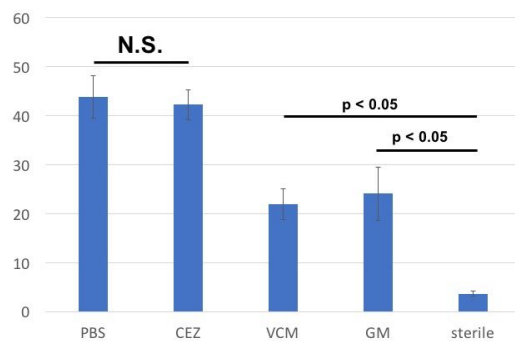
次に術後投与に検討を行った。



術後 1 日目からの投与においては VCM、GM では少量ではあるがバイオフィルムの形成を認めた。また、CEZ においては抗菌薬なしとほとんど変わらないバイオフィルムの形成を認めていた。

%バイオフィルム面積の定量を n=5 で行ったところ、CEZ と抗菌薬なし(PBS)では有意差がなく、CEZ の術後投与はバイオフィルム形成にはほぼ無効であることがわかった。また、VCM、GM 投与においても細菌なし(Sterile)よりも有意に多いバイオフィルム形成を認めていた。(次図)

術翌日からの投与によるバイオフィルム抑制効果。



術後 14 日目からの投与では何の抗菌薬も無効であり PBS 群と有意差のないバイオフィルム形成を認めていた。以上のことから単剤でのバイオフィルム治療には限界があり、多剤の組み合わせが必要であることが示唆されたため、今後多剤での検討を行っていく予定である。

#### 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 7 件)

Nishitani K, Ishikawa M, de Mesy Bentley KL, Ito H, Matsuda S, Daiss JL, Schwarz EM. Staphylococcus epidermidis caused chronic infection with making small quantity of biofilm without forming abscess or osteolysis in murine implant-associated osteomyelitis model. 25th Annual Meeting of the European Orthopaedic Research Society, Munich, Germany, September 13-15, 2017

西谷江平、石川正洋、伊藤宣、松田秀一、整形外科インプラント感染マウスモデルにおける In vivo バイオフィルムの定量法の開発と抗菌薬のバイオフィルムへの効果の検討、2017.6.15 第 40 回日

本骨・関節感染症学会 東京

Yokogawa N, Ishikawa M, Nishitani K, de Mesy Bentley KL, Smith B, Mesfin A, Kates SL, Daiss JL, Schwarz EM. Synergistic effects of combination antibiotic and immunotherapy demonstrated in a novel murine one-stage exchange model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* implant-associated osteomyelitis. 63th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Diego, CA, USA, Mar 18-22, 2017

de Mesy Bentley KL, Ninomiya M, Nishitani K, Daiss JL, Kates SL, Chung HL, McGrath JL, Schwarz EM. Quantifying *Staphylococcus aureus* motility through submicron pores via an in vitro nanoporous transwell system that mimics canaliculi colonization. 63th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Diego, CA, USA, Mar 18-22, 2017

西谷江平、伊藤宣、Edward M. Schwarz、松田秀一、マウス黄色ブドウ球菌感染モデルを用いた、インプラント上でのバイオフィーム成熟過程の定量的定性的評価 2016.10.14、第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡

西谷江平、伊藤宣、Edward M. Schwarz、松田秀一、インプラント感染マウスモデルにおいて黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌による感染形態の比較検討～なぜ表皮ブドウ球菌は慢性感染の原因となるのか、2016.10.14、第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡

西谷江平、伊藤宣、松田秀一、マウス黄色ブドウ球菌感染モデルを用いた、インプラント上でのバイオフィーム成熟過程の定量的定性的評価、2016.09.30 第127回、中部日本整形外科災害外科学会、松本

〔図書〕(計1件)

Nishitani K, de Mesy Bentley KL, Daiss JL. Implant-associated biofilm. Principles of Orthopedic Infection Management, 1st Edition. 2017 (pp 3-18). Edited by Kates SL, Davos, Switzerland, A0 publishing

6. 研究組織

(1)研究代表者

西谷 江平 (Nishitani, Kohei)

京都大学・医学研究科・特定助教  
研究者番号： 70782407

(2)研究協力者

富澤 琢也 (Tomizawa, Takuya)

森田 有吾 (Morita, Yugo)

斉藤 元央 (Saito, Motoo)