

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2023

課題番号：17K11547

研究課題名（和文）術後感染予防に向けた創傷の迅速細菌定量装置の開発

研究課題名（英文）Development of a bacteria counting device for the prevention of surgical site infection

研究代表者

佐藤 智也（Sato, Tomoya）

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10445132

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、創傷の細菌が肉芽組織に及ぼす影響を組織学的に検証することと、創傷の細菌量を迅速診断できる機器を開発することの2点である。まず創傷の細菌が肉芽組織に及ぼす影響についての解析を行った。褥瘡の病理組織を検査することにより、組織内の細菌量と細胞増殖の間に負の相関関係があることを示した。次に細菌量の迅速定量機器の開発を目指し研究を進めた。研究計画の段階で使用を予定していたDEPIM法が機器の製造中止により入手困難となったため、ウンドブロットング法による細菌の同定法を用いて研究を進めている。現在データを解析している段階である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、まず創傷の細菌量と肉芽形成の間に負の関係があることを示した。現在、褥瘡や下肢潰瘍などの難治性創傷（6週間以上治癒しない創傷）が本邦のみならず、世界中で患者の増加が問題となっている。創部の慢性感染が創傷治癒遅延の一因であることを明らかにしたことで、治療対象が明確となり、難治性創傷の治療成績向上に寄与できるものと考えられる。また患者のQOLを改善するだけでなく、治療期間の短縮により医療費の削減にも貢献できる。また現在進行中である創傷の細菌量の迅速測定機器が開発されれば、手術部位感染のリスクの高い創傷を事前に同定でき、手術成績の向上に寄与することができる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was twofold: to histologically examine the effects of wound bacteria on granulation tissue and to develop a tool for rapid diagnosis of wound bacterial levels. First, we analyzed the effect of wound bacteria on granulation tissue by studying the pathology of pressure ulcers. The results of the study suggested that there is a negative correlation between the amount of bacteria in the tissue and cell proliferation. We then proceeded with research aimed at developing a tool for rapid quantification of bacterial counts. Since the DEPIM method used in the research planning phase is no longer available due to the discontinuation of its production, we are now conducting research on a method for identifying bacteria using the wound-blotting method. We are currently analyzing the data.

研究分野：創傷治癒

キーワード：細菌感染 皮膚軟部組織感染症 手術部位感染 褥瘡 下肢潰瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

熱傷や褥瘡などの開放創を閉鎖する場合の感染率は高い。感染率を下げ、より確実性のある手術をすることは形成外科医にとって関心の的である。創傷治癒遅延の危険因子はいくつか報告されているが、創傷における細胞増殖の障害に關与する具体的な因子は不明である。栄養不良、肥満、糖尿病(DM)、喫煙は創傷治癒障害の原因としてよく知られている。実験的研究から、熱傷や切除創の治癒は、高齢のマウスでは若年成体マウスよりも時間がかかることが明らかになっている。小型哺乳類の動物モデルでは、高齢動物では若い動物の肉芽組織形成に比べ、肉芽組織形成が低下または遅延していた。最近の前向き研究では、65歳以上の高齢は創傷治癒期間の延長と有意に関連していることが示された。臨界コロニー形成または局所感染という概念が認識されるようになってきており、典型的な感染症の臨床的特徴がなくても、高い細菌負荷が創傷治癒を阻害することが示唆されている。近年、創傷が大量の細菌で汚染されていても臨床徴候に乏しく、見落としやすいことが明らかになっている。汚染されている創に対して手術を行うことで術後感染の危険性が高まる。このような汚染された状態を事前に発見することで術後感染率を下げられると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の二つである。

(1) 創傷の細菌が肉芽組織に及ぼす影響の組織学的検証

組織における細胞増殖マーカーとして用いられる Ki-67 タンパクを用いて、創傷の細菌量と細胞増殖の関係を評価する。Ki-67 は非ヒストン核タンパク質であり、抗体を用いて G1 期、S 期、G2 期、および有糸分裂期に存在する Ki-67 核抗原を検出することができる。この抗原は G0 期には存在しない。Ki-67 は、多種多様な正常および悪性ヒト組織における増殖分画の推定に優れており 13, 14、Ki-67 免疫組織化学は、創傷治癒の研究だけでなく、ケラチノサイト 15-17 や肉芽組織における細胞増殖の評価にも広く用いられている。この Ki-67 を用い、細菌が増えている創で細胞増殖が抑制されているかを検証する。

(2) 創傷の細菌量を迅速診断できる機器の開発

創傷の細菌量を術前に迅速診断できる機器を開発し、将来的には術後感染のリスクの高い患者を同定するのに応用することを目指す。実用性を考慮し、測定に要する時間は5分以内とし、測定コストが安価な方法を想定する。

3. 研究の方法

(1) 創傷の細菌が肉芽組織に及ぼす影響の組織学的検証

創傷の細菌が肉芽組織に及ぼす影響について病理組織学的所見を用いて検討した。細菌の少ない創と多い創の組織を採取し、その組織学的所見を比較した。

具体的な手順は下記の通りである。肉眼的に感染や Critical colonization を疑う臨床所見のない褥瘡で、皮弁手術の適応となった患者を対象とした。事前に書面で同意を得た。まず全身麻酔後に創部を生理食塩水で洗浄した。その後 4mm パンチで肉芽組織を 2 検体採取した。1 つは定量培養に用い、もう一つは組織学的評価に用いた。検体の質量を無菌的に計測し、1ml の生理食塩

水を加えテンブロック型ホモジナイザーで処理した。液状になった検体を定量白金耳で細菌培養用の培地に播種する。組織の細菌量 (CFU/g) は以下の計算式で算出した。

細菌量(CFU/g) = (培地上の細菌コロニー数) × 100 × (検体の質量 + 1.0) / 検体の質量

さらに肉芽組織上の細胞増殖を、全細胞中の Ki-67 陽性率(Ki-67 index)を定量して細胞増殖の速度を定量した。

Ki67 陽性率と患者背景 (年齢、性別、BMI、基礎疾患) 血液データ (ヘモグロビン、アルブミン、白血球数、CRP) 組織中の細菌量との関係をそれぞれ統計学的に比較した。

連続変数は平均値 ± 標準偏差、カテゴリー変数は数および百分率で表した。ピアソンの積率相関係数 (r) を用いて Ki-67 index と、年齢、肥満度、細菌数、血清アルブミン値、ヘモグロビン値、白血球数、CRP 値などの他の定量的評価値との関係を評価した。マン・ホイットニーの U 検定を用いて、Ki-67 index の平均値に関して、異なる関心要素 (例えば、性別、糖尿病、喫煙状態、創傷培養) の存在によって定義される 2 つのグループが統計的に異なるかどうかを評価した。

統計の方法としては、まず単変量線形回帰を用いて、Ki-67 index (従属変数) と、性別、喫煙歴、糖尿病、年齢、肥満度、細菌数、血清アルブミン値、ヘモグロビン値、白血球数、CRP 値などの他のパラメータとの関連を評価した。その後、潜在的に関連する変数の過大評価を避けるために重回帰分析を行った。5 人以上の患者で検出された細菌種については、Ki-67 index と各細菌種との関係を明らかにするために単変量および重回帰分析を行った。Ki-67 index に対する予測変数の効果に対応する各有意因子について、標準化 係数と 95%信頼区間 (95%CI) を求めた。有意閾値は 0.05 とした。すべての統計解析は SPSS version 22 (IBM Corp.) にて行った。

(2) 創傷の細菌量を迅速診断できる機器の開発

研究開始当初は DEPIM 法を応用した細菌量の迅速診断機器の開発に着手した。DEPIM 法とは電極のインピーダンス変化を測定し、細菌量を推測する方法である。測定法は、まず創傷面を綿棒で拭い、その綿棒を溶媒に浸漬して細菌を溶媒に移行させる。その後、溶媒に誘電泳動を行い、インピーダンスの変化を測定する。この方法で創傷の細菌量をインピーダンスから推測できるかを検証した。

細菌混濁液での結果が創傷でも適応できるかを検証する。Levine らの方法により 1 × 1 cm の範囲を培養用の綿棒でぬぐい細菌を採取した。(Levine NS, et al. J Trauma. 1976 ;16(2):89-94.)。DEPIM 法を用いて細菌によるインピーダンスの変化を計測した。

横軸に細菌量、縦軸にインピーダンスをとり散布図を作成する。両者の値について単回帰分析を行い、インピーダンスから細菌量を推定する回帰式を求めた。

4 . 研究成果

(1) 創傷の細菌が肉芽組織に及ぼす影響の組織学的検証

単変量線形回帰分析により、細菌数は Ki-67 指数の有意な予測因子であることが示された。未調整の 係数は -1.02 (95%信頼区間、-1.66 ~ -0.37、p = 0.002) であった。他の因子は Ki-67 指標と関連していなかった。多変量解析の結果、細菌数は独立した予測値を維持した (表)。細菌数が多いほど Ki-67 index が低いことと有意に関連していた。調整 係数は -1.34 (95%信頼区間、-2.01 ~ -0.66、p < 0.001) であった。

Variable	Coefficient	Standard error	95% CI	p-Value
Intercept	11.7	9.14		
Age	-0.37	0.05	-0.14 to 0.06	0.46
Gender	1.44	0.22	-2.04 to 4.93	0.41
Body mass index	-0.19	0.22	-0.63 to 0.25	0.39
Diabetes	1.50	1.89	-2.26 to 5.27	0.43
Current smoking	-0.92	1.79	-4.49 to 2.64	0.61
Bacterial count (Log ₁₀ CFU/g)	-1.34	0.34	-2.01 to -0.66	<0.001
Serum albumin, g/dL	2.36	2.21	-2.04 to 6.77	0.29
Hemoglobin, g/dL	-0.77	0.40	-1.56 to 0.03	0.06
WBC count, ×10 ³ /μL	0.01	0.00	0.00 to 0.02	0.06
CRP, mg/dL	-0.32	0.29	-0.91 to 0.26	0.28

WBC, white blood cell; CRP, C-reactive protein

また細菌種ごとに比較すると黄色ブドウ球菌、コリネバクテリウム属の細菌量と Ki67 陽性率の間に負の相関があった。

(2) 創傷の細菌量を迅速診断できる機器の開発

研究開始当初は DEPIM 法を用いて定量することを試みた。まず創傷の細菌量とインピーダンスとの間に相関がみられるかを検証した。綿棒での検体の採取法については Levine の方法と DEPIM 法の検体と同じ方法で採取をした。しかし DEPIM 法の方では創傷部位の滲出液の量や出血により結果がばらついてしまい、データの再現性を確保するのが困難であった。結果のばらつきを減らすため、検体を採取する部位を事前に一定量の生食で洗浄する、表面を清浄剤で清拭するなどの方法を試みたが誤差を減らすことは困難であった。また研究期間中に DEPIM 法の機器が製造中止となってしまったためこの方法は断念した。そこで代替の方法を検討した。まず生体蛍光イメージングによる創傷表面の細菌量の同定 (MY Rennie, et al. Journal of Wound Care 26 (8), 452-460) を用いることを検討した。しかし生体蛍光イメージングの機器が高額であり予算を超えるため断念した。より低コストな方法としてウンドプロットング法による細菌の同定を試みた。具体的には、細菌が生成するタンパク質をニトロセルロース膜を用いて創傷表面から採取し、ルテニウムレッドで染色し定量する方法 (Nakagami G. et al. Int Wound J. 2020) を用いた。本研究機関終了の時点では染色の状態により細菌量を推測することの妥当性を検討しており、データを解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomoya Sato	4. 巻 14
2. 論文標題 Interventions for Co-occurring Cannabis Use and Depression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e27632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.27632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hirokawa E, Sato T, Fujino T, Gotoh Y, Yokogawa H, Ichioka S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Hydrosurgical debridement as an approach to wound healing: an animal thermal burn model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Wound Care.	6. 最初と最後の頁 304-311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12968/jowc.	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 Sato Tomoya, Arai Kiyohito, Ichioka Shigeru	4. 巻 5
2. 論文標題 Hyperbaric oxygen therapy for digital ulcers due to Raynaud's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Plastic Surgery and Hand Surgery	6. 最初と最後の頁 72 ~ 74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23320885.2018.1525684	査読の有無 無
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 Sato Tomoya, Abe Takahiro, Ichioka Shigeru	4. 巻 26
2. 論文標題 Factors impairing cell proliferation in the granulation tissue of pressure ulcers: Impact of bacterial burden	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Wound Repair and Regeneration	6. 最初と最後の頁 284 ~ 292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/wrr.12675	査読の有無 無
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 Sato T, Ichioka S	4. 巻 4
2. 論文標題 Microsurgical replantation of an amputated ear.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acute Med Surg.	6. 最初と最後の頁 373-374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ams2.274.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato T, Yana Y, Ichioka S	4. 巻 51
2. 論文標題 Free flap reconstruction for diabetic foot limb salvage.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Plast Surg Hand Surg.	6. 最初と最後の頁 399-404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2000656X.2017.1285782.	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tomoya Sato, Takahiro Abe, Shigeru Ichioka
2. 発表標題 High bacterial load impairs cell proliferation in the granulation tissue of pressure ulcers.
3. 学会等名 The American Professional Wound Care Association Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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