

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700460

研究課題名(和文)光触媒と超音波を用いた異物に起因する感染症の撲滅

研究課題名(英文)Prevention of implant related infection using titanium dioxide photocatalyst and ultrasound

研究代表者

吉田 隆司 (Yoshida, Takashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10546641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは骨折治療に用いる鋼線を光触媒処理し、紫外線照射による感染予防効果を確認し、すでに臨床応用している。しかし、生体内人工物には紫外線が到達しないため、侵入できる超音波を用いて光触媒を励起させ、殺菌やバイオフィルムの分解を行う手法を考案し、これを早期の感染症対策に応用することを目的とした。in vivo実験と動物実験では、熱による有害作用を生じずに、効果の生じる至適超音波強度を決定することは困難であった。一方、光触媒酸化チタンピンを用いての臨床における研究も施行した。創外固定治療時のピン刺入部の細菌感染予防効果は特に重症の感染の予防に効果があることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We found the anti-infectious effect of ultraviolet using titanium dioxide photocatalyst and apply it in the bedside. However, implant inside the body does not receive ultraviolet. Ultrasound can invade inside the body and can excite photocatalytic effect. The purpose of this study was to make the method of disinfection and decomposing biofilm using photocatalyst excited by ultrasound and to apply it in preventing early stage infection. It was difficult to settle the appropriate ultrasound strength without harmful effect. We researched clinical effect of titanium dioxide photocatalyst. We demonstrated that titanium dioxide photocatalyst prevent severe pin tract infection among the treatment using external fixation.

研究分野：小児整形外科

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：光触媒 細菌感染 超音波

1. 研究開始当初の背景

医療の進歩によりインプラントなど人工物・内固定材料を用いた治療は今日不可欠であり、特に整形外科領域では、骨折治療用の内固定材料、関節を置換する人工関節、脊柱体幹を矯正する脊椎固定・後方インストルメンテーションなど発展が著しい。一方で、人工物の挿入後には感染症の発症頻度が増加し、この異物に起因した感染症(implant related infection)は、発症すれば治療に難渋する。

感染症の治療は現在のところ初期治療として抗生物質などの薬剤を用いるのが一般的である。骨・関節感染症の治療は薬剤による化学療法で効果が得られなければ、異物や壊死組織を切除するデブリドマン処置など、外科的ドレナージが行われる。しかし、異物に起因した感染症の根治には多数回の処置や手術を必要とすることが多い。その理由として、異物表面にバイオフィームが形成されるため薬剤の効果が得られにくく、多数回の手術で改善できなければ、根治のためにインプラントの抜去を余儀なくされる。しかし、これまでの感染症治療研究の方向性としては、薬剤を効率的に局所に届けるか、さらに強力な薬剤の開発に重点が置かれてきた。MRSAをはじめとする多剤耐性菌が問題となっているものの未だ革新的な治療法や予防法はない。薬剤による治療アプローチはより強い耐性菌の発生を誘導するため限界が来ると考えられ、感染予防効果を持つ医療材料の作成は急務である。現在までに異物に起因した感染症に関する研究では金属に抗生物質を担持させる試み(Parvizi, Clin Orthop Relat Res, 2004)がなされているが、耐性菌の発生や全身性の副作用の問題が払拭できない。

光触媒は、日本の藤嶋による発見により本邦が研究と応用においても世界で最も進んでいるが、医療への応用は実用化レベルではなく医学・工学・化学が連携して研究を進める必要がある。近年触媒機能の強化など産業界での応用は実用化レベルに達している。しかし光触媒の医療応用は未開拓の分野であり、臨床に広く応用されているものは現在まで限られている。

骨折治療としての経皮鋼線固定や創外固定術では、体表面に露出した金属刺入部の感染率が高いが、これに対しわれわれは刺入する材料を光触媒に置き換え感染予防効果を確認し(Oka, J Biomed Mater Res B, 2008)、臨床応用に成功した。さらに研究を進展させ光が当たらない深部への適用として、生体深部まで達する超音波の応用に着眼した。近年光触媒の励起に超音波を用い分解反応を確認した報告が注目されている(Pandit, Ultrasonics Sonochemistry, 2001. Mahmoud, Biochem Engine J, 2005)。このように、異物に起因した感染症治療に、光触媒効果を付加した内固定材料に超音波刺激

を応用した技術を導入することを考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 生体内人工物には紫外線が到達しないため、侵入できる超音波を行って光触媒を励起させ、殺菌やバイオフィームの分解を行う手法を考案し、これを早期の感染症対策に活用することを目的とした。

(2) われわれは基礎研究において、酸化チタン光触媒ピンを用いることで、ピン刺入部の細菌のコロニー数が有意に減少することを報告した。しかし、臨床での有用性はまだ明らかではない。酸化チタン光触媒ピンの臨床における感染予防効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)

光触媒と超音波による殺菌効果(in vitro) 菌数測定フィルム密着法(JIS Z2801, ISO2196)を改変した試験法を用いる。材料: 酸化チタン光触媒プレート, 純チタンプレート(対照)

試験方法(N=20): 菌種... グラム陽性球菌の代表として MRSA(ACTT43300), 黄色ブドウ球菌(Seattle1945), グラム陰性桿菌の代表として緑膿菌(ACTT27853)を用いる。普通ブイヨン入りの試験管に入れ、指数関数的増殖期まで 37℃, 24 時間増殖させる。菌液を希釈して調整し, 1×10^5 CFU/ml とする。

材料: 1cm 角の酸化チタン光触媒プレート, 対照として純チタンプレートを準備する。LDPE(Low density polyethylene)フィルム上にのせた金属に菌液をそれぞれ滴下し試験中の乾燥を防ぐため再度フィルムを被せ、金属片にシャーレ底面から超音波刺激する。一定時間終了後金属片を清潔操作で取り出し、滅菌生理食塩水で洗いだした菌液を採取する。また洗いだし後の金属片も採取し蛍光顕微鏡で観察する。

評価: 10 倍希釈系を用いた洗い出し菌液から BHI 培地を用いて 37℃, 24 時間培養し、コロニーカウントによる菌数定量

Live/Dead® bacterial viability assay により蛍光顕微鏡で金属片の残存細菌の検討 crystal violet 染色による金属表面のバイオフィームの占拠率

この実験系について 菌種による効果の差異 至適超音波刺激強度 至適刺激時間を検討し、超音波刺激による細菌の分解、殺菌に最適な条件を確定する。

光触媒と超音波のバイオフィーム分解効果(in vitro)

菌数測定フィルム密着法(JIS Z2801, ISO2196)による試験法をもとに、適宜改変して用いる。

材料: 酸化チタン光触媒プレート, 純チ

タンプレート(対照)

試験方法(N=20):菌種は前述したとおり 3 種の細菌とバイオフィーム形成株を用いる。普通ブイヨン入りの試験管に入れ、37℃、24 時間増殖させる。菌液を調整し 1×10⁵ CFU/ml とする。

比較材料は前述したものと同じものを準備しておく。液体培地(TSB)の入った試験管内に試料金属を入れ、37℃で一定期間培養し、Biofilm の付着した金属片を採取する。これに試験中の乾燥を防ぐため LDPE で挟み、金属片をシャーレ底面から超音波刺激する。一定時間終了後金属片を清潔操作で取り出し、滅菌生理食塩水で洗浄し、洗いだした菌液を採取する。洗浄後の金属も観察する。

評価: 10 倍希釈を用いた洗い出し菌液からの BHI 培地における菌数定量 Live/Dead® bacterial viability assay により蛍光顕微鏡で金属片の残存細菌の検討

crystal violet 染色による金属表面のバイオフィームの占拠率

この実験系について バイオフィーム形成のための至適培養日数(1-7 日) 超音波刺激強度 刺激時間を検討し、超音波刺激によるバイオフィームの分解に最適な照射条件を確定する。

(2)2007 年 7 月から 2013 年 7 月の間にリング型創外固定器を用いて下腿の変形矯正・延長治療を行った 16 例 16 肢を対象とした。光触媒酸化チタンピン使用群(光触媒群)が 9 例(男性 7 例,女性 2 例),光触媒酸化チタンピン非使用群(コントロール群)が 7 例(男性 5 例,女性 2 例)であった。ピン刺入部は光触媒群で 134 カ所,コントロール群で 93 カ所であった。手術時年齢は光触媒群で平均 10.3 歳(4 歳 3 カ月~18 歳 10 カ月),コントロール群で平均 23.8 歳(12 歳 4 カ月~77 歳 8 カ月)であった。疾患は光触媒群で先天性下腿偽関節症 4 例,Ollier 病 1 例,骨端線早期閉鎖 1 例,外傷後足関節拘縮 1 例,腓骨列形成不全 1 例,大腿動脈閉鎖後成長障害 1 例であった。コントロール群では Russel-Silver 症候群 2 例,Ollier 病 1 例,骨端線早期閉鎖 1 例,麻痺性尖足 1 例,ペルテス病後下肢短縮 1 例,先天性下腿偽関節症 1 例であった。創外固定器は光触媒群でイリザロフ創外固定器が 8 例,Taylor Spatial Frame®(TSF)が 1 例,コントロール群でイリザロフ創外固定器が 4 例,TSF が 3 例であった。ピン刺入部に紫外線が到達するように創外固定器を覆わずに露出するように指示をした。刺入部の評価方法は,Dahl の分類を当科で改変した方法に則り,Grade を 0 から 4 に分類した。Grade0:汚染なしあるいは漿液性滲出液,Grade1:疼痛のみ,Grade2:発赤,腫脹を伴う,Grade3:膿性滲出液を伴う,Grade4:蜂窩織炎あるいは X 線学的骨融解像とした。Grade2 以上を明らかな感染とし,抗

生剤による薬物療法開始の指標とした。抗生剤による薬物療法では,まず経口投与を行い,効果が不良であれば経静脈的投与へ変更した。さらに効果が不良の場合はピン抜去を行うこととした。結果はカルテ記載を元に後ろ向きに評価した。

創外固定器装着期間,ピン刺入部感染数,抗生剤経静脈的投与症例数,および光触媒ピンの生体への有害事象の有無につき検討した。また,抜釘時に採取したワイヤーの刺入部内外側それぞれ 1cm の部分を清潔操作の下に切除し,その部分における付着細菌を 3 日間培養した。その後コロニー数をカウントし,非光触媒群と光触媒群の 2 群間で比較検討した。

4. 研究成果

創外固定器装着期間は,光触媒群で 283±106 日間,コントロール群で 154±61.5 日間であり,光触媒群が有意に長期間装着していた(p<0.05)。ピン刺入部感染数は,光触媒群の内,Grade2 が 19 カ所(14.2%),Grade3 が 2 カ所(1.49%),Grade4 が 0 カ所であった。一方,コントロール群の内,Grade2 が 10 カ所(10.8%),Grade3 が 2 カ所(2.15%),Grade4 が 0 カ所であった(表 1)。

表 1

ピン刺入部感染数

Grade	光触媒群 (134カ所)	コントロール群 (93カ所)
2	19カ所 (14.2%)	10カ所 (10.8%)
3	2カ所 (1.5%)	2カ所 (2.2%)
4	0カ所 (0%)	0カ所 (0%)

Grade2 と Grade3 において両群間での統計学的有意差はなかった。抗生剤経静脈的投与症例数は,光触媒群で 3 例(33.3%),コントロール群で 4 例(57.1%)であった(表 2)。両群間での統計学的有意差はなかった。光触媒ピン使用による生体に及ぼす有害事象は認めなかった。

表 2

抗生剤経静脈的投与症例数

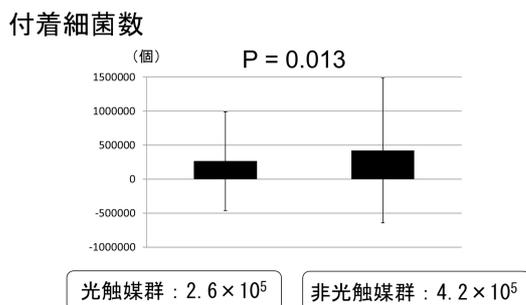
	光触媒群 (9例)	コントロール群 (7例)
経静脈的投与(+)	3例 (33.3%)	4例 (57.1%)
経静脈的投与(-)	6例 (66.6%)	3例 (42.9%)

光触媒ピンの生体に及ぼす有害事象:なし

コロニー数は、非光触媒群で 4.2×10^5 (個)、光触媒群で 2.6×10^5 (個) であり有意差を認められた ($P=0.013$) (図 1)。

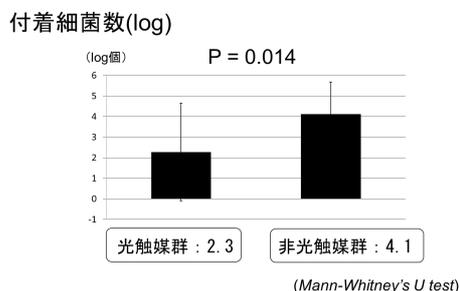
究院)・助教
研究者番号：10546641

図 1



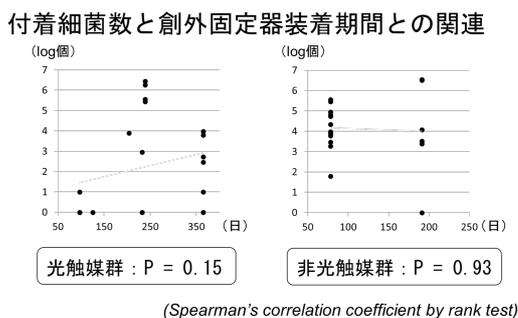
常用対数では、非光触媒群で 4.1 (log 個)、光触媒群で 2.3 (log 個) であり有意差を認められた ($P=0.014$) (図 2)。

図 2



付着細菌数と創外固定器装着期間との関連については、2 群ともに有意差はなく、装着期間との関連はなかった (図 3)。

図 3



5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

中瀬 雅司 酸化チタン光触媒を利用した創外固定ピン感染の予防効果 第 27 回 日本創外固定・骨延長学会 平成 26 年 3 月 8 日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 隆司 (YOSHIDA, Takashi)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研