

## 学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	越湖 進
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Limitations in the use of rifampicin-gelatin grafts against virulent organisms (細菌感染に対するリファンピシン結合ゼラチン被覆人工血管の適用制限)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>笹嶋 唯博、村木 専一、東 信良、山崎 弘資 千葉 薫、橘 峰司、稲葉 雅史</p> <p>Journal of Vascular Surgery 掲載予定</p> <p>研 究 目 的</p> <p>人工血管とその応用の進歩は、手術術式の変革と治療成績の飛躍的な向上をもたらした。しかし、人工血管移植後の最大の合併症として細菌感染があり、一度感染が成立すると、感染人工血管を摘出しない限り治癒は得られず、高い死亡率や四肢切断率が報告されている。そこで人工血管の抗菌性を高めて感染を防止するため、さまざまな抗菌剤を付与させる試みがなされてきた<sup>1)</sup>。その中で抗結核薬のリファンピシンは強力な殺菌作用と広い抗菌スペクトラムを有し、その溶液はゼラチンとイオン結合して化学的に安定するという特性がある。これを利用して、リファンピシン結合ゼラチン被覆人工血管 (rifampicin-gelatin graft) が作成され、その抗感染性が諸家により報告され、特に Coagulase negative Staphylococcus に対する有効性が示唆されたが<sup>1)</sup>、臨床的に問題となっている E. coli や MRSA 等の強毒菌に対しての臨床応用の可能性に関する研究報告はみられない。そこで本研究では、临床上主要な人工血管感染起因菌に対する rifampicin-gelatin graft の抗感染性の有効性・持続期間について、in vitro 及び動物感染実験を行って明らかにした。</p>			

## 材料・方法

### 1. 滅菌リファンピシン溶液及び rifampicin-gelatin graft の作成

自家調整により溶液濃度 1mg/mL、浸透圧 270 mOsm、pH 7.40 の滅菌リファンピシン溶液を作成した。これにゼラチン被覆ポリエステル人工血管 (Gelseal®) を室温で 30 分間浸漬し、rifampicin-gelatin graft を得た。

### 2. 細菌溶液の調整

本実験に用いる細菌は、いずれも早期発育型の菌種で、なおかつ臨床的に問題となる *Staphylococcus epidermidis*、MRSA、*E. coli* の 3 種類とした。前 2 者は臨床分離株、後者は American Type Culture Collection No.25922 とした。各々の細菌溶液は colorimeter (ATB 1500, VITEK SYSTEMS Co., Japan) を用い、NaCl 0.85% 溶液を溶媒とし、菌液濃度  $1 \times 10^8$  / mL に調整した。

### 3. rifampicin-gelatin graft の in vitro における細菌感受性試験

あらかじめ 3 種類の細菌溶液を塗抹した感受性培地に、直径 6 mm の円形ディスクに切り出した rifampicin-gelatin graft を各々 4 枚ずつ接置し、ディスクの周囲に完成する初期感染阻止円の直径を計測し、平均値を算出した。Susceptible の判定は阻止円の直径が、*Staphylococcus* 群では 35 mm 以上、*E. coli* では 11 mm 以上と規定した。この細菌学的手法は National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) に準拠した。

### 4. イヌ埋め込み実験による rifampicin-gelatin graft の抗感染性の評価

28 頭の雑種成犬を用いた。気管内挿管、全身麻酔下に開腹し、そのうち 24 頭は直径 6 mm、6 cm 長の rifampicin-gelatin graft で腎動脈下腹部大動脈を置換した。4 頭はコントロールとして Gelseal® で置換した。rifampicin-gelatin graft で置換した 24 頭のうち 16 頭は、菌液濃度  $1 \times 10^8$  / mL の *Staphylococcus epidermidis* 溶液 2 mL をグラフトに接種し閉腹、1、2、3、4 週後に犠牲死させ、移植グラフトを摘出した。同時に開腹所見の観察、グラフト周囲貯留液培養、動脈血培養を施行、さらに in vitro での検討と同様に摘出グラフトを直径 6 mm の円形ディスクに切り出し、あらかじめ *Staphylococcus epidermidis* を塗抹した感受性培地に接置して阻止円形成の有無を観察した。残ったグラフトは 10%ホルマリン溶液で固定後、短軸切片でパラフィン包埋し、H-E 染色と EVG 染色を施し、顕像で観察した。また 8 頭のうち 4 頭には MRSA 溶液を、さらに 4 頭には *E. coli* 溶液を接種し、1 週後にグラフトを摘出、同様な検討を行った。コントロールとして用いた 4 頭は、1 週後に犠牲死させ、グラフトを摘出し、同様な検討を行った。

## 結 果

### 1. rifampicin-gelatin graft の in vitro における感受性試験

rifampicin-gelatin graft の *Staphylococcus epidermidis*、MRSA、*E. coli* に対する初期感染阻止円の直径は各々、 $40.0 \pm 0.3$  mm、 $36.0 \pm 0.2$  mm、 $11.8 \pm 0.1$  mmであり、いずれも Susceptible と判定された。しかし MRSA では3日後に阻止円内に耐性菌が出現した。

### 2. イヌ腹部大動脈移植実験

*Staphylococcus epidermidis* を接種した16頭ではいずれも人工血管に感染をきたしておらず、グラフト周囲貯留液培養でも細菌は検出されなかった。摘出グラフトの感受性試験では、初期感染阻止円の直径は、1週後摘出 rifampicin-gelatin graft で  $20.1 \pm 1.1$  mm、2週後摘出 rifampicin-gelatin graft で  $7.6 \pm 1.0$  mmで、3、4週後摘出 rifampicin-gelatin graft では阻止円は形成されなかった。顕像でも感染の所見はなく、移植後2~4週で良好な治癒が得られることが示された。これに対しコントロールの4頭ではグラフト周囲貯留液培養で *Staphylococcus epidermidis* が検出され、顕像でも著明な好中球の浸潤を認めた。

一方 MRSA、*E. coli* を接種した8頭はいずれもグラフト周囲膿瘍を形成し、グラフト周囲貯留液培養で各々接種した細菌が検出された。また顕像でも著明な好中球の浸潤を認めた。*Staphylococcus epidermidis* に対する感受性試験では、初期感染阻止円の直径は、MRSA を接種した rifampicin-gelatin graft で  $18.5 \pm 0.5$  mm、*E. coli* を接種した rifampicin-gelatin graft で  $8.0 \pm 0.2$  mmであった。

## 考 察

臨床的な抗菌性人工血管の使用目的は、感染予防のための使用と、感染性大動脈瘤や成立したグラフト感染の治療目的での使用の2つがある。このうちグラフト感染に対する治療は、従来より感染グラフトの摘出と非解剖学的バイパスによる再建術が行われていたが、近年抗感染性生体材料として homograft などによる生理的経路での再建術も検討されている<sup>2)</sup>。rifampicin-gelatin graft はその利便性の面から、homograft と対極をなす人工材料であるといえる。

リファンピシンとゼラチンの結合は、リファンピシン粒子の正の電荷とゼラチン粒子の負の電荷によるイオン結合であるとされる<sup>1)</sup>。一方 Gelseal®の被覆ゼラチンはこれまでの実験的検討で、移植後7~10日で溶出することが知られている。したがって、本実験では rifampicin-gelatin graft は2週までの抗菌性を有することが示されたが、これはリファンピシンの失活よりもむしろゼラチンの溶出によるものと推察された。

リファンピシンはすぐれた抗結核薬として用いられるが、他にも広い抗菌スペクトラムを有することが知られており、その作用は殺菌的である。この知見にもとづき、本実験では biofilm 感染でしばしば臨床的に問題となっている *Staphylococcus epidermidis*<sup>3)</sup> に加え、*E.coli*、MRSA を対象として選択した。後 2 者はグラフト感染の起因菌として高率かつ難治であるにも拘わらず、これまでこれらに対して rifampicin-gelatin graft の抗菌性の研究はなされていない。本研究では *E. coli* と MRSA に対する rifampicin-gelatin graft の有効性は認められず、したがってこれらにより成立した人工血管感染の治療として rifampicin-gelatin graft を用いた再建は無効と結論された。また rifampicin-gelatin graft に対する MRSA の挙動として、*in vitro* での感受性試験及び動物移植実験において耐性菌の早期出現があり、最初から MIC が大きい *E.coli* とは様相を異にした。

#### 結 論

rifampicin-gelatin graft は *Staphylococcus epidermidis* 感染に対しては明らかに有効であったが、*E. coli* と MRSA 感染に対しては有効性を認めなかった。rifampicin-gelatin graft は血管外科領域において、このような菌が同定された場合は適用すべきでない。

#### 引用文献

- 1) Brissonniere OG, Leport C, Bacourt F, Lebrault C, Comte R, Pechre JC. Prevention of Vascular Graft Infection by Rifampin Bonding to a Gelatin-Sealed Dacron Graft. *Ann Vasc Surg* 1991 ; 5 : 408-412.
- 2) Litzler PY, Thomas P, Danielou E, Lucq J, Jacques B, Frebourg N, et al. Bacterial resistance of refrigerated and cryopreserved aortic allografts in an experimental virulent infection model. *J Vasc Surg* 1999 ; 29 : 1090-1096.
- 3) Towne JB, Seabrook GR, Bandyk DF, Freischlag JA, Edmiston CE. In situ replacement of arterial prosthesis infected by bacterial biofilms : Long-term follow-up. *J Vasc Surg* 1994 ; 19 : 226-235.

#### 参考文献

- 1) 笹島唯博, 稲葉雅史, 東信良, 越湖進, 久保良彦. 被覆人工血管の具備すべき条件 : ゼラチンコート織布人工血管 CL-301 の基礎的検討. *日胸外会誌* 1995 ; 43 :1639-1645.
- 2) T. Sasajima, M. Inaba, N. Azuma, K. Goh, S. Koshiko, Y. Kubo, et al. Myristoyl Gelatin as a Sealant for Dacron Vascular Prostheses. *Artificial Organs* 1997 ; 21 : 287-292.
- 3) 平田哲, 笹嶋唯博, 郷一知, 越湖進, 八柳英治, 山崎弘資, 久保良彦, 千葉薫. Rifampicin-bonded Gelatin-sealed Dacron 人工血管を用いた T4 肺癌に対する大動脈合併切除術. 1998 ; 12 :778-782.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	越湖 進
審査委員長 伊藤喜久 ㊦  審査委員 石川睦男 ㊦  審査委員 笹嶋唯博 ㊦			
学 位 論 文 題 目  <b>Limitations in the use of rifampicin-gelatin grafts against virulent organisms</b> (細菌感染に対するリファンピシン結合ゼラチン被覆人工血管の適用制限)			
本論文はrifampicin結合ゼラチン被覆人工血管の抗菌作用、およびその持続性を、in vitroおよびin vivoに検索した研究である。 抗結核剤であるrifampicinは術後感染症の起炎菌であるstaphylococcus epidermis, E Coli, Methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA)に対し、強い殺菌作用を有する。このrifampicinにはゼラチンとイオン結合性を有することから、ポリエステル人工血管にrifampicin結合ゼラチンを被覆したrifampicin-gelatin graft (RGG)の利用は、高い抗菌性の付与が期待される。本研究では、このRGGに上記3種の起炎菌を接種してイヌの腹部大動脈に埋め込み、その抗菌機能を経時的に観察し、細菌学的、病理組織学的に評価、検討を行った。 In vitroにおけるRGGの細菌感受性試験では、いずれに対してもsusceptibleと判定された。しかし、MRSA接種グラフトでは3日目に、高度耐性菌株の出現が見られた。			

雑種成犬28頭を用いたRGG埋め込み実験では、staphylococcus epidermis 接種血管には、いずれの摘出時にも局所感染所見はなく、血管周囲貯留液培養も陰性であった。また炎症細胞の浸潤は認められなかった。摘出RGGの感受性試験では、第2週まで阻止円が存在し抗菌能が維持されていることが示された。

これに対して、MRSA、E Coliでは、いずれも人工血管周囲膿瘍が形成され、培養でコロニーの著明な発育が見られ、高度の好中球の浸潤が認められた。RGGによる阻止円は消失し抗菌作用は失われ、人工血管感染の成立が示された。

以上の結果から、rifampicin結合ゼラチン被覆人工血管はstaphylococcus epidermisに対しては植え込み2週間までは抗菌性を発揮したが、MRSA、大腸菌に対しては無効であり、これらの病原菌による人工血管感染への臨床利用は困難であるとの結果を得た。

これまで、MRSA、E Coliの強毒菌に対しては rifampicin結合ゼラチン被覆人工血管の研究は行われておらず、本研究において初めてこの臨床適応を明確化し、抗細菌人工血管の開発に新たな道を開いた臨床的価値は、高く評価される。今後、更に、局所の感染を制御、抑制する人工血管の開発を期待したい。

発表後、研究解析法、解釈、また関連領域について質疑を行い、適切かつ明快な回答が得られ、本学の博士を授与するにふさわしい知識、技能を有すると考え、全員一致で合格とした。

なお本研究はJournal of Vascular Surgery 35巻に掲載予定である。