

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

学位番号乙第 2674 号

学位申請者 : 佐 々 木 雄 毅

学位審査論文 : The in vitro research of bacterial invasion of prosthetic vascular grafts: Comparison of elastomer-sealed and gelatin-coated Dacron vascular grafts

(人工血管への細菌進入に関する研究 : エラストマーシールドダクロンとゼラチンコーティングダクロンの比較)

著 者 : Yuki Sasaki

公 表 誌 : Surgery Today 44 (8) : 1542-1547, 2014

論文内容の要旨 :

(Introduction)

人工血管感染は難治性で致死的な合併症である。細菌感染に関する人工血管側の因子は、細菌の外側から内側への通過と人工血管への付着で決定されると考えられる。人工血管への付着に関する論文はしばしば散見されるが人工血管への細菌の通過に関する文献はほとんどない。本実験では人工血管感染モデルを作成し人工血管外側から内側へ侵入する細菌の量と時間の関係を調査した。さらに人工血管断面の電子顕微鏡所見を観察した。

(Methods)

Study1: 細菌の侵入量と時間の関係

人工血管素材として日本でのみ販売されている新しい人工血管で低い通過性が特徴のエラストマーシールドダクロングラフト (ESDVG) と従来から使用されているゼラチンコーティングダクロングラフト (GCDVG) を選択しデータを比較した。細菌は緑膿菌を選択し、約  $1.0 \times 10^8$  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 9 つのタイムポイント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測定した。ESDVG で 18 モデル、GCDVG で 12 モデル作成した。

両群間の各時間帯での細菌数の比較には Mann-Whitney U-test を人工血管内側に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。

Study2: 電子顕微鏡による人工血管の観察

Study1 で 60 時間細菌生食懸濁液に浸漬された人工血管を処理し、電子顕微鏡で観察できる試料とした。コントロールとして細菌汚染されていない人工血管も観察した。

(Result)

Study1: GCDVG は 6 時間後から人工血管内側より細菌を検出したモデルが出現し、30 時間までにすべてのモデルの人工血管内側より菌を認めた。人工血管内に菌が出現するまでの平均時間は  $15.5 \pm 7.0$  時間であった。

ESDVG は実験開始直後に採取した検体から菌の検出を認めたものが 2 つあった。しかし 60 時間でようやく菌の検出を認めたモデルが 1 つと 60 時間でも菌が出現しなかったモデルが 1 つあった。人工血管内に菌が出現するまでの平均時間は  $22.0 \pm 19.7$  時間であった。両群とも平均人工血管内細菌数は時間経過で増加していった。両群間で各時間帯における人工血管外の菌量に有意差は認めなかった。人工血管内の菌量にも有意差は認めなかった。Kaplan-Meier curve であらわした人工血管内に細菌が出現するまでの時間も有意差はなかった。

Study2: 細菌汚染されていない人工血管の電子顕微鏡による観察では GCDVG は平織りダクロンの構造を示しており、ESDVG は綾織りダクロンに通過性の低いエラストマーが挟まれた構造をしていた。そして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を認めた。このような部分が Study1 における細菌通過時間に影響を及ぼしたと考えられる。細菌汚染後の人工血管では両群とも人工血管の断面に細菌を認めた。

(Discussion)

緑膿菌は人工血管感染の原因菌としては典型的でないが自動性があり、生食中でも長期間生存できるため今回の実験に適していると考えた。また、日本でのみ販売されている新しい人工血管のエラストマーシールドダクロンを使用したが、通過性の低いエラストマーを綾織りダクロンで挟んだ構造をしており、標準的なコーティング人工血管と比較すると水の通過性が非常に低くなっている。そのため、細菌の通過性も低いと考えた。今回の実験では両群間の有意差は認められなかったが、人工血管外側に高濃度の細菌汚染がある状態でも汚染直後より菌が内側へ通過するとは限らず、また時間経過とともに人工血管内側の菌量平均値が増加することが判明した。これより臨床的には人工血管外側に高濃度の細菌汚染がある状態においても、敗血症やグラフト抜去に発展する前に早急に洗浄、ドレーン挿入、創部陰圧吸引療法を施行するべきである。近年、感染人工血管をなんとか保存的に治療するために様々な努力がなされている。Dosluoglu らは鼠径部の創離開で人工血管が露出した症例をグラフト抜去せず、創部陰圧吸引療法で治療できたことを報告している。外傷や感染性動脈瘤など汚染が疑わしい術野において、十分な洗浄、人工血管周囲への陰圧吸引ドレーン挿入は人工血管への細菌侵入を防ぐと考えられる。また、エラストマーシールドダクロングラフトはエラストマー層を均一に厚く改良することで細菌の侵入を防ぐことができる可能性が示唆された。

## 1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2674 号	氏 名	佐 々 木 雄 毅
学位審査担当者	主 査	金 子 弘 真
	副 査	澁 谷 和 俊
	副 査	周 郷 延 雄
	副 査	石 井 良 和
	副 査	尾 崎 重 之

### 学位審査論文の審査結果の要旨 :

本実験は人工血管への細菌の通過に関する研究で、人工血管感染モデルを作成し人工血管外側から内側へ侵入する細菌の量と時間の関係を検討したうえで、人工血管断面の電子顕微鏡所見を観察したものである。

#### 実験方法

##### 研究 1: 細菌の侵入量と時間の関係

人工血管素材として、新しい人工血管で低い通過性が特徴のエラストマーシールドダクロングラフト (ESDVG) : Group T と従来から使用されているゼラチンコーティングダクロングラフト (GCDVG) : Group G を選択し両者の比較検討を行った。細菌は緑膿菌を選択し、約  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml の生食懸濁液として使用した。

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 注入した人工血管感染モデルを作成した (図 1)。60 時間まで 9 つのタイムポイント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測定した。両群間の各時間帯での細菌数の比較には Mann-Whitney U-test を人工血管内側に菌が出現するまでの時間を Kaplan-Meier curve で比較した。

##### 研究 2: 電子顕微鏡による人工血管の観察

Study1 で 60 時間細菌生食懸濁液に浸漬された人工血管を処理し、電子顕微鏡で観察できる試料とした。コントロールとして細菌汚染されていない人工血管も観察した。

#### (結果)

GroupG は 6 時間後から人工血管内側より細菌を検出したモデルが出現し、30 時間までにすべてのモデルの人工血管内側より菌を認めた。人工血管内に菌が出現するまでの平均時間は  $15.5 \pm 7.0$  時間であった。GroupT は実験開始直後に採取した検体から菌の検出を認めたものが 2 つあった。しかし 60 時間でようやく菌の検出を認めたモデルが 1 つと 60 時間でも菌が出現しなかったモデルが 1 つあった。人工血管内に菌が出現するまでの平均時間は  $22.0 \pm 19.7$  時間であった。両群とも平均人工血管内細菌数は時間経過で増加していった。両群間で各時間帯における人工血管外の菌量に有意差は認めなかった (table1)。人工血管内の菌量にも有意差は認めなかった

(table2)。Kaplan-Meier curve であらわした人工血管内に細菌が出現するまでの時間も有意差はなかった(図2)。

細菌汚染されていない人工血管の電子顕微鏡による観察では GroupG は平織りダクロンの構造を示しており、GroupT は綾織りダクロンに通過性の低いエラストマーが挟まれた構造をしていた。そして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を認めた。このような部分が細菌通過時間に影響を及ぼしたと推察される。しかし、細菌汚染後の人工血管では両群とも人工血管の断面に細菌を認めた。

#### (考察と結語)

今回の実験に緑膿菌を用いたことは人工血管感染の原因菌としては典型的でないが自動性があり、生食中でも長期間生存できるために適しているとして選択した。また、新しい人工血管のエラストマーシールドダクロンは、通過性の低いエラストマーを綾織りダクロンで挟んだ構造をしており、標準的なコーティング人工血管と比較すると水の通過性が非常に低くなっている。細菌の通過性も低いと考えられたが、今回の実験では両群間の有意差は認められなかった。しかし、人工血管外側に高濃度の細菌汚染がある状態でも汚染直後より菌が内側へ通過するとは限らず、また時間経過とともに人工血管内側の菌量平均値が増加することが判明した。これより臨床的には人工血管外側に高濃度の細菌汚染がある状態においても、敗血症やグラフト抜去に発展する前に早急に洗浄、ドレーン挿入、創部陰圧吸引療法を施行するべきである。

人工血管の感染に対して保存的に治療するために様々な努力がなされてきている。最近でも鼠径部の創離開で人工血管が露出した症例をグラフト抜去せず、創部陰圧吸引療法で治療できたとの報告もある。外傷や感染性動脈瘤など汚染が疑わしい術野において、早期かつ十分な洗浄、人工血管周囲への陰圧吸引ドレーン挿入は人工血管への細菌侵入を防ぐと考えられた。今後、エラストマーシールドダクロングラフトはエラストマー層を均一に厚く改良することで細菌の侵入を防ぐことができる可能性が示唆された。