

「化膿性脊椎炎の早期制御を目指したゼラチンハイドロゲル徐放化抗菌薬局所治療」

国立大学法人神戸大学 医学部附属病院 整形外科 由 留 部 崇

1 研究の背景と目的

近年、超高齢社会の日本では高齢化や糖尿病・リウマチ・がんなどの相対免疫不全の増加に伴い、化膿性脊椎炎患者が増加の一途にある。化膿性脊椎炎は椎間板や隣接椎骨に深部感染・骨髄炎を生じる難治性疾患であり、発熱、背部痛、神経痛や運動麻痺から体動困難へと至る。治療法は数か月にも及ぶ入院、床上安静と抗菌薬投与を基本とし、体幹支持性の喪失から時に外科的手術が必要となる。治癒後も全身の廃用性萎縮から長期間のリハビリテーションを要し、高額な医療費と長期間の労働力の損失は深刻な社会問題となっている。

椎間板は中心の髄核を取り囲む周囲の線維輪と軟骨終板からなる特殊な構造から、人体最大の無血管組織である。栄養供給を隣接する椎体からの拡散に依存するため抗菌薬の局所移行が不十分であり、高容量・長期間の投与でも奏功せず、複数回の病巣搔爬術や高侵襲・高額な脊椎固定術を要する症例も多い。そのため有効かつ安全で早期に介入可能な低侵襲局所治療が切望されている。

Drug delivery system は薬剤を必要な部位に必要な濃度で必要な時期に作用させる機構であり、作用の増強と副作用の低減が期待できる。がん領域では腹腔内播種マウスでゼラチンハイドロゲルを用いた抗がん剤投与の有効性の報告があり、我々もラット転移性骨腫瘍モデルにおけるゼラチンハイドロゲル徐放化抗がん剤局所投与の有効性を報告した (Kanda Y, Yurube T, et al. J Orthop Res 2021)。そこで我々はゼラチンハイドロゲル徐放化抗菌薬の局所投与が化膿性脊椎炎に有効かつ安全であると仮説を立て、細胞実験でゼラチンハイドロゲル徐放化抗菌薬を作製し、ラット化膿性脊椎炎モデルを用いた動物実験で椎間板内局所投与の有効性と安全性を検証し、早期の感染制御と可及的な組織温存を図る新規治療法の確立を目指した。

2 研究方法・研究内容

(1) 徐放化抗菌薬の溶出動態に関する検討

徐放化する抗菌薬としてセファゾリン (CEZ) を用いた。ゼラチンハイドロゲル (GM) に CEZ を担持させ、徐放化 CEZ (GM-CEZ) を作成した。37℃ のリン酸緩衝バッファー (PBS) 中で攪拌振盪し、24 時間後にコラゲナーゼ D を投与した。上清の蛋白濃度と CEZ 濃度を測定することで分解試験と徐放試験を行い (n=4)、初期放出率や溶出動態を経時的に評価した。

(2) 徐放化抗菌薬の局所投与の有効性に関する検討

ラット化膿性脊椎炎モデルを確立された方法で作製した。蛍光標識した黄色ブドウ球菌 XEN29 *S. aureus* を培養し、細菌懸濁液を得た。Sprague-Dawley ラットにイソフルランで吸入麻酔を施行し、鎮静後、第 8/9 尾椎椎間板内に 27 G 針を刺入し、細菌懸濁液 (1×10^6 cells/100 μ L PBS) を注入し、感染を成立させた。

作製したラット化膿性脊椎炎モデルに対し、細菌注入後 3 日で以下の方法により治療介入を行った。未治療の対照群 (C 群)、CEZ-PBS の感染椎間板への局所投与群 (L 群)、CEZ-PBS の腹腔経由の全身投与群 (P 群)、GM-CEZ の感染椎間板への局所投与群 (G 群) の計 4 群を作成した (各 n=5)。術後 7 日及び 28 日で全身麻酔薬の腹腔内大量投与により安楽死させ、計測を行った。最終的に n=40 のデータから統計学的検討を行った。検討項目として以下の評価を行い、細菌量は蛍光標識細菌によ

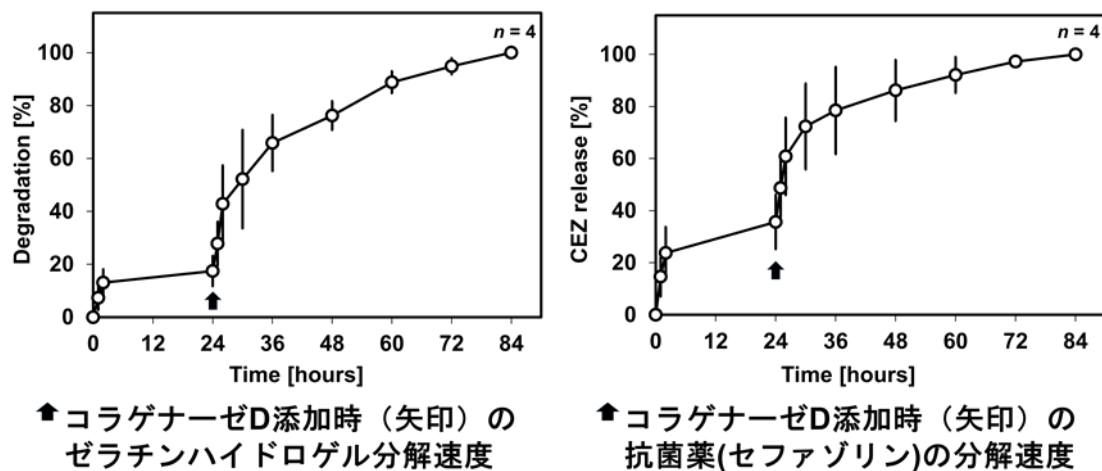
る発光を In Vivo Imaging System (IVIS) で定量化した。残存骨量は骨体積比 (BV/TV) をマイクロ CT 撮影装置で計測した。また椎体-椎間板-椎体組織を一塊として組織標本を作製し、蛍光免疫染色で血管内皮細胞マーカー CD31 と平滑筋アクチン (SMA) の DAPI 陽性細胞に対する発現陽性率から血管新生評価を行った。さらに全身状態及び副作用の評価として、血液検査による白血球数の測定と体重の計測を実施した。

3 研究成果

(1) 徐放化抗菌薬の溶出動態に関する検討

GM-CEZ の分解試験において 24 時間後の分解率は 20% 前後であったが、コラゲナーゼ D を添加することで速やかに分解された (図 1)。CEZ の徐放試験においても 24 時間以内に 30%-40% の初期放出が確認されたが、コラゲナーゼ D を添加することで分解試験と同様に CEZ は速やかに放出された (図 1)。

(図1) 徐放化抗菌薬の放出検証実験

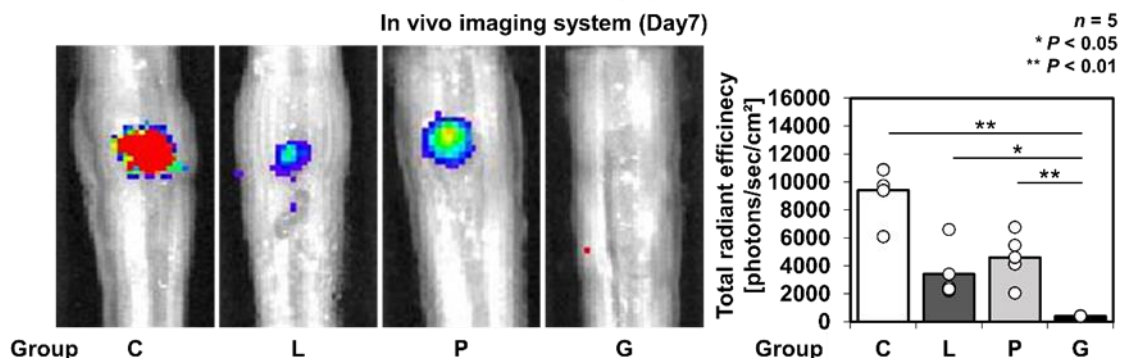


(2) 徐放化抗菌薬の局所投与の有効性に関する検討

【抗菌効果】

ラット椎間板感染モデルを用い、治療介入による細菌数の変化を解析した (図 2)。術後 7 日における IVIS の結果、細菌数は GM-CEZ 群で最も少なく (G 群, 336 ± 34.1 photons/sec/cm²)、対照群 (C 群, 9404 ± 1759 photons/sec/cm²: $p < 0.01$)、CEZ-PBS 局所投与群 (L 群, 4612 ± 1742 photons/sec/cm²: $p = 0.039$) 及び CEZ-PBS 腹腔内投与群 (P 群, 3418 ± 1648 photons/sec/cm²: $p < 0.01$) と比較して有意に減少していた。一方、術後 28 日では 4 群間に統計学的有意差はみられなかった。以上より、GM-CEZ の局所投与が細菌量の早期低減に寄与した可能性が示唆された。

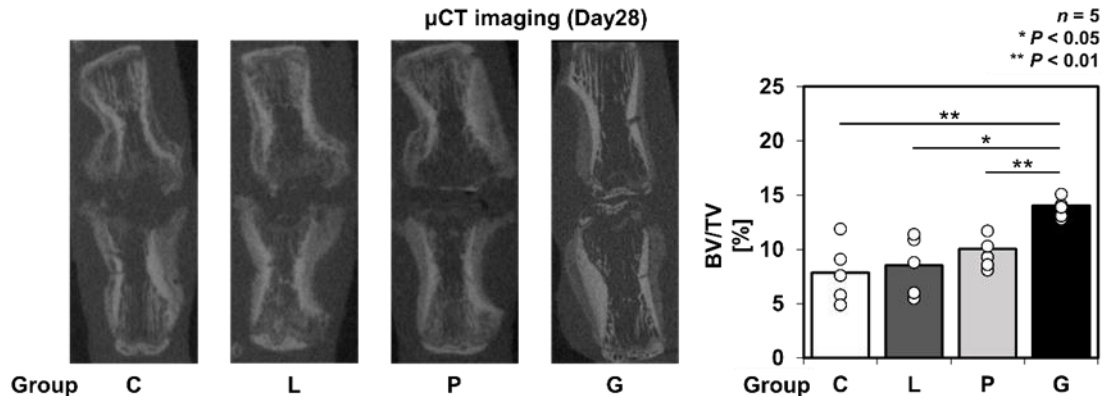
(図2) 抗菌効果検証実験



【骨溶解抑制効果】

ラット椎間板感染モデルにおける治療介入後の残存骨量の変化を解析した(図3)。術後7日のマイクロCTによる画像解析の結果、4群ともに骨量の減少を認めず(C群, $13.8\% \pm 4.3\%$; L群, $15.0\% \pm 3.5\%$; P群, $14.0\% \pm 4.6\%$; G群, $19.6\% \pm 3.3\%$)、統計学的有意差はみられなかった。一方、術後28日においてはG群で骨量が最も多く($13.5\% \pm 1.2\%$)、C群($6.3\% \pm 2.1\%$; $p < 0.01$)、L群($8.4\% \pm 2.5\%$; $p < 0.01$)、P群($9.5\% \pm 1.2\%$; $p = 0.02$)と比較して有意に高値を示した。以上より、GM-CEZの局所投与により骨融解が抑制され、骨量が維持される可能性が示唆された。

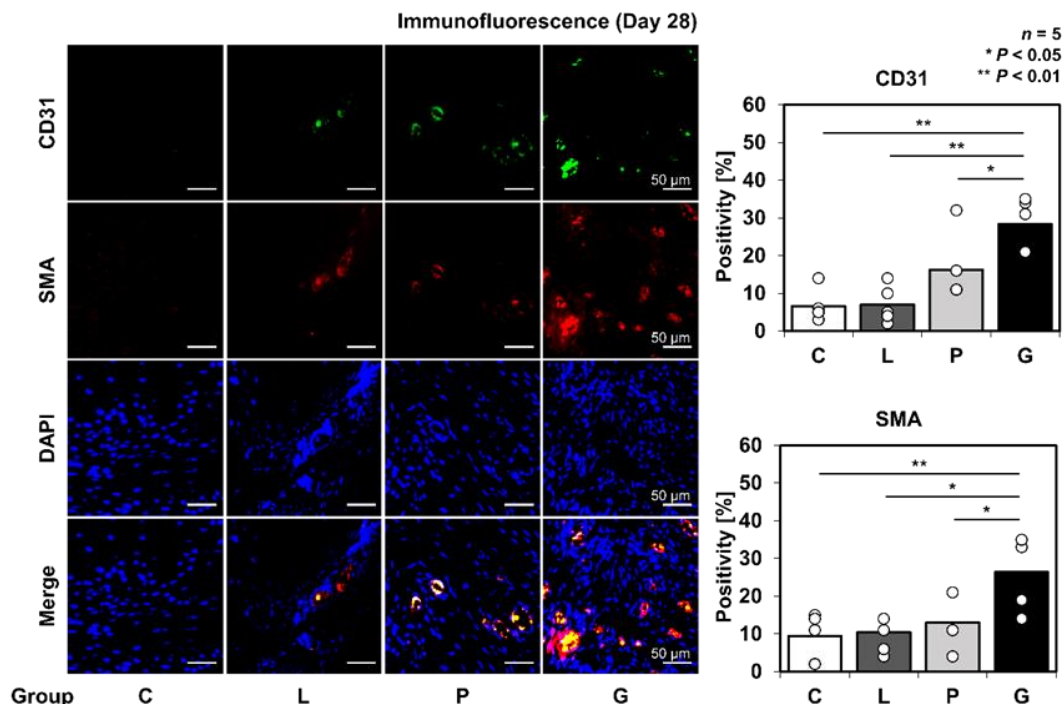
(図3) 骨融解抑制効果検証実験



【血管新生効果】

ラット椎間板感染モデルで治療介入後の血管新生について解析した(図4)。術後28日で施行した蛍光免疫染色の結果、G群におけるCD31の発現陽性率($26.4\% \pm 8.33\%$)が他の3群と比較して有意に高かった(C群, $9.40\% \pm 5.08\%$; $p < 0.01$; L群, $10.4\% \pm 4.84\%$; $p = 0.011$; P群, $13.0\% \pm 5.97\%$; $p = 0.035$)。また同様にSMAの発現陽性率もG群($28.4\% \pm 6.18\%$)で有意に高い結果であった(C群, $6.60\% \pm 3.82\%$; $p < 0.01$; L群, $7.00\% \pm 4.38\%$; $p < 0.01$; P群, $16.2\% \pm 8.13\%$; $p = 0.043$)。以上より、GM-CEZの局所投与が感染部位の血管新生の促進に寄与する可能性が示唆された。

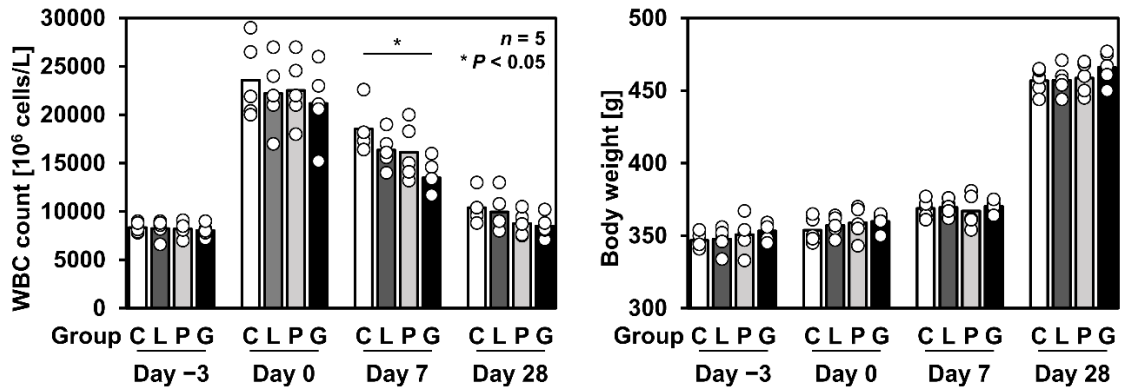
(図4) 血管新生検証実験



【副作用・全身状態評価】

ラット椎間板感染モデルで治療介入後の白血球数と体重の変化を解析した(図5)。術後7日の血液検査でG群の白血球数 ($1.35 \pm 0.17 \times 10^4$ cells/ μ L) はC群 ($1.85 \pm 0.21 \times 10^4$ cells/ μ L) と比較して有意に低値であった ($p=0.043$) (L群, $1.63 \pm 0.16 \times 10^4$ cells/ μ L; P群, $1.61 \pm 0.26 \times 10^4$ cells/ μ L)。一方、体重については術後7・28日の両計測時点ともに4群間で統計学的有意差を認めなかった。

(図5) 全身状態・副作用検証実験



4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究は持続的な抗菌薬放出を可能にする、安全性の高い生分解性キャリアシステムを用いた新たな治療法の有効性を検証したものであり、将来の臨床応用及び産業分野の発展において大きな貢献が期待される。

化膿性脊椎炎の従来の抗菌薬治療では経静脈投与による全身的な抗生剤投与が一般的であったが、血流が乏しい椎間板領域への薬剤浸透が不十分であり、長期治療が必要となる。脊椎は体幹支持性の土台であり、感染制御と骨増生による病巣の安定化が得られなければ離床には至らず、全身の廃用性萎縮に伴う日常生活動作の喪失が著しい。さらに長期間の抗菌薬治療に関連した治療抵抗性細菌の増加が問題視されてきた。今回の研究で使用したゼラチンハイドロゲルを用いた抗菌薬の局所投与戦略では直接的に病巣へ薬剤を届けることで高い抗菌効果を発揮し、治療初期から有効に感染を抑制することが示された。かつ抗菌薬が持続的に放出されることで従来の治療法と比較して投与頻度と総使用量の減量につながり、副作用を軽減できる点は臨床的に大きな利点となる。この技術は重症化しやすい相対免疫不全患者や手術適応のない患者にとって低侵襲かつ効果的な代替治療としての応用が期待される。さらに抗菌効果、骨溶解抑制効果、血管新生効果の早期化を認めたことから長期臥床を余儀なくされていた患者の減少に寄与できる可能性があり、医療費の削減や労働力の再獲得、そして患者の生活の質の向上への貢献が示唆される。

加えて本研究で示された局所投与による持続的な抗菌薬放出技術は他臓器の感染症治療への応用も期待できる。例えば糖尿病性足潰瘍や慢性骨髓炎などの局所感染が問題となる疾患に対して適応可能であり、治療成績の大幅な向上が見込まれる。さらに公衆衛生学的な観点からも持続放出型抗菌剤の開発は抗菌薬の過剰使用を抑え、耐性菌の発生率の低減につながる利点がある。抗菌薬への多剤耐性細菌の出現は世界的な問題であり、この drug delivery system は新たな治療戦略になりうる。

本研究成果は化膿性脊椎炎の治療成績の向上にとどまらず、他の感染症治療など多岐にわたる医療分野に応用可能であり、臨床および産業の発展に大きく貢献することが期待できる。