

# 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

鯨岡 学より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 606 号

学位申請者 : くら 鯨                      おか 岡                      まなぶ 学

学位審査論文 : Comprehensive diagnosis of bacterial infection associated with acute cholecystitis using metagenomic approach

(メタゲノム解析を用いた急性胆嚢炎の網羅的解析)

著 者 : Manabu Kujiraoka, Makoto Kuroda, Koji Asai, Tsuyoshi Sekizuka, Kengo Kato, Manabu Watanabe, Hiroshi Matsukiyo, Tomoaki Saito, Tomotaka Ishii, Natsuya Katada, Yoshihisa Saida, Shinya Kusachi

公 表 誌 : Frontiers in Microbiology Volume 8 : Article ID 685, 2017

論文内容の要旨 :

【目的と背景】

急性胆嚢炎は不適切な治療により重症化する炎症性疾患の一つである。治療ガイドラインとしては、2013 年に「Tokyo Guideline 2013」が再編集され、軽症、中等症、重症におけるそれぞれの治療指針が定められた。中でも、中等症や重症においては、ドレナージ加療や手術加療が治療の中心となっているが、標準的な抗菌薬投与も推奨されており、起因菌同定としては各施設における胆汁培養検査が推奨された。抗菌薬の選択においては薬剤感受性試験結果によって、適切な抗菌薬の使用が求められている。しかし、胆汁培養に2~3日、さらに薬剤感受性試験結果も合わせると4~5日の日数を要する点は、適切な抗菌薬の早期使用といった面で支障があった。このような状況の中で、今回われわれは、近年不明感染症等の起因菌診断において注目を浴びているメタゲノム解析を用いて、急性胆嚢炎の起因菌迅速診断、薬剤感受性結果を迅速に得ることを目的として研究を立案、有用性を検討した。また、消化液の逆行性感染が指摘されている急性胆嚢炎において、発症患者の消化液における常在菌を解析し、胆汁感染との比較を行った。

【方法】

当院にて2015年5月から2016年3月において急性胆嚢炎にて手術を施行した症例のうち、書面にて同意を得られた6症例 (P1

～P6)を対象とした。胆汁は術中に無菌的に採取し、好気ポーター及び嫌気ポーターに分注することで、院内培養検査及びメタゲノム解析を行った。メタゲノム解析用としては、即座に-20℃で凍結保存を行い、研究協力施設である国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センターへ検体を搬送することで解析を行った。

メタゲノム解析結果と従来の胆汁培養検査・薬剤感受性結果と比較した。さらに、上部消化液、下部消化液の常在細菌叢を明らかにするため唾液・便においてもメタゲノム解析による網羅的解析を行った。薬剤耐性菌が検出された場合には Multilocus sequence typing (MLST)法も追加で行った。

#### 【結果】

全ての症例においてメタゲノム解析と従来の検査法で検出細菌は一致した。P1及びP4では従来の培養検査及び薬剤感受性試験にて Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)を有する *Escherichia coli* (*E. coli*)が検出されたが、メタゲノム解析においても迅速に *E. coli*、*ESBL*を同定することが可能であった。従来の培養検査では数日を要し、定性的評価しかできなかったが、メタゲノム解析では24時間以内にDNA検出頻度を用いた定量的評価も可能であった。さらに薬剤耐性評価として、MLSTも迅速に判定することが可能であった。薬剤耐性としては *E. coli*が検出された2症例(P1、P4)においてCTX-M-14及びCTX-M-27がそれぞれ検出された。さらに別の2症例においては胆汁細菌陰性と迅速に診断され、治療を目的とした抗菌薬の継続投与は不要と判断することが可能であった。

起因菌として胆汁より *E. coli*が高頻度に検出された症例では唾液または便、その両者において *E. coli*の検出頻度が健常者と比較して高かった。また、腹腔内膿瘍等の術後合併症を発症した症例では、*E. coli*が唾液および便の両者において高頻度に検出され、常在細菌叢の乱れが合併症発生に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

#### 【結論】

メタゲノム解析は従来の検査法に比較して起因菌の同定において迅速かつ、よりの確に定量的評価、網羅的評価が可能であることが明らかとなった。さらに、唾液及び便の解析を行うことで、消化液の胆汁への逆行性感染が示唆される急性胆嚢炎において、常在菌叢と胆汁検出細菌の関連性が明らかとなった。*E. coli*を起因菌とした胆汁感染において、便からの *E. coli*の検出頻度が高いといった結果より、消化管常在菌叢の乱れが急性胆嚢炎発症において何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

## 1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 606 号	氏 名	鯨 岡 学
学位審査担当者	主 査	舘 田 一 博
	副 査	前 谷 容
	副 査	船 橋 公 彦
	副 査	岡 住 慎 一
	副 査	澁 谷 和 俊

### 学位審査論文の審査結果の要旨 :

申請者らは、急性胆嚢炎にて手術が実施された 6 症例を対象に、採取された検体を用いて次世代シーケンサーによる病原体遺伝子解析を行っている。今日、急性胆嚢炎に対しては 2013 年に発表された「Tokyo Guideline 2013」を参考に重症度分類および治療法が選択されることが多い。原因病原体に関しては大腸菌、肺炎桿菌、腸球菌などの腸管内細菌による逆行性感染が多いことが知られているが、混合感染例もしばしば観察されている。また急性胆嚢炎の発症病態に関しては、まだまだ不明なことが多く残されている。本研究では、近年注目される新技術である次世代シーケンサーを用いることにより網羅的に病原体遺伝子解析を行い、従来法である培養法との違いを検討している。また、本症の発症病態に関して検討する目的で、同一患者の手術直前の唾液および糞便も同時に次世代シーケンサーで解析を行った。

術中摘出検体の次世代シーケンサーの結果としては、予想された通り、大腸菌、肺炎桿菌の遺伝子が優勢を占めていた。また、頻度は少ないものの、腸球菌遺伝子が同時に検出されている症例も観察された。今回の 6 症例の検討では、従来法である培養法と基本的に同じ結果が次世代シーケンサー解析で得られている。また基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ産生を示す耐性遺伝子の存在も次世代シーケンサーにて検出された。これに加えて、患者の唾液および糞便を用いた次世代シーケンサー解析から、症例 1 において唾液および糞便から急性胆嚢炎の原因菌と遺伝学的に同一と思われる大腸菌が検出されていた。本知見は、唾液で優勢になった大腸菌が急性胆嚢炎の発症原因になっていることを示唆する成績であり、さらに症例を増やして解析することが必要であると考えられた。

申請者による説明ののち、審査委員から多数の質問が出された。遺伝子解析においても原因菌陰性となった症例の解釈、唾液および糞便中からの同一菌検出の意味、コストおよび時間との関連などに関して、申請者は本研究における知見・課題・今後の研究の展開について理論的に説明を行った。申請者らはすでに 55 症例にまで解析数を増やして検討を継続しており、新しい遺伝子診断法 (Verigene) などの有用性についても検討を行っていることが説明された。次世代シーケンサーによる解析は現時点では迅速性およびコストの面からすべての症例に適応することは難しいが、本研究で得られた知見は急性胆嚢炎の診断・治療および発症病態の理解に重要な示唆を与えるものと考えられた。発表・質疑応答ののち審査委員で議論され、本論文は学位に値する研究成果であることが全員一致のもとに確認された。