

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10198

研究課題名(和文) 急性胆道炎におけるメタゲノム解析による次世代型網羅的病原体検出

研究課題名(英文) Comprehensive diagnosis of bacterial infection associated with acute cholecystitis using metagenomic approach

研究代表者

浅井 浩司 (ASAI, Koji)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：20366454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性胆道炎の胆汁を用いて、100例以上の症例に対してメタゲノム解析を用いた網羅的病原体検出を施行した。いずれの解析においても検査開始から24時間で起因菌の同定が網羅的に検出可能であった。耐性菌の発症状況にはさらに24時間を要した。通常、細菌培養検査から抗菌薬感受性結果を得るのに5日程度必要であった検査過程を48時間に短縮することが可能であった。この手法は将来的に抗菌薬治療・選択を画期的に変革できる基礎研究であると考えられた。

本研究期間中に初期の6例の解析結果を報告した(Kujiraoka M, Front Microbial 2017)。全症例の解析結果に関しても近日中に報告予定である。

研究成果の概要(英文)：We undertook a metagenomic approach to characterize the bacterial infection associated with acute cholecystitis and cholangitis. More than 100 cases included this analyses during 3 years. Metagenomic analysis demonstrated possible single or multiple bacteria infections within 24 h. Also, antimicrobial resistance including extended-spectrum beta-lactamase gene could be identified in other 24 h. Metagenomic analysis was useful for rapid bacterial diagnosis including assessing potential antimicrobial susceptibility in patients with acute cholecystitis and cholangitis.

We have already reported preliminary 6 cases (Kujiraoka M, Front Microbial 2017). Now, we prepare to report total analytic cases.

研究分野：消化器外科

キーワード：急性胆道炎 メタゲノム解析 抗菌薬感受性 耐性菌

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の世界的な蔓延はこれまでの過剰な抗菌薬使用が原因であることに異論はない。急性胆道炎の起原菌として検出頻度の高い腸内細菌においてもこの薬剤耐性菌の検出頻度は増加傾向にある。特に近年では急性胆道炎の起原菌として最も検出頻度の高い *Escherichia coli* や *Klebsiella* spp. においても高率に extended spectrum -lactamase (ESBL) 産生菌が検出される。これらは急性胆道炎の抗菌薬治療で汎用されるセファロスポリン系、ペニシリン系、フルオロキノロン系抗菌薬の効果期待できない。また世界的に見てもカルバペネム耐性緑膿菌、多剤耐性緑膿菌・腸球菌・アシネトバクターなどの多剤耐性菌の検出頻度も増加している。今後、急性胆道炎の起原菌として、これらの耐性菌の検出頻度が増加することが予測される。また、国内においては徐々に進んでいる高齢化社会に伴い、薬剤耐性菌検出が高率な医療関連感染の増加も今後危惧されるところである。

このような国内の状況を背景に、今後増加することが予想される薬剤耐性菌に対する急性胆道炎の抗菌薬治療は抗菌薬の選択の点で困難なことが予想される。適切な抗菌薬治療が行われないと容易に敗血症性ショックから多臓器不全に進展し致死的となるこの急性感染症において、早期より起原菌を同定し、かつ、その耐性状況などの特性を判別する基礎的研究の開発は急務と考えられていた。

2. 研究の目的

近年、網羅塩基配列解読を可能にした次世代(第二世代)DNA シークエンサーは従来の病原体ゲノミクスを変貌させ、迅速に病原体ゲノムの全容を明らかにすることが可能となった。これは Human Microbiome project (HMP) などのプロジェクトにより数多くの細菌種を個々に解読し、メタゲノム解析情報から正確な菌種同定ができるようになったことによるものである。感染症対策においては、患者分離株に特有の毒素や薬剤耐性因子を見出すことが抗菌薬治療の第一優先となるが、メタゲノム解析では draft 配列のみで抗菌薬選択に関するゲノム情報を得ることができる。

このように近年進化したメタゲノム解析の領域であるが、これまで急性胆道炎の起原菌の解析は行われていない。今回立案したメタゲノム解析により以下の点が期待できる。

(1)メタゲノム解析により早期より起原菌を同定し、その耐性状況の確認が行えることは、早期より適切な抗菌薬治療を開始可能で致死率を低下することが期待される。

(2)急速にショックから多臓器不全にいたった症例における起原菌のメタゲノム情報を

集積することにより、その危険性をより早期に判別し、適切な対応が可能となり救命率の向上が期待される。

(3)抗菌薬の効果をもメタゲノムデータで解析することにより客観的な評価が可能となり、今後の抗菌薬の使用法に新たな提言ができる。また、ゲノムレベルで効果発現部、非発現部を評価することにより、今後の抗菌薬開発・改良に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

2年間で100例以上の急性胆道炎症例の胆汁検体を採取・評価することを予定した。

(1)急性胆道炎診断方法・重症度判定方法

ガイドラインに準じて行う。急性胆管炎と急性胆嚢炎の双方とも理学的所見、血液性化学検査所見、画像検査を組み合わせることで確定診断に至る。重症度もこれら3点から評価を行い、軽症・中等症・重症に分類する。高齢者施設入所中の症例、あるいは他疾患の術後症例などは医療関連感染に分類され、抗菌薬耐性菌発生の増加が証明されていることからこれらの症例は別に集積する。

(2)症例基礎データの集積

理学的所見、血液生化学検査結果、画像検査結果などのデータ登録を行うとともに、症例の基礎データ(年齢、性別、基礎疾患、発症からの経過時間、抗菌薬使用の有無など)に関してもデータ登録を行っておく。

(3)急性胆道炎における胆汁、胆嚢粘膜採取法

急性胆道炎は肝内・肝外胆管、胆嚢管に閉塞機転が存在し、細菌感染が関与することにより発生する急性感染症である。胆汁は経皮的、内視鏡的、手術時に採取を行う。採取された胆汁は院内細菌検査に提出するとともに国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター(連携研究者:黒田 誠)に直ちに搬送する。胆嚢粘膜の採取は摘出胆嚢において肉眼的に悪性病変がない部分を無菌的に約5×5mmを採取し上記施設に搬送する。同時期に口腔検体(唾液)と便検体も採取し同様に搬送する。これらは抗菌薬の影響、分布状況などを確認することが目的であり、さらには常在菌の評価も目的とする。

(4)メタゲノム解析の概要

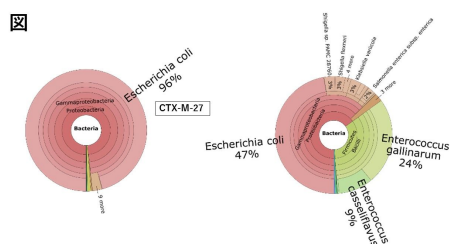
一般的に生物固有のメタゲノム情報を個別に解析して理解するゲノム解析に対して、多種多様な生物種が混在する試料の中から包括的に配列情報を取得し、その混在情報を相対的に比較・解析することをメタゲノム解析(metagenomic analysis)と呼ぶ。メタゲノム解析が有用な点としては、通常病原体の同定に必須な“培養工程を経ずに”試料の核酸配列を網羅的に配列解読できる点である。

その工程としては、まず臨床検体から DNA と RNA の精製を行い、その後解読配列リードの情報解析を行い病原体の同定を行う。

メタゲノム解析は第2世代シーケンサーを使用して行う。これは基本的に調整した DNA ライブラリー1分子の数万～数億個を個別に蛍光・発光・イオン半導体の分子特性を利用して ATGC の塩基解読を行うものである。このメタゲノム情報を既存のデータと照らし合わせて起病菌の同定と薬剤耐性を確認する。

4. 研究成果

既に 100 例以上の胆汁検体の評価は終了し、現在解析を行っている段階である。初期結果 6 例に関しては論文発表を行った(Kujiraoka M, 2017, *Front Microbio*). 6 症例全例、



メタゲノム解析を用いることにより、24 時間以内に網羅的に病原体の確認が可能であった。従来の細菌検査で得られた結果と同様、あるいはそれ以上の細菌株を同定可能であった。ESBL の遺伝子型も同定可能であったが、それにはさらに 24 時間を要した。よって、従来の細菌検査では 5 日前後を要する細菌同定・抗菌薬感受性検査結果を 24～48 時間で同定可能であった。今後の抗菌薬治療を画期的に変革し得る有用な基礎研究と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Kujiraoka M, Kuroda M, Asai K, Kusachi S. Comprehensive diagnosis of bacterial infection associated with acute cholecystitis using metagenomic approach. *Frontiers in Microbiology*. 査読有 . 2017,10.3389/fmicb.2017.00685.

Asai K, Watanabe M, Kusachi S. Evaluating the timing of laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis is an experienced center based on propensity score matching. *Asian Journal of Endoscopic Surgery*. 査読有 . 10,2017,166-172. DOI: 10.1111/ases.12353

浅井浩司, 渡邊 学, 草地信也. 単孔式腹腔鏡下手術用デバイスを用いた急性胆嚢炎に対する腹腔鏡下胆嚢摘出術における手術指導の工夫. *日本内視鏡外科学会雑誌*. 査

読有 . 22,2017,827-832.

渡邊 学, 草地信也, 浅井浩司. ESBL 産生菌感染症の診断・治療法の実践. *感染と抗菌薬*. 査読有 . 20,2017,134-138.

浅井浩司, 草地信也, 渡邊 学. 急性胆嚢炎の胆汁細菌からみた抗菌薬適正使用に関する検討. *日本外科感染症学会雑誌*. 査読有 . 13,2016,279-286.

崔 勝隆, 浅井浩司, 草地信也. 抗血栓薬療法中に急性胆管炎で発症した胆道重複瘻の 1 例. *胆道*. 査読有 . 30,2016,870-875.

[学会発表](計 5 件)

Asai K, Watanabe M, Kusachi S. Timing of laparoscopic cholecystectomy in an experienced center for acute cholecystitis using propensity score matching. Joint Congress of the 6th biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-pancreato-Biliary Association and the 29th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. 2017

浅井浩司, 草地信也, 渡邊 学. 急性胆嚢炎の胆汁細菌からみた抗菌薬適正使用に関する検討. 第 65 回日本化学療法学会学術集会. 2017

浅井浩司, 黒田 誠, 草地信也. 次世代シーケンサーを用いた急性胆嚢炎の起病菌迅速同定および病態解析. 第 72 回日本消化器外科学会総会. 2017

浅井浩司, 黒田 誠, 草地信也. 急性胆嚢炎における新しい胆汁細菌同定方法-メタゲノム解析による次世代網羅的病原体検出-第 53 回日本胆道学会学術集会. 2017

浅井浩司, 黒田 誠, 草地信也. 急性胆嚢炎におけるメタゲノム解析による次世代網羅的病原体検出. 第 52 回日本胆道学会学術集会. 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.lab.toho-u.ac.jp/med/ohashi/lgp_surgery_patient/clinical_study.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅井 浩司 (ASAI, Koji)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号: 20366454

(2)研究分担者

草地 信也 (KUSACHI, Shinya)

東邦大学・医学部・教授
研究者番号：70169978

(3)連携研究者

黒田 誠 (KURODA, Makoto)
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研
究センター・センター長
研究者番号：80317411

松本 哲哉 (MATSUMOTO, Tetsuya)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：10256688

前谷 容 (MAETANI, Iruru)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：00219263

渡邊 学 (WATANABE, Manabu)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：30297709