

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08591

研究課題名（和文）ゲノミクスを用いた感染性心内膜炎の新規診断法の検討

研究課題名（英文）Development of new diagnostic method of infective endocarditis using genomics

研究代表者

片岡 明久（Kataoka, Akihisa）

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：70758143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：感染性心内膜炎の診断は、心臓超音波検査を用いた疣腫や弁の破壊所見と細菌学的に血液培養で陽性になることである。COVID-19に感染拡大に伴う発熱症例の診療フローが変わったため、統計学的な検討が可能なほど十分な症例登録が得られなかったが、症例報告により次世代シーケンサーでのゲノミクスの手法を用いて唾液、血液、手術で摘出された弁検体と古典的血液培養での原因菌の一致を得た。これにより血液培養に変わり、感染性心内膜炎の原因菌学の診断が可能であることが示唆できた。発熱のため抗菌薬が事前に投与された血液培養陰性症例に対しても、本手法で初期の病勢を見逃さず診断できる可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染性心内膜炎の診断は、心臓超音波検査を用いた疣腫や弁の破壊所見と細菌学的に血液培養で陽性になることがあげられているが、診断前に発熱のため抗菌薬が投与されている症例などでは血液培養が陰性になることがあり、診断が遅れ初期の病勢を見逃す可能性がある。しかし、本研究によりゲノミクスの手法を用いて細菌学的な診断が可能であることが分かった。現在、超小型次世代シーケンサーの登場により、低コスト、短時間のサンプル調整、シーケンス時間も数時間で行うことができると考える。

研究成果の概要（英文）：The diagnosis of infectious endocarditis is based on the presence of vegetation or valve destruction on echocardiography and positive blood culture results. Due to changes in the diagnostic flow for fever cases associated with the spread of COVID-19, a sufficient number of cases were not registered for statistical analysis. However, We genomics-based methods using next-generation sequencers have enabled the matching of causative bacteria identified from saliva, blood, and surgically extracted valve specimens with those from classical blood cultures in several cases. This indicates that the diagnosis of the causative organism in infectious endocarditis is possible using genomic methods, replacing the need for blood cultures. It is also believed that this method may allow for early detection of the disease in cases where blood cultures are negative due to prior administration of antibiotics for fever.

研究分野：循環器内科学

キーワード：感染性心内膜炎 口腔内細菌 バイオインフォマティクス 細菌学 遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

感染性心内膜炎(IE: infective endocarditis)は、心内膜・心臓弁膜に細菌集簇を含む疣腫を形成し、菌血症・脳血管塞栓・心不全などの多彩な病態を呈する全身性敗血症性疾患である。IEは発熱、寒気、震戦などの急性症状、食欲不振及び体重減少、易疲労感といった慢性症状を伴うことが特徴である。IEの発症率は高いとは言えないが、的確な診断のもと、適切に奏効する治療を行わなければ、多くの合併症を引き起こし生命に危機をもたらす。観血的な歯科治療や外科手術など、感染性心内膜炎の誘因となる危険因子が発熱以前に存在する症例は約25%も報告されている。原因菌のうち口腔由来のものとしては、口腔レンサ球菌種がほとんどであるとされており、主要な細菌としては、*Streptococcus sanguinis* などの *mitis group* のレンサ球菌が知られている。従来までのIEの診断や細菌解析方法は培養技術を主に用いられてきた。しかしながら、口腔内には難培養性の細菌種を含む、約700菌種以上の細菌が生息するとされており、数種類の細菌種のみを培養する従来の方法では原因細菌種を特定することは不可能といえる。そのため、罹患部位に存在する全ての細菌種を特定し、どのような口腔内由来の細菌種が存在するのかを明らかにする必要がある。

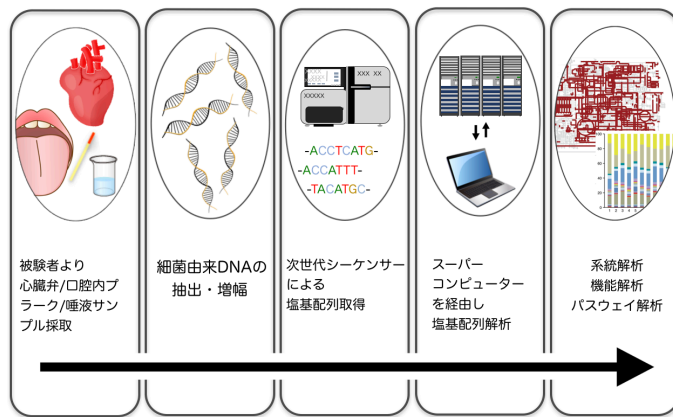
IEの治療では、抗菌薬投与が行われるが、疣腫は血流に乏しく抗菌薬の奏功が悪いことから、高用量の殺菌性抗菌薬の長期投与が必要となる。発症後初期の段階では原因菌の特定ができないため、原因菌として頻度の高い菌種をカバーする広域スペクトラムな抗菌薬を選択することが多く、その原因菌として口腔内細菌の関与も多く報告されている。このようなエンピリック治療では効果的な薬効が認められない他に、耐性菌の増加や非感染者への不要な抗菌薬投与などが問題となる。疾患部位の細菌叢を網羅的に解析することは、抗菌薬の種類や投与期間を減少させることで、抗菌薬の乱用による耐性菌の問題や増加する医療費の削減につながると考える。また、新たなIEの原因菌を特定することで、従来の血液培養による原因菌同定の精度向上に寄与できると考えている。

### 2. 研究の目的

本研究では、この重症化したら予後不良であるIEにおいて、バイオインフォマティクスの手法により口腔内細菌の関与及び感染性心内膜炎の原因となる細菌叢の網羅的解析に加え、細菌種間のネットワーク構造を解明し、IEに及ぼす影響を解明することで新規診断・予防・治療法の開発を目指すことである。

### 3. 研究の方法

研究デザインは前向きであり、帝京大学医学部附属病院でIEの診断または疑いで入院中加療中の患者。生体試料として、唾液、血液、外科的僧帽弁置換術または形成術を受けた患者の外科手術における摘出弁を医科歯科大学に移送して細菌のDNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子シーケンシングを用いて臨床分離株の特性解析を行った。細菌のDNAはDNeasy Blood & Tissue キット (Qiagen、ドイツ・ヒルデン) を用いて抽出、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域 (341F [CCTACGGGNGGCWGCAG] および 806R [GACTACHVGGGTATCTAATCC]) を ExTaq HS DNA ポリメラーゼ (TaKaRa、日本・滋賀) を用いて増幅させた。その後、MiSeq プラットフォーム (Illumina、アメリカ・CA) で 2 × 300 bp のペアエンドリードを得るためにシーケンシングを行った。リードデータは、DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) にアクセッション番号 DRA014717 として登録され、Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) 2 (バージョン 2021.2) を用いて解析した。また、解析には、デフォルトのパラメータが使用されたが、Dada2 で trim、dereplicate、および filter chimeric sequences のための truncLen=c(260,210) および trimLeft=c(17,21) に変更が加えられた。アンプリコンシーケンスバリエーションの分類は、QIIME feature-classifier classify-sklearn を使用し、SILVA 138 および 99% の配列類似性を基に行った。



#### 4. 研究成果

研究期間中に COVID-19 パンデミックが発生し、日常診療において発熱患者のフローが劇的に変わったため当初 50 例を想定していたが、研究期間を 1 年延長しても最終的な総解析対象症例は 8 例と極端に少ない登録人数であった。解析結果について幾度と研究者の間で検討を行ったが、登録症例数が少ないことのみならず、手術症例数（弁検体数）が 3 症例と少ないことから、統計的結果は困難と判断し、典型的な *Streptococcus oralis* と *Streptococcus gordonii* が原因細菌による感染性心内膜炎で僧帽弁破壊と疣腫を認めるため、僧帽弁置換術に至った 2 症例で報告した。

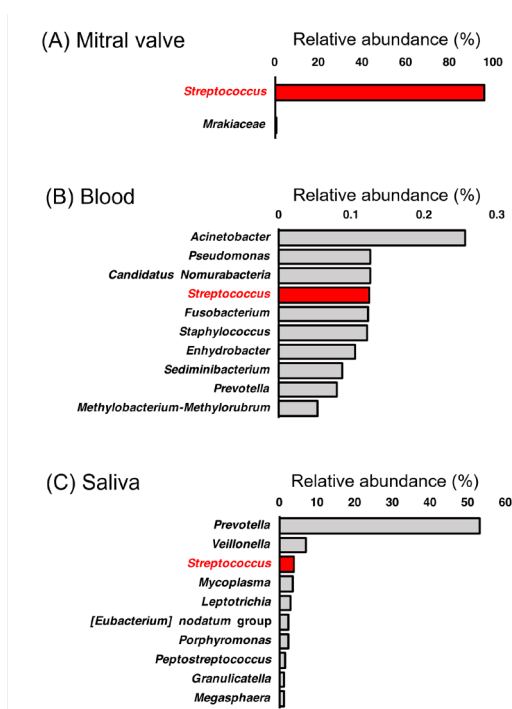
症例 1 では切除された僧帽弁組織の細菌分析により、主に *Streptococcus* (95.9%) が優勢な属であることが明らかになり、血液には多くの未分類の細菌が含まれていたが *Streptococcus* (0.124%) も主要な属の 1 つであり、唾液でも *Streptococcus* が優勢であった 3.51%（下記図）。症例 2 では僧帽弁組織の鏡検査で *Streptococcus* の存在は認められず、培養試験でも増殖はなかったものの細菌分析では *Streptococcus* (28.3%) が主要な属であることが判明した。血清中と唾液サンプル中の *Streptococcus* の相対的な存在比率は、それぞれ 0.613 と 0.449 であり、これは症例 1 と同様に主要な属であることが示唆された。

この *S. oralis* と *S. gordonii* は *S. mitis* 群に属しており、歯磨きや噛むといった日常的な習慣や歯科治療を通じて血流に容易に侵入する。したがって口腔衛生が悪く長期間歯科治療を受けていないような多くの歯石を有する患者では、歯磨きや日常の習慣による心内膜炎のリスクが増加する可能性がある。16S rRNA 遺伝子のシーケンスによって唾液、血液、および僧帽弁中に *Streptococcus* の存在が確認されたことから、*S. oralis* と *S. gordonii* は唾液を介して僧帽弁の内皮に定着し、心内膜炎を引き起こすことが示唆された。

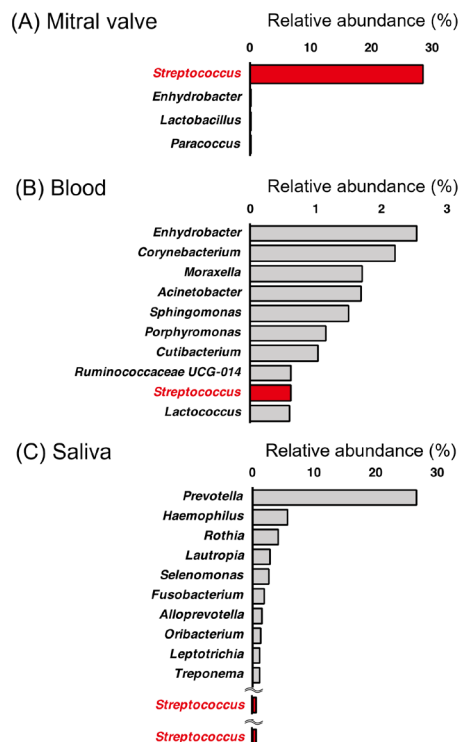
IE の原因細菌は通常、培養後 7 日以内に血液培養から回収され、適切な抗生物質が心内膜炎の治療に使用される。*S. oralis* や *S. gordonii* はペニシリンに対して感受性があり、血液培養の結果がわかる前に抗菌療法を経験的に開始するが、血液採取前に既に抗菌薬が投与されている場合、血液培養は陰性になることがある。

この症例シリーズでは、抗生物質の投与後の唾液や血液飼料中に *Streptococcus* が遺伝学的に検出された。最新のゲノムシーケンシング法は、迅速かつ比較可能な結果を提供し、病原体だけでなく耐性遺伝子も同定することができる。したがって、血液培養が陰性であるため既に抗生物質が投与されている IE 患者において、本手法は抗生物質療法の選択と感染源の同定に役立つ可能性が示唆された。

図 摘出僧帽弁、血液、唾液サンプルでの遺伝子レベルの分類学的構成  
症例 1



症例 2



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Kataoka A, Shiba T, Katagiri S, Koyama S, Kito K, Ota T, Katayama T, Ohsugi Y, Nagai T, Kobayashi R, Komatsu K, Urata M, Imazuru T, Iwata T, Kozuma K. Novel and Efficient Method for Diagnosing Infective Endocarditis Using 16S Ribosomal RNA Gene Amplicon Sequence. JACC Case Rep. 2023 Feb 22;11:101793. doi: 10.1016/j.jaccas.2023.101793.

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者：芝 多佳彦

ローマ字氏名：Takahiko Shiba

研究分担者氏名：片桐 さやか

ローマ字氏名：Katagiri Sayaka

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：名倉 福子

ローマ字氏名：Nagura Fukuo

研究協力者氏名：佐々木 直樹

ローマ字氏名：Sasaki Naoki

研究協力者氏名：駒津 匡二

ローマ字氏名：Komazu Keiji

研究協力者氏名：根本 昂

ローマ字氏名：Nemoto Takashi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kataoka Akihisa, Shiba Takahiko, Katagiri Sayaka, Koyama Shuhei, Kito Kento, Ota Tatsuya, Katayama Taiga, Ohsugi Yujin, Nagai Takahiko, Kobayashi Ryota, Komatsu Keiji, Urata Masahiro, Imazuru Tomohiro, Iwata Takanori, Kozuma Ken	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel and Efficient Method for Diagnosing Infective Endocarditis Using 16S Ribosomal RNA Gene Amplicon Sequence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JACC: Case Reports	6. 最初と最後の頁 101793 ~ 101793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaccas.2023.101793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片桐 さやか  (Katagiri Sayaka)  (60510352)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教   (12602)	
研究分担者	芝 多佳彦  (Shiba Takahiko)  (90802306)	東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師   (12602)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	名倉 福子  (Nagura Fukuo)	帝京大学・内科学講座   (32643)	
研究協力者	佐々木 直樹  (Sasaki Naoki)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	駒津 匡二  (Komazu Keiji)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科	
研究協力者	根本 昂  (Nemoto Takashi)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関