

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18190

研究課題名(和文) 16S rRNA配列解析を利用した感染性大動脈瘤患者の起炎菌同定法の開発

研究課題名(英文) Development of the method for pathogenic identification of mycotic aortic aneurysm patients by 16S rRNA gene sequencing.

研究代表者

松岡 孝幸 (Matsuoka, Takayuki)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：80816447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：「16S rRNA遺伝子の塩基配列決定による起炎菌同定法」の感度向上を目指した本研究によって、これまでに、感染性大動脈瘤患者などを対象に、血液検体及び組織検体から起炎菌の同定を図ってきた。これまでに23検体中21検体で起炎菌同定、あるいは陰性の一致を確認できており、感染性動脈瘤や縦隔炎の起炎菌としては世界で初となる菌種の同定にも成功した。さらに一部の症例では、含有菌量が格段に少ない血液検体からも起炎菌を同定することができ、既存の検査法よりも早期に結果が判明するなど、本研究手法が感染症治療にとって有益な情報、有効な検査手法になり得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌種同定法として有用な「16S rRNA遺伝子の塩基配列解析による細菌同定法」の基本原則を維持し、感度向上を図った本研究手法により、血液検体に含まれるごく微量な細菌をも検出できる可能性が示された。本研究手法の確立は、これまでの細菌培養に基づく起炎菌同定法のネックとなっている、時間的制約、検査感度の大きなブレイクスルーとなり、早期に標的を絞った抗菌薬治療が可能となる。これは、感染性疾患の予後改善効果のみならず、医療コストの軽減、耐性菌出現リスクの軽減に直接的に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have improved the sensitivity of the pathogenic identification method using 16S rRNA gene sequencing. So far, we have identified the specific antigens or proved the negativities in 21 of 23 samples from blood or specimens operatively resected, including two first cases of infectious diseases caused by certain pathogens. Additionally, we have succeeded in identifying microbial species from blood of septicemia that contain absolutely less number of bacteria.

This method enables us to know pathogens more quickly than conventional culture tests and provides us the worthwhile information to treat infectious diseases, and It's demonstrated to be a potential examination for infectious diseases.

研究分野：Cardiovascular surgery

キーワード：起炎菌同定法 16S rRNA遺伝子

研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

「炎症性変化を伴う大動脈瘤」には感染性大動脈瘤と炎症性大動脈瘤があり、本題としている感染性大動脈瘤は主に細菌の血流感染(菌血症)が原因となる。血流に乗った細菌が動脈壁に定着した結果、動脈壁の脆弱化、瘤化を来し、時に破裂を引き起こす。その死亡率を高めている要因の1つに、培養検査による起炎菌同定までの所要時間が長いことが挙げられる。また、培養検査の検査感度の問題から、必ずしも起炎菌を同定することができず、標的を絞った抗菌薬治療を行うことができないケースも多い。経験的治療で使用される広域スペクトラムの抗菌薬は抗菌活性が高くない傾向にあり、その長期使用は耐性菌の問題も生じさせることから、疾患の死亡率を上げるもう1つの要因となっている。

さらに、血液培養陰性であっても感染性大動脈瘤の可能性を完全に否定はできない。例えば、検査前に抗菌薬治療が行われていた症例では培養の結果が偽陰性になる可能性がある。結果、実際には感染性大動脈瘤であっても、抗菌薬治療とは対照的なステロイド治療が行われてしまう場合もある。

培養検査に基づく感染性大動脈瘤治療には以上のような問題点があり、疾患の生命予後を大きく制限していると考えられる。そこで近年、細菌培養に依らない新規起炎菌同定法が探索され始め、その中の1つとして「16S rRNA 塩基配列解析による起炎菌同定法」が挙げられる。その検出率は培養検査よりも高いことが示されているが、手技が煩雑で解析機器も一般の医療機関には無いこと、検査費用が高いこと、術後にしか結果が得られないことなどから一般的検査法としては普及していないのが現状である。

2. 研究の目的

感染性大動脈瘤など心臓血管外科で手術を要する感染症例に対し、術前に血液検体から起炎菌を同定すること、手術で摘出した検体でも培養検査陰性となることがあるため、後者についても起炎菌同定を図り、結果の整合性を確認すると共に、培養検査を相補するような新たな検査手法としての確立を目指す。

3. 研究の方法

これまでの「16S rRNA 配列解析を利用した起炎菌同定法」について、再度、細かい条件検討を行い、感度の向上を目指す。

本研究の検査事項は以下の通りである。

- ・術前：血液培養検査、血液を利用した本研究の検査
- ・術中：組織培養検査、摘出した組織の一部を利用した本研究の検査

通常実施する臨床検査に加えて、本研究では以下の点について検証、解明していく。

引き続き従来の方法による起炎菌同定を行いデータの蓄積を図る。

抽出過程で核酸の損失を可能な限り防ぐため、試料をそのまま直接PCRを行い(direct PCR法)感度上昇を試みる。

の結果を踏まえ、術前に血液検体で検出可能かどうか検証する。

first PCRの増幅産物をsecond PCRの鋳型とし入れ子状に核酸を増幅するnested PCR法さらに検出感度上昇を検証する。

従来法と本研究手法との間で、結果の整合性を確認する。

4. 研究成果

「16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定による起炎菌同定法」の感度向上を目指した本研究によって、これまでに、感染性大動脈瘤患者などを対象に、血液検体及び組織検体から起炎菌の同定を図ってきた。これまでに23検体中21検体で起炎菌同定、あるいは陰性の一致を確認できており、感染性動脈瘤や縦隔炎の起炎菌としては世界で初となる菌種の同定にも成功した。さらに一部の症例では、含有菌量が格段に少ない血液検体からも起炎菌を同定することができ、既存の検査法よりも早期に結果が判明するなど、本研究手法が感染症治療にとって有益な情報、有効な検査手法になり得ることが示された。

さらなる進展による本研究手法の確立は、これまでの細菌培養に基づく起炎菌同定法のネックとなっている、時間的制約、検査感度の大きなブレイクスルーとなり、早期に標的を絞った抗菌薬治療が可能となる。これは、感染性疾患の予後改善効果のみならず、医療コストの軽減、耐性菌出現リスクの軽減に直接的に貢献できるものと考えられる。

以下に症例解析のまとめを示す。

Analysis No.	Clinical diag.	Culture			Sequencing		
		blood (Pre-ope) (Referred hosp.)	blood (Pre-ope) (Our hosp.)	Tissue (Pre-ope)	Tissue (Post-ope)	Blood	Tissue
1	PVE (AV)	Coagulase negative staphylococcus		(-)		(-)	Staphylococcus aureus or epidermidis
2	IE	(-)		(-)		(-)	Candida parapsilosis
3	Graft infection, S/A EVAR	(-)	cter koseri / Staphylococcus epidermidis:	(-)		(-)	Bacteroides fragilis
4	Mycotic aneurysm	(-)		(-)		(-)	Staphylococcus aureus
5	PVE (AV)	(-)		(-)		(-)	Bacteroides vulgatus/dorei
6	Wound infection	(-)		(-)		(-)	(-) (no-operation)
7	IE	(-)		(-)		(-)	negative
8	Healed? IE	(-)		(-)		(-)	negative
9	Pseudoaneurysm, S/A distal bypass	(-)		(-)		(-)	negative
10	IE	(-)		(-)		(-)	negative
11	Mycotic aneurysm	(-)		(-)		(-)	(-) (no-operation)
12	IE (MV)	(-)		(-)		(-)	Candida parapsilosis
13	PVE	(-)		(-)		(-)	negative
14	Graft infection, S/A Y graft	(-)		(-)		(-)	Streptococcus mitis/sanguinis
15	IE (MV)	(-)		(-)		(-)	?
16	PVE	(-)		(-)		(-)	Escherichia coli
17	Graft infection, S/A TEVAR	(-)		(-)		(-)	negative
18	IE	(-)		(-)		(-)	negative
19	PVE?	(-)		(-)		(-)	negative (GPC)
20	IE	(-)		(-)		(-)	Mycobacterium tuberculosis
21	Mycotic aneurysm (IIA)	(-)		(-)		(-)	(-) (no-operation)
22	Wound infection, S/A TAR-OSG	(-)		(-)		(-)	(-) (no-operation)
23	Mediastinitis	(-)		(-)		(-)	negative
24	IE (AV)	(-)		(-)		(-)	negative
25	Mediastinitis	(-)		(-)		(-)	Ruminococcus gnavus
26	IE (AV, MV)	(-)		(-)		(-)	negative
27	Mycotic aneurysm (AAA-CIA)	(-)		(-)		(-)	Salmonella sp.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Minagawa Tadanori, Ohara Takahiro, Oizumi Tomoya, Takeda Miki, Hiranuma Wakiko, Matsuoka Takayuki, Shimizu Takuya, Kawamoto Shunsuke	4. 巻 25
2. 論文標題 Infective Endocarditis with a Left Ventricular Pseudoaneurysm Caused by <i>Proteus mirabilis</i> : A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology Cases	6. 最初と最後の頁 79 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jccase.2021.06.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka Takayuki, Shimizu Takuya, Minagawa Tadanori, Hiranuma Wakiko, Takeda Miki, Kakuta Risako, Kawamoto Shunsuke	4. 巻 21
2. 論文標題 First case of an invasive <i>Bacteroides dorei</i> infection detected in a patient with a mycotic aortic aneurysm - raising a rebellion of major indigenous bacteria in humans: a case report and review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12879-021-06345-8	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 -

1. 著者名 Kakuta Risako, Nakano Ryuichi, Yano Hisakazu, Ozawa Daiki, Ohta Nobuo, Matsuoka Takayuki, Motoyoshi Naotaka, Kawamoto Shunsuke, Saiki Yoshikatsu, Katori Yukio, Kaku Mitsuo	4. 巻 40
2. 論文標題 First Two Cases of Infected Aortic Aneurysm Caused by Non-Vaccine <i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotype 23A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 270 ~ 270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3343/alm.2020.40.3.270	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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------