

令和元年6月4日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20261

研究課題名(和文) 眼表面の細菌叢の静的状態および動的反応からさぐる新たな眼感染症の治療法

研究課題名(英文) The novel treatment of ocular infections that seeks from the static state and dynamic response of the bacterial flora of ocular surface

研究代表者

佐々木 慎一 (SASAKI, Shin-ichi)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30745849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：白内障術後眼内炎の予防対策として既存の術前滅菌法に代替しえる手法を確立し、その評価を行った。感染対策手法の有効性を術後眼内炎発症率を指標にメタ解析を用いて解析した結果、抗菌薬の前房投与の有効性ももっとも有意であった。つぎに抗菌薬前房投与の功罪を毒性面を含め分子免疫学的に評価した。眼表面の細菌叢の状態を把握するため、細菌16S r-DNAを指標に、角膜や眼感染症における細菌の動態を質的かつ量的に評価した。その結果、16S r-DNA定量及びその配列解析により有効な診断手法となりえることが判明した。さらに、若年者における角膜感染の主要な原因となりえるCL関連汚染につながる因子群を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

眼科領域における新たな眼感染症の治療法の確立を目指して検討を行って得られた知見は、以下の点で学術的意義や社会的意義があると思われた。
即ち白内障手術における術後眼内炎予防に、消毒薬の眼内毒性、抗菌薬の細胞への毒性や炎症惹起反応を考慮して、有効かつ安全性の高いプロトコルが立案できる可能性があること。
また感染性角膜炎の診断の手順として16S ribosomal DNAのシーケンシングによる細菌の同定の知見をもとに、人工知能モデルを用いてさらに簡便な診断方法を確立できる可能性があることである。

研究成果の概要(英文)：As a preventive measure for postoperative endophthalmitis, we established the intraoperative timely iodine irrigation method and evaluated its efficacy. Preventive measures were evaluated for efficacy in reducing incidence of endophthalmitis using network meta-analysis of previous literatures. Meta-analysis indicated that intracameral antibiotics was highly efficacious in reducing incidence of endophthalmitis. Toxic or inflammatory aspect of these intracameral antibiotics were assessed. To understand the state of the bacterial flora on the ocular surface, the dynamics of bacteria in corneal or ocular infections were evaluated using bacterial 16S r-DNA. We found 16S r-DNA quantification and sequencing analysis combined with conventional microbial testing is very effective diagnostic measure. To assess major cause of corneal infection in young subjects wearing contact lenses, we evaluated and identified a group of factors leading to contact lens-related contamination.

研究分野：眼科学

キーワード：白内障術後眼内炎予防 術前滅菌法 眼表面細菌叢動態 16S ribosomal DNA 抗菌薬前房内投与 角膜感染症

1. 研究開始当初の背景

白内障術後合併症の適切な予防は、眼科医にとって共通の課題である。白内障術後眼内炎は、白内障術後合併症の中でも最も重篤な合併症であり、その予防のため、本邦においては、術前滅菌法が普及しつつある。しかしながら、その他の予防手段も乱立する中で、至適化された予防手段が達成できているとは言いがたい。こうした予防対策の至適化には、眼表面の細菌叢の動的および静的な状態の把握が必須であると考えられる。つまりこうした細菌叢の理解により、より適切な術後感染症対策の開発につなげることができると考えられた。

一方、若年者の角膜感染症においては、コンタクトレンズ装用が大きな原因となっている。これまで、コンタクトレンズの汚染に関しては、国民生活センターを含めた多施設共同研究をおこなってきた。その結果、約一割のコンタクトレンズケースは、アカントアメーバDNAに汚染されていることを報告してきた。しかしながら、CLに関連して角膜感染症を発症しやすくする因子の詳細は明らかではなく、これらを明らかにすることは、重篤な角膜感染症の重要な予防対策となりえると考えられた。

また、これまで我々の施設においては、臨床サンプルを含め、角膜細菌感染症の診断には、さまざまな病原体real-time PCR法を確立し、臨床診断及びマネージメントに応用してきた。特に細菌感染に関連しては、16S r-DNAを用いた細菌DNA検査が有用であると想定されてきたが、臨床においていかなる意義があるのか、あるいはいかに運用していけばよいのかに関しては明らかではなかった。

2. 研究の目的

眼表面の細菌叢の状態を把握するため、細菌 16S r-DNA を指標に、角膜や眼感染症における細菌の動態を質的かつ量的に把握し恒常状態に加えて、刺激や治療に対する動的反応を解明する。これにより、難治性角膜感染症や術後眼内炎の発症機序および治療、さらに予後に関与する因子を抽出し、より適切なマネージメントの確立と恒常性維持のメカニズムを明らかにすることで、新規治療法の可能性をさぐることを目的とする。

(1) 正常及び病的な眼表面の細菌叢を細菌16S r-DNAを指標として明らかにする。さらに年齢・生活環境・病的状態あるいは抗菌薬投与を含めた治療に対して16S r-DNAとしての細菌叢がどのように変動するかを明らかにする。

(2) 難治性角膜感染症や眼内炎を引き起こしやすい結膜細菌叢の状況、および感染症の早期診断方法、術後眼内炎発症予防プロトコルを検証し、適切な治療指針を提案する。

(3) 細菌叢由来のシグナルと宿主側の制御機構を細胞間・細胞内の伝達シグナルを検討することで、病態の探索を図る。

3. 研究の方法

眼表面の細菌叢を16S r-DNAを指標にしてその詳細を明らかにし、年齢や生活環境あるいは病的状態、抗菌薬投与・眼科手術を含めた治療に反応して細菌叢がいかに応答するかを解析し、

リスク因子の同定、さらには新たな眼内炎予防および感染対策手法の提案を試みる。

細菌叢、真菌叢の検索には、培養検査に加え、16S r-DNA定量、16S r-DNA領域のクローニングおよびsequencingを用いておこなう。クローニングを含めた手法により、多様性の高いと判明した細菌叢の解析には次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を行う。メタゲノム解析は、細菌叢のゲノムを培養に依存することなく網羅的に解析するものであり、培養法の不明なものも含め試料中に含まれる細菌の種類や比率を検索することが可能である。つぎにこれらを種々の臨床データとともに主成分分析、多変量重回帰分析を行うことにより種々のリスク因子の検証を行う。

術後眼内炎を予防する上で、周術期をいかに管理すべきかのベースとなるデータの蓄積は十分でない。レボフロキサシン点眼を術前3日前より開始する術前滅菌法は研究協力者の井上らが報告し、さらに手術直前に行われる眼表面のヨード製剤による洗眼も全国で多用されている。そこで現在当院において施行している周術期プロトコル、さらに前房内抗菌薬投与、術中ヨード洗眼法を用いた場合の細菌量および細菌叢の変化を定量および定性的に評価する。汚染度は、16S ribosomal DNA定量を用いて評価し、白内障術中や術前マネージメント手法の評価を試みる。

次にこれら微生物に対する宿主側の認識レセプターを介した応答を明らかにする。このためには、各種微生物のもつpathogen specific molecular patternに属する分子群が宿主の免疫反応をいかに制御しえるのか明らかにしていく。これらにより、細菌感染後、治療経過を含め恒常性の破綻に寄与しえる要因を明らかにする。

4. 研究成果

正常者における眼表面の細菌叢の動態をまず理解するため、白内障手術をうける患者の眼表面の細菌量変化の動態を16S ribosomal DNAを対象として解析した。手術開始直前では、結膜嚢から培養陽性かつ多くの細菌が認められたが、術野のsetting後は、開始前の15%程度までただちに減少し15分の手術時間中低い数値が維持された。このことより、術中においては、灌流により清潔度の高い環境が維持されやすいことが判明した。術直前の眼表面には多くの細菌のcolonizationがあることから、これらをいかに清潔度の高い状態にかえることができるかを検討した。術中においては、とくにcriticalステップにおいて滅菌を徹底することに清潔度の維持がたもちやすいことを考慮し、Timely iodine法を提案し、その有効性を報告した。Timely iodine法は、開瞼器をかけた直後と10Lを挿入する直前のステップのみにヨード灌流を行う手法である。本手法は、頻繁なヨード使用による角膜上皮障害が予防できるのみならず、通常の施設においても簡便に応用可能であるというメリットがある。

本邦においては、術中感染対策として、術前滅菌法としてレボフロキサシン点眼の術前使用が広くおこなわれている。同様のプロトコルが抗VEGF硝子体注射の前処置としても推奨されているが、近年米国ではこのような使用は耐性菌の増大を誘導する可能性があり、必ずしも推奨されないとの提案がされるようになった。そこで、考案したTimely iodine法による滅菌をはか

った場合、どの程度術野を清潔にできるかを評価した。対照は、術前抗菌薬投与眼であり、術野からの細菌検出を指標に同等性試験として評価した。その結果、Timely iodine 法による術野からの細菌培養陽性率は、術前滅菌法とまったく同等であることが判明した（投稿中）。このことは、術前滅菌法に頼らずとも術野の清潔度はTimely iodine 法により改善できることを示していた。

これまで、白内障術後の眼内炎予防のために、前述の手法を含め様々なプロトコールが用いられてきており、多数例の報告がある。しかしながらその優劣は明確ではない。そこで様々なプロトコールの有効性をネットワークメタ解析により検証した。その結果眼内炎頻度減少に大きく寄与していたのは抗菌薬の前房内投与であり、中でもヨーロッパで広く行われているセフロキシムがもっとも有意となり、モキシフロキサシンがこれに続いて術前抗菌薬の点眼よりも有効な結果となった。とくに欧米ではセフロキシム前房内投与が広く行われており、その高度な有意性は N の大きさによる可能性はあるが、前房内投与は眼内炎発症率を下げるうえでは適切な選択枝である可能性が示唆された。

しかし、これらは日本で認可された方法ではないため、術中術後の検出菌や菌量を指標に新たなプロトコールを提案する必要性が示唆された。また、まれではあるものの抗菌薬の前房内投与による出血性閉塞性網膜血管炎の発症が報告されている。投与後、1 - 2 週後に遅発性に発症することから補体を含めた免疫学的機序が想定されているがその詳細は明らかではない。そこで我々は細菌表面の pathogen molecular pattern に着目し、抗菌薬に加えこれらが免疫応答をいかに誘導し得るのかの解析を始めた。網膜血管内皮細胞はこれらの刺激に迅速に反応し、多量の IL-8 を分泌しえることを見いだした（投稿準備中）。特に IL-8 は強いマクロファージや白血球遊走の刺激作用をもつのみならず、浮腫の増強や血管新生を誘導する作用があり、感染あるいは抗菌薬投与後の局所の免疫学的環境に大きく寄与する可能性が示唆された。

次に病原性細菌と常在細菌叢の関連性を検討するため、実際に細菌感染が疑われる眼表面の 16S ribosomal DNA 量を 272 例 272 眼の患者を対象として、16S r-DNA を測定し評価を行った。とくに多様な細菌叢が想定された症例あるいは、一万 copy をこえる量の細菌量が検出された症例は全例、16S r-DNA 領域を増幅後、クローニングを行いシーケンシングによる解析を行った。細菌性感染性角膜炎の診断は、熟練した評価者 3 人にくわえ、教師無し学習法（潜在クラス解析）を用いて、確定、おそらく、非細菌性の分類を行い評価者及び潜在クラス解析の結果が一致したもののみを対照により詳細な評価を行った。16S r-DNA の診断精度を Receiver Operating Characteristic 解析を用いた場合、AUC は 0.67 となり、培養の 0.65、塗抹の 0.73 と比較して大きな差は認めなかった。しかしながら、これらの検査群はまったく異なる指標をみているため、これらを組み合わせることにより AUC は 0.81 まで改善し、有効な検査手段となり得るレベルとなった。以上の結果より 16S r-DNA 評価は、古典的な検査手法とあわせて評価することにより、さらに診断精度を上げることができると考えられた（投稿中）。さらに 16S r-DNA 定量にクローニング、シーケンシングを組みあわせることにより詳細な感染菌の把握が可能であり、臨床的な有用性が高いと考えられた。

そこでコンタクトレンズ装用者における細菌叢の変化と感染につながるリスク因子を同定することを目的に、正常なコンタクトレンズ (CL) 装用者より回収したケースの汚染状態を評価した。まず、16S r-DNA 定量による評価を行った結果、CL ケースは非常に多くの細菌に汚染されていることが判明した。16S r-DNA 量を汚染量の指標として、多変量解析および構造方程式モデリングによる解析をおこなった結果、汚染に強く関連していたのは、ケースの感想状態や使用前の手洗いの状態、長期使用であり、これらの管理を徹底することにより汚染を減らしえること、さらに角膜感染のリスクを減らしえることが判明した (投稿準備中)。

以上の解析により、CL ケースは多様な細菌叢に汚染されていることから、これらを用いて次世代シーケンサーによるメタゲノムの検索により検証した。特に CL 関連の感染症としてはアカントアメーバ感染が重篤であり、アカントアメーバ汚染がいかにおこりえるかを定量 PCR 法を併用して検証した。その結果、アカントアメーバ PCR 検出の有無において、細菌 DNA copy の違いは認めなかったが、アカントアメーバ copy 数増大には Actinomyces をはじめ多くの菌種が有意な相関を示した。また、多様性の指標であるシャノン係数もアカントアメーバ PCR 陽性例で有意に増大し、アメーバ qPCR 陽性例では、特定の菌種にとどまらない多様な細菌叢による汚染を呈していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1) Effectiveness of timely intraoperative iodine irrigation during cataract surgery.
Kazuki Matsuura, Dai Miyazaki, Shin-ichi Sasaki, Keiko Yakura, Yoshitsugu Inoue, Masako Sakamoto

Japanese Journal of Ophthalmology、査読有、60(6)、2016

DOI: 10.1007/s10384-016-0471-z

6 . 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 井上 幸次

ローマ字氏名: (INOUE, yoshitsugu)

研究協力者氏名: 宮崎 大

ローマ字氏名: (MIYAZAKI, dai)

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。