

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08633

研究課題名(和文) 急性胆道炎に対する自動多項目同時遺伝子システムを用いた新規起因菌同定法の開発

研究課題名(英文) Quick detection of causative bacteria in cases of acute cholangitis and cholecystitis using a multichannel gene autoanalyzer

研究代表者

浅井 浩司 (ASAI, Koji)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：20366454

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)：目的：急性胆道炎の胆汁細菌の迅速診断を試みた。対象：当科で経験した108例の急性胆道炎の胆汁に関して、全自動遺伝子検査システムであるVerigeneの評価を行った。

結果：胆汁細菌陽性例のうち、Verigeneによる細菌同定率は35.7%であった。胆汁細菌陽性率は細菌量が10 colony-forming unit (CFU)/mL以上で有意に検出率が増加した(58.1%)。複数菌検出例ではVerigene同定率が低下する傾向を認めた。結語：Verigeneによる迅速細菌同定法は急性胆道炎における新たな起因菌同定法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかとなっていなかった全自動遺伝子検査システム(Verigene)を使用し急性胆道炎症例の胆汁評価を行った。高い検出率を期待したが、細菌量が少ない場合や複数菌が検出された場合は検出率が低下した。次世代の迅速細菌同定法の評価を行うことができ、今回の結果は今後の臨床応用に寄与できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Purposes: In this study, we evaluate the use of a multichannel gene autoanalyzer (Verigene system) for the quick detection of causative bacteria in cases of acute cholangitis and cholecystitis. Methods: This study included 108 patients diagnosed with acute cholangitis or cholecystitis. Bacterial culture test and Verigene assay were used to evaluate the bile samples.

Results: Among patients with positive bile cultures, bacteria were detected in 35.7% of cases via the Verigene system. The detection rates of the Verigene system significantly increased when the number of bacterial colonies was 10 colony-forming unit (CFU)/mL (58.1%). Cases with a maximum colony quantity of 10 CFU/mL exhibited higher inflammation, suggesting the presence of bacterial infection. Conclusions: The Verigene system might be a new method for the quick detection of causative bacteria in patients with infectious acute cholangitis and cholecystitis.

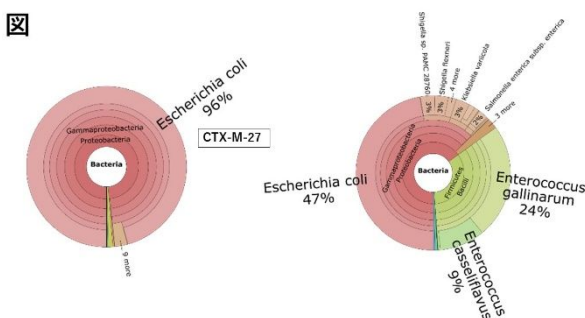
研究分野：消化器外科

キーワード：急性胆道炎 全自動遺伝子検査システム 胆汁細菌

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌の世界的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（急性胆管炎・急性胆嚢炎）の起因菌として検出頻度の高い腸内細菌においても、薬剤耐性菌の検出頻度は増加傾向にある。例えば、急性胆道炎の起因菌として高率に検出される *Escherichia coli* や *Klebsiella spp.* においても、近年では高率に extended spectrum β -lactamase (ESBL) 産生菌が検出される。これらの細菌は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が期待できない。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おり、今後これらの耐性菌がさらに増加することが予想される。また、国内においては徐々に進んでいる高齢化に伴い、薬剤耐性菌が高率に検出される医療関連感染の増加も危惧される。このように本邦における各医療施設では、細菌感染症に対する診断技術の向上、予防対策や治療指針の決定により細菌感染症治療成績の向上、薬剤耐性菌蔓延予防に寄与していくことが求められている。

従来の細菌感染症起因菌同定および薬剤感受性試験はゲノム解析技術の発展に伴って変革を遂げてきた。特に次世代シーケンサーの登場によって短時間で大量の塩基情報を解読することが可能となり、不明感染症の起因菌診断、迅速診断への応用が期待されるようになった。これまでわれわれは急性胆道炎症例にメタゲノム解析を行い、24 時間以内に従来の細菌検査と一致した結果を網羅的に得られることを確認したが、ESBL 産生菌の同定にはさらに 24 時間を要した (Kujiraoka M 2017 *Front Microbio*) (図左：24 時間で大腸菌を同定できたが、ESBL の遺伝子型 CTX-M-27 を



得るまでにはさらに 24 時間を要した。図右：細菌培養では大腸菌のみが検出されたが、メタゲノム解析では *Enterococcus* 属も同定できた。従来の細菌検査法よりは短時間で細菌同定・耐性状況を確認できるメタゲノム解析であるが、このタイムロスには容易に敗血症に陥る可能性のある一刻を争う急性胆道炎においては致命的となる可能性がある。よって、メタゲノム解析よりも、さらに一層迅速に起因菌を同定し、かつその耐性状況を判別するための技術確立に向けた基礎的研究の遂行は急務と考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は新たな迅速起因菌同定システムの構築である。今回、ナノスフィア社が開発した自動多項目同時遺伝子検査システムである「Verigene[®]」システムを使用し、急性胆道炎症例より採取された検体（胆汁、血液など）の評価を行う研究を立案した。Verigene[®]システムに用いる診断キットは既に体外診断用医薬品として承認されており（承認番号：22800EZX00025000）、菌血症が疑われる血液培養ボトルから起因菌を同定し、かつ薬剤感受性を推定する迅速システムとして保険収載されている。

現在、臨床で通常行われている検査法では、検体採取、細菌検査提出、起因菌同定から薬剤感受性の結果までを得るのに 5 日前後を要するところ、本システムを用いることにより 3 時間以内に解析・同定できる。Verigene[®]システムを用いた急性胆道炎（胆汁）への応用はこれまで報告されていないため、本研究の独自性は極めて高いと言える。さらに、本研究では Verigene[®]システムの解析結果と通常の細菌検査結果との対比を行うのみではなく、これまでわれわれが解析を行ってきた次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析による検査も併用することにより、薬剤耐性菌について遺伝子型を含めた詳細な評価が可能である点も本研究の学術的特徴である。また、現在の Verigene[®]システムはメタゲノム解析と比較し、検査手技が容易で、かつ迅速評価が可能であるが、実際に臨床で用いる場合は 1 検体あたりの検査費用（消耗品費用）が高額である点が問題である。今回の研究を基盤とし、より安価な診断キットの作成へ繋げていくことも視野に入れており、今後の医療経済上に寄与することが期待される。さらに、胆汁検体で問題なく検査可能であれば、その他の腹部急性感染症（汎発性腹膜炎、腹腔内膿瘍など）への適応拡大も検討していく。このように本研究は消化器外科領域における急性感染症検査法を革新していく創造性に富んだ研究と言える。

3. 研究の方法

本研究は国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターとの共同研究である。Verigene[®]は 3 年間の期限で賃借し、qPCR 法、メタゲノム解析を行うための次世代シーケンサー等の設備・機器は連携協力施設設置物品を使用するものとする。

【2018 年度】

<目標症例数>

後述する事前検査を既に 50 例行っていることから、目標症例数を 100 症例とする。

<検体採取方法>

経皮的あるいは内視鏡的に胆汁を無菌的に採取する。敗血症が疑われる症例では血液培養検体も採取する。採取した検体は嫌気ポーター3本に直ちに分注し、1本は通常の院内細菌検査室へ提出し、他2本は Verigene[®]解析用とメタゲノム解析用に保管する。

<Verigene[®]システムを用いた迅速起因菌同定>

嫌気ポーターへ分注した検体を2時間培養した後に Verigene[®]システムを用いて解析し、起因菌および薬剤耐性遺伝子の有無に関する結果を得る。全ての検体は -20℃ で冷凍保存を行った後に国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターへ搬送し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行う。

【2019, 2020 年度】

症例集積終了後に迅速起因菌同定、耐性菌遺伝子型同定の正確性に関する解析を行う。正確性に関して問題がないことを判定した後、他施設における同様の検体評価を行う。院外協力施設として国立病院機構東京医療センター外科、東京医科大学病院外科（本院、茨城医療センター）、昭和大学病院外科（本院、藤が丘病院）の5施設において研究協力の同意を既に得ている。目標症例数は全施設を合わせて 100 例とする。

<解析項目>

1. Verigene[®]システムによる細菌、薬剤耐性状況と院内細菌検査結果、メタゲノム解析結果との同一性の確認。検体の種別による結果の比較。
2. 使用抗菌薬（抗菌薬種類、投与期間など）と検出細菌の特性（検出細菌、薬剤感受性結果、薬剤耐性菌遺伝子型）との関連性の評価。
3. 症例疾患別、重症度別に検出細菌、薬剤耐性状況を評価し、そのアウトカム（生存、死亡、入院期間、費用など）を評価する。医療関連感染症例に関しては分けて評価する。得られた本研究成果に関連する知見に関しては、可能な限り早急に国内外の感染症および外科領域の関連学会誌にて公表する。さらに、研究室ホームページに掲載し広く情報を一般に提示するとともに、市民公開講座でもその詳細を報告する。

4. 研究成果

当科で経験した急性胆道炎症例 108 例を対象とした。56 例(51.9%)に胆汁中に細菌を認めた。胆汁細菌陽性例のうち、Verigene による同定可能であった症例は 10 例(35.7%)であった。ESBL 産生菌は 6 例中 4 例が検出可能であった。単数菌検出例では 42.4%の同定率であったが、複数菌検出例では 26.1%に同定率が低下した。細菌量が 10⁶CFU/mL 以上認めた症例は有意に同定率が増加した。細菌量が 10⁶CFU/mL 以上に認めた症例は CRP 値が高値であり、有意な細菌感染を認める急性胆道炎発生例である可能性が示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Ryutaro Watanabe, Koji Asai, Makoto Kuroda, Manabu Kujiraoka, Tsuyoshi Sekizuka, Miwa Katagiri, Nanako Kakizaki, Hodaka Moriyama, Manabu Watanabe, Yoshihisa Saida	4. 巻 -
2. 論文標題 Quick detection of causative bacteria in cases of acute cholangitis and cholecystitis using a multichannel gene autoanalyzer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 0件／うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Asai K, Watanabe M, Kujiraoka M, Moriyama H, Kakizaki N, Saida Y
2. 発表標題 Operative results for acute cholecystitis according to the operative timing using propensity score matching
3. 学会等名 31th Meeting of Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kujiraoka M, Kuroda M, Asai K, Watanabe M, Moriyama H, Enomoto T, Saida Y
2. 発表標題 Comprehensive analysis of 103 cases of acute cholecystitis and cholangitis using metagenomic approach
3. 学会等名 The International College of Surgeons, The 65th Annual Congress of the Japanese Section (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe R, Kuroda M, Kujiraoka M, Asai K, Watanabe M, Katagiri M, Moriyama H, Kakizaki N, Saida Y
2. 発表標題 A study of 103 cases with acute cholecystitis and cholangitis using multichannel gene autoanalyzer
3. 学会等名 The International College of Surgeons, The 65th Annual Congress of the Japanese Section (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asai K, Watanabe M, Kujiraoka M, Moriyama H, Watanabe R, Kakizaki N, Teraoka S, Katagiri M, Enomoto T, Saida Y
2. 発表標題 Instruction of laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis using single-incisional laparoscopic surgery device
3. 学会等名 The 7th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association (A-PHPBA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe R, Kuroda M, Kujiraoka M, Asai K, Watanabe M, Katagiri M, Moriyama H, Kakizaki N, Saida Y
2. 発表標題 A study of 105 cases with acute cholecystitis and cholangitis using multichannel gene autoanalyzer
3. 学会等名 The 7th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association (A-PHPBA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kujiraoka M, Kuroda M, Asai K, Watanabe M, Moriyama H, Watanabe R, Saida Y
2. 発表標題 Comprehensive diagnosis of 103 cases of acute cholecystitis and cholangitis using a metagenomic analysis
3. 学会等名 The 7th Biennial Congress of the Asian-Pacific Hepato-Pancreato-Biliary Association (A-PHPBA 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井浩司, 高田忠敬, 岡本好司
2. 発表標題 特別企画1「新たに改訂されたTG18: ここがポイント」TG18 急性胆嚢炎の診療フローチャート
3. 学会等名 第55回日本胆道学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 鯨岡 学, 森山穂高, 渡辺隆太郎, 柿崎奈々子, 片桐美和, 榎本俊行, 桐林孝治, 二渡信江, 斉田芳久
2. 発表標題 単孔式内視鏡外科手術デバイスを用いた急性胆嚢炎に対する早期腹腔鏡下胆嚢摘出術
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 鯨岡 学, 森山穂高, 渡辺隆太郎, 寺岡晋太郎, 柿崎奈々子, 片桐美和, 榎本俊行, 桐林孝治, 斉田芳久
2. 発表標題 急性胆嚢炎に対して早期腹腔鏡下胆嚢摘出術を基本的治療方針としている当科の治療成績
3. 学会等名 第32回日本外科感染症学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 鯨岡 学, 森山穂高, 渡辺隆太郎, 柿崎奈々子, 片桐美和, 榎本俊行, 桐林孝治, 二渡信江, 斉田芳久
2. 発表標題 急性胆嚢炎に対する早期腹腔鏡下胆嚢摘出術の治療成績と最近の工夫
3. 学会等名 第32回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 鯨岡 学, 森山穂高, 渡辺隆太郎, 柿崎奈々子, 片桐美和, 榎本俊行, 桐林孝治, 二渡信江, 斉田芳久
2. 発表標題 急性胆嚢炎の腹腔鏡下胆嚢摘出術における開腹移行の危険因子に関する検討
3. 学会等名 第32回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asai K, Watanabe M, Saito T, Kujiraoka M, Moriyama H, Katagiri M, Enomoto T, Saida Y, Kusachi S
2. 発表標題 Timing of laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis using propensity score matching
3. 学会等名 International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists Continuing Medical Education: Advanced Post-Graduate Course in Tokyo 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kujiraoka M, Kuroda M, Asai K, Watanabe M, Matsukiyo H, Saito T, Moriyama H, Saida Y, Kusachi S
2. 発表標題 Comprehensive diagnosis and severity evaluation for acute cholecystitis using metagenomic approach
3. 学会等名 International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists Continuing Medical Education: Advanced Post-Graduate Course in Tokyo 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kujiraoka M, Kuroda M, Asai K, Watanabe M, Matsukiyo H, Saito T, Moriyama H, Enomoto T, Okamoto Y, Saida Y, Kusachi S
2. 発表標題 Comprehensive diagnostic method for acute cholecystitis using metagenomic approach
3. 学会等名 The International College of Surgeons, The 64st Annual Congress of the Japanese Section (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asai K, Watanabe M, Saito T, Kujiraoka M, Moriyama H, Enomoto T, Saida Y, Kusachi S
2. 発表標題 Instruction of laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis using single-incisional laparoscopic surgery device
3. 学会等名 The 13th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kujiraoka M, Kuroda M, Asai K, Watanabe M, Matsukiyo H, Saito T, Moriyama H, Saida Y, Kusachi S
2. 発表標題 Comprehensive analysis for acute cholecystitis using metagenomic approach
3. 学会等名 The 13th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 齋藤智明, 鯨岡 学, 森山穂高, 片桐美和, 榎本俊行, 桐林孝治, 二渡信江, 斉田芳久, 草地信也
2. 発表標題 急性胆嚢炎に対する早期腹腔鏡下胆嚢摘出術の現状と安全性の評価
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井浩司, 岩下幸雄, 本田五郎, 梅澤昭子, 若林 剛, 高田忠敬
2. 発表標題 手術困難とは?そして危険回避手術とは?
3. 学会等名 第31回日本外科感染症学会総会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 齋藤智明, 鯨岡 学, 森山穂高, 片桐美和, 榎本俊行, 桐林孝治, 二渡信江, 斉田芳久, 草地信也
2. 発表標題 急性胆嚢炎に対して早期腹腔鏡下胆嚢摘出術を基本的治療方針としている当科の治療成績
3. 学会等名 第31回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 齋藤智明, 鯨岡 学, 森山穂高, 片桐美和, 榎本俊行, 桐林孝治, 二渡信江, 斉田芳久, 草地信也
2. 発表標題 急性胆嚢炎に対する安全な早期腹腔鏡下胆嚢摘出術を目指したわれわれの工夫
3. 学会等名 第55回日本腹部救急医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 松清 大, 齋藤智明, 鯨岡 学, 森山穂高, 片桐美和, 榎本俊行, 斉田芳久, 草地信也
2. 発表標題 急性胆嚢炎に対する腹腔鏡下手術における単孔式腹腔鏡下手術用デバイスを応用した手術指導の工夫
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊 学, 松清 大, 齋藤智明, 鯨岡 学, 森山穂高, 片桐美和, 榎本俊行, 斉田芳久, 草地信也
2. 発表標題 術者別に見た急性胆嚢炎に対する腹腔鏡下胆嚢摘出術の治療成績の検討
3. 学会等名 第16回日本消化器外科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅井浩司, 黒田 誠, 渡邊隆太郎, 鯨岡 学, 片桐美和, 柿崎奈々子, 森山穂高, 榎本俊行, 桐林孝治, 二渡信江, 長田拓哉, 渡邊 学, 斉田芳久
2. 発表標題 急性胆嚢炎に対する早期腹腔鏡下胆嚢摘出術を基軸とした治療戦略と自動多項目同時遺伝子検出システムを用いた早期起因菌同定法
3. 学会等名 第33回日本外科感染症学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Watanabe R, Asai K, Kujiraoka M, Moriyama H, Watanabe M
2. 発表標題 Rapid detection of causative bacteria in case of acute cholangitis and cholecystitis using a multichannel gene autoanalyzer
3. 学会等名 第32回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井浩司, 黒田 誠, 渡邊隆太郎, 鯨岡 学, 森山穂高, 寺岡晋太郎, 柿崎 奈々子, 片桐美和, 榎本俊行, 桐林孝治, 二渡信江, 渡邊学, 齊田芳久
2. 発表標題 急性胆道炎における自動多項目同時遺伝子検出システムによる早期起因菌同定法
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asai K, Watanabe M, Kujiraoka M, Moriyama H, Watanabe R
2. 発表標題 Early laparoscopic cholecystectomy using the bailout procedure for acute cholecystitis with severe local inflammation
3. 学会等名 第32回日本肝胆膵外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井浩司, 渡邊学, 森山穂高, 鯨岡 学, 渡邊隆太郎, 柿崎奈々子, 寺岡晋太郎, 榎本俊行, 二渡信江, 齊田芳久
2. 発表標題 急性胆嚢炎に対する早期腹腔鏡下胆嚢摘出術-積極的にFundus first techniqueを行っている当科の治療成績
3. 学会等名 第33回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2021年

〔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	鯨岡 学 (KUJIRAOKA Manabu) (00807092)	東邦大学・医学部・助教 (32661)	
研究 分担者	片桐 美和 (KATAGIRI Miwa) (90385667)	東邦大学・医学部・助教 (32661)	

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