

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08305

研究課題名（和文）Tm mapping法による肝硬変腹水中の細菌の同定・定量と自然免疫応答の解析

研究課題名（英文）Analyses of immune response and bacteria in cirrhotic ascites with Tm mapping method.

研究代表者

田尻 和人 (Tajiri, Kazuto)

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：30512165

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）：有腹水肝硬変患者の腹水中の細菌をTm mapping法を用いて解析し、従来の特発性細菌性腹膜炎（SBP）の診断法である、腹水中好中球数、腹水細菌培養と比較検証した。また腹水中のサイトカインを測定し、腹水中のマクロファージ、好中球についてFACS解析を行った。培養法に比しTm mapping法ではより多くの細菌反応が検出され、培養に比し優れた感度が示された。腹水中のIL-6、IL-1bは増加し、腹水中のM1マクロファージが増加していた。今回の検討からSBPと診断される以前からIL-6が腹水中で増加しており、肝硬変患者の病態形成に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変症では腹水、特発性細菌性腹膜炎を含めた様々な合併症を発生するが、その診断、病態解明などには改善の余地が残されている。今回の検討では新規細菌同定法であるTm mapping法により腹水中の細菌の同定を行い既存の培養法より感度よく細菌の同定が可能であった。これは肝硬変合併症の診断、予後の改善につながる結果である。また細菌が腹水中に移行することで、肝硬変合併症の病態形成に寄与することを見出した。肝硬変の病態形成の解明につながる結果である。

研究成果の概要（英文）：We evaluated cirrhotic ascites with Tm mapping method and evaluated it with usual test such as culture or blood test method. Furthermore, cytokines and flow cytometric analyses were evaluated in ascites. Tm mapping method showed higher sensitivity than culture method, IL-6 and IL-1b were increased, and M1 macrophages were increased in cirrhotic ascites. Present study suggested that proinflammatory cytokines are produced from M1 macrophages before the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis and contribute to the pathogenesis of cirrhotic complications.

研究分野：肝硬変症の管理

キーワード：特発性細菌性腹膜炎 肝硬変症 肝硬変合併症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

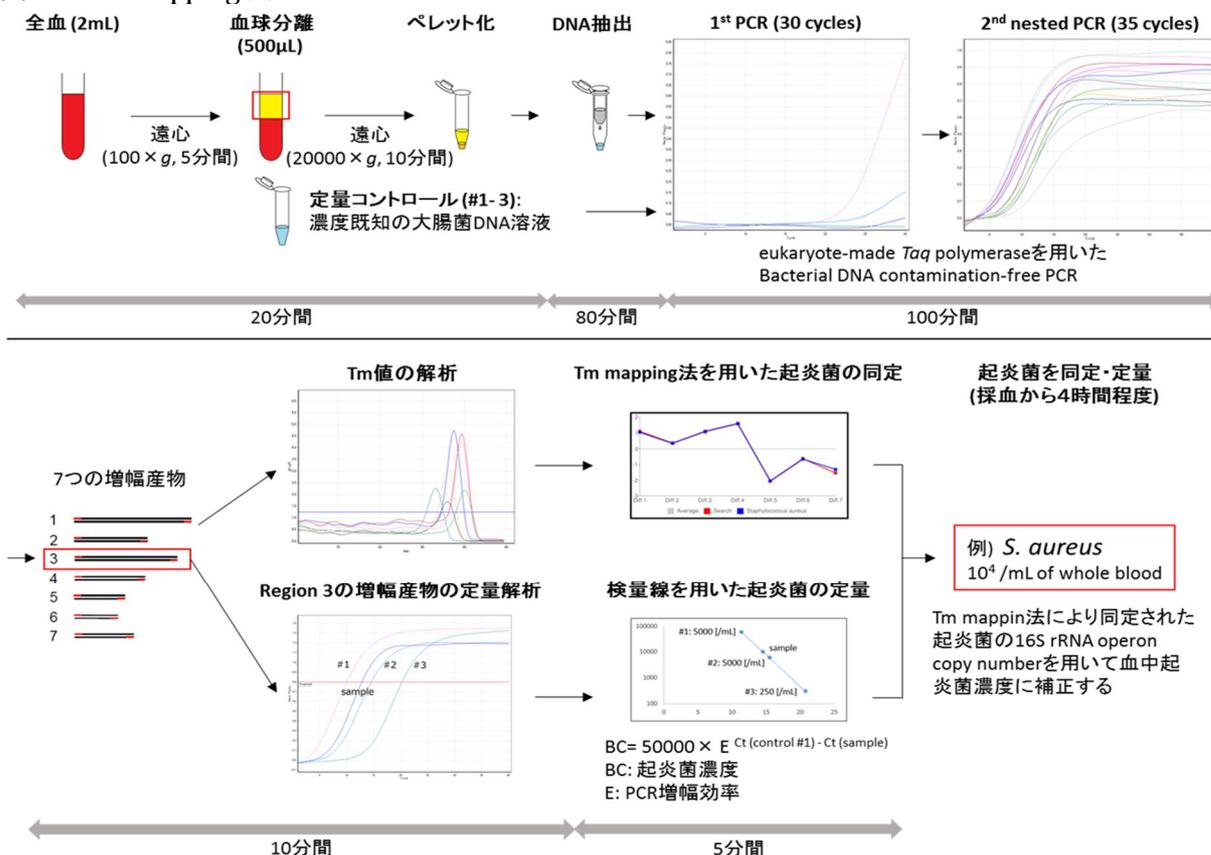
1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルスやB型肝炎ウイルスによる肝炎ウイルス感染による肝炎は本邦を含むアジアで頻度の高い疾患であり、その持続感染の結果、肝硬変・肝細胞癌に至る。また近年では肝炎ウイルス感染は治療法の発達などにより減少傾向もみられているが、脂肪肝やアルコール性などの非肝炎ウイルス性の肝硬変は増加傾向にある。

肝硬変症は不可逆的な病態と考えられ、腹水、易感染性、肝性脳症、消化管出血など様々な合併症を併発し、死亡リスクも高い。そのうち腹水は最初に出現する頻度の高い合併症であるが、有腹水患者においては特異性細菌性腹膜炎(Spontaneous Bacterial peritonitis, SBP)の発症が知られており、SBPを発症すると、肝腎症候群などの腎障害の続発症もみられ、肝硬変患者の予後は急速に悪化することが知られている。SBPの診断には腹水中の細菌培養陽性、腹水中の好中球 250/ μ L が用いられているが、腹水細菌培養の陽性率は 10-20%以下と低く、その診断は困難なことも多い。SBP から他臓器障害に至る原因も感染に伴う血管内脱水などの機序が想定されているが、細菌培養の陽性率も低いことからその病態の把握は十分にできていない。

当院の臨床検査部の Niimi らは細菌の共通領域に複数のプライマーを設定し PCR 反応を行い、その Tm パターンからデータベースを用いて細菌を同定し、同時に大腸菌換算の菌量の測定を最短 4 時間でを行う方法(Tm-mapping 法)を開発し、その有用性を報告している(図1)。(Niimi et al, J Clin Microbiol 2011, Niimi et al, Sci Rep 2015, Ueno et al, PLoS One 2015)

図1 Tm-mapping 法



肝硬変患者の腹水を Tm mapping 法を用いて解析することで SBP の診断能の改善のみならず、肝硬変合併症の病態解明につながる可能性がある。

2. 研究の目的

有腹水肝硬変患者の腹水中の細菌を Tm mapping 法を用いて検討し、SBP の診断への意義につき検討する。併せて腹水中のマクロファージ、好中球の応答、サイトカインの応答を解析し、肝硬変合併症の病態についての検討を行う。

3. 研究の方法

有腹水肝硬変患者の腹水検体を用いて、通常の腹水検査(生化、血算、培養)に加えて Tm mapping 法、腹水のサイトカインの ELISA 法による測定、腹水中細胞 FACS 検査を行い、臨床情報との関連や予後との関連を腹水採取から前向きに観察する。

【対象】

2019年10月から2022年12月までに当科を受診し、腹水穿刺を施行した有腹水肝硬変患者

【方法】

*前向き観察研究

*腹水採取の際に通常の腹水検査(生化学、血球、腹水培養)に加え、Tm mapping を施行し、細菌の検出率、培養検査との一致率を検討

*当院では腹水の好中球分画測定ができず、末梢血好中球分画割合から腹水白血球 ≥ 350 を好中球 ≥ 250 の代用とした

*腹水をFACS解析し、腹水マクロファージ、好中球分画を測定

*腹水のサイトカインのELISA解析(IL-6, IL-1b, IL-8)

*臨床情報、予後との関連についても検討

4. 研究成果

対象患者

対象患者は下記の表1の通りであり、肝線維化の進行し、予備能の低下した患者を多く含んでいた。

表1. 患者背景

	症例数、中央値(範囲)
年齢(yrs)	69(48-94)
性別(M/F)	16/11
Etiology(HBV/HCV/NASH/AL/Others)	2/3/7/8/7
HCC既往(yes/no)	8/19
食道静脈瘤(なし/F1/F2<)	14/2/11(治療歴6例)
WBC(/ μ L)	5940(2640-21900)
Plt(万/ μ L)	8.5(1.5-22.6)
CRP(mg/dL)	1.77(0.23-18.9)
Child-Pugh score	10(8-14)
Cre(mg/dL)	1.08(0.57-8.18)
ALBI	-0.89(-2.02-0.71)
MELD-Na	10.9(0.8-25.9)
Fib-4 index	6.83(1.46-41.51)
抗菌薬使用(yes/no)	15/12

腹水検査結果

通常の腹水検査結果は下記の表2の通りで、腹水中の白血球数からSBPと診断しえたのは14例であり、培養陽性となったのは3例のみであった。

表2: 腹水検査結果

	症例数、中央値(範囲)
腹水WBC(/ μ L)	330(30-13740)
腹水Total Protein(g/dL)	1.3(0.4-3.3)
腹水ALB(g/dL)	0.6(0.1-1.8)
腹水LDH(U/L)	70(32-371)
SAAG	1.6(0.8-2.4)
漏出性/滲出性	25/4
腹水培養	Enterococcus faecium 1, Klebsiella pneumonia 2

SBP診断におけるTm mapping法の有用性の検討

細菌培養で陽性となったのは3例のみで、その3例では腹水中WBCは350以上に上昇していた。腹水中のWBCが350以上に上昇している14例中、12例でTm mapping法で菌体反応が検出され、培養法に比し有意に細菌を検出していた。

細菌培養で検出された3例において2例で同一の検体がTm mapping法で同定され、残る1例では複数細菌が検出された。

さらに興味深いことに腹水中のWBCが350未満においてもTm mappingで細菌反応が検出された用

例が3例みられた。

腹水 FACS 解析とサイトカイン ELISA 解析

腹水の FACS 解析とサイトカイン ELISA 解析結果は下記表3の通りで、IL-6 や IL-1 β などの炎症性サイトカインの上昇している症例が認められ、またマクロファージがM1優位に上昇している症例がみられ、一部の症例で活性化好中球がみられた。

表3 , FACS, ELISA 解析結果

	中央値 (範囲)
IL-6 (pg/mL)	2,137 (0.2-45,442)
IL-1 β (pg/mL)	12.9 (0.8-1,028)
IL-8 (pg/mL)	2.21 (0.15-70.28)
M1 macrophage (CD11b+CD80+, %)	0.15 (0.0-4.0)
M2 macrophage (CD11b+CD163+, %)	0.05 (0.0-0.6)
M1/M2 ratio (%)	1.91 (0.20-20.0)
活性化好中球 (CD15+CD63+, %)	0.1 (0.0-1.0)

腹水中サイトカインや免疫細胞と腹水病態との関連

腹水中 IL-6 は腹水中 WBC, LDH, Tm mapping での細菌定量値と正の相関を示し (r=0.894, p<0.001; r=0.957, p<0.001; r=0.776, p=0.003, respectively) IL-1 β も同様 (r=0.913, p<0.001; r=0.755, p<0.001; r=0.973, p<0.001, respectively) であった。

腹水中マクロファージの M1/M2 比は Tm mapping 陰性と陽性で比較すると陽性例で有意に上昇しており、M1/M2 比は腹水中 IL-6 と正の相関を占め傾向 (r=0.366, p=0.078) がみられた。

腹水サイトカインと予後との関連

今回のコホートの全生存期間は中央値で 10.6 ケ月 (95% CI 1.6-19.2) であった。

多変量解析において腹水増加イベントと腹水 IL-1 β 、IL-6 は有意な関連が示されなかったが、全生存における多変量解析において IL-1 β が有意な因子 (HR 1.009 95%CI 1.003-1.015, p=0.005) として抽出された。

今回の検討のまとめと今後の展望

Tm mapping 法はこれまでに腹水細菌培養法に比し、最近の検出感度は有意に高く、SBP の新規診断法として有効性が示された。SBP の診断能の改善は肝硬変患者の予後改善に大きく寄与できる可能性がある。

また SBP と診断される以前から細菌の腹水中への移行が認められ、腹水中のマクロファージを介した病態形成の可能性が認められた。このことは肝硬変合併症の病態の解明につながる可能性があり、肝硬変患者の予後の改善につながることを期待される。

細菌や細菌成分によるマクロファージの活性化メカニズムや引き続き免疫応答は不明な部分もあり、今後 in vitro の検証などにより確認し、より詳細な病態解明につなげる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0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 田尻和人	4. 巻 139
2. 論文標題 肝性脳症患者に対する栄養療法と生活指導	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床栄養9月臨時増刊号 肝疾患エキスパートブック	6. 最初と最後の頁 464-467
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 無
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 田尻和人	4. 巻 5088
2. 論文標題 私の治療 脾腫	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 46
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 無
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 田尻 和人	4. 巻 62
2. 論文標題 肝硬変	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 人生の最終段階における薬の使い方&緩和ケア	6. 最初と最後の頁 83-88
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 無
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田尻和人、村山愛子、林 有花、安田一朗
2. 発表標題 肝硬変患者に対するリファキシミンの長期的効果の検討
3. 学会等名 第25回日本肝臓病学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田尻和人、村山愛子、林 有花、安田一郎
2. 発表標題 肝細胞癌患者における末梢血免疫細胞の病態および予後との関連の検討
3. 学会等名 第57回日本肝癌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田尻 和人
2. 発表標題 肝細胞癌の既往を有するHCV感染者に対するDAAs治療の意義についての検討
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻和人
2. 発表標題 慢性肝疾患管理におけるQOL評価とその有用性
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻和人、村山愛子、安田一郎
2. 発表標題 新規遺伝子解析法を用いた 特発性細菌性腹膜炎の診断の有用性の検討
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田尻和人、林 有花、村山愛子
2. 発表標題 腹水中のサイトカイン、マクロファージ解析からみた肝硬変の病態解析
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会ワークショップ
4. 発表年 2023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	仁井見 英樹 (Niimi Hideki) (50401865)	富山大学・学術研究部医学系・准教授 (13201)	

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