

平成 29 年 4 月 26 日

平成 28 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 大分大学 医学部附属病院 消化器・小児外科 助教
氏 名 平塚 孝宏

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 腸内正常細菌叢と手術部位感染原因菌のメタゲノム解析：国際多施設共同研究 (英文名) Metagenomic analysis of normal intestinal bacterial flora and surgical site infection-inducing bacteria: International multicenter collaborative research
2. 研究実施期間 平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日
3. 助成金額 1,000,000 円
4. 研究の目的 <p>本研究の目的は、1) メタゲノム解析を利用し、正常細菌叢の構成と、SSI 発生有無との関連を調べること、2) 異人種間での正常細菌叢の違い、3) SSI 原因菌の違いを明らかにすることである。</p> <p>なお本研究の背景には、まず手術部位感染：Surgical Site Infection (以下 SSI) が手術操作に関連して発生する高頻度の術後合併症であり、在院日数の延長、医療費増大をもたらすため、その予防策を講じる必要性が高いことにある。</p> <p>一方ヒトの腸内には腸内細菌叢が常在しており、創感染の原因になりうる。感染症原因菌の同定は、これまで実験室で培養できる菌種は全体の 1%-20%とされてきたが、近年シーケンス技術の発展に伴い、細菌叢のゲノム配列を直接決定して、細菌の遺伝子情報を大抵に獲得するメタゲノム解析の手法が確立された。</p> <p>大腸癌術後 SSI 発生頻度は日本では 13%、米国では 20-25%と格差が大きい中で、日本は米国疾病予防管理センター (CDC) が公開している SSI 予防の為のガイドラインに倣っており、米国のガイドラインを日本に適用することには議論がある。メタゲノム解析を用いた周術期の腸内細菌叢の変化の詳細と SSI の関連を見ることは、SSI に関連する細菌叢の同定ができるかもしれない。そして同定された細菌叢の異人種間での差異が SSI の発生頻度へ関連することがわかれば、国の壁を超えた共通した新たな SSI 対策に繋がると考えられる。</p>

5. 研究概要報告

(研究の対象)

clinical stage 0～Ⅲの大腸癌手術予定で、大腸手術歴、化学療法・放射線治療歴のない 20-80 歳の文書により同意の得られた患者

(方法)

1. 経口抗生剤による化学的前処置、置腸管洗浄剤による機械的前処置を行なったのちに術直前の経静脈的抗生剤投与、術後経静脈的抗生剤投与、整腸剤投与による共通した周術期管理を行う。
2. スワブによる術前、術後 1, 3, 7 日、1 ヶ月、1, 2, 3 年の便採取を行う。
3. 採取便検体中の 16S rRNA 遺伝子を PCR にて特異的に増幅
4. 次世代シーケンサーによる遺伝子配列決定
5. 既存の 16S rRNA データベースと比較し、腸内細菌叢構成特定
6. 細菌叢変化と血液検査での炎症所見との関連評価

(結果)

- ・現時点で大腸癌 15 例、非大腸癌 3 例の患者の同意が得られサンプル採取中。
- ・Preliminary な実験として 7 名の非術前健常者より得たサンプルを用いた細菌の全 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の V3-4 領域を特異的に PCR 増幅させたところ、A～G のいずれのサンプルでも 500bp 付近で DNA が増幅し 16SrRNA 遺伝子の V3-4 領域の増幅が確認できた (図 1)。
- ・腸内細菌叢のゲノム解析にはさまざまな菌種の溶菌が不可欠であるが、中でもグラム陽性菌は溶菌しにくく、加熱法による要菌を試みたところ、若干の波形の差異を認めるものの、DNA 量自体は殆ど変わらず、温度を上げても DNA 抽出量は変わらないことが示された (図 2)。

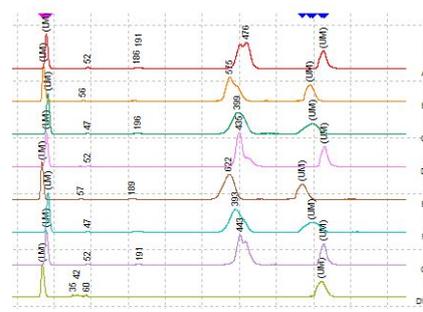
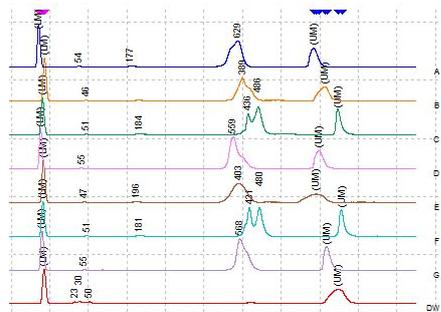


図 1. 16SrRNA 遺伝子の PCR による増幅 図 2. 16SrRNA 遺

伝子の PCR による増幅 (加熱処理後)

(まとめ)

- ・臨床検体 (便) を用いた実験を開始し、順調なサンプル採取が進んでいる。
- ・スワブを用いて採取した便からの 16S rRNA 遺伝子の V3-4 領域の増幅に成功した。
- ・溶菌処置後も便からの DNA 抽出量は保たれていた。

(今後の予定)

引き続き、サンプル採取を行い、20 例採取終了時点で一度解析を行う予定である。

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 大分大学 医学部附属病院 消化器・小児外科 助教
氏 名 平塚 孝宏

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。
また、別刷り2部を必ず添付してください。

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

○著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。