

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 岩澤 堅太郎
横浜市立大学 大学院医学研究科 発生成育小児医療学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科 微生物学	教授 梁 明秀
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 肝胆膵消化器病学	教授 中島 淳
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 血液・免疫・感染症内科学	講師 吉見 竜介

博士の学位論文審査結果の要旨

小児期発症の原発性硬化性胆管炎の 唾液細菌叢解析と診断的バイオマーカーとしての可能性

原発性硬化性胆管炎 (Primary Sclerosing Cholangitis: PSC) は、肝内および肝外胆管周囲に慢性炎症と線維化をきたす疾患で、有効な内科的治療はなく、最終的には肝不全に至り肝移植以外に救命方法がない難治性の肝疾患である。PSCは潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis, UC) をはじめとする炎症性腸疾患を合併する頻度が高い事から、腸内細菌叢の関与も以前から考えられていた。成人発症例を対象とした腸内細菌叢解析では、*Veillonella* 属などの口腔内で主要な菌属が増加していたことが報告されていた (Kummen et al., 2017)。一方、申請者らは、過去の研究において、小児期発症PSCの腸内細菌叢では口腔由来の菌種が増加することを明らかにした (Iwasawa et al., 2017)。唾液検体は容易に採取でき、診断的検査の侵襲性が低いという長所があることから、本研究では、PSCの口腔内細菌叢の特徴を精査し、唾液細菌叢を用いた診断的バイオマーカーとしての可能性について探求した。

PSC 患者 (PSC 群) 24 例、PSC 非合併 UC 患者 (UC 群) 16 例、および健常者 (HC 群) 24 例から唾液を採取し、溶菌酵素法により細菌 DNA を調整し、16S リボソーム RNA 遺伝子 V1-V2 領域を PCR 増幅し、次世代シーケンサーでシーケンスすることで塩基配列の決定を行った。

詳細な解析に入る前に、サラゾスルファピリジン (SASP) をはじめとする内服薬による細菌叢への影響を検討したところ、腸内細菌叢では認めていた SASP による多様性の低下が、唾液細菌叢では認めなかった。その他の内服薬についても同様の結果であったので全症例を対象とした比較解析を行った。3 群比較では、 α 多様性の指標として用いた Operational taxonomic unit (OTU) 数と Shannon's index の有意な違いを認めなかったが、 β 多様性の指標である Weighted UniFrac 距離解析では PSC 群は UC 群とも HC 群とも有意に異なったクラスターを形成した。また、主要細菌種の菌属の組成比を比較検証したところ、PSC 群は、HC 群と UC 群に比較して、*Haemophilus* 属が特異的に減少しており、また UC 群と比較して、*Oribacterium* 属の有意な増加を認めた。これらの主要細菌種の組成比の違いを用いた診断能について、ランダムフォレスト機械学習を駆使したアルゴリズムで評価したところ、PSC と UC を 6 菌属で Area under the curve (AUC) 値 0.8756 で、PSC と HC を 13 菌属で AUC 値 0.8011 でそれぞれ区別することができた。

唾液細菌叢は、口腔内疾患のみならず、様々な全身疾患でもその関連が報告されている。唾液細菌叢を用いた PSC の診断能は腸内細菌叢を用いた診断能よりも優れ、また、その他の内科疾患の診断能の報告と同等であった。糞便と比較して採取が簡易で、抗菌薬を始めとする環境の影響を受けにくい特徴を持つ唾液細菌叢は、侵襲性の低い病態バイオマーカーとして利用できる可能性がある。今後、様々な国や地域、UC 以外の鑑別を要するその他の内科疾患、および成人期発

症の症例も含めた *PSC* 唾液細菌叢データの蓄積が望まれる。

審査に当たり、以上の論文要旨の説明の後に以下の質疑応答が行われた。

まず中島副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 成人の報告では、*Klebsiella pneumoniae* が原因だったという報告もあったと思うが、これについてはどう解釈しているか。本研究では *Klebsiella pneumoniae* は検出されたか。成人特有の原因菌という解釈か。
- 2) 口腔内細菌叢の構成の異常という事象の因果関係についてはどう考えているのか。
- 3) 肝硬変に伴う胃酸分泌量の異常など、病態に伴う結果としての腸管環境の変化も細菌叢に影響すると考えられるが、どう考えているか。
- 4) シークエンサーは何を用いているのか。

これらの質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) *Klebsiella pneumoniae* は、成人 *PSC* 症例の糞便をマウスに投与することで検出された菌種である。腸管上皮を障害して近接するリンパ節へ移行し、免疫応答により肝胆管病変が出現される可能性が示唆された。しかし、*Klebsiella pneumoniae* は腸内細菌叢全体における組成比としてはかなり低い菌種であったため、組成比が比較的高い菌種を中心に解析を行った我々の検討においては検出されなかった。
- 2) 腸管外の内科疾患においても腸内細菌叢が原因になることがわかってきている疾患も多くあるものの、口腔内細菌叢が全身に及ぼす影響に関しては、まだわかっていないことが多い。現状は、腸内細菌叢の構成の異常に連動した、すなわち、菌叢全体の生態バランスが崩れたことに伴う結果であるという事を考えている。しかし、唾液細菌叢を無菌マウスに投与するなどといった実験が今後の研究課題になってくる。
- 3) ご指摘の通り、肝硬変や炎症性腸疾患にともなう胃酸分泌能異常が、腸管環境変化を引き起こし口腔内細菌叢の腸管内への定着に寄与する可能性がある。
- 4) 少し古いシークエンサーではあるが、454 シリーズのシークエンサーを使用した。

次に吉見副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 10 分割交差検証を複数回行った平均 AUC 値を用いたとのことだが、この際の AUC 値のバラツキや信頼度はどうだったか。
- 2) 口腔由来の細菌の腸管への生着しやすさが疾患によって異なるのかについての検討は行っているのか。
- 3) 今回の結果から、どのように臨床応用できる可能性があると考えているのか。

これらの質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) 統計ソフト R の AUCRF という、ランダムフォレスト機械学習と AUC を組み合わせたようなパッケージを用いて解析を行ったが、バラツキや信頼度までは提示されなかったと記憶している。ただし、統計処理においては非常に重要な情報だと思うので、今後同様の解析を行う際

には注意したい。

- 2) 同一症例から採取した唾液細菌叢と腸内細菌叢を同時に解析し、唾液と腸内で共有している OTU の比率をそれぞれの群間で比較検討した結果、健常者と比較して、疾患群の方が唾液と腸内で共有する OTU の存在比率が高い傾向にあった。
- 3) UCと診断されている症例の胆管病変をスクリーニングしたところ、PSCと診断もしくは疑診に至る症例が数%存在するというような報告もある。今回は PSC の診断に至った症例の検討であるため、本研究で示した唾液細菌叢をスクリーニングすることで早期診断と結びつくかどうかについてはさらなる検証が必要である。PSC は内科的治療方法がなく、早期診断できたところで予後に変化がないのが現状ではある。しかし、PSC に対する内科的治療方法が確立された将来、PSC 患者を早期診断し、早期介入を行うことで、肝移植時期を遅らせる、もしくは、発症を予防するような介入への一助になればと考えている。

最後に梁主査より以下の論評と質問がなされた。

- 1) AUC 値は ROC 曲線を作成して求めたものなのか。感度や特異度などはわかるのか。計算手法についてももう少し詳細に説明してほしい。
- 2) 経時的なサンプルの採取は行ったか。その際の組成比の推移はどうだったか。
- 3) 血液検査所見など、他のバイオマーカーと組み合わせたような診断能についての検討は行ったか。
- 4) なぜ、疾患群の比較対象として UC 群を選択したのか。
- 5) 口腔内細菌叢や腸内細菌叢の構成異常に対する宿主の免疫応答の違いなども疾患発症には関与していると考えられるが、そのような機序についてはどう考えているか。

これらの質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) AUCCRF というパッケージは、ランダムフォレスト機械学習で通常用いる Out-of-bag というアウトプットを AUC 値で置換するような特殊な統計手法であるため、感度や特異度までの情報は得られない。
- 2) 少数の症例では経時的なサンプルの採取も行っていたが、比較解析できるようなサンプル数を集めることができなかつたため、今回は横断的な1症例あたり1サンプルの解析を行った。しかし、疾患活動性バイオマーカーとしての可能性という視点からも、このような解析も重要であると考えている。
- 3) 疾患活動性との相関を検査するという観点で、肝胆道系酵素の値との相関関係についても少し検討を行ったが、結論づけられるようなデータは得られなかつた。また、診断の補助という観点で、細菌叢の組成比と合わせた際の診断能の検討は今回行ってないので、今後の参考にしたい。
- 4) PSC の診断に先行して IBD の症状があることもあり、IBD の中でも特に合併頻度が高い UC 患者に PSC が合併しているかの有無の判定が、臨床的に頻度として高く遭遇する課題であるという点大きい。また、UC は腸管限定的な病変に対して、PSC は腸管病変に加えて肝胆管系で病態を引き起こすという疾患の特徴から、二群間を比較する肝胆管系の病態を引

き起こす原因菌などの特定にもつながると考え、比較対象疾群は UC を選択した。

- 5) 先に述べた成人の報告における, *Klebsiella pneumoniae* を例にとると, 腸管上皮バリアを突破し近接リンパ節まで進入するという特徴をこの菌種自体が持っていたとしても, その後起こる宿主の免疫応答の強弱により, 肝臓胆管病変の発症の有無を決定している可能性が考えられる. PSC は時々自己免疫疾患にも分類されるような疾患なので, 細菌叢に対する過剰な免疫応答も疾患発症原因の一つであると考えられている。

以上のような質疑応答がなされた。本学位論文は, 唾液細菌叢の菌種組成比を, 侵襲性の低い診断バイオマーカーとして用いる可能性を示した学術的価値の高い研究と判断した。また, 申請者は本学位論文の内容を中心に幅広い質問に的確に答え, これら課題について深い理解と洞察を持っていることを示した。審査員による協議の結果, 本研究は博士(医学)の学位に値するものと判定された。