

主論文の要旨

**Temporal dynamics of the plasma microbiome in
recipients at early post-liver transplantation:
a retrospective study**

肝移植患者の術後早期における血漿マイクロバイオームの経時的動態
(後方視的研究)

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

奥村 俊彦

【緒言】

肝移植は末期肝疾患に対する根治的な治療である。移植後の臓器片拒絶を防ぐため免疫抑制剤が投与されるが、免疫抑制により重症感染症のリスクが上がるため、抗微生物薬をしばしば必要とする。一方、血液中には多種の微生物遺伝子が存在し、その構成は免疫抑制剤や抗微生物薬によって変化すると報告されている。この血液中マイクロバイオーーム(微生物叢)と臨床経過との関連は十分に評価されていない。そこで本研究は、肝移植後患者の血漿中微生物遺伝子について解析し、その推移を調べるとともに、急性細胞性拒絶(ACR)発症予測バイオマーカーとしての臨床応用の可能性を検討した。さらに、重症感染症診断における次世代シーケンス(NGS)の病原微生物検索ツールとしての臨床応用を試みた。

【対象および方法】

名古屋大学医学部附属病院における 2016-18 年の肝移植レシピエント 51 例において、移植後 1 週間以内(week 1 post-transplantation: week 1 と表記(以下同様))の保存血漿、および一部の症例では 3-5 週間後(week 4 post-transplantation)/7-9 週間後(week 8 post-transplantation)/血液培養陽性から 2 日以内の保存血漿を後方視的に収集し、DNA を抽出して NGS 解析を行った。NGS データ解析は独自に開発したパイプライン PATHDET を用いた。各微生物のリード数(reads per million mapped reads: RPM)、各微生物の相対優占度(relative abundance: RA)、多様度指数(Simpson's diversity index および Shannon's diversity index)を算出し、移植後の経過における血漿中微生物叢の変化や ACR の有無による血漿中微生物叢の相違を検討した。細菌は、リードからの情報量により、「科」「属」「種」のいずれかのレベルまで同定した。さらに、非計量多次元尺度法(non-metric multidimensional scaling: NMDS)を用いて検体間の類似度を表し、微生物叢に影響する環境因子を特定した。また、血液培養陽性時の検体を用いて、培養検査と NGS 解析との結果の相違を検討した。

【結果】

51 症例から得た計 111 検体を解析した。1 検体あたり平均 135 万リードが得られ、その 0.03% が微生物のリードであった。症例の特徴を表 1 に示す。図 1 は各検体採取時点の科レベルでの平均 RA を示しており、*Anelloviridae*、*Nocardiaceae* および *Microbacteriaceae* の RA は移植後の経過で有意に上昇し(*Anelloviridae*: 0.07 ± 0.19 (week 4) vs. 0.01 ± 0.04 (week 1), $p = 0.62$, 0.23 ± 0.28 (week 8) vs. 0.01 ± 0.04 (week 1), $p < 0.001$; *Nocardiaceae*: 0.127 ± 0.100 (week 4) vs. 0.057 ± 0.084 (week 1), $p = 0.003$, 0.089 ± 0.074 (week 8) vs. 0.057 ± 0.084 (week 1), $p = 0.36$; *Microbacteriaceae*: 0.017 ± 0.013 (week 4) vs. 0.004 ± 0.007 (week 1), $p < 0.001$, 0.013 ± 0.012 (week 8) vs. 0.004 ± 0.007 (week 1), $p = 0.002$)、*Enterobacteriaceae* の RA は有意に低下した(0.13 ± 0.12 (week 4) vs. 0.26 ± 0.17 (week 1), $p < 0.001$, 0.09 ± 0.11 (week 8) vs. 0.26 ± 0.17 (week 1), $p < 0.001$)。特に *Anelloviridae* の RA は week 1、week 4、week 8 でそれぞれ 0.01、0.11、0.16 と大きな上

昇が見られた。week 1 の検体では、week 8 と比較して、属レベルの Simpson's diversity index が有意に高かった (0.85 ± 0.09 vs. 0.76 ± 0.23 , $p = 0.03$; 図 2)。NMDS による解析では、移植からの時間経過や抗微生物薬の使用が血漿中微生物叢の構成と相関していた(図 3)。ACR の有無に関して 2 群に分けた特徴を表 2 に示す。ACR 群のほうが *Enterobacteriaceae* の RA が有意に低く (*Enterobacteriaceae*: 0.18 ± 0.16 , vs. 0.30 ± 0.17 , $p = 0.045$; 図 4)、属および種レベルの Simpson's diversity index が有意に高かった(属レベル: 0.89 ± 0.04 vs. 0.84 ± 0.10 , $p = 0.03$; 種レベル: 0.93 ± 0.04 vs. 0.85 ± 0.13 , $p = 0.004$; 図 5)。血液培養陽性時に採取した 16 検体中 14 検体では、血液培養と同じ細菌が検出され、うち 8 検体では高い優占度で検出された(図 6)。血液培養陰性であった 1 検体からヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) が検出された。

【考察】

肝移植後 8 週間の期間で血漿中微生物叢は変化した。*Anelloviridae* を主に構成する Torquetenovirus (TTV) は、特定の疾患とは関連がないウイルスと考えられている。Maggi らは腎移植または肝移植後の患者において血漿中の TTV 量が増加すると報告し、Görzer らと Abbas らは肺移植後の患者において血漿や気管支肺胞洗浄液中の TTV が増加すると報告している。本研究でも肝移植後から 8 週目までに *Anelloviridae* が有意に増加しており、*Anelloviridae* は臓器移植後の免疫抑制下にて他の微生物より増加しやすいと考えられた。

NMDS 解析では移植後の同じ時点での検体の微生物叢同士が似る傾向にあった。また抗菌薬、抗ウイルス薬、抗真菌薬の使用も微生物叢と関連があった。過去には免疫抑制剤も微生物叢と関連するという報告もあるが、本研究では個々の薬剤と微生物叢との関連は見られなかった。感染や肝移植そのもののように微生物叢に影響する因子が多いため、単一の免疫抑制剤だけでは微生物叢への影響が十分に出なかったと考えられた。

ACR は移植片に対する免疫反応であるため、ACR 群と比較して非 ACR 群のほうが免疫抑制が十分にかかっていると考えられる。非 ACR 群のほうが有意に *Enterobacteriaceae* の RA が高かったこと、また移植後の経過で免疫抑制が強いと思われる week 1 の検体で *Enterobacteriaceae* の RA が高かったことから、*Enterobacteriaceae* が免疫抑制の程度を反映している可能性が示唆された。肝移植後に腸内細菌叢の *Enterobacteriaceae* が増えるという報告や、血流感染を起こす *Enterobacteriaceae* は腸内細菌叢に由来するという報告があり、本研究でも腸内で増えた *Enterobacteriaceae* が免疫抑制によってさらに血流内に侵入しやすくなり、*Enterobacteriaceae* の RA が高くなったと考えられた。血漿中微生物叢の *Enterobacteriaceae* ゲノムは肝移植後の ACR 発症予測のバイオマーカーになるかもしれない。

本研究では血液培養陽性時の 16 検体のうち 8 検体で、血液培養で検出された細菌と同じ細菌を NGS でも検出し、病因微生物と考えた。この検出率は過去の報告と同程度である。1 人の患者の臨床症状悪化時の検体で NGS によって HHV-6 が多量に検出

されており、NGS の包括的な診断手法としての有用性が期待された。

本研究のリミテーションとしては、後方視的研究であり採血手技が一定でないかもしれないこと、対象者が成人から小児まで幅広く疾患も様々であること、肝移植前の検体がないことが挙げられる。肝移植前後で血漿中微生物叢がどのように変化しているのか、肝移植後の経過で血漿中微生物叢は移植前の状態に戻っていくのかが今回の研究では不明である。

【結論】

肝移植後は血漿中微生物叢が変動し、*Enterobacteriaceae* と微生物叢の多様度は ACR 発症予測バイオマーカーとなる可能性がある。NGS は感染症診断において臨床応用できると考えられた。