

主論文の要約

**The Detection of Intraoperative Bacterial Translocation
in the Mesenteric Lymph Nodes is Useful in
Predicting Patients at High Risk for Postoperative
Infectious Complications After Esophagectomy**

腸間膜リンパ節における術中 bacterial translocation の検出は、
食道切除術後感染性合併症に高リスクな患者の予測に有用である

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：椰野 正人 教授)

西垣 英治

【諸言】

食道切除術は一般外科分野において最も侵襲の高い術式のひとつである。手術手技や周術期管理の進歩にも関わらず、術後の感染性合併症は依然として多く、重大な問題である。以前我々は胆管癌に対する肝切除において、細菌特異的 ribosomal RNA を標的とした定量的逆転写 PCR 法（以下 RT-qPCR）によって検出した腸間膜リンパ節への術中 bacterial translocation（以下 BT）が、術後の感染性合併症の予測因子となることを報告した。しかし食道切除術後の BT や菌血症の発生率については分かっていない。また腸間膜リンパ節から検出された細菌が、実際に血中に移動して術後菌血症の原因となるのかも明らかではない。本研究では RT-qPCR を用いて食道切除術中の腸間膜リンパ節への BT 発生率を検討し、術後菌血症および感染性合併症との関連性を検討した。

【対象及び方法】

2008年1月から2011年8月までに名古屋大学医学部附属病院消化器外科1で開胸により食道切除術と縦隔郭清を行った食道癌患者18例を対象とした。

サンプルの採取

腸間膜リンパ節は術中に2回採取した。初回は開腹直後に（以下 MLN-1）、2回目は消化管再建終了後に（以下 MLN-2）、いずれも無菌的に採取した。血液と喀痰は術前（以下 Blood-1、Sputum-1）と術後1日目（以下 Blood-2、Sputum-2）に採取した。

RT-qPCRによる菌数測定

腸間膜リンパ節・血液・喀痰より抽出した RNA、および標準菌株 RNA を鋳型として、各菌群に特異的な primer により RT-qPCR を行った。得られた Ct 値を標準曲線に代入し、検体 1g (ml)中の菌数を算出した。

rRNA 遺伝子のシーケンス解析

腸間膜リンパ節と血液、喀痰から分離された細菌間における rRNA の配列相同性を、16S もしくは 23S rRNA 遺伝子配列を用いて測定した。増幅産物の 100%配列相同性が得られた場合、その細菌は同一部位の由来とみなした。

臨床データと術後合併症の記録

術前の患者背景因子、術中パラメータおよび術後 28 日までの感染性合併症を記録した。

解析

カテゴリ変数にはカイ二乗検定もしくは Fisher の直接確率検定を、連続変数には Wilcoxon の符号順位検定と t 検定を使用した。

【結果】

腸間膜リンパ節中の細菌検出

MLN-2 の細菌検出率（56%）は MLN-1（17%）よりも有意に高かった（ $p=0.015$ ）

(図.1)。検出菌数も MLN-1 に比べて MLN-2 の方が多い傾向にあった (図.2)。また検出される菌は偏性嫌気性菌がより多くみられた。

血液中の細菌検出

Blood-2 の細菌検出率 (56%) は Blood-1 (22%) よりも有意に高かった ($P=0.040$) (図.1)。従来法の血液培養による菌血症は術前・術後 1 日目ともに見られなかったが、RT-qPCR 法では術前にも菌血症が見られ、検出感度の高さを示した。検出菌数も Blood-1 に比べて Blood-2 の方が多い傾向にあった (図.3)。

喀痰中の細菌検出

喀痰中の細菌検出率は Sputum-1 で 80%、Sputum-2 で 78% だった (図.1)。検出菌数も Sputum-1 と Sputum-2 で同等だった (図.4)。

MLN-2・Sputum-2 とその他のサンプルとの細菌検出の相関性

MLN-2 への BT は、Blood-2 の菌血症と強い関連性があった ($p=0.001$)。MLN-2 への BT はまた、Blood-1 の菌血症とも有意に関連していた ($p=0.043$)。Sputum-2 の細菌検出は Sputum-1 のそれと有意な関連があった ($p=0.024$) が、MLN や血液の細菌検出とは何ら関連性が無かった (表.1)。

シーケンス解析による分離菌相互の相同性

術後菌血症の供給源を明らかにするため、MLN-2・Blood-2・Sputum-2 全てから Enterobacteriaceae が検出された 5 名のサンプルを使用して、シーケンス解析により分離菌相互の相同性を調べた。MLN-2 と Blood-2 の組み合わせでは、分離菌が同じ菌株であると考えられる組み合わせが 80% であったのに対し、Sputum-2 と Blood-2 のそれは 20% のみだった (表.2)。

MLN-2 の BT と術前・術中因子の相関性

単変量解析で、MLN-2 の BT 発生と術前および手術因子との間に相関性は見られなかった (表.3)。

MLN-2 の BT と術後合併症の相関性

MLN-2 の検討で、BT 陽性例の術後感染性合併症発生率は BT 陰性例よりも有意に高かった (13% vs 60%, $p=0.040$)。Clavien-Dindo 分類 III b 以上の重篤な合併症も BT 陽性例で有意に多く発生した (0% vs 40%, $p=0.043$)。術後の在院日数も BT 陽性例で有意に長かった ($p=0.037$) (表.4)。

【考察】

高度な手術ストレスは腸管の防御機構を損傷し、BT や菌血症を引き起こすと報告されているが、食道切除術後の BT 発生率と術後菌血症との関連性を示した報告はこれまでになかった。本研究で用いた RT-qPCR 法は非常に感度が高く、腸間膜リンパ節や血液から高い細菌検出率が得られた。また MLN-1 に比べ MLN-2 の、Blood-1 に比べ Blood-2 の細菌検出率が高く、手術侵襲により BT が強く惹起されることが証明された。さらに興味深い点は、腸間膜リンパ節や血液から検出された菌種が、偏性嫌気性菌優位だったことである。ヒトの腸内細菌叢は偏性嫌気性菌が 99% を構成してお

り BT の起因菌となる可能性が高い。この意味で本研究の結果は整合性のあるものと思われる。偏性嫌気性菌は酸素の影響を受けやすく培養が難しいため、従来の培養法による検出率は不十分で、実際の BT 発生率は過小評価されてきた可能性がある。一方、本研究で使用した RT-qPCR 法は細菌の酸素感受性と無関係に、より高い感度の検出が見込まれる。我々は、RT-qPCR 法により従来の血液培養法では検出できない“潜在的菌血症”を検出することができ、それが術後経過に深刻な影響を与えるため、臨床上重要であると考えている。

術後感染性合併症の発生率は、MLN-2 の BT 陽性例で有意に高かった。手術侵襲によって引き起こされる BT が起こりやすい患者は、より高い術後感染性合併症発生率を示す傾向にあった。これらの患者は免疫学的に易感染性であり、そのため菌血症・肺炎・手術部位関連感染症といった様々な感染性合併症に冒されやすい傾向にあると推測できる。本研究で使用した細菌検出システム（RT-qPCR）は、7-8 時間以内に高い感度で BT を診断できる。これにより術直後にハイリスクな患者の選別が可能になり、また MLN から検出された菌種を標的とする有効な抗生剤の選択が可能になる。

【結論】

BT は食道切除術中にしばしば起こり、術後の菌血症は消化管由来であると考えられた。MLN-2 で細菌が検出された患者は、術後感染性合併症のリスクが高いため、慎重に術後管理を行う必要がある。