




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第708号	氏名	Batsaikhan Saruuljavkhlan
審査委員会委員		主査氏名	石野 敏理 (印)
		副査氏名	松浦 恵子 (印)
		副査氏名	水戸 一弘 (印)
<p>論文題目</p> <p>Advantage of 16S rRNA amplicon sequencing in <i>Helicobacter pylori</i> diagnosis (ヘリコバクター・ピロリ感染診断における 16S リボソーム RNA 由来増幅 DNA 産物シーケンスの有用性)</p> <p>論文掲載雑誌名 Helicobacter</p> <p>論文要旨</p> <p>胃萎縮や腸管形質転換 (IM) の患者において、現状の診断法では、少数ではあるがヘリコバクター・ピロリ (<i>H. pylori</i>) 陽性症例を見逃している可能性があることが知られている。ピロリ菌検出には、生検を伴う内視鏡検査、組織学的検査、免疫組織化学、迅速ウレアーゼ試験 (RUT)、培養などの侵襲的な方法が必要である。一方で、これらの方法によるピロリ菌検出には、胃粘膜における <i>H. pylori</i> のコロニー形成の量と位置に部分的に依存する。便中抗原や尿素呼気試験などの非侵襲的検出法は、最適条件下で 85~95% の特異度と感度を示しているが、細菌活性の最低閾値が必要であるため、プロトンポンプ阻害剤の使用や、胃萎縮症や胃粘膜下垂症のようにピロリ菌の存在量が低い際は、判断が不正確になる場合がある。従って、慢性胃炎、萎縮性胃炎、胃 IM、および潰瘍、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、胃がんなどの関連臨床症状を含むピロリ菌関連疾患の臨床管理および負担軽減には、改良された感度の高い検出方法の確立が急務である。</p> <p>近年、16S リボソームリボ核酸アンプリコンシーケンスなどの次世代シーケンシング法の精度は格段に向上しており、検査の費用対効果も高まっている。多くの研究において、16S rRNA シーケンスにより胃の微生物の構造や細菌数を調べることが可能との報告も多く、このことから、16S rRNA シーケンスは、ピロリ菌の非培養診断を行うための有益かつ簡便な方法となり得る可能性がある。</p> <p>本研究では、胃粘膜生検の 16S rRNA 配列決定により同定された症例数が、ピロリ菌に関連する疾患の組織学的スペクトルにおいて、現在ルーチンに用いられている診断法と比較して、どの程度改善されるかを推定することを検討した。加えて、16S rRNA シーケンスを用いて活動性ピロリ菌感染を検出するための OTU (Operational Taxonomic Units) および RA (Relative Abundance) のカットオフ値を評価した。</p> <p>ルーチンの診断法を用いた場合、75.8% が <i>H. pylori</i> 陽性であり、16S rRNA シーケンシングの感度と特異度は、カットオフ値を 1113 (OTU 数) とした場合 94.3% と 82.1%、また 4.4% RA に設定した場合は 93.4% と 82.1% となった。これら検証値を組み合わせると一致率は高く (91.1%)、16S rRNA シーケンシングでは、ルーチンの診断法と比較して 9 例 (5.6%) で追加陽性収となり、病理組織学、培養、RUT、血清学と比較して、それぞれ 12 例 (7.4%)、37 例 (23.0%)、43 例 (26.7%) で追加陽性を示した。このように、16S rRNA アンプリコンシーケンスは、ルーチンの診断法では陰性と判定されてしまう <i>H. pylori</i> 陽性症例の検出を可能にすることが判明した。</p> <p>本研究は、既存の方法では検出できなかった疾患においても <i>H. pylori</i> 検出を可能にし、正確かつ費用対効果の高い将来の診断法確立の一助になるものである。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ① 課・論	第708号	氏名	Batsaikhan Saruuljavkhlan
審査委員会委員	主査氏名	江崎 敏理	
	副査氏名	松浦 恵子	
	副査氏名	水戸 弘	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 先行研究との関係について 2. 消化不良とは具体的にどのような症状を指すのか？ 3. 図2Aの縦軸と横軸について 4. ピロリ菌の量が多い場合、他の細菌叢は消失するのか、それとも相対的で見えないだけなのか？ 5. 225人から胃サンプルを採取したが、約30人はDNAが不十分であったとあるが、不十分な割合が高すぎないか。 6. この方法は非侵襲的スクリーニングとして適応されるのか？ 7. 今回、シーケンスデータをV4領域にアライメントした工夫点は？ 8. ピロリ菌は他の微生物叢とどのように関係があるのか？ 9. ヘリコバクター・ピロリの診断について、血清抗体陽性はHP陽性群に含めているがこれでは偽陽性が増えることが懸念される。ピロリ菌の判定に血清抗体を入れたのはなぜか。 10. 全体として、リボソームRNAアンプリコンシーケンシングによりピロリ菌陽性がわずかに増加している（表4）。この増加は組織学的に正常な症例でピロリ菌陽性が増加したためと考えられるが、これは従来測定法の偽陰性ではなく、リボソームRNAアンプリコンシーケンシングによる偽陽性の可能性とは考えられないのか？ 11. このような検出方法が一般化された場合、検出にかかる時間はどの程度なのか？ 12. Helicobacterの検出が重要なのか？それとも病因に関わるようなCagA陽性の菌体を検出するのが重要なのか？ 13. Sharron diversityはどのような方法で求めるのか？ 14. Normal groupに対して、IM groupではVeillinellaやStreptococcusなど複数の菌種で有意差が認められないが、どのような理由が考えられるのか？ 15. 将来的にこの研究をどのように発展させていくのか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 Batsaikhan Saruuljavkhlan

論 文 題 目

Advantage of 16S rRNA amplicon sequencing in *Helicobacter pylori* diagnosis

(ヘリコバクター・ピロリ感染診断における 16S リボゾーム RNA 由来増幅 DNA 産物シークエンスの有用性)

要 旨

Background: 16S rRNA amplicon sequencing is an accurate method of detecting microbial infection without culture. It is unclear if sequencing has additional benefits over routine diagnostic methods for *Helicobacter pylori* testing.

Methods: We enrolled Mongolian volunteers with dyspepsia. Using routine diagnostic methods, positive *H. pylori* was defined as positive results on histology/immunohistochemistry, culture, rapid urease test, or serology; negative *H. pylori* was defined by negative results from all these tests. We performed 16S rRNA sequencing on gastric biopsy specimens and calculated cutoffs for operational taxonomic units (OTUs) and relative abundance (RA) to define positive results using ROC curves.

