

令和 5 年度（2023 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2021B06	
申請者に関する事項	氏 名	山本 雅裕
	所属機関名	大阪大学 微生物病研究所 感染病態分野
	職 名	教授
研究課題名	先天性トキソプラズマ症の新規予防メカニズムの探索	
研究期間	2021 年度～2023 年度（3 年間）	
本センター担当教員	小林 隆志	

令和 5 年度（2023 年度）研究成果の概要

① トキソプラズマ感染時、ケモカイン受容体 CCR2 依存的にインフラマトリーモノサイトが胎盤に集積することを明らかにした

我々はこれまでにトキソプラズマ感染時に CCR2 欠損マウスは野生型マウスに比べて胎児の形態異常や死産の割合が有意に高くなることを見出した。そこで、今年度は CCR2 がトキソプラズマの感染時における異常妊娠を防御するメカニズムを明らかにすべく、野生型マウスの胎盤に CCR2 依存的に集積してくる細胞を解析し、その中で CCR2 欠損マウスではそれが阻害されているサブセットがあるか解析した。その結果、インフラマトリーモノサイトと呼ばれる細胞集団を見出した。マウスへの感染実験は大分大学医学部感染予防医学講座の P2A 実験施設にて実施した。

② 先天性トキソプラズマ症に対する抗血清およびワクチン療法の効果を検証した

本研究で使用しているトキソプラズマは大阪大学で元々使用していた ME49 株(阪大系統)であるが、我々はペンシルベニア大学から分与された同株(PENN 系統)も保有しており、これまでに両者はマウスに対する病原性が大きく異なることを見出している。即ち、PENN 系統は阪大系統に比べてマウスに対する病原性が非常に低い。そこで、今年度は PENN 系統を感染させたマウスから回収した血清を CCR2 欠損マウスに投与することで異常妊娠を予防できるか解析した。さらに、不活化させた ME49 株を予め接種することで、同様の予防効果が得られるか検証した。その結果、抗血清療法は異常妊娠を抑制することができなかったが、ワクチン療法は有意に異常妊娠を抑制することを明らかにした。

③ 研究打ち合わせと学生への教育およびセミナー

2023 年 7 月 7 日第 14 回グローバル感染症セミナーを実施した。2023 年 10 月 19 日、大分大学感染予防医学講座 123 号室にて本研究に関する研究打ち合わせを行った。さらに、「トキソプラズマ原虫の基本的知識とトキソプラズマ原虫の病原因子の機能とそれに対する宿主免疫応答」に関する特別講義を大分大学医学部医学科 2 年生に対して行った。さらに、2024 年 2 月 16 日にも大分大学感染予防医学講座にて本研究に関する研究打ち合わせを行った。

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2021B08	
申請者に関する事項	氏 名	森 康子
	所属機関名	神戸大学大学院医学研究科 附属感染症センター・臨床ウイルス学分野
	職 名	教授
研究課題名	造血幹細胞移植患者検体からの HHV-6B 潜伏感染細胞の分離同定	
研究期間	2021 年度～2023 年度（3 年間）	
本センター担当教員	緒方 正男	
令和5年度（2023 年度）研究成果の概要		
本研究では造血幹細胞移植患者体内で起こるヒトヘルペスウイルス6（Human Herpesvirus 6: HHV-6）の潜伏感染からの再活性化について、大分大学医学部附属病院で取得された臨床検体を用いた解析により、潜伏感染細胞の特定し、再活性化機序を解明することを目的とした。 大分大学医学部附属病院での造血幹細胞移植患者から血液検体の提供を得て解析を行う研究計画について、神戸大学大学院医学研究科等医学倫理委員会における承認を得て、また同内容を大分大学医学部倫理委員会での承認を受けることで研究の実施体制を整備した。大分大学グローバル感染症センター緒方正男教授との連携により、今年度から症例登録を開始し、造血幹細胞移植前及び移植後について血液検体の提供を受けている。 各血液検体から血漿と末梢血単核球を分離し、さらに末梢血単核球については再活性化での寄与が予想されるメモリーT細胞とその他の細胞を、細胞表面マーカー分子に対する磁気標識により分画を行った。2024年3月時点で5名の対象者から同意のもと提供を受けた計27サンプルの検体から、血漿および各細胞分画を得ており、それぞれ-80℃フリーザーおよび-150℃超低温フリーザーでの保存を行っている。またHHV-6ゲノムに対する定量PCRを行うために、各細胞分画および血漿からDNAを抽出し、-20℃フリーザーで保管した。 近年キメラ抗原受容体発現-T細胞（CAR-T細胞）輸注療法を受けた患者体内でのHHV-6再活性化について報告があり本研究内容と密接な関与が予想されることから、大分大学グローバル感染症センター緒方正男教授との協議により本研究での実施内容に加えるために各倫理委員会に変更申請を行った。		

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2021B10	
申請者に関する事項	氏 名	鈴木 留美子
	所属機関名	国立遺伝学研究所 ゲノム・進化研究系
	職 名	特任准教授
研究課題名		ピロリ菌遺伝子に対する進化的選択圧のゲノムワイド解析
研究期間		2021 年度～2023 年度（3 年間）
本センター担当教員		山岡 吉生

令和5年度（2023年度）研究成果の概要

1. ピロリ菌病原遺伝子タイピングの効率化

2023年度は、これまでの共同研究の成果として、ピロリ菌の主要病原遺伝子CagA, VacA, OipAのタイピングを自動的に行うプログラムソフトウェア **Helicobacter pylori virulence factor genotyper**を開発した。このソフトウェアはプログラミング言語Perl で書かれており、タイピングしたい遺伝子の塩基/アミノ酸配列を用意して、コマンドを打ち込むことでタイピング結果を出力する。プログラムは研究分担者Kirill Kryukovのホームページで公開している。

<https://kirill-kryukov.com/study/tools/Helicobacter-pylori-virulence-factor-genotyper/>

<実行例>

perl helpvifag.pl --genes-nuc-file cagA_NCTC11637.fas --out-CagA cagA_type.tsv

[コマンド] [入力配列ファイルの指定] [出力ファイルの指定]

結果はタブ区切りファイルで出力される。以下にCagA配列に対するタイピング結果の例を示す。これは単一の配列に対する出力だが、一度に複数の配列をタイピングすることも可能である。

<出力例>

EPIYA motif	CagA motifs	CagA type	CagA motif sequence	CM motif	CM motif sequence	Combined CagA and CM sequences
EPIYA	AB	ABB type	A(EPIYAKV/NK), B(EPIYAQVAK)	CMW	CMW FPLKRHDKVDDLKVG)	A(EPIYAKV/NKK), B(EPIYAQVAKK), CMW(FPLKRHDKVDDLKVG)

従来CagAのタイピングは、アミノ酸配列の保存モチーフEPIYAを目印として、周辺配列を目視してA, B, C, D モチーフに分類し、モチーフの組み合わせで欧米型(ABC)、東アジア型(ABD)などにタイピングしていた。**Helicobacter pylori virulence factor genotyper**はこのプロセスを自動化し、ピロリ菌病原遺伝子のタイピングを効率化するものである。

2. ピロリ菌遺伝子にかかる正の選択圧の検出

遺伝子上に有利な変異が生じると、その有利な遺伝子型は正の選択圧によって急速に集団中に広まる。このため有利なアミノ酸変異をもたらす非同義置換(dN)が同義置換(dS)より多くなる。これを利用してdN/dS>1である座位を探索し、遺伝子上で正の選択を受けている場所を検出することができる。本研究では進化解析ソフトウェアPAMLを利用してピロリ菌遺伝子にかかっている正の選択圧を探索した。正の選択圧は薬剤耐性関連遺伝子や宿主との相互作用にかかわる膜タンパクなどにかかりやすく、どのアミノ酸に選択圧がかかっているかを知るとは、菌の抵抗性や感染性の機序を探る上で重要である。

例として薬剤耐性遺伝子 *arlR* 上で正の選択圧を受けている箇所を示す。

[位置] [dN/dS>1の確率] [dN/dS の平均と標準誤差]

65 R 0.671 1.631 +- 0.654

129 G 0.894 1.932 +- 0.737

131 A 0.683 1.666 +- 0.686

この解析は現在も継続中であり、解析終了後に論文化を計画している。

Report for Joint Research Fiscal Year 2023

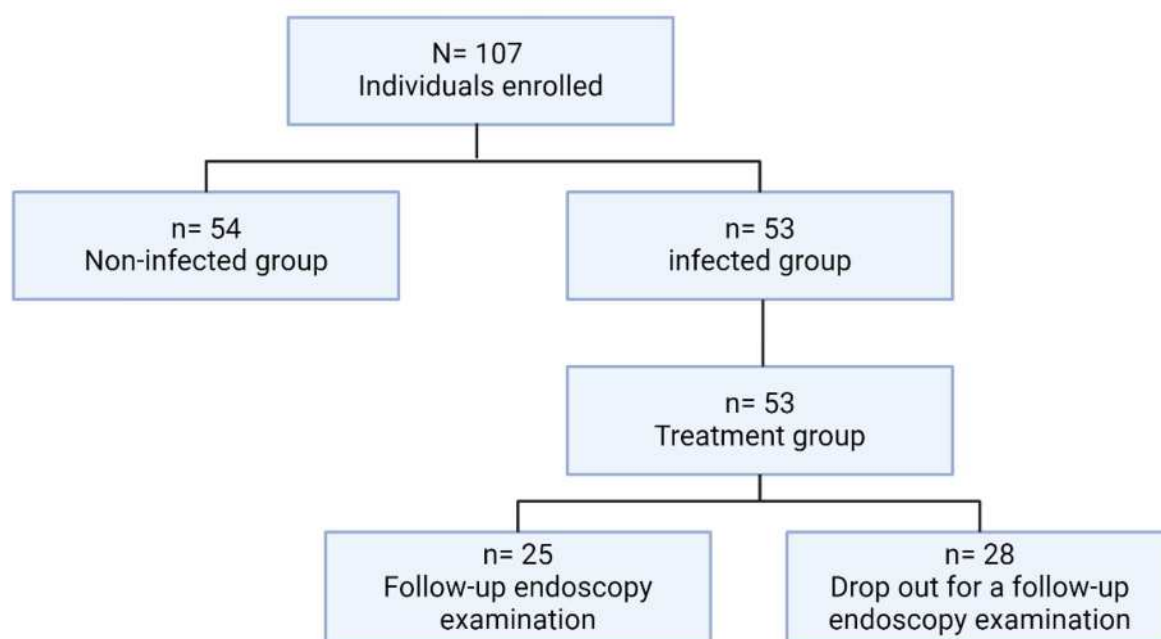
Adoption number	2021B13
Name	Khasag Oyuntsetseg
Affiliated Organization	Mongolian National University of Medical Sciences, Mongolia-Japan University Hospital, Endoscopy Center
Job Title	Consultant doctor
Research Topic	Characteristics of virulence factors and the migration pattern of <i>Helicobacter pylori</i> isolated from western part of Mongolia including ethnic Kazakhs using next generation sequencing
Research Period	FY2021 ~ FY2023 (3 year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Yoshio Yamaoka

Summary of Research Results for Fiscal Year 2023

This year's project focused on stomach microbiome analysis in patients who received eradication treatments for determining the microbial diversity changes of the stomach in a long-term (6-month) follow-up and to study its relationships with clinical outcomes in *H. pylori* eradication treatment. We performed follow-up endoscopic examinations on 25 patients who received eradication treatment in Bayan-Ulgii province between June 23 and June 25, 2023, and took biopsy samples from the antrum part of the stomach.

Regarding the first purpose of the project, we are currently undertaking full size of 16S rRNA gene amplicon sequencing in biopsy samples from 25 patients who received eradication treatments using the GridION sequencer at Oita University. Due to COVID-19 pandemics, GridION flowcells are delaying arriving at our laboratory, which will be used for microbiome sequencing. Our group will complete the microbiome analysis of gastric microbiome changes after *H. pylori* infection and during different types of eradication treatments by the end of March 2024.

Regarding the second purpose of the project, we sequenced and analyzed 20 *H. pylori* complete and circularized genomes from these 25 patients to find out the interaction between the gastric microbiome and *H. pylori* MGEs.



令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2021B14	
申請者に関する事項	氏 名	永島 裕之
	所属機関名	札幌医科大学 微生物学講座
	職 名	客員研究員
研究課題名	LPS の構造に注目したピロリ菌の病原性の多様性	
研究期間	2021 年度～2023 年度（3 年間）	
本センター担当教員	山岡 吉生	
令和5年度（2023年度）研究成果の概要		
申請者である永島は、2012 年から山岡教授の研究室で研究を開始した。そこで疫学調査から得られる <i>H.pylori</i> の感染症、免疫反応に対する研究について学んだ。 <i>H.pylori</i> 感染における生化学的な解析のみならず、疫学調査の重要性について学び研究を続けている 1) <i>H. pylori</i> 感染における Toll-like receptor 10 (TLR10) の役割 <i>H. pylori</i> LPS は大腸菌などと異なる LSP の構造を有している。Lipid A の acyl 基の数が大腸菌などでは 6 本であるが、<i>H. pylori</i> では 4 本になっており、これらの構造が TLR4 からの認識から逃れることが知られている。<i>H. pylori</i> の LPS は TLR2/TLR10 に認識されることを証明し、この認識からのシグナルが PI3K を介して Anti-inflammatory な反応を惹起することを証明した。 また、同様の構造は <i>Akkermansia muciniphila</i>, <i>Bacteroides fragilis</i> など腸内細菌に共通の構造であり、その他の構造を有する LPS でも同様の反応を示すことが判明した。これらの反応は腸内細菌と宿主との関係を示す有力なデータとして現在再現性を確認している。 TLR10 SNP に応じた病原性の変化 現在論文作成中（title: Toll-like receptor 10 polymorphisms affect pathological findings and cytokine expression in <i>Helicobacter pylori</i> infection） 2) 新型コロナ感染症における後遺症と腸内細菌の関係性 申請者である永島の勤務先である北海道がんセンターにおいて 2020 年にクラスターが発生した。当時勤務していた看護師の多くが感染し、回復したあとも後遺症に悩まされている。腸内細菌に注目し、勤務していた看護師の腸内細菌を採取し、後遺症と関係性の高い腸内細菌を解析した。そのなかで口腔内細菌が多く含まれる腸内細菌を有する症例では後遺症が多彩で、長期間続くことが判明した。 3) 肝細胞癌に対してチェックポイント阻害剤投与における腸内細菌の関与 (2023 年の研究結果) 肝細胞癌に対してチェックポイント阻害剤の投与は、これまでの標準治療を凌駕する効果を示した。しかし、近年増加している NASH 由来の肝癌には効果が乏しいことが報告されている。北海道がんセンターにおいてチェックポイント阻害剤を使用した肝臓がんにおいて腸内細菌と治療効果の比較を行った。その結果 viral HCC と non-viral HCC においてバクテロイデス門の比率に違いを認め、PFS と相関関係を認めることが判明した。		

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2021B16	
申請者に関する事項	氏 名	塩見 大輔
	所属機関名	立教大学 理学部
	職 名	教授
研究課題名		細菌の L-form 化と細菌感染症の関連
研究期間		2021 年度～2023 年度（3 年間）
本センター担当教員		三室 仁美

令和5年度（2023年度）研究成果の概要

（和文：600～800 字を目安に記入）

バクテリアはペニシリン、メチシリンなどの細胞壁合成を阻害する抗生物質存在下で、嫌気、高浸透圧などの条件下では、集団中の一部の細胞（およそ 1,000～10,000 細胞に 1 細胞程度）は、細胞壁が無くとも増殖可能な状態に変換して生存する。この状態のバクテリアは L-form と呼ばれる。L-form は再発性尿路感染症など細菌感染症の患者からも単離されている。また、尿を培地に加えることにより L-form に安定に変換できる。以上のことから L-form と細菌感染症の密接な関連が示唆される。

これまでの共同研究では、非病原性大腸菌 K-12 株の機能未知非必須遺伝子 *yobH* が大腸菌 L-form の増殖に必須であることを見いだした。本年度は、引き続き *yobH* 欠損株および YobH タンパク質の解析を行った。細胞壁に結合する蛍光物質による標識実験から、*yobH* 欠損株では野生株に比較して細胞壁が多いことが示唆されたことから YobH は細胞壁の分解に関わる因子の可能性が考えられる。また、YobH の C 末端に FLAG タグを融合した YobH-FLAG を発現する株を用いて、通常の細胞と L-form 細胞での発現量を比較したところ、明らかに L-form ではタンパク質量が多かった。これらの結果から、L-form 変換時に *yobH* の発現量が上昇し、YobH が細胞壁の分解を促進し、L-form への変換を促す可能性が考えられる。今後は、リアルタイムなどにより L-form 変換時に実際に転写レベルでの発現上昇が起るかを明らかにする。また、YobH と相互作用する因子を明らかに、YobH の機能解明を行う。

今年度から開始した新たな研究で、複数の抗生物質存在下で L-form に変換しないことを見いだしていたが、その抑圧変異株を単離した。その変異部位（*ppsA* 遺伝子）を決定した。興味深いことに、センターの資産であるピロリ菌ゲノム配列情報を調べたところ、大腸菌 K-12 株の PpsA と 53%程度相同なアミノ酸配列をもつタンパク質がピロリ菌にも共通して保持されていることが明らかになった。今後はそれらの抑圧機構を明らかにしていく。

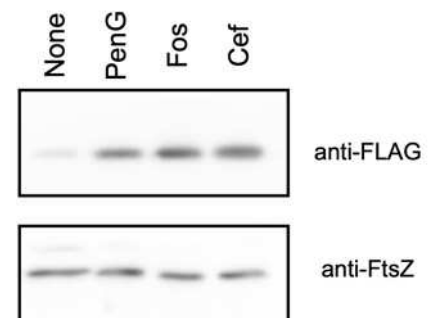


図 L-form における YobH-FLAG のタンパク質量（上）。コントロールとして FtsZ のタンパク質量を比較した。ペニシリン G(PenG)、ホスホマイシン(Fos)、セフスロジン(Cef)によって L-form に変換した。

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2022B01	
申請者に関する事項	氏 名	藤 重夫
	所属機関名	大阪国際がんセンター 血液内科
	職 名	副部長
研究課題名		同種造血幹細胞移植後の日和見感染症 PCR 法の最適化に関する検討
研究期間		2022 年度～2023 年度（2 年間）
本センター担当教員		緒方 正男

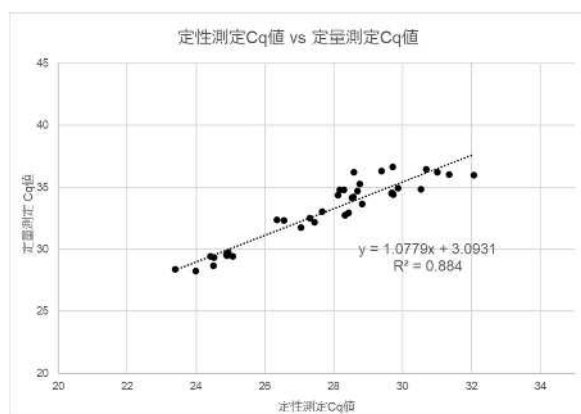
令和5年度（2023年度）研究成果の概要

同種造血幹細胞移植（以下同種移植）後に日和見感染症ウイルス検出 PCR キット（島津製作所、13 種類のウイルスを検出、HHV6、CMV、ADV 等を含む）にて定性検査を施行された例を対象とした。その中で定性検査で陽性となり、定量検査も施行された例において、定性検査での Cq 値と定量検査での Copy 数の相関等や臨床経過との関連等を各ウイルス毎に統計学的に検討を行った。

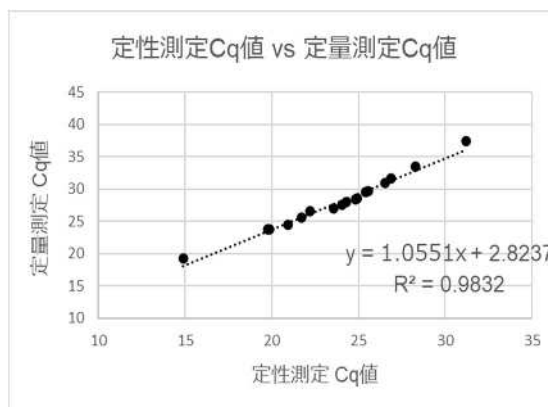
13 種類のウイルスの検査項目の中で陽性率が高いウイルスとして HHV6、また陽性となった際の予後と臨床成績の相関が報告され临床上重要と考えられた ADV について解析を進めた。HHV6 に関しては延べ 51 検体において HHV6 が定性で陽性となり、定量検査を行った。定性測定 Cq 値と定量測定 Cq 値の相関は $R^2=0.88$ と高かった（定量測定 Cq 値 $=1.08 \times$ 定性測定 Cq 値 $+ 3.09$ ）。同様に定性測定 Cq 値とコピー数に関する相関も $R^2=0.85$ と高かった。

ADV に関しては陽性例自体が少なく、のべ 17 検体において ADV が定性で陽性となり、定量検査を行った。定性測定 Cq 値と定量測定 Cq 値の相関は $R^2=0.98$ と非常に高かった（定量測定 Cq 値 $=1.06 \times$ 定性測定 Cq 値 $+ 2.82$ ）。同様に定性測定 Cq 値とコピー数の相関も $R^2=0.98$ と非常に高かった。

（図 1, Figure 1）



（図 2, Figure 2）



本研究において HHV6 と ADV において定性・定量の 2 つの検査系により得られる結果の相関についての検討を行ったが、両者の相関は非常に高い結果が得られた。現在本邦において一部施設にて先進医療として行われている同検査法の検討においては定性・定量の両者の測定が勧められているが、本研究結果からは定性の結果のみで十分と考えられ、このことは実臨床における検査の測定コストの削減に貢献することが期待される。現在研究成果の論文化を進めている。

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2022B07	
申請者に関する事項	氏 名	福島 慎二
	所属機関名	東京医科大学病院 渡航者医療センター
	職 名	准教授
研究課題名		狂犬病ワクチン接種後の狂犬病ウイルス抗体価に関する研究
研究期間		2022 年度～2023 年度（2 年間）
本センター担当教員		西園 晃

令和5年度（2023年度）研究成果の概要

【背景・目的】

日本は狂犬病清浄国であるが、世界の多くの地域では依然としてヒトの感染例が発生している。狂犬病リスク国への渡航者には狂犬病ワクチンの接種が推奨されているが、曝露前接種の2-3回接種した後に狂犬病ウイルス抗体価が何年間持続するかデータが乏しい。

本研究の目的は、狂犬病ワクチンの接種から2年間以上経過した日本人成人の狂犬病ウイルス抗体価の保有状況を確認することである。本研究の結果は、日本から海外への渡航者に対する重要な研究課題であり、狂犬病ワクチンに関する重要な基礎データとなりうる。

【研究状況】

倫理委員会の承認後、臨床研究保険に加入し、本研究を開始した。

対象は、狂犬病ワクチンの最終接種（曝露前・曝露後接種を含む）から2年以上経過した日本人成人100名であった。採血を1回行い、狂犬病抗体価を測定した。狂犬病ウイルス抗体は、定性法（RAPINA）と大分大学微生物学講座でRAFFIT法による中和抗体価を測定した。解析は、過去の接種回数や最終接種からの経過年数などを層別に、抗体保有率と抗体価の幾何平均値を算出した。

2022年度中に100名を登録完了した。2022～2023年度に、狂犬病ウイルス抗体価を測定していただいた。抗体価結果をもとに解析を進め、2023年度は学会発表した。現在、「狂犬病曝露前接種後2年以上経過した者の狂犬病ウイルス抗体価」と「狂犬病ウイルス抗体価測定におけるRAFFIT法とRAPINA法の関係」をテーマにした論文2編を作成中である。

【研究成果】

① 狂犬病ワクチン曝露前接種から2年間以上経過した者の狂犬病ウイルス抗体価

対象者97名の内訳は男性53例、女性46例で、同意取得時の年齢は23～71歳（平均41歳）であった。過去の接種歴は、2回接種10名、3回58名、4回17名、5回接種以上12名であった。狂犬病ウイルスに対する抗体価が0.5IU/ml以上の抗体保有率は、2回接種後60%、3回86.2%、4回94.1%、5回以上の接種で100%であった。狂犬病ウイルスに対する抗体価の幾何平均値は、2回接種後0.64IU/ml、3回1.15IU/ml、4回5.58IU/ml、5回以上の接種で3.64IU/mlであった。

狂犬病ワクチン曝露前接種を受け2年以上経過すると、曝露前2回接種の者は、3回以上接種した者よりも抗体価が陰性であることが多いと推測された。狂犬病ワクチン2回の接種で長期間経過した者は、リスクに応じて追加接種を検討すべきと考える。

② 狂犬病ウイルス抗体価測定におけるRAFFIT法とRAPINA法の関係

RAPINAの感度、特異度、偽陰性率、偽陽性率、一致率はそれぞれ88.5%、100%、11.5%、0%、90.0%であった。陽性的中率は100%、陰性的中率は56.5%であった。カッパ係数（ $\kappa = 0.667$ ）は中程度の一致を示していた。

【大分大学グローバル研究センターとの共同研究】

大分大学微生物学講座で狂犬病ウイルス中和抗体価を測定していただき、解析に関して助言を頂いた。本共同研究費は、抗体価測定にかかわる費用（RAPINAの購入費、大分大学微生物講座での中和抗体価測定費）、論文の作成費として使用した。

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2022B09	
申請者に関する事項	氏 名	池辺 詠美
	所属機関名	国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター
	職 名	主任研究官
研究課題名		NEDD8 活性化酵素（NEDD8 Activating Enzyme:NAE）阻害剤の ATL 治療薬としての有効性の検討
研究期間		2022 年度～2023 年度（2 年間）
本センター担当教員		伊波 英克

令和5年度（2023年度）研究成果の概要

成人 T 細胞白血病（ATL）細胞に見られる恒常的な NF- κ B の活性化は、発癌やアポトーシス抵抗性への関与が示唆されており、NF- κ B は ATL の治療標的となることが期待される。NEDD8 Activating Enzyme（NAE）阻害剤は NF- κ B 抑制性タンパク質 I κ B α のプロテアソーム分解を抑制することで、間接的に NF- κ B を不活化することから、ATL 治療薬としての有効性、及び安全性について評価を進めている。

これまでの研究成果により、NAE 阻害剤の ATL 治療薬としての有効性、及び安全性を In vitro、In vivo にて明らかにしてきた。本共同研究（1 年目）は、患者検体において NAE 阻害剤の抗 ATL 効果を明らかにし、作用機序として予想される NF- κ B 活性化抑制作用について確認した。

本年度（2 年目）は、詳細な作用機序の解明を目指し、HTLV-1 感染細胞と非感染細胞が混在する無症候キャリア検体を用いて NAE 阻害剤が HTLV-1 感染細胞と非感染細胞それぞれに与える影響をシングルセルレベルで解析し、NAE 阻害剤により感染細胞特異的に発現変動する遺伝子について検討した。

HTLV-1 キャリア CD4⁺T 細胞（3 検体）に NAE 阻害剤（TAS4464）を作用させ、シングルセル RNA-seq を行ったところ、合計 30,060 細胞は 15 のクラスターに分類された（図 1A）。ウイルス RNA が検出された細胞を感染細胞として解析すると、4,562/30,060 細胞（15%）が感染細胞として検出され、70%以上が感染細胞であるクラスター 4,7 が特定された（図 1B）。

この 2 つのクラスター 4,7 は TAS4464 の有無により有意に細胞数が異なり、NAE 阻害剤が感染細胞特異的に作用することが示唆された（図 2）。

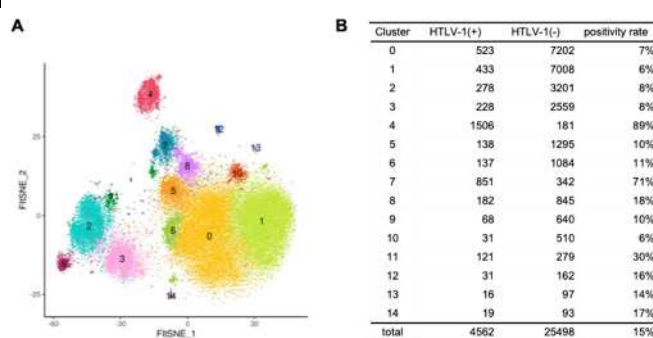


図 1. HTLV-1 キャリア CD4⁺ T 細胞の scRNA-seq プロファイル

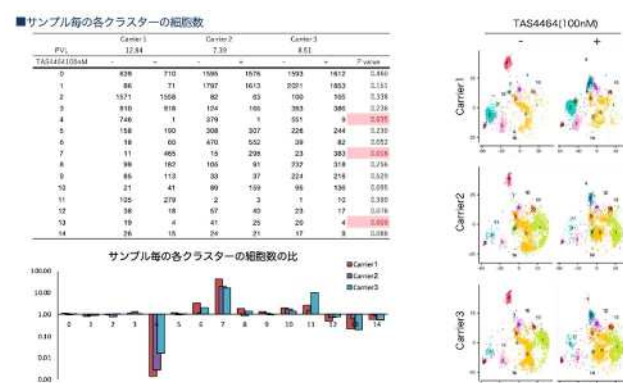


図 2. NAE 阻害剤の感染細胞特異的な作用

令和 5 年度（2023 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2022C01	
申請者に関する事項	氏 名	宮崎 安弘
	所属機関名	大阪急性期・総合医療センター 外科
	職 名	副部長
研究課題名	減量・代謝改善手術後に COVID-19 に感染した患者の臨床的特徴	
研究期間	2022 年度～2023 年度（2 年間）	
本センター担当教員	太田 正之	
令和 5 年度（2023 年度）研究成果の概要		
本研究では多施設共同研究として後方視的にデータの集積・解析を行った。減量・代謝改善手術施行施設に 1 次アンケート調査を行い、減量・代謝改善手術後に COVID-19 に感染した症例を有する施設を特定したところ、計 26 施設であった。その後に 2 次調査を行い、個々の施設の治療担当者にデータシートを送り、患者本人の同意を得て（患者死亡の場合はオプトアウトにより）、個々の症例の臨床的特徴についてデータの集積を行った。データ集積項目は、前回報告書に記載通りである。 2023 年 3 月末締め切りでデータシートを回収し、4 月～6 月においてデータの解析を行った。26 施設より 119 名の患者データを回収できている。厚生労働省、および大阪府より報告されている日本人 COVID-19 感染データと比較したところ、感染率は 4.5%であり、一般的な感染率 7.5%より低かった。今回の 119 例の患者においては、COVID-19 感染による死亡例はなかったが、中等症以上の COVID-19 肺炎発生率（13.4%）は一般集団（1.3%）よりも高かった。また、減量・代謝改善手術実施症例における肺炎重症度に影響する因子として、感染時ワクチン接種の有無、および術後最低体重時における脂質異常症寛解率という 2 つの因子が同定された。世界的にもこれらの因子は COVID-19 増悪に影響する因子と報告されており、邦人においても同様の因子が初めて抽出されたことになる。 これらの結果について、論文にまとめ、2023 年 9 月に英文ジャーナル Obesity surgery に投稿した。論文レビューに非常に時間がかかり、2023 年 12 月に Revise comment があり、そちらに対応し 2024 年 1 月に論文修正後再投稿を行うも、アクセプトとならなかった。よって、次のジャーナル Annals of gastroenterological Surgery 誌に投稿すべく原稿修正を行い、2024 年 3 月に投稿した。		

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2023B01	
申請者に関する事項	氏 名	川野 光興
	所属機関名	中村学園大学 栄養科学部 栄養科学科
	職 名	准教授
研究課題名		バクテリオファージを用いた食品由来薬剤耐性菌の殺菌法の開発
研究期間		2023 年度（1 年間）
本センター担当教員		三好 智博

令和5年度（2023年度）研究成果の概要

福岡市内の小売店で購入した鶏肉から 12 種類の ESBL 産生菌を分離した。この ESBL 産生菌に感染し溶菌するファージの探索を行い、それを用いて食品上で殺菌効果の検証を行った。

下水サンプル液と ESBL 産生菌培養液を混合し、二重平板法を用いてプラーク形成実験を行った。上記実験において、プラークが大きかった 3 種類のファージ（ ϕ 13-1、 ϕ 14-1、 ϕ 17-1）を 12 種類の ESBL 産生菌に感染させる実験を二重平板法で行った。今回は MOI 100~0.0001 の 7 種類とファージなしの合計 8 種類をマイクロタイタープレートに分注した。30 分おきに 24 時間継続して OD₆₁₀ の吸光度測定を行い、増殖曲線を作成した。食品として鶏むね肉、プロセスチーズを殺菌した。その後チューブに移した食品に宿主菌を塗布し、乾燥させた後ファージ液を塗布した。28℃で一晩培養した食品を SM バッファーで処理し、希釈した菌液をセフトキシム（2 μ g/ml）含有 LB 寒天培地に塗布して 37℃で一晩培養した。

12 種類中 10 種類の ESBL 産生菌に対し、感染するファージを単離することができた。どのファージも探索に用いた ESBL 産生菌にしか感染せず、高い宿主特異性を示した。12 種類中 ϕ 13-1 のプラークが大きく透明度も高かったため、 ϕ 13-1 の高力価ファージ液を作成した。液体培養におけるファージの感染実験において、24 時間後に低い濁度を示したのは、MOI=1 と MOI=0.01 であった。チーズ上では、ファージを入れた液は 6.0×10^5 cfu/ml を示し、ファージを入れていない液は 2.3×10^7 cfu/ml を示し、ESBL 産生菌を 97.3%減少することができた。鶏肉と米飯ではファージによる殺菌効果を証明するには至らなかった。電子顕微鏡での撮影により、Myovirus と Siphovirus と呼ばれるファージを観察した。

今後は、ファージの探索に用いる汚水のバリエーションを増やし、様々な細菌に感染できるファージを分離する。今後は食品や培養温度、pH 等を変えてさらに検討する。

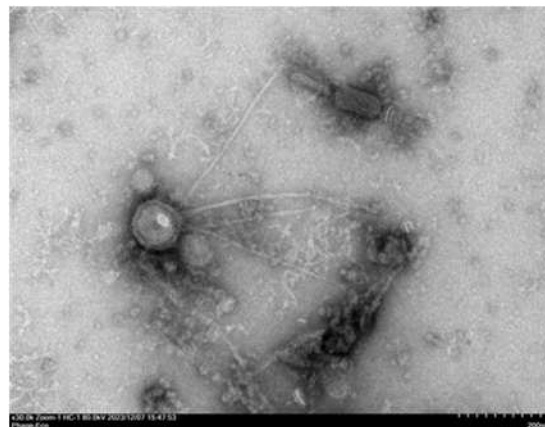


図1（左下）Myovirus（右上）Siphovirus

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2023B02	
申請者に関する事項	氏 名	寺尾 豊
	所属機関名	新潟大学 大学院医歯学総合研究科
	職 名	教授
研究課題名	薬剤耐性菌の消毒に関する開発研究	
研究期間	2023 年度（1 年間）	
本センター担当教員	三好 智博	

令和5年度（2023年度）研究成果の概要

I. 研究の背景

新型コロナウイルスの流行を受け、消毒液を使うことが増えました。そのため、消毒液の供給不足、購入費による家計の圧迫、そして使用済み液の排出による環境悪化への懸念などの各種課題が生じています。最も一般的なエタノール消毒液は、アレルギーの問題のほか、製造段階におけるコストや材料調達の問題もあります。素材の1つであるバイオエタノールは、トウモロコシや木材などから合成されます。しかし、それら材料を確保するために、途上国の食料供給の悪化や熱帯雨林の環境破壊が引き起こされています。つまり、SDGsの観点から解決困難な課題を抱えています。そこで、エタノールなどの化学薬品を用いた既存消毒液に替わる、水と空気ベースの「安全かつ安心、そしてSDGsな国産消毒液」の開発を目指しました。

II. 研究の概要

酸素原子から構成されるオゾンが空気から生成でき、各種微生物に消毒活性を示します。しかし、通常の方法で水に溶解させたオゾンは、すぐに気泡として水面へ浮上し、空気中で酸素へと分解される欠点を持ち、消毒液には適していません。そこで、気体を約100 nmのバブル、すなわちナノサイズ（ナノは10億分の1）の気泡にしてから水に溶解する「ナノバブル技術」に着目しました。ナノバブルは、長時間水に溶け続けることが報告されています。その理由はナノサイズの直径により、浮力が誤差程度にしか生じず、ナノサイズの気泡は水面へ浮上することなく溶液中に維持されるからです。本研究では、オゾンナノバブル状態で水に溶解する装置を開発し（新潟大学工学部の牛田晃臣准教授とフューテックニイガタ合同会社の樋渡忠氏らとの共同研究）、24時間以上、消毒効果のあるオゾン濃度が水中で維持される消毒液（＝オゾン・ナノ水）を生成しました。そして、食品加工や調理の場、介護施設や病院で病原性を発揮する各種細菌に対するオゾン・ナノ水の消毒効果（人体に悪影響の無い条件下で）を調べました。

III. 研究の成果

結果1：同一被験者の左手をオゾン・ナノ水で洗浄し、右手を蒸留水で洗浄後、自然乾燥させた左手および右手を寒天培地に圧接し一晚培養しました（8名で実験）。その結果、オゾン・ナノ水洗浄では、蒸留水洗浄と比べ、手指の細菌が有意に減少しました。

結果2：被験者ごとに歯列を歯ブラシで刷掃し、刷掃後の歯ブラシを生理食塩水に浸漬し、超音波にて付着細菌を回収しました。回収した細菌懸濁液に、オゾン・ナノ水もしくは蒸留水を加え、その後寒天培地に滴下し一晚培養しました。その結果、オゾン・ナノ水添加では、蒸留水添加と比べ、細菌が有意に減少しました。

結果3：黄色ブドウ球菌や緑膿菌は、院内感染などを引き起こしますが、抗菌薬が効きにくく、感染すると治療が困難になります。黄色ブドウ球菌および緑膿菌を培養し、オゾン・ナノ水もしくは蒸留水を加え、その後寒天培地に滴下し一晚培養しました。その結果、オゾン・ナノ水添加では、蒸留水添加と比べ、黄色ブドウ球菌および緑膿菌が有意に減少しました。

結果4：各種の病原細菌が産生する外毒素へのオゾン・ナノ水の影響を調べた結果、供試した黄色ブドウ球菌エンテロトキシン、肺炎球菌ニューモリシン、歯周病原細菌ロイコトキシンの全てを分解し、不活化できることが示されました。

IV. 今後の展開

オゾンは自然環境下で酸素に分解されるため、環境負荷が低いという利点を持ちます。さらに、オゾン・ナノ水は、空気由来のオゾンと水のみを原料とするため、一度小型の生成装置を導入すれば、低コストで長期的・大量に生産可能となります。そのため、新型コロナウイルス感染拡大時に発生した、エタノール買い占め等による消毒液の欠品問題の解決策ともなり得ます。医療の場では、病院スタッフの手指や医療機器の消毒に活用でき、安全で安心な院内感染対策に繋がると考えられます。介護施設などの集団生活の場では、入所者それぞれの歯ブラシや持ち物を安心安全に消毒することにも使えます。また、食品を扱う調理場や病院・介護施設などの水回りに繁殖する病原細菌に対しても、消毒液として使用できる将来性も有します。さらには、トウモロコシや木材等を原料とするバイオエタノールとは異なり、途上国の食や地球環境への弊害なく、安価に大量製造が可能であり、SDGsな国際貢献の可能性も有します。

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2023B05	
申請者に関する事項	氏 名	野杵 由一郎
	所属機関名	新潟大学 医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野
	職 名	教授
研究課題名	口腔と胃のピロリ菌感染経路や感染機序を包括的に解明する為の磁気ビーズを用いた MLST 法の確立	
研究期間	2023 年度（1 年間）	
本センター担当教員	三室 仁美	

令和5年度（2023年度）研究成果の概要

本研究ではポリクローナル抗体結合磁気ビーズを用いて、口腔 *Helicobacter pylori* (以下ピロリ菌)を検出する方法を確立し、口腔サンプルから分離できるか否かを検証する。

方法

H. pylori IID3023 株を培養し、OD₆₀₀ を $5 \times 10^{-1} \sim 10^{-7}$ まで調整した。また、それらの菌液を *Streptococcus mutans* UA159 懸濁液 (OD₆₀₀ 0.5) にそれぞれ混和した。抗体は Anti-*Helicobacter pylori* ab20459 (Abcam, Cambridge, England) を使用した。磁気ビーズは Dynabeads M-280 Tosylactivated (Veritas, Tokyo, Japan) を用い、プロトコールに従って処理した。各濃度の菌液 1ml に反応後回収したビーズを、培養及び Nested PCR で回収率を確認した。

結果

培養法ではいずれの濃度でも菌が回収されたが、濃度の低下とともに回収量は低下した。*S. mutans* 混合菌液でも同様の結果であった。(表 1)

Nested PCR での検出限界は OD₆₀₀ 5×10^{-5} であった。混合菌液の検出限界は OD₆₀₀ 5×10^{-4} であり、回収率の低下が確認された。(表 2)

考察

以前の報告により、1st 及び 2nd PCR による検出限界はそれぞれ OD₆₀₀ 5×10^{-3} 、 5×10^{-6} である。培養法では全濃度でコロニーが確認されているが、口腔ピロリ菌が培養可能な状態で存在するか不明である。Nested PCR による検出限界は 5×10^{-5} であり、混合菌液では回収率が低下する。口腔ピロリ菌は 2nd PCR で検出できる濃度で存在し、磁気ビーズで回収できると証明することはできない。

現在、使用する抗体の種類を増やし、抗体により検出率が異なることを確認している。抗体を混合することで、多様な形態で存在しうる口腔ピロリ菌の検出に対応可能か検証している。

Table 1. Isolation of *H. pylori* using immunomagnetic beads by culture method.

<i>H. pylori</i> OD ₆₀₀	Only <i>H. pylori</i>	<i>S. mutans</i> mixed
5×10^{-5}	+	+
5×10^{-6}	+	+
5×10^{-7}	+	+

Tabel 2. Isolation of *H. pylori* using immunomagnetic beads by Nested PCR.

<i>H. pylori</i> OD ₆₀₀	Only <i>H. pylori</i>	<i>S. mutans</i> mixed
5×10^{-4}	+	+
5×10^{-5}	+	-
5×10^{-6}	-	-
5×10^{-7}	-	-

Report for Joint Research Fiscal Year 2023

Adoption number	2023B10
Name	Stella I. Smith
Affiliated Organization	Nigerian Institute of Medical Research, Yaba, Lagos
Job Title	Director of Research
Research Title	The Complete Genome Sequencing of Nigerian <i>Helicobacter pylori</i> Isolates.
Research Period	FY 2023 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Yoshio Yamaoka
Summary of Research Results for Fiscal Year 2023	
Studying genetic population using the maximum likelihood approach, we have observed that all the nigerian strains clustered with hpAfrica1 population strains. 5 out of 7 strains clustered with hspAfrica1MiscAmerica subpopulation and 2 of them clustered with hspAfrica1NAmerica subpopulation. (Kabamba <i>et al.</i>, 2018). To assess virulence factors, we used the VFDB database within the Abricate pipeline. Strains 26695, J99, SouthAfrica20, and SouthAfrica7 were utilized for comparative purposes. Nigerian strains exhibited VF counts ranging from 110 to 113, like strains 26695 and J99. Further investigation revealed that all strains were positive for CagPAI, with intact CagPAI. The CagPAI region displayed a lower GC content (36%) compared to the rest of the genomes. The length of the CagPAI region varied, with two strains measuring approximately 36,000 bp, two others around 50,000 bp, and the rest 51,000 bp. Similar to strains 26695 and J99, the CagPAI was flanked between <i>era</i> and <i>murI</i> genes in the strains with a CagPAI length of 30,000 bp. Conversely, strains with a CagPAI region of about 50,000 bp had their CagPAI flanked between <i>murI</i> and <i>dapB</i> genes. Additionally, the <i>cagA</i> gene was positioned upstream of <i>cagI</i>, with several genes (including <i>glnA</i>, <i>rplI</i>, <i>hslV</i>, <i>clpY</i>, <i>era2</i>, <i>recD2</i>, etc.) inserted between these two. The <i>cagA</i> type identified was western, with all sequences carrying the ABC motif except for one strain, which carried the BC motif. All strains harbored the EPIYA motif. Regarding <i>vacA</i> genotype, all strains exhibited the most virulent genotype <i>s1m1dlil</i>, except for one strain displaying the motif <i>s1m2dlil</i>. Moreover, all strains had an <i>oipA</i> status of ON. In addition to the CagPAI, Nigerian strains also carried other type 4 secretion systems, whose role in the virulence of <i>H. pylori</i> has been discussed in numerous studies. The type IV secretion system 3 (tfs3 ICE) exhibited a GC content of 33-34%.	

Report for Joint Research Fiscal Year 2023

Adoption number	2023B14
Name	Muhammad Miftahussurur
Affiliated Organization	Faculty of Medicine, Universitas Airlangga
Job Title	Lecturer
Research Topic	Gastric Mucosa Pathology Status and Microbiome
Research Period	FY 2023 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Yoshio Yamaoka
Summary of Research Results for Fiscal Year 2023	
The research was done in Gabriel Manek Hospital in Atambua, East Java, Indonesia. A total of 123 dyspeptic patients was interviewed and then endoscopy was done. Biopsy was taken from gastric antrum and corpus. From endoscopy, most patients had gastritis with twelve patients had gastric ulcers. One of the biopsies was used for rapid urease test (RUT), made by the Department of Environmental and Preventive Medicine, Oita University, Japan, and results showed 32 patients are positives, composes of 17 males and 15 females. From 32 patients, 28 patients were of Timor ethnicity, an ethnicity native to the island. We collected two biopsies, each from antrum and corpus was preserved in 10% formalin for histological assessment, one biopsy for culture, and another one for RNA later. Blood samples was taken and centrifuged, serum was extracted. All biopsy samples for culture were homogenized and plated, resulting in twenty samples growing, while twelve RUT-positive samples were not grown. Histologic assessment with staining will be done to evaluate the cellular appearance of samples. For further analysis, we will check the antimicrobial resistance of these samples, and sequence the 20 attainable strains to see their virulence factors. Moreover, we would like to check the microbiome of these population, since from the questionnaires, the population had a high-salt diet.	

Report for Joint Research Fiscal Year 2023

Adoption number	2023B16
Name	Kimberly Fornace
Affiliated Organization	School of Biodiversity, One Health and Veterinary Medicine, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom.
Job Title	Associate Professor
Research Title	Molecular and serological survey for HTLV-1 infection in the Sabah state of Northern Borneo, Malaysia.
Research Period	FY2023 (1 year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Hidekatsu Iha

Summary of Research Results for Fiscal Year 2023

HTLV-1 infection has been identified in various regions of the pan-Pacific zone, but comprehensive epidemiological studies in Southeast Asia have not been conducted. For the first time, we have identified a high prevalence area of HTLV-1 in northern Borneo, Malaysia. This project aims to perform definitive diagnosis of samples potentially infected with HTLV-1, using a few thousands blood samples collected by my research group in Malaysian Borneo. We collected a total of 3,753 blood samples from Sabah state, comprising 1,785 samples from rural districts of Kudat during October 2014 and January 2015, volunteer blood donors and municipal workers residing in the metropolitan area of Kota Kinabalu (1,586 samples) and febrile patients in Kota Belud (382 samples) between August 2016 and July 2018. Serological evaluation of HTLV-1 infection was conducted using the particle agglutination method (SERODIRR-HTLV-1, Fujirebio, Tokyo, Japan) and further confirmed with line-blot analysis (INNO-LIA-SCORE HTLV, Fujirebio, Tokyo, Japan). Blood samples were collected from individuals representing 40 different ethnic groups. Among the samples from Kota Kinabalu (0/1,586), all were found to be negative for HTLV-1. In Kota Belud, one sample was inconclusive (1/382), while in the Kudat area, 45 samples tested positive (2.3%), and 61 were inconclusive (3.1%). Further line-blot evaluation identified 68 samples as HTLV-1 positive out of 106 tested (64.2%). The estimated HTLV-1 prevalence in this area was as high as 3.8%. We hereby report the first results of HTLV-1 prevalence in the northern area of Borneo, Malaysia. Expanding surveillance to provide the detailed epidemiological profiles of HTLV-1 in the relevant area including the Peninsular Malaysia is ongoing. We are planning to advance epidemiological studies covering the entire Malaysia, including the Malay Peninsula, to understand the HTLV-1 infection status in this region and contribute to the healthcare policies of the country.

Report for Joint Research Fiscal Year 2023

Adoption number	2023B17
Name	Ernest Wandera Apondi
Affiliated Organization	Kenya Medical Research Institute
Job Title	Senior Research Scientist
Research Title	Whole Genomic Analysis of Rotaviruses Detected in Humans and Animals in Kenya
Research Period	FY 2023 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Satoshi Komoto

Summary of Research Results for Fiscal Year 2023

During the implementation of the Joint Research FY 2023, we identified several archived samples which had previously tested positive for rotavirus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and subjected them to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) to determine their electropherotypes (RNA migration patterns) that would subsequently inform their selection for next generation sequencing (NGS). A total 24 strains were selected for NGS, 20 of which had been obtained from diarrheal children aged below 5 years attending various health facilities in Kenya, while 4 had been collected from wild birds. Nine of these samples displayed short electropherotype; four showed long electropherotype; while electropherotypes could not be determined for the rest of the samples. We subjected 24 of these strains to Illumina MiSeq next-generation sequencing. Majority of the strains were G3P[8] (49%), followed by G3P[6] (13%). Of noteworthy, the 11 genes of strain G8P[14] were assigned as G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3. Phylogenetic analysis of strain G8P[14] provide compelling evidence to suggest that the strain may have been directly transmitted from artiodactyls to humans. We are preparing a manuscript for these novel findings. Additionally, we collected 28 stool samples during the recent rotavirus outbreak in Kenya, analyzed them by ELISA, PAGE and RT-PCR. Of the 22 samples obtained from Mombasa County in Coastal Kenya, 7 tested positive for group A rotavirus representing a prevalence of 31.8% (95% CI: 15.1-53.1%). In Kiambu County, Central Kenya, rotavirus was detected at 33.3% (2/6, 95% CI: 6.0-73.8%). We intend to further analyze these samples by NGS during the Joint Research FY 2024 in order to gain more insights into their origin, evolutionary patterns and transmission dynamics and to monitor vaccine effectiveness against them.

Report for Joint Research Fiscal Year 2023

Adoption number	2023B19
Name	Ratana Tacharoenmuang
Affiliated Organization	National Institute of Health, Thailand
Job Title	Medical Scientist
Research Title	Epidemiology and genomics study of rotaviruses in diarrheic human and animal in Thailand
Research Period	FY 2023 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Satoshi Komoto

Summary of Research Results for Fiscal Year 2023

Rotavirus is the leading cause of diarrhea in developed and developing countries, and it can be especially dangerous for infants and young children. Besides causing diarrhea in humans, rotavirus can also cause diarrhea in animals, especially economic animals. Rotavirus genome consists of 11 genes, and reassortment has easily occurred. Currently, the new strains of rotavirus caused by reassortment of rotavirus genes have been found in humans and mammals, especially cows, pigs, and horses, at higher rates than other animals, and the current rotavirus vaccine may not protect against this new strain. This study aims to study the strains and genomic properties of Thai rotavirus causing diarrhea in humans and mammals and to analyze the evolutionary mutation of the rotavirus. Since 1 October 2021 – 31 December 2023, 857 stool samples were collected from diarrheic humans, cows, pigs, and horses in Nakhon Pathom, Ratchaburi, and Udonthani provinces. 339 stool were collected from diarrhea cases, and 343, 147, and 28 stool samples were collected from diarrheic cows, pigs, and horses, respectively. All 857 samples were subjected to detect rotavirus groups A, B, and C by conventional RT-PCR. There are 110 samples positive for rotavirus; 98 samples were identified as group A, and the other 16 samples were group C rotavirus. Then, 110 rotaviruses were analyzed the VP7 and VP4 genes by Sanger sequencing. The results shown that G3P[8] was dominance genotype in 35.5%, follow by G9P[13] and G6P[11] in 20.9% and 18.1%, respectively. The other genotype were belong to G1P[6], G1P[8], G5P[6], G8P[8], and G10P[11]. Then 11 G3P[8], 10 G6P[11], 3 G10P[11], 2 G8P[8], 2 G9P[13], and 1 G1P[6] were subject to perform whole-genome characteristics using Miseq Illumina. The whole genome analysis result showed that each of 11 genes of G3P[8] originated from human rotavirus, while the G6P[11] and G9P[13] showed a genome constellation as G6-P[11]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3, and G9-P[13]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T7-E1-H1, respectively.

令和5年度（2023年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2023C01	
申請者に関する事項	氏 名	大城 崇司
	所属機関名	東邦大学医療センター佐倉病院外科
	職 名	准教授
研究課題名	腹腔鏡下スリーブ状胃切除術後縫合不全時の繁殖細菌の検討	
研究期間	2023 年度（1 年間）	
本センター担当教員	太田 正之	
令和5年度（2023 年度）研究成果の概要		
最新の日本内視鏡下肥満・糖尿病外科研究会による全国調査によれば、2006 年から行われた腹腔鏡下スリーブ状胃切除術（LSG）5106 例中（全国 85 施設）、21 例（0.4%、13 施設）に縫合不全（リーク）を認めたことが分かっている（プロポフォール注入症候群による死亡 1 例を含む）。それを踏まえ、演者を研究代表者として「腹腔鏡下スリーブ状胃切除術後縫合不全の実態調査」を行ったので中間解析の結果を報告する。 21 例（男：7、女：14）のリーク症例の平均年齢・体重・BMI はそれぞれ 37 歳・105kg・40.7kg/m²であった。Acute leak（術後 7 日以下）と Early leak（術後 1～6 週）が 29%、62%であり、His 角近傍からのリークを最多とし、91%が胃体上部から発生していた。初期治療としてドレナージ術（手術、CT・US ガイド下）が選択されたのは 57%に留まっていた。プロポフォール注入症候群による死亡例を 1 例に認めた。（内視鏡的治療として最も行われた）ステント治療が奏功した症例は 10 例中 5 例であった。最終的に、根治術（胃全摘、噴切、縫合）が必要な症例は 5 例で、その群を陽性とした場合、リーク解決までの日数の ROC 曲線における AUC は 0.72 で、カットオフ値を 86 日とすると、感度は 0.667、特異度は 0.8 であった（95%信頼区間は 0.490-0.950）。 初回手術の退院後にもリークが発生すること、（必要に応じて）初期治療としてはドレナージを行うこと、引き続き行うステント治療の成功率は予想されるよりも低いことも念頭に、リークの改善がない場合は、最終的な根治術の時期を先延ばしにしないことが重要かと思われる。 上記については、研究期間内に大分県に 2 度渡航し（大分大学医学部ならびに大分市内）、研究成果の報告ならびに論文化に向けての研究解析方法についてディスカッションを行った。		