

令和元年5月16日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10049

研究課題名（和文）早産児の慢性肺疾患進展に対する細菌学的要因の特定と発症予防法の確立

研究課題名（英文）Detection of microbiological aspects in the development of chronic lung disease in premature infants and prevention strategies of the disease

研究代表者

保科 隆之（Hoshina, Takayuki）

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30398078

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）： 出生時から呼吸障害を呈し、人工呼吸器管理を行った早産児を対象とし、気道細菌叢の解析を行った。

出生直後の胃液を51例の児から採取したところ、39%で細菌陽性となり、細菌叢解析では、Lactobacillus属、Ureaplasma parvumが最優占菌種となった症例が多かった。

出生後、人工呼吸器管理を1週間以上行われ、最終的に慢性肺疾患に進展した4例について、気管洗浄液の細菌叢解析を行ったところ、出生時に検出されたLactobacillus属やU. parvumは検出されなかった。一方、すべての症例において、Staphylococcus epidermidisが優占的に検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

出生直後に採取した児の胃液から優占的に検出された頻度の高かった腔常在細菌が長期間、下気道から検出されることはなく、これらの細菌が持続感染することが慢性肺疾患進展の要因となっていることは否定的だった。一方で慢性肺疾患に進展したすべて児の下気道からS. epidermidisが優占的に検出されており、同菌の持続的な下気道への常在が慢性肺疾患進展に関与している可能性が示唆された。

この結果から慢性肺疾患に進展に対する細菌学的要因の関与が疑われ、さらなる解析を行うことで、慢性肺疾患進展予防に対して細菌叢バランスを保つことの重要性が証明できれば、新生児医療のさらなる発展に通じると考えられる。

研究成果の概要（英文）： We performed analysis of microbiome of respiratory tract in preterm infants with respiratory failure requiring mechanical ventilation at birth to investigate the development of chronic lung disease.

The gastric juice at birth was collected from 51 children, and 39% was positive for bacteria. Microbiome analysis showed that Lactobacillus spp. or Ureaplasma parvum were detected the most predominantly in many cases.

Lactobacillus species and U. parvum was not detected in microbiome analysis of tracheal lavage in 4 preterm infants, who required respiratory support more than one week after birth and had finally developed chronic lung disease. On the other hand, Staphylococcus epidermidis was predominantly detected in all cases.

研究分野：感染症学

キーワード：感染症 新生児

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性肺疾患 (chronic lung disease : CLD) は、新生児期の呼吸障害に引き続く慢性的な呼吸障害の総称であり、「先天奇形を除く肺の異常により、酸素または陽圧換気を必要とするような呼吸窮迫症状が新生児期に始まり、日齢 28 を超えて続くもの」と定義されている。世界的には気管支肺異形成 (bronchopulmonary dysplasia : BPD) と呼ばれることが多い。在宅酸素療法の必要性があるなど、早産児の予後に多大な影響を与える疾患であるが、現在において有効な予防法や治療法は確立されていない。

我が国は、医療の進歩により新生児の救命率は飛躍的に改善しており、2005 年調査における超低出生体重児 (extremely low birth weight infant : ELBWI) の新生児死亡率は 11.7%であったが、2010 年調査では 7.6%まで低下している。しかし、日齢 28 を越えて酸素または陽圧換気が必要な ELBWI は 57.7%から 61.2%、修正 36 週以降も酸素または陽圧換気が必要な重症 CLD は 35.8%から 40.0%と、CLD の発症率は増加傾向となっている。

CLD 発症の危険因子としては、肺の未熟性(生体側の要因)や人工呼吸器管理に伴う肺傷害、酸素毒性(医原性)に加えて、子宮内もしくは出生後の感染症の関与が挙げられる。近年、子宮内感染による流産や早産の原因菌であるウレアプラズマ属細菌の CLD 発症への関与が示唆されており、ウレアプラズマ感染の超低出生体重児の 23 コホート研究のメタアナリシスでは、ウレアプラズマ感染と続発する BPD の関連が報告されている(Sheltonka RL, et al. *Pediatr Infect Dis J*, 2005)。人工呼吸管理を行った早産児でのウレアプラズマ感染の有無による BPD 発症率の比較でも、有意にウレアプラズマ感染群で BPD 発症率が高値であったと報告されている(Viscard RM, et al. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2012)。また、出生後の感染症も増悪因子となり、CLD の特徴とされる持続的な炎症状態に水平感染が生じるとさらなるエラスターゼとプロテイナーゼ阻害物質の不均衡が生じ、肺組織の傷害を助長させ CLD への進展に関与すると考えられている。

このように、子宮内や出生後の感染症は早産児の CLD 発症における重要な危険因子であり、そのコントロールが CLD の予防に繋がると考えられる。しかし、羊水中のウレアプラズマ陽性例に対する胎内治療の報告は少なく、抗菌薬治療のエビデンスもまだない。また、CLD 発症におけるウレアプラズマ以外の細菌の関与を検討した報告も少ない。さらに、新生児の下気道細菌叢や母体の膣細菌叢の変化が CLD 発症に与える影響についての研究は、現在のところ皆無であり、CLD の発症予防および有効な治療法の確立のために細菌叢解析を行うことは重要である。

2. 研究の目的

出生時より人工呼吸器管理を必要とした新生児の気道分泌物を定期的に採取し、細菌の 16S ribosomal RNA 遺伝子を PCR 法によって増幅して得られた産物をクローニングし、その塩基配列から細菌を同定する手法(クローンライブラリー法)を用いて、慢性肺疾患に進展した症例群としなかった症例群における気道細菌叢の違いを解析することで、慢性肺疾患の進展に対する細菌学的要因を明らかにし、それを予防する最適な治療の確立を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 症例の集積と検体の採取

出生時から呼吸障害を呈し、人工呼吸器管理を行った早産児を対象とした。対象は新生児であるため、患者家族に研究内容を説明し同意を得た。解析を行う下気道分泌物は、挿管チューブより閉鎖式吸引カテーテルを用いて採取した。また、出生時の検体として、胃管を挿

入して胃液も採取した。検体の採取は出生時と日齢 3、7、以降 7 日おきと抜管時および下気道感染症発症時に行った。

(2) 16S ribosomal RNA 遺伝子を利用した早産児の下気道細菌叢の網羅的解析

クローンライブラリー法を用いて細菌叢の網羅的解析を行った。具体的には、検体から核酸を抽出し、PCR 法によって 16S ribosomal RNA 遺伝子を増幅された産物をクローニングし、選択したコロニーの塩基配列を解析して同定された細菌の解析した全コロニーに占める割合をそれぞれ求めることによって、対象症例の下気道細菌叢の細菌の組成を求めた。この組成を、CLD を発症した児と発症しなかった児で比較し、CLD 発症に関与している細菌の特定を行った。

4. 研究成果

出生直後の気道細菌叢解析を行う

ために 51 例の児から胃液を採取した。PCR 法によって 16S rRNA 遺伝子が検出された（細菌陽性）のは、20 例（39%）だった。細菌陽性症例群と陰性症例群の背景の違いを検討したところ、分娩様式に有意差を認めたと、CLD の有無に有意差はなかった（表 1）。

細菌陽性例で細菌叢解析を行ったところ、*Lactobacillus* 属（45%）、*Ureaplasma parvum*（15%）が最優占菌種となった症例が多かった（表 1）。

出生後、人工呼吸器管理を 1 週間以上行われ、最終的に CLD に進展した 4 例について、気管洗浄液の細菌叢解析を行ったところ、出生時に検出された *Lactobacillus* 属や *U. parvum* は検出されなかった（表 2）。一方、すべての症例において、*Staphylococcus epidermidis* が優占的に検出された。

以上の結果から、出生直後に優占的に検出された頻度の高かった *Lactobacillus* 属、*Ureaplasma parvum* が長期間、下気道から検出されることはなく、これらの細菌が持続感染することが CLD 進展の要因となっていることは否定的だった、一方で CLD に進展したすべて児の下気道から *S. epidermidis* が優占的に検出されており、同菌の持続的な下気道への常在が CLD 進展に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Ishii M, Hoshina T, Ichikawa S, Shimizu D, Araki S, Kinjo T, Shibata E, Hachisuga T, Kusahara K. The physiological variation in plasma presepsin levels during the early neonatal period. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 246 (3): 199-203, 2018 査読有

表1 胃液採取症例の背景および細菌叢解析結果

- 患者背景
 - 在胎週数 中央値34週 (範囲: 26週-36週)
 - 分娩様式 帝王切開 23/51 (45%) 経膈分娩 28/51 (55%)
 - CLD CLDあり 5/51 (10%) CLDなし 46/51 (90%)
- 胃液の細菌陽性率 (20/51, 39%)
 - 帝王切開 4/23 (17%) vs 経膈分娩 16/28 (57%) ($P=0.004$)
 - 前期破水あり 12/23 (52%) vs 前期破水なし 8/28 (29%) ($P=0.08$)
 - CLDあり 1/5 (20%) vs CLDなし 19/46 (41%) ($P=0.64$)
- 最優占菌種 (細菌陽性20例の解析)
 - Lactobacillus crispatus* 5/20 (25%)
 - Lactobacillus iners* 4/20 (20%)
 - Ureaplasma parvum* 3/20 (15%)

表2 下気道分泌物の細菌叢解析結果

- 症例1 (在胎26w 328g CLD I)
- 症例2 (在胎26w 905g CLD II)
- 症例3 (在胎27w 1048g CLD II)
- 症例4 (在胎28w 1211g CLD II)

症例	下気道分泌物		
	採取日齢	第1・第2優占菌種	% of clones
1	day15	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	95
		<i>Corynebacterium tuberculostrictum</i>	4
2	day15	<i>Corynebacterium simulans</i>	75
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20
3	day3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	92
		<i>Streptococcus oralis</i>	3
	day19	<i>Klebsiella oxytoca</i>	78
4	day8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	97
		<i>Corynebacterium tuberculostrictum</i>	3

2. Haro K, Igarashi R, Hoshina T, Kojiro M, Kusuhara K. Utility of the performance of lumbar puncture for febrile children with status epilepticus in the bacterial conjugate vaccine era. *Pediatric Infectious Disease Journal* 37 (10): 963-966, 2018 査読有
3. Kawamura M, Hoshina T, Ogawa M, Nakamoto T, Kusuhara K. Effectiveness of an early switch from intravenous to oral antimicrobial therapy for lower respiratory tract infection in patients with severe motor intellectual disabilities. *Journal of Infection & Chemotherapy* 24 (1): 40-44, 2018 査読有
4. Haro K, Ogawa M, Hoshina T, Kojiro M, Kusuhara K. Difference of the change of the hospitalization for pneumonia in children between Japanese secondary and tertiary medical facilities after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 70 (3): 270-274, 2017 査読有
5. Ichikawa S, Hoshina T, Kinjo T, Araki S, Kusuhara K. Efficacy of periodic surveillance culture in a neonatal intensive care unit in the presumption of causative pathogens of late-onset bacterial infection. *American Journal Infection Control* 45 (3): 251-254, 2017 査読有
6. Hoshina T, Yamamoto N, Ogawa M, Nakamoto T, Kusuhara K. The efficacy of the direct clinical intervention for infectious diseases by a pediatric infectious disease specialist in the pediatric ward of a tertiary medical facility without a pediatric antimicrobial stewardship program. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 36 (3): 1449-1454, 2017 査読有
7. Taku K, Hoshina T, Haro K, Ichikawa S, Kinjo T, Takahashi M, Akiba D, Fukuda K, Kusuhara K. An infant case with hydrocephalus as the initial manifestation of *Mycoplasma hominis*-associated meningitis. *J Infect Chemother* 23 (10): 713-716, 2017 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. Ogawa M, Hoshina T, Haro K, Kumadaki T, Ishii M, Fujino Y, Fukuda K, Kusuhara K: The microbiological characteristics of lower respiratory tract infection in patients with neuromuscular disorders: An investigation based on a multiplex polymerase chain reaction to detect viruses and a clone library analysis of the bacterial 16S rRNA gene sequence in sputum samples.
The 9th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases 2018.11.10-12 Fukuoka Japan
2. 保科隆之：
新生児に対するゲンタマイシン単回投与への変更による効果と影響
第66回日本化学療法学会 2018.5.31-6.2 岡山コンベンションセンター（岡山市）
3. 保科隆之、山本 昇、小川将人、楠原浩一：
感染症専門医の直接的診療介入による小児感染症診療の変化
第121回日本小児科学会 2018.4.20-22 福岡国際センター（福岡市）
4. 波呂薫、保科隆之、斎藤光正、楠原浩一：
出生直後の胃液の網羅的細菌叢解析結果と早産児の慢性肺疾患進展との関連性の検討
第49回日本小児感染症学会 2017.10.21-22 ホテル日航金沢（金沢市）
5. 保科隆之、山本 昇、小川将人、中本貴人、楠原浩一：
小児に対する Antimicrobial stewardship program のない大学病院における感染症専門医の直接的診療介入による感染症診療の変化
第91回日本感染症学会 2017.4.6-8 京王プラザホテル（東京都新宿区）
6. 小川将人、保科隆之、山本 昇、波呂 薫、中本貴人、楠原浩一：
重症心身障がい児の下気道炎における微生物学的特徴
第48回日本小児感染症学会 2016.11.19-20 岡山コンベンションセンター（岡山市）
7. 山本 昇、保科隆之、川村 卓、小川将人、波呂 薫、中本貴人、楠原浩一：
16S rRNA 遺伝子配列に基づく網羅的細菌叢解析法を用いた重症心身障がい児における下気道感染症の起炎菌推定と抗菌薬至適投与期間の検討
第48回日本小児感染症学会 2016.11.19-20 岡山コンベンションセンター（岡山市）

8. 保科隆之、楠原浩一、原 寿郎：
中枢神経系細菌感染症の診断および重症度・予後予測に対するプロカルシトニンの有用性
第 21 回日本神経感染症学会 2016.10.21-22 金沢東急ホテル（金沢市）

9. 保科隆之、名西悦郎、神野俊介、西尾壽乗、齋藤光正、明田幸宏、大石和徳：
免疫不全小児の結合型肺炎球菌ワクチンに対する免疫応答低下の要因の検討
第 90 回日本感染症学会 2016.4.15-16 仙台国際センター（仙台市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

福田 和正 (FUKUDA Kazumasa)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：40389424