

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10114

研究課題名(和文)NICU入室新生児におけるビフィズス菌製剤の投与による正常腸内細菌叢の獲得

研究課題名(英文)Gut microbiota development of preterm infants hospitalised in intensive care units

研究代表者

田内 久道 (Tauchi, Hisamichi)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30314959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：出生後に新生児集中治療室(NICU)で保育された早産児(在胎37週未満)と健康な正期産児(在胎37～42週)における腸内細菌叢の形成過程について調査し以下の3点を確認した。

NICUで保育された早産児は、正期産児と比較してビフィズス菌の定着が遅れること、NICUで保育された早産児は、一部病原性を有するものが属するブドウ球菌群が多いこと、ビフィズス菌優勢の腸内細菌叢構成が形成されると、腸内の有機酸濃度が上昇しpHが低下すること

研究成果の学術的意義や社会的意義

本試験の結果、NICUで保育される早産児では、腸内細菌叢の形成が健康な正期産児とは異なり、特にビフィズス菌優勢の腸内細菌叢の形成が遅れていることを確認した。これは、NICUで保育されている早産児は、衛生的に保たれた閉鎖環境にいるため、様々な菌と接触する機会が少ないことが、その要因の一つであると考えられる。今回得られた知見は、NICUで保育された早産児における腸内細菌叢の形成の遅れを確認したものであり、出生後間もない時期からビフィズス菌を与えることにより正常な腸内細菌叢へ導くなど、新たな対応策を構築するための糸口となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated morphosis of the intestinal bacterial flora in a premature infant (under gestational ages 37 weeks) and the healthy term infant (gestational ages 37-42 weeks) raised in a neonatal intensive care unit (NICU). (1) The premature infant raised in NICU is behind with the colonization of the bifidus bacillus as compared with a term infant. (2) As for the premature infant raised in NICU, there are many staphylococcal groups where a thing with some pathogenicity belongs to.

(3) When intestinal bacterial flora constitution of the bifidus bacillus superiority is formed, an enteral organic acid concentration increases, and pH decreases.

研究分野：小児科学

キーワード：腸内細菌叢 NICU ビフィズス菌

1. 研究開始当初の背景

ヒトが生きていくためには腸内細菌叢は無くてはならない存在であり、特に新生児の正常な発育発達には以下のように腸内細菌が密接に関わっている。

- ・母乳中には含まれているオリゴ糖は腸管内の Bifidobacteriaceae により分解されたのち吸収される。
- ・ビタミン K やビタミン B12 は腸内細菌により産生され、ヒトの止血や造血機構に関与している。
- ・腸管内の正常細菌叢が十分発達していないと考えられる NICU で治療中の新生児は通常より高率にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が腸管に定着し感染制御上問題となっている (新生児医療における MRSA に関する日本小児科学会新生児委員会の見解 平成 13 年 5 月 日本小児科学会新生児委員会)。

・腸内細菌を定着させない環境で育ったマウスでは腸内細菌叢によって産生が促進される神経伝達物質が発達過程にある脳に働かないため多動障害となる (Heijtz RD et al., PNAS, 2011)

腸内細菌叢の解析に関しては従来の培養法を用いた腸内細菌の同定と定量では再現性に乏しいことが明らかとなっている。この培養法による問題点を克服するため、平成 26 年度 基盤研究(C)「新生児の腸内フローラの形成が成長発達に与える影響に関する研究」により私たちは新生児の便から DNA を抽出し定量的 PCR、16S rDNA パイロシーケンス解析することにより正確な腸内細菌叢の確立の過程を明らかにした。

図 1. 健常新生児の腸内細菌の確立

正常新生児 51 例を用いた検討では、無菌の状態で出生した新生児は腸内細菌科細菌が最優勢となる時期を経て、生後 1 ヶ月の時点では 80% でビフィズス菌が最優勢となり以後安定していた。

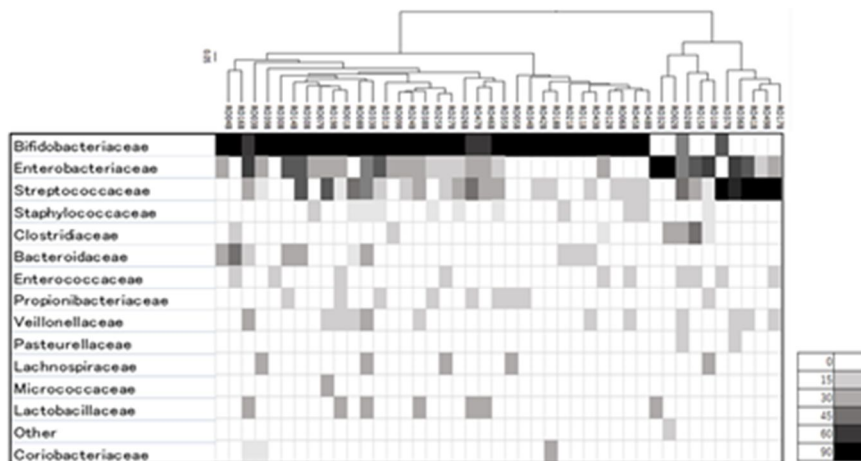


図1 生後1ヶ月時の新生児腸内細菌の構成
80%の例でビフィズス菌が最優勢菌種となっている。

図2. 健常新生児と新生児集中治療室(NICU)で治療されている新生児の腸内細菌の比較

健常新生児(左)に比べ NICU 児(右)では、明らかにビフィズス菌の獲得が遅延していた。また健常新生児が腸内細菌科細菌(E)が最優勢である時期を経た後ビフィズス菌に移行するのに対して、NICU 児では健常児には見られないレンサ球菌(Sr)、ブドウ球菌(St)、腸球菌(Ec)が優勢である期間が長く見られる。

清潔な保育器に収容されている期間と、ビフィズス菌獲得までの日数には正の相関(R=0.64)が認められ、嚴重な感染対策が NICU 児の正常腸内細菌叢の確立を障害している可能性がある。

Subjects	Days after birth																											
	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13	15	17	19	24	23	25	27	29										
J		St	E		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E									
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E									
F		St	St	St	St	St	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	B	B										
G					St	St	St	St	St	E	E	E	E	B	B	B	B	E										
I			E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B										
D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B										
L			E	E	E	E	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B										
A		St	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B										
H		St	St	St	St	St	St	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B										
B	E	E	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B										
C	E	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B										
K		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B										

Subject	Days after birth																											
	1	2	3	4	5	6	7	9	11	13	15	17	19	24	23	25	27	29										
E207		St	Sr	St	St	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr	Sr										
E829		Ec	Ec	Ec	Ec	St	St	St	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec										
E032				St	St	St	St	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E										
E277			St	St	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E										
E048			St	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E										
E821		St	St	St	St	St	St	St	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec	Ec	B	B	B										
E440			Sr	St	St	St	St	St	St	St	St	St	Ec	Ec	Ec	B	B	B										
E721			St	St	St	St	St	E	E	E	B	B	B	B	B	B	B	B										
E713			St	Ec	Ec	Ec	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B										
E679			B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B										
E661		B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B										

図2 健康新生児とNICU児の出生後腸内細菌最優勢菌種の比較

2. 研究の目的

NICU で治療されている新生児に対しピフィズス菌 (*B. breve*:ピフィズス菌の中で日本人乳幼児の最優勢菌種) の投与をおこない、腸内細菌叢が正常化できるかに関して検討を行う。ピフィズス菌の投与は他の細菌が腸管に定着する前、すなわち出生後すぐから 5 日間継続して行い、この菌株が優位菌として機能するかどうかを検討する。

ピフィズス菌を投与した NICU 児の腸内細菌の解析を継続して行い、対象児の腸内のピフィズス菌は継続して投与株であるか、に関して 2 年を通して解析を続ける。また、ピフィズス菌を投与しない対照群と比較し成長・発達や感染症などの疾病状況について比較検討を行う。

3. 研究の方法

NICU で治療されている新生児に対しピフィズス菌 (*B. breve*) の投与をおこない、腸内細菌叢が正常化できるかに関して検討を行う。本研究は、単遮蔽を用いたマスキング群間比較試験である。

対象は NICU 環境下で治療される、出生時体重が 1500 g 以上で重篤な疾患を持たない新生児とする。予定症例数はピフィズス菌投与群 10 例、非投与群 10 例である。

ピフィズス菌の投与方法: 生後 0 日目より 1 日 1 回 0.5 g を 1.5 mL の蒸留水に溶かし、(10 分程度放置した後) その上澄み 0.5 mL を与える。投与期間は 5 日間とする。

採取する便検体:

day0-6, 10,14,21,28,以後退院まで 7 日毎に採取

退院後から 1 ヶ月検診まで - 7 日毎に採取

1 ヶ月検診後生後 4 ヶ月まで - 1 ヶ月毎に採取

生後 1 年時

生後 2 年時

入院中は、おむつ交換の際に採便を行う。退院後は両親に採便容器に便を採取してもらい、家庭用のフリーザーにて保存し検診時に持参してもらう。

解析項目: 便検体: 腸内フローラ構成(定量的 PCR、16S メタゲノム解析)、便中有機酸濃度、pH、オリゴ糖濃度、代謝産物、便中タンパク質

ただし以下の場合、その被験者に対する試験の継続を中止する。

- (1) 生直後に生菌製剤が処方された場合、
- (2) 保護者から試験参加の辞退の申し出や同意の撤回があった場合、
- (3) 患者の病態により試験の継続が困難な場合、
- (4) その他の理由により、医師が試験を中止することが適当と判断した場合、

平成 29 年度は、採取した便検体について順次 DNA を抽出し、菌属・菌種特異的プライマーを用いて標的とする菌の 16SrDNA 遺伝子を選択的に増幅後、PCR 産物のパイロシーケンスを行うことにより菌の同定を行う。

生後 1 ヶ月までの新生児の便を継続して解析することにより、ピフィズス菌を投与することにより NICU 児が早期にピフィズス菌を腸内細菌として獲得することが可能であるかに関して検討を行う。合わせて便中の pH と有機酸濃度の測定、便中の残存オリゴ糖分析、CE-MS によるメタボローム解析をおこない、腸内環境の生化学的データに関して解析を行う。

4. 研究成果

NICU で保育された 3 名の新生児について検討を行った。
 ピフィズス菌投与群 2 名、非投与群 1 名である。
 経時的な腸内細菌叢の変化を図 3 から 5 に示す。

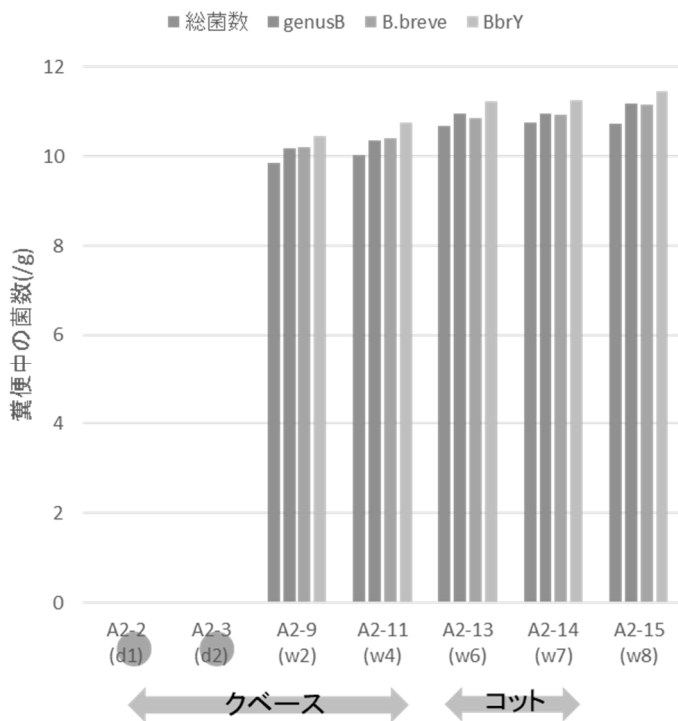


図 3 患者 A BBG-01 投与群

BBG-01 を投与することにより、早期にピフィズス菌優勢フローラが形成された。BbrY が観察期間中最優勢であることがわかった。

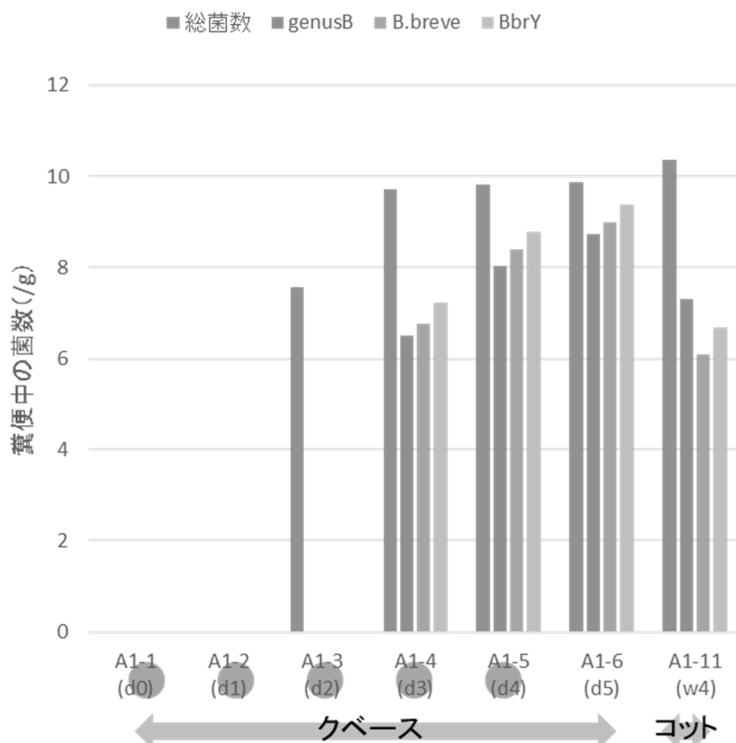


図 4 患者 B BBG-01 投与群

BBG-01 投与にもかかわらず、ピフィズス菌優勢フローラは形成されなかった。(BbrY は総菌数に対して

1%未満で検出された)

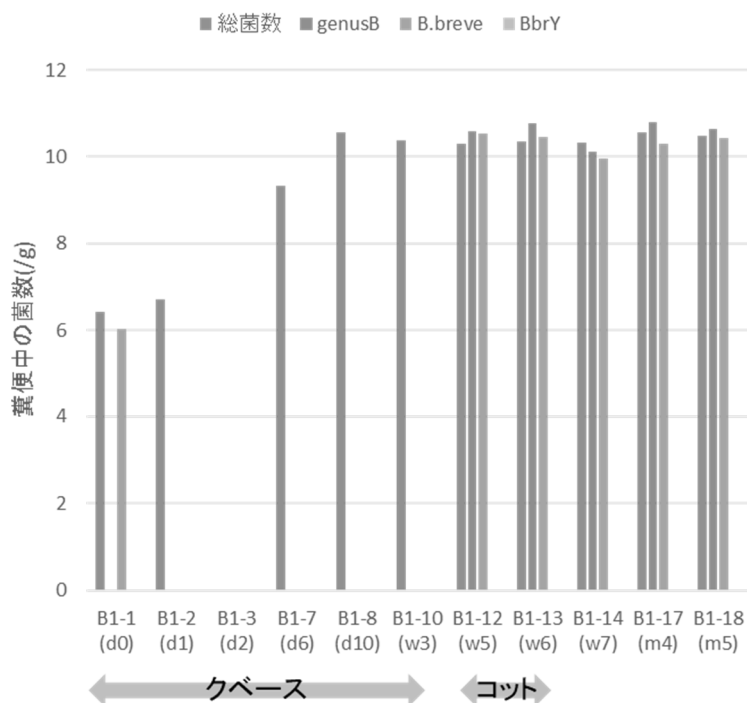


図5 BBG-01 非投与群

生後1か月を過ぎたあたりでピフィズス菌優勢のフローラが形成された。BbrYは検出されず、別のB. breve菌株が伝播・定着したと考えられる。

本研究により、出生後早期のNICUにて保育されている新生児に対して、ピフィズス菌製剤を投与することにより、腸内細菌叢を正常化することが可能であり、それはピフィズス菌投与終了後も継続して観察されることが明らかとなった。

この手法により、NICUで治療されている新生児の感染症への抵抗性や、その後の発達、発育を正常化することが可能かもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 H. Tauchi, K. Yahagi, T. Yamauchi, T. Hara, R. Yamaoka, N. Tsukuda, Y. Watakabe, S. Tajima, F. Ochi, H. Iwata, M. Ohta, E. Ishii, S. Matsumoto and T. Matsuki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Gut microbiota development of preterm infants hospitalised in intensive care units	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Beneficial Microbes	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ochi Fumihiko, Tauchi Hisamichi, Nagai Kozo, Moritani Kyoko, Tezuka Mari, Jogamoto Toshihiro, Aibara Kaori, Motoki Takahiro, Ishii Eiichi	4. 巻 57
2. 論文標題 Therapeutic Effect of Linezolid in Children With Health Care-Associated Meningitis or Ventriculitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1672 ~ 1676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0009922818803399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ochi Fumihiko, Tauchi Hisamichi, Jogamoto Toshihiro, Miura Hiromitsu, Moritani Tomozo, Nagai Kozo, Ishii Eiichi	4. 巻 2018
2. 論文標題 Sepsis and Pleural Empyema Caused by Streptococcus pyogenes after Influenza A Virus Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Reports in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/4509847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 田内久道
2. 発表標題 渡航医学における乳酸菌の果たす役割
3. 学会等名 第22回 日本渡航医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H Tauchi
2. 発表標題 Infection control for pediatric patients with cancer.
3. 学会等名 The 6th Matsuyama-Gwangju Pediatric Society Joint Meeting. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田内久道
2. 発表標題 日常診療での感染対策
3. 学会等名 第70回中国四国小児科学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 1.Suemori K, Murakami S, Ochi F, Saito M, Tamaki M, Tao M, Uchikura Y, Miyamoto H, Sugiyama T, Tauchi H.
2. 発表標題 Incidence of Mycoplasma hominis in pregnant women in Japan, and susceptibility to antimicrobial agents.
3. 学会等名 The Asia Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石井 榮一 (Ishii Eiichi) (20176126)	愛媛大学・医学系研究科・名誉教授 (16301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	越智 史博 (Ochi Fumihiro) (30637905)	愛媛大学・医学部附属病院・講師 (16301)	
研究分担者	江口 真理子 (Eguchi Mariko) (40420781)	愛媛大学・医学系研究科・教授 (16301)	