

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：23601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10889

研究課題名（和文）新生児における常在細菌の獲得と形成に関わる基礎的研究

研究課題名（英文）Investigation for maternal-to-neonatal transmission commensal bacteria and the dissemination in maternity hospital.

研究代表者

中畑 千夏子（Nakahata, Chikako）

長野県看護大学・看護学部・講師

研究者番号：60438174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：NICUにおける新生児の健全な常在細菌の定着促進と感染源の伝播防止に有効な看護方法の基礎資料を得ることを目的とした。既存データおよび2023年5月～8月にA産科医院にて出生した新生児と母親54組を対象に、鼻腔から*S. epidermidis*を分離し、MLVA法で母児間および新生児間の菌株異同およびそれに係る要因を調査した。11組で母親由来*S. epidermidis*の新生児への移行が確認され、生後1日目に鼻腔から細菌が分離された新生児では母親由来菌株の移行が有意に多かった（ $P=0.018$ ）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、健常な母児54組において母親由来*S. epidermidis*が児にどの程度移行するか、どのような要因が移行に関連するかを検討した。その結果、11組で新生児の鼻腔内から分離された菌株が母親の菌株と一致することが示され、出生後超早期の直接授乳が移行に影響する可能性が示唆された。今後は、生後超早期の母児間の接触時期や方法、頻度を詳しく調べることで、母親由来常在細菌の新生児への有効な移行方法の確立を図りたい。特に、母児分離を余儀なくされたNICUの新生児に対しても適用可能な方法を目指すうえで、その開発につながる基礎的データが得られたと考える。

研究成果の概要（英文）：The study aimed to develop effective nursing strategies for preventing neonatal infections, particularly *S. aureus*, in the NICU. It employed experimental methods to promote the acquisition of normal bacterial flora and prevent infections in neonates. Nasal swabs were collected from 54 neonate-mother pairs between November 2018 and January 2019, as well as from May to August 2023 at Clinic A. *S. epidermidis* was isolated, and MLVA assessed maternal strain colonization in neonates. Maternal *S. epidermidis* colonization was confirmed in 11 neonates, with significant maternal transmission post-birth ($P=0.018$), primarily through direct breastfeeding.

研究分野：感染予防学

キーワード：新生児 感染予防 常在細菌

1. 研究開始当初の背景

ヒトの感染防御に果たす常在細菌叢の役割は、我々が健康を維持していく上で極めて重要である。特に免疫系の未発達な新生児にとって、病原微生物に対する感染の予防、とりわけ MRSA (Methicilin Resistant-*Staphylococcus aureus*) に代表されるような薬剤耐性菌の感染を防ぐためには、健全な常在細菌の早期獲得が有効である。そうしたことから、出生後の早い時期における直接授乳、母児の同室等を積極的に推進することが、母児間の愛着形成のみならず、母親由来の健全な常在細菌叢を児に移行・定着させるためにも有用な方策であると考えられている。しかしながら NICU (Neonatal Intensive Care Unit) に入院中の新生児では、感染に対する生体防御を担う皮膚や粘膜が未熟であることに加えて、本来であれば健全な常在細菌叢を獲得する時期において身近な人との関わりを絶たれることによって、正常な細菌叢の形成が困難になることが懸念される。このことが NICU において、MRSA 等による院内感染の報告が後を絶たない理由の一つであるとも言われている。さらには、自身における MRSA の鼻腔内保菌が、MRSA 感染のリスク要因であることも知られている。母親の常在細菌をその児へ移行させる方法には、母親の皮膚に接触させるカンガルーケアや、母乳哺育、児に触れる前後の消毒剤による手指衛生、沐浴の個別化 (1 回使用ごとの浴槽の洗浄) 等が挙げられるが、こうした報告にも関わらず、生後早期における常在細菌の獲得および定着の過程や、それに関連する要因の解明は健常児においてもされていない。

一方、様々な処置が行われる NICU においては、母親からの正常な常在細菌の獲得が困難になるだけでなく、医療従事者の手指等を介して間接的に児から児へ菌が伝播するリスクも高くなる。特に、出生直後から NICU に入院し、その期間が長い超低出生体重児では MRSA を鼻腔内に保菌するリスクが高いとされている。

2. 研究の目的

本研究では、NICU へ入室中の新生児において、*S. aureus* のような病原性細菌への感染を阻止するうえで、有効な看護方法に関する基礎的資料を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 研究対象

調査への参加協力が得られた A 産科クリニックにおいて、2018 年 11 月～2019 年 1 月 (第期) にサンプリングされた試料に加え、2023 年 5 月～同年 8 月 (第 2 期) の間に出生した健常新生児とその母親を対象とし、試料を得た。健常新生児とは先天性疾患や出産に伴う重篤な合併症を有していないものとした。また、出産様式 (自然分娩または帝王切開) は問わないこととした。これら条件に該当する対象者の選定と研究の説明は、同クリニック担当者 (看護師長) に依頼した。いずれも、出産が近づいた妊婦に対して、外来受診時に文書を用い、研究の趣旨等を説明した。後日、同意が得られた妊婦または産婦を対象者とした。新生児については、母親を代諾者とし、母親とともに同意が得られた児を対象とした。

2) 鼻腔内細菌の採取

母親は分娩後の入院期間中および児の 1 か月健診時の計 2 回、新生児は出生後 1 日目、退院時 (5 日目または 6 日目)、1 か月健診時の計 3 回において、鼻腔内の細菌を採取した。採取には細菌採取専用のカルチャースワブ (BD BBL カルチャースワブプラス、日本ベクトン・ディッキンソン) を用い、母親は鼻腔入り口から 2cm 程度を目安とし、鼻腔粘膜をスワブで 5 回拭った。児については鼻腔入り口から 1cm 程度を目安とし、同様に鼻腔粘膜をスワブで 5 回拭った。

3) CNS: Coagulase negative Staphylococci の分離と保存

対象者の鼻腔内を擦過したスワブを卵黄加マンニット食塩寒天培地 (BD BBL™ 卵黄加マンニット食塩寒天培地、日本ベクトン・ディッキンソン) に塗布し、培地の黄変を認めなかったコロニーを CNS として分離した。

4) *S. aureus* の分離と保存

母児間の *S. epidermidis* の移行に関連する要因として、母児の鼻腔内の *S. aureus* の検出の有無についても調査した。対象者の鼻腔内を擦過したスワブを卵黄加マンニット食塩寒天培地 (BD BBL™ 卵黄加マンニット食塩寒天培地、日本ベクトン・ディッキンソン) に塗布し、培地の黄変を認め、かつ卵黄反応のみられたものを *S. aureus* として分離した。

5) DNA の抽出

分離菌からの DNA の抽出には、PrepMan Ultra Sample Preparation Regent (ThermoFisher Scientific) を使用した。SCD 寒天培地上の 1~2 コロニー (直径 1~2 mm) を同試薬の 1ml に懸濁し、100 で 10 分間の処理を行った。その後遠心分離 (15000rpm, 5min) 行い上清を分取し、分離菌の DNA 溶液として -20 で保存した。

6) *S. epidermidis*の同定

卵黄加マンニット食塩寒天培地上でコロニーの形態から選別したのものについて、PCRにより特異的なDNA領域であるSe705が検出されたものを*S. epidermidis*と同定した。PCR反応には、滅菌水で20倍希釈した分離菌のDNA溶液5 μ lを試料DNAとし、DNAポリメラーゼにHotStar Taq(QIAGEN)、プライマーにはSe705-1およびSe705-2を用いた(Table 1)。増幅反応は、95で1分(変性)、55で1分(アニーリング)、72で1分(伸長)の各ステップからなる反応を30サイクルくり返した。アガロースゲル電気泳動法による増幅産物の分析には、2.5% NuSieve3:1 Agarose (Lonza)を用いた。緩衝液はTris-acetate/EDTA (TAE)を使用し、アガロースゲルの染色にはSYBR Green (Lonza)を用い、染色時間は30分とした。

7) *S. epidermidis*の異同の識別

分離された*S. epidermidis*について、菌株の異同を識別するための方法として、Multiple-locus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA法)による解析を用いた。

*S. epidermidis*の5つのVNTRローカスのうち、複数のローカスを組み合わせることによって、識別能力が高まると考えられたため、Se1およびSe3を分析に用いた。

PCRの増幅反応は、95で1分(変性)、55で1分(アニーリング)、72で1分(伸長)の各ステップからなる反応を30サイクルくり返した。アガロースゲル電気泳動法による増幅産物の分析には、2.0% NuSieve3:1 Agarose (Lonza)を用いた。緩衝液はTris-Borate-EDTA (TBE)を使用し、アガロースゲルの染色にはSYBR Green (Lonza)を用いて染色時間は30分とした。本研究では、*S. epidermidis* ATCC12228株のゲノムDNA(理化学研究所より分与)をreference standardとして用いた。そのうえでSe1, Se3の2種のローカスの繰り返し数がどちらも同じ菌株を同一の菌株とした。

8) 母親からの新生児への*S. epidermidis*の移行に影響する要因の検討

母親から新生児への*S. epidermidis*の移行に影響する要因として、在胎週数、出生時体重、出産様式(自然分娩または帝王切開)、入院日数、母親の抗菌薬投与の有無、保育器への収容の有無、光線療法の有無、授乳の状況(母乳または人工乳摂取)、きょうだいの有無、鼻腔検体からの*S. aureus*の分離の有無、新生児の第1回目(出生後1日目)の鼻腔検体に対して行った分離培養において*S. epidermidis*を含めたCNS分離の有無に関して、母親への抗菌薬の投与の有無について対象者の診療録から情報収集した。抗菌薬投与の有無について、出産前日から入院中の期間に母親が抗菌薬治療を受けた場合に、胎盤または母乳を介した児への移行が考えられるため、新生児の属性項目として、これを含めた。母親と同一の*S. epidermidis*株の保有の有無を従属変数として2群に分け、前述の要因を独立変数として連続変数に対してはMann-Whitney's U検定を、カテゴリ変数に対し2検定またはFisherの正確確率検定を行った。有意水準は<5%とした。

9) 倫理的配慮

本研究は長野県看護大学倫理委員会の承認(承認番号2018-9)を得て実施した。

4. 研究成果

1) 結果

1)-1 母親由来*S. epidermidis*の新生児への移行

母児54組の全例から*S. epidermidis*が分離され、その総数は389菌株であった。内訳は、2018年度が134菌株(母親62菌株、新生児72菌株)、2023年度は255菌株(母親122菌株、新生児133菌株)であった。これらについて、MLVA法を用いて、菌株の異同を調べたところ、母児11組において、母親から分離された*S. epidermidis*と児のいずれかの採取日から分離された*S. epidermidis*についてVNTRのSe1およびSe3共に一致し、新生児の*S. epidermidis*菌株は母親由来と判断した。11組のうち5組では、1か月健診時に児の鼻腔から採取した検体からも母親由来*S. epidermidis*が分離されていた。

1)-2 母親から新生児への*S. epidermidis*の移行に関連する要因の検討

母親からの*S. epidermidis*の移行の有無を従属変数として、在胎週数、出生時体重、出産様式(自然分娩または帝王切開)、入院日数、母親の抗菌薬投与の有無、入院期間中における母児分離の有無、授乳の状況(母乳、人工乳の摂取)、きょうだいの有無、鼻腔検体からの*S. aureus*の分離の有無、新生児の第1回目の鼻腔検体における細菌分離の有無を独立変数とした統計学的解析を行った。その結果、第1回目に細菌が分離された群では、有意に母親由来*S. epidermidis*の移行数が多かった($p=0.018$)。その他の要因についてはいずれも統計学的に有意な関連を認めなかった。

そこで、母親由来の*S. epidermidis*が分離された新生児のうち、生後1日目の鼻腔内培養スワブから細菌が分離された新生児の9例について、出生後から退院するまでの経過に関する情報を診療記録より抽出した(Table1)。

Case	Prenatal age (days)	Birthweight (g)	Delivery	Hospital stay (days)	Feeding	Maternal separation	Sibling	Antibiotic treatment for mother	Carriage of <i>S.aureus</i>		Isolation of CNS
									Mother	Neonate	
1	281	3856	vaginal	6	breast milk	none	0	CEZ	none	none	<i>S.epidermidis</i> <i>S.intermedius</i> <i>S.warneri</i>
2	277	2740	vaginal	6	breast milk	none	1	none	none	none	<i>S.epidermidis</i> <i>S.intermedius</i> <i>S.warneri</i>
3	280	2740	vaginal	5	breast milk	none	3	BPG	none	none	<i>S.epidermidis</i> <i>S.heamolyticus</i>
4	282	3242	vaginal	6	breast milk	none	1	none	none	none	<i>S.intermedius</i>
5	283	3246	vaginal	5	breast milk	none	1	none	none	none	<i>S.epidermidis</i> <i>S.hominis</i>
6	289	3488	vaginal	5	breast milk	none	1	none	none	yes	<i>S.epidermidis</i>
7	278	2938	vaginal	5	breast milk	none	0	CEZ	none	none	<i>S.epidermidis</i>
8	270	2990	vaginal	6	breast milk	none	0	CEZ	none	yes	<i>S.epidermidis</i>
9	268	2584	vaginal	6	breast milk	none	1	none	none	none	<i>S.epidermidis</i>
10	267	2676	vaginal	6	breast milk	none	1	FOM	none	none	<i>S.epidermidis</i>

1)-3 Case 1~Case 10のまとめ

児の生後1日目に鼻腔内から分離された菌種について、1例を除く9例で *S. epidermidis* が分離された。残り1例については、*S. epidermidis* は分離されなかったものの、CNSである *S. intermedius* が分離された。10例とも経膈分娩によって出生した児であった。全例とも入院期間中に保育器への収容や光線療法は行われていなかったことから、入院期間を通じて母児分離はなかったと判断した。Case 4を除く、9例において、出生当日のうちに直接授乳が行われていた。Case 4についても、出生当日のうちに搾乳された母乳を哺乳していた。さらに、初回の授乳または哺乳の後、約3時間おきに母乳と人工ミルクを哺乳していた。鼻腔内からの *S. aureus* について、母親では全例において分離されなかったが、児では2例で分離された。

1)-4 新生児における *S. aureus* の鼻腔内保菌に関連する要因の検討

母親の入院時の鼻腔検体、新生児の第1回目(出生後1日)および第2回目(出生後5日または6日)の鼻腔検体からの *S. aureus* 分離数を Table 2 に示した。

新生児における *S. aureus* の分離の有無を従属変数、在胎週数、出生時体重、出産様式(自然分娩または帝王切開)、入院日数、母親の抗菌薬投与の有無、入院期間中における母児分離の有無、授乳の状況(母乳、人工乳の接種)、きょうだいの有無、母親由来 *S. epidermidis* の移行の有無、新生児の第1回目の鼻腔検体における細菌分離の有無を独立変数として統計学的解析を行った。その結果、いずれの項目についても有意な関連を認めなかった。しかしながら、母親由来 *S. epidermidis* の児への移行が見られなかった群では児における鼻腔内の *S. aureus* の分離が40名中9名(22.5%)であったのに対して、その移行が見られた群では14名中2名(14.3%)と、鼻腔内 *S. aureus* を保菌する割合が低い傾向にあった。

Table 2. Nasal carriage of *S. aureus*

Sampling	Both of mother and neonate	Mother only	Neonate only	Mother n (%)	Neonate n (%)
	2	7	3	9 (31.9)	5 (21.7)
	2	1	8	3 (9.7)	10 (32.3)
Total	4	8	11	12 (22.2)	15 (27.8)
					n=54

2) 考察

母児 54 組から分離された *S. epidermidis* について、MLVA 法を用いて、菌株の異同を調べたところ、母児 11 組において、VNTR の Se1 および Se3 共に一致した。このことから、この 11 組については、母親と新生児から同一の *S. epidermidis* 菌株が分離されたものと判断した。

本研究において対象とした産科クリニックは、健常な新生児の出生直後から母児同室とすることを基本としており、直接授乳や母児の接触を積極的に行っている。しかしながら、新生児にとって最も接触の多い母親を由来とする *S. epidermidis* の移行は 20.3% と約 5 人に 1 人に留まる結果となった。これについて、母児同室ではあるものの、新生児が母親以外のヒト、すなわち助産師や看護師、面会者等との接触の機会があることに加えて、環境に由来する常在細菌を獲得する機会を有している可能性があるものと考えた。

また、11 組のうち、5 組では、新生児から分離された母親由来の *S. epidermidis* が、1 か月健診時に採取した鼻腔検体においても分離されていた。これは、新生児の入院中に母親から移行した母親由来 *S. epidermidis* の定着がその後も維持されていることを意味しており、また、出生直後に獲得した細菌が、その後の児における常在細菌叢の構成菌の一部になり得るものこと示唆しているものと考えられる。

さらに母親由来 *S. epidermidis* の移行の有無を従属変数として、在胎週数、出生時体重、出産様式（自然分娩または帝王切開）、入院日数、母親の抗菌薬投与の有無、入院期間中における母児分離の有無、授乳の状況（母乳、母乳および人工ミルクの混合、人工ミルクのみ）、きょうだいの有無、鼻腔検体からの *S. aureus* の分離の有無、新生児の生後 1 日目の鼻腔検体における細菌分離の有無を独立変数とした統計学的解析を行ったところ、生後 1 日目に細菌が分離された群では、有意に母親由来 *S. epidermidis* が移行していた。その他の要因についてはいずれも統計学的に有意な関連を認めなかった。生後 1 日目に細菌が分離された群の分離菌株をみると、1 例については本研究の指標菌とした *S. epidermidis* が分離されなかったものの、CNS である *S. intermedius* が分離された。それ以外の 9 例については、*S. epidermidis* を含む CNS が分離された。また、事例の検討から、全例で出生当日のうちに、直接授乳が実施されていることが明らかとなった。そのうち 3 例では分娩台の上で出生直後に実施する添い乳が行われていた。直接授乳では、母の乳首周辺の皮膚を児が吸うことから、母の皮膚に常在する *S. epidermidis* を含めた常在細菌が児の口腔内に付着する可能性が非常に高いものと考えられる。こういった直接授乳を可能な限り早い時期に実施することが、すでに明らかにされている腸管内の常在細菌叢の形成のみならず、新生児の鼻腔や口腔粘膜における常在細菌叢の獲得と形成に影響を与え、また、母親由来常在細菌の児への移行を促すものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	坂田 憲昭 (Sakata Noriaki) (70158921)	長野県看護大学・看護学部・教授 (23601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関