

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791042

研究課題名(和文)

RT-PCR 法による腸管粘膜バリア機構およびプロバイオティクス感染予防効果の解明

研究課題名(英文) Study of protective effect of probiotics that influence intestinal mucosal barrier system and systemic infection by RT-PCR methods.

研究代表者

久田 研 (HISATA KEN)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：10420853

研究成果の概要(和文)：

消化管粘膜バリア機構の未熟性により敗血症を起こしやすい低出生体重児において、RT-PCR 法による血中細菌の検出を試みた。結果、敗血症症例において、血液培養に比べ、検出感度が優れることが確認された。また、一部の感染徴候のない児において、RT-PCR により血中細菌が検出されたことから、臨床症状とあわせ、bacterial translocation による菌血症評価への有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

In the low-birth-weight infants who easily develop sepsis by prematurity, we tried to detect pathogens from blood samples by RT-PCR method. As a result, in septic neonates, it was indicated that the sensibility of RT-PCR was significantly higher than for blood culture. On the other hand, in some neonates without infectious signs, bacteria were detected from blood samples. It was speculated that RT-PCR technique is useful to evaluate bacteremia caused by bacterial translocation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：RT-PCR、プロバイオティクス、bacterial translocation

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児、特に低出生体重児では、消化管粘膜バリア機構が未熟であることから、腸内細菌の bacterial translocation が高頻度に生じ、新生児敗血症の主な原因となっている。

(2) これら新生児の高い感染率を改善すべく、新生児領域においても、probiotics の導入が試みられ、感染予防効果が期待されている。しかしながら、現在の meta-analysis の結果、壊死性腸炎の予防効果は証明されたものの、感染症の発症予防効果に関しては、十分な結果が得られていない。

(3) 新生児の感染症、特に血流感染において、その診断の根拠となるのは血液培養である。しかし、新生児、なかでも、その未熟性から bacterial translocation の頻度が高い低出生体重児においては、血液培養の採血量に限界があり、高い血液培養検出率を得ることが困難である。ゆえに、Probiotics によって、その抑制が期待される bacterial translocation を、敗血症を発症した時点ではなく、高頻度で生じているとされる菌血症の状態でも評価することも困難である。

2. 研究の目的

(1) real time RT-PCR 法による高感度定量的な起因为菌検出システムを用いて、新生児・低出生体重児における敗血症発症時の血液培養と real time RT-PCR 法を比較し、RT-PCR 法の起因为菌検出における有用性を明らかにする。

(2) 高感度および定量的な方法を生かし、bacterial translocation に伴う菌血症を検出し、プロバイオティクスの感染予防効果についての応用が可能かどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) 新生児集中治療室へ入院している新生児・低出生体重児を対象に、敗血症発症時、治療開始前の血液検体を用い①血液培養、②real time RT-PCR 法、③血液生化学検査を施行し、血液培養と比較した real time RT-PCR 法による起因为菌の検出感度を検討する。

(2) 新生児集中治療室へ入院している 1500g 未満の低出生体重児を対象に、感染徴候のない状態での定期的な採血の一部検体を用い、real time RT-PCR 法により菌血症の頻度および菌種を定量的に評価する。

① 血液培養

血液検体採取後、直ちに、好気性・嫌気性培養ボトル(Becton Dickinson)に各 0.5ml を分注し、Bactec 9240(Becton Dickinson)にて、培養し、検出菌を同定。

② RT-PCR

血液検体採取後、直ちに、RNA protect™ Bacterial Reagent (Qiagen)2ml の入った保存チューブに、0.5ml を投入後、-80°Cにて保存。既存の方法により RNA を抽出。

Staphylococcus spp. (*S. aureus*, CNS),

Enterococcus spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Atopobium* cluster, *Prevotella* spp. を標的とした primers を用い、RT-qPCR assay を施行。

4. 研究成果

(1) 敗血症発症時の血液培養と real time RT-PCR 法における起因菌の検出率：

当該期間中に、感染徴候が出現し敗血症を疑われた 39 名の新生児が entry された。

- ・ 出生体重： 2091±788g
- ・ 在胎週数： 34.8±5.8weeks
- ・ 男女比： 25/14
- ・ 発症日齢： 13.7±2.9

血液培養における細菌検出率は 6/39 (15.3%) であったのに対し、RT-PCR では 15/39 (38.5%) で起因菌が検出され、血液培養に比べ 3 倍程度の高い検出感度を認めた。

(表) 血液培養と RT-PCR 法での検出率

		血液培養		
		Positive	Negative	Total
PCRs	Positive	6	9	15
	Negative	0	24	24
Total		6	33	39
(p=0.0039)				

RT-PCR 法、血液培養において検出された菌種は、*Staphylococcus* / *S. epidermidis* (2 名)、

Enterobacteriaceae / *K. pneumoniae* (2 名), *P. aeruginosa* (1 名), *K. pneumoniae* + *E. cloacae* (1 名) であり、それぞれ、菌種が一致していた。(RT-PCR / 血液培養)

RT-PCR 法にて起因菌が検出されたが、血液培養が陰性となった 9 例中 7 例に関しては、その後の調査により、子宮内感染(2 名)、尿路感染症(1 名)、DIC を伴う臨床的敗血症(2 名)、臨床的敗血症(1 名)、胎便吸引症候群(1 名)であり、6 名が後方視的にも敗血症と診断された。

以上の結果より、本 PCR 法は、血液中の起因菌を高感度に検出することが可能であると考えられた。

(2) 感染徴候のない 1500g 未満の低出生体重児における RT-PCR 法による血中細菌の検出および bacterial translocation の評価：

当該期間中に、8 名の極低出生体重児が entry された。

- ・ 出生体重： 875±217g
- ・ 在胎週数： 26.5±1.9weeks

8 例中 2 例において、RT-PCR 法により、日齢 5、日齢 3 の血液検体から *Staphylococcus* spp.、*Enterobacteriaceae* spp. が検出された。この 2 症例は、便培養からも同一菌種が優勢菌として検出されており、後方視的にも、感染の focus がなく、bacterial

translocation による菌血症の可能性が示唆される結果であった。

今回 entry された 8 症例は、いずれも probiotics 投与症例であった。今後、probiotics 投与の有無による比較検討を行うことで、bacterial translocation の評価および probiotics の有効性を検証することが可能と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Fujimori M, Hisata K, et al. Efficacy of bacterial ribosomal RNA targeted reverse transcription quantitative PCR for detecting neonatal sepsis: a case control study. BMC Pediatr. 2010 Jul 29;10:53 査読(有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 藤森 誠, 久田 研, et al. Bacterial ribosomal RNA-RT-quantitative PCR 法を用いた新生児敗血症診断の有用性. 日本小児消化管感染症研究会 (2010. 2. 6 東京)
- ② 藤森 誠, 久田 研, et al. 新生児敗血症における Bacterial rRNA-targeted RT-Quantitative PCR 法の有用性. 日本小児科学会総会 (2010. 4. 23-25 盛岡)
- ③ 藤森 誠, 久田 研, et al. 新生児敗血症診断における Bacterial ribosomal RNA-RT-quantitative PCR 法の臨床的有

用性. 臨床微生物迅速診断研究会 (2010. 6. 26 岐阜)

- ④ 藤森 誠, 久田 研, et al. 血液培養陰性/高感度定量的 RT-PCR 陽性となった新生児敗血症の 7 例の臨床像の検討. 日本小児感染症学会 (2010. 11. 27-28)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久田 研 (HISATA KEN)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号 : 10420853

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし