

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15434

研究課題名（和文）プロバイオティクス投与による下気道細菌叢への影響に関する研究

研究課題名（英文）Effect of probiotics on lower respiratory tract bacterial flora

研究代表者

富岡 雄一郎 (Tomioka, Yuichiro)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70836428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：気管切開術後患者（以下、気切）は口腔内と気管が粘膜で連続しているのに対して、喉頭気管分離術後患者（以下、分離）は粘膜の連続性が断たれており、両群において気管内の環境の相違を観察する。また口腔内にプロバイオティクスを投与した際に気管内の環境へ与える影響が直接的なものか、それとも「腸肺軸」のように間接的なものかを明らかにする。これまでに44名（気切=19名、分離=25名）の観察と、25名（気切=9名、分離=16名）のプロバイオティクス経口投与前後の観察を行った。現在は採取された気管内・口腔内・糞便・血液の各検体に含まれる細菌叢やpHや有機酸濃度の解析を行っており解析が終了次第、公表予定としている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロバイオティクス投与によりVAP（挿管に関連した肺炎）の予防効果が得られる可能性が示唆されている。ただし機序については腸内環境の改善を通して気管内の環境へ影響を与える「腸肺軸」が考えられている。また腸管内においては細菌叢やpHや有機酸濃度などの腸内環境により炎症抑制効果を得られるとされているが、気管内では細菌叢やpHや有機酸濃度などの環境がどのように変わっているか未だ不明である。本研究ではこれらを明らかにするために、気管内の環境の観察および、腸内環境に良いとされるプロバイオティクスが気管内の環境へ及ぼす影響について本研究で明らかにすることで気管内の炎症抑制の仕組みの解明につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Post-tracheotomy patients (referred to as tracheostomy patients) have a continuous mucosal connection between the oral cavity and the trachea, while post-laryngotracheal separation patients (referred to as separation patients) have severed mucosal continuity. In both groups, differences in the tracheal environment are observed. Additionally, the study aims to clarify whether the effects of administering probiotics into the oral cavity directly influence the tracheal environment or indirectly, similar to the "gut-lung axis."

Observations have been conducted on 44 individuals so far (tracheostomy: 19, separation: 25), including 25 individuals (tracheostomy: 9, separation: 16) before and after probiotic administration. Currently, analysis is underway on bacterial flora, pH, and organic acid concentrations in samples collected from the trachea, oral cavity, feces, and blood. Upon completion of the analysis, the findings are scheduled for publication.

研究分野：気道

キーワード：プロバイオティクス 気管切開 喉頭気管分離 シンバイオティクス 気道内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

全身に約 100 兆個もの微生物が存在し、それらが宿主の健康や病気に関与していることが広く知られるようになりました。以前は培養技術によって、健常者の下気道は無菌と考えられていましたが、最近の技術の進歩により、下気道にも細菌叢が存在することが明らかになりました。健常者や肺炎、アレルギー、喘息、腫瘍などの様々な疾患において、下気道の細菌叢の解析が行われ、その乱れが疾患の発症や進行に関与する可能性が示唆されています。

これまでに、健常者や気管切開術後の患者、挿管患者などを対象に、口腔内と下気道の細菌叢の解析が行われており、下気道の細菌叢は口腔内のものと関連が深いことが分かっています。口腔内の細菌が下気道に微小な吸引によって運ばれ、下気道の細菌叢が形成されると考えられています。

気管切開術は、呼吸機能が低下したり、肺炎などの呼吸器障害が繰り返される場合や、喀痰の排出が難しい場合に行われます。手術によって上気道と下気道の連続性が保たれます。一方、喉頭気管分離術は、嚥下機能が低下し誤嚥を繰り返す患者に行われ、口腔内と下気道の直接的な交通が完全に遮断されます。

脳性麻痺は、出生時や新生児期における低酸素状態や未熟児、先天性疾患などが原因で発症します。その重症度や運動障害の程度、知的能力などは個々に異なりますが、舌根沈下や嚥下障害による誤嚥性肺炎などの呼吸器合併症が予後に大きな影響を与えます。呼吸器障害が強い場合には通常、気道確保と喀痰の除去のために気管切開術が行われ、その管理は小児期から青年期に至るまで行われることがあります。

プロバイオティクスは生きた微生物であり、適切な量で投与されると宿主に健康上の利益をもたらします。シンバイオティクスは、プロバイオティクスにオリゴ糖や難消化性食物繊維を追加して効果を高めるものです。プロバイオティクスの投与は、人工呼吸器関連肺炎の予防やアレルギー疾患、喘息に効果があるとされています。これらの効果は、腸肺軸を介して全身の免疫調節を通じて間接的に起こると考えられています。一方で、下気道へのプロバイオティクスの直接的な影響についてはまだ明らかにされていません。

これまで、下気道における細菌叢や短鎖脂肪酸などの環境が、炎症抑制などの恒常性の維持に与える役割については十分に解明されていません。本研究では、シンバイオティクスの経口投与前後における下気道環境の変化を観察しました。

これまでの気管内分泌物の細菌叢の研究では、口腔内を通して気管挿管チューブや気管支ファイバーを挿入し、分泌物を採取していたので、口腔内の分泌物が困窮してしまうという問題点がありました(図 1)。本研究では、気

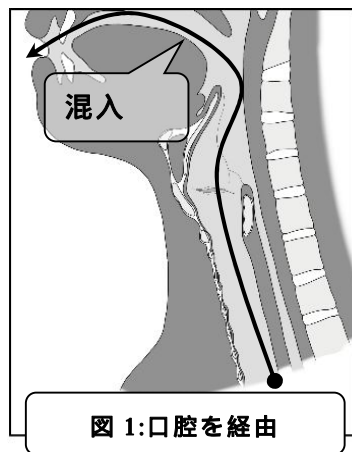


図 1:口腔を経由

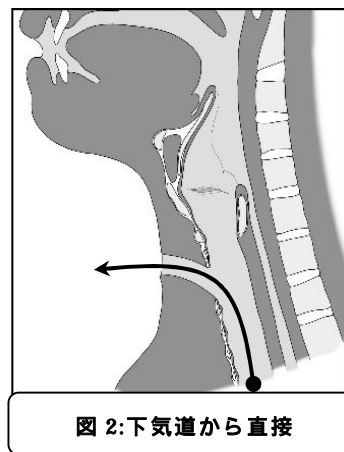


図 2:下気道から直接

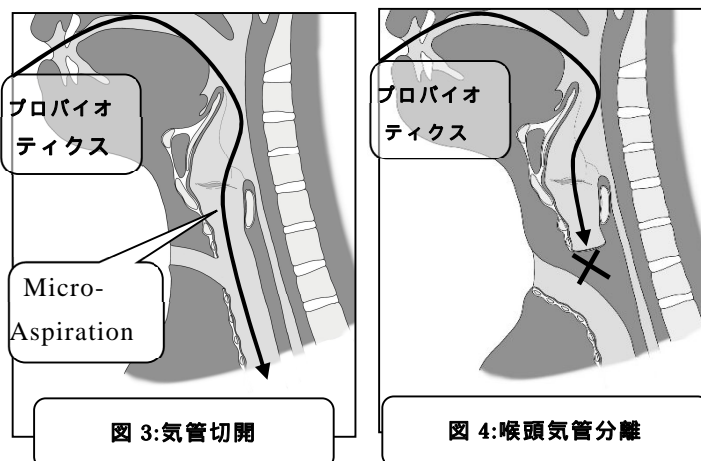
管切開術後の患者様や喉頭気管分離術後の患者様を対象としています。気管切開孔から直接下気道内へとアプローチできるため、口腔内分泌物の混入を避けることができ、より正確に検体の採取が行えるようになりました(図 2)。

2. 研究の目的

本研究ではこれらを明らかにするために、気管内の環境の観察および、腸内環境に良いとされるプロバイオティクスが気管内の環境へ及ぼす影響について調べることが目的です。気管切開術後患者(以下、気切)は口腔内と気管が粘膜で連続しているのに対して(図 3)、喉頭気管分離術後患者(以下、分離)は粘膜の連続性が断たれており(図 4)、両群において気管内の環境は相違がある可能性があります。両群において気管内の環境の相違を観察しました。また口腔内にプロバイオティクスを投与した際に気管内の環境へ与える影響が直接的なものか、それとも「腸肺軸」のように間接的なものかを明らかにすることが目的です。

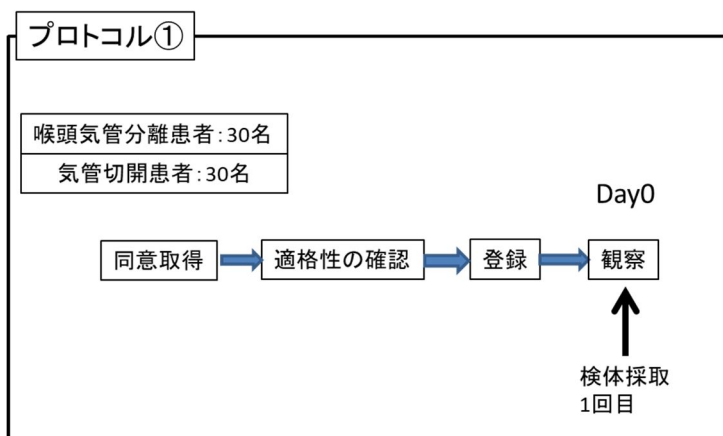
本研究では、喉頭気管分離患者と気管切開患者の 2 群間における、シンバイオティクス投与による下気道細菌叢の変化の差を観察することを目的としています。

また、肺炎は正常な細菌叢の恒常性が破綻し、肺炎球菌やインフルエンザ桿菌や緑膿菌などいわゆる悪玉菌といわれるものが増殖することで発症する。一方で Bifidobacterium や Lactobacillus に代表されるいわゆる善玉菌といわれるものは、代謝により短鎖脂肪酸などを産生することで炎症反応の抑制や上皮バリアの修復や pH の低下など有益な反応を起こすと考えられます。下気道細菌叢が口腔内細菌叢と強く関連があり、シンバイオティクスの『経口』投与により改善された口腔内細菌叢が MicroAspiration により下気道細菌叢も改善すると仮定すれば、シンバイオティクスの経口投与により肺炎の予防や、喘息・アレルギー疾患といった慢性炎症疾患の予防・改善が期待できると予測しています。



3. 研究の方法

神戸大学医学部附属病院・ここにこハウス医療福祉センター・国立あおの病院・医療福祉センターきずなにおいて2020年8月1日～2023年7月31日の期間に外来受診した者又は入院している者のうち、過去に気管切開または喉頭気管分離術を受けたことのある者をリクルートした。手術や他の治療の影響を避けるため、気管切開や喉頭気管分離の手術後6カ月以上経過しており、肺炎などの全身状態が良好かつ、研究に参加する1か月以内に抗生剤を使用していないことを参加条件とした。



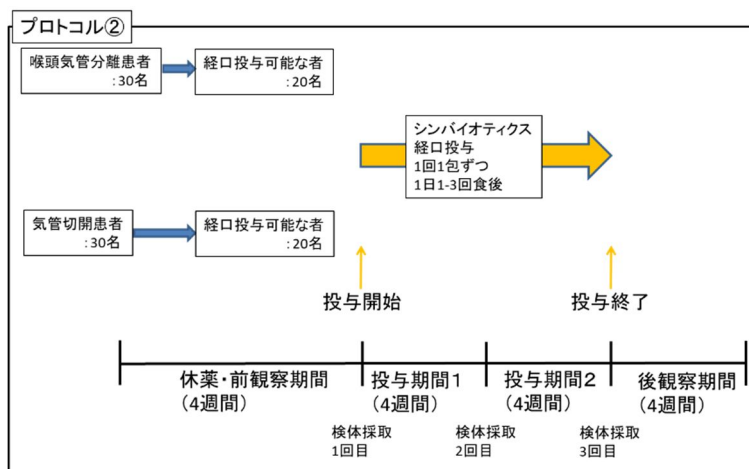
研究参加の1か月前から他の食品を含むプロバイオティクスは中止した。またこれらの者のうち、経口摂取が可能なのは、次に示す2ndプロトコルへと参加した。

2nd protocol

経口摂取が可能なのは、シンプロテック（乳酸菌・ビフィズス菌含有食品1包1.0g+オリゴ糖類食品：1包6.8g、ヤクルト本社中央研究所）を投与した。体重が20kg未満の者は1日1包、20kg～40kg未満の者は1日2包、40kg以上の者は1日3包をそれぞれ経口で合計8週間摂取した。

Sample collection

対象者からはそれぞれ下気道分泌物(喀痰)・口腔内分泌物(唾液)・便・血液を採取した。採取は対象者・その家族・医療者によって行われた。下気道分泌物は、気管切開カニューレや気管孔から吸引、または気管切開カニューレに付着した分泌物を採取した。採取した物はそれぞれ2本のチューブにコレクションした。(into the fecal collection tube (Sarstedt AG & Co., Numbrecht, Germany) containing 2 ml RNAlater (an RNA stabilization solution;

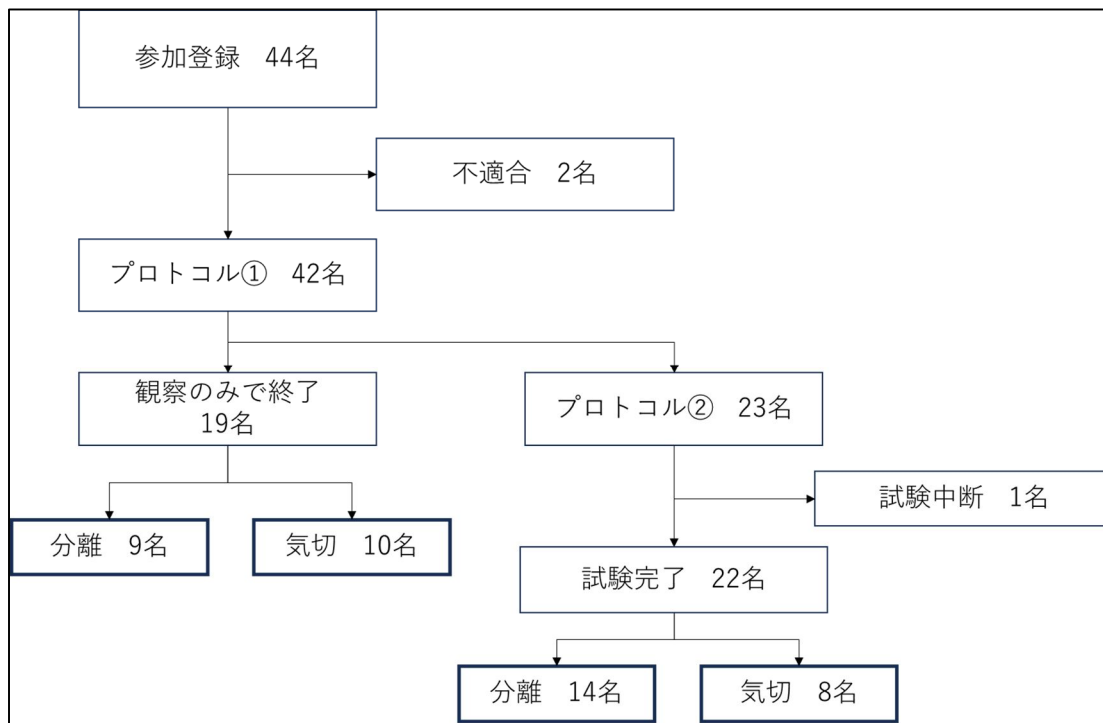


Ambion, Austin, TX) (for microbiota analysis) and an empty tube (for organic acid analysis and pH measurement). チューブにコレクションした後は、解析までの間 4 (tube with RNAlater)、20 (empty tube) にて保管した。

4. 研究成果

これまでに 44 名 (気切 = 19 名、分離 = 25 名) の観察 (プロトコル ①) と、25 名 (気切 = 9 名、分離 = 16 名) のプロバイオティクス投与 (プロトコル ②) を行った。2 名は試験に参加した者の不適合のため解析対象からは除外となり、1 名はプロトコル ② の途中で原疾患のため試験中断となった。プロトコル ① を完了した者は 42 名、プロトコル ② を完了した者は 22 名であった。

図 5. フローチャート



研究参加者の背景を以下に示す。

気管切開群と喉頭気管分離群の背景には有意な差は認められなかったが、表 2 に示す通り、プロトコル ① と ② の背景疾患において、プロトコル ② は有意に脳性麻痺患者が多い結果となった。これは、本研究のプロトコル ② の参加条件に、「試験薬の経口摂取」が含まれており、経口摂取が不可能なものがプロトコル ① に振り分けられた結果と考えられた。年齢や性別には有意な差は認められなかった。

表 1. 気管切開群と喉頭気管分離群の背景

		気切 (n=19)	分離 (n=25)
性別 (男)		11 (57.9%)	19 (76.0%)
年齢		3~80 歳 (26 歳)	9~79 歳 (28 歳)
背景疾患	脳性麻痺	13 (68.4%)	16 (64.0%)
	気道疾患	5 (26.3%)	4 (16.0%)
	その他	1 (5.3%)	5 (20.0%)
プロトコル	観察のみ	10 (52.6%)	9 (36.0%)
	試験薬投与	9 (47.4%)	16 (64.0%)

(年齢 = 中央値)

表 2. プロトコル（観察のみ）とプロトコル（試験薬投与）の背景比較

	プロトコル	
	観察のみ (n=19)	試験薬投与 (n=25)
性別 (男)	11 (57.9%)	19 (76.0%)
年齢	3 ~ 80 歳 (26 歳)	9 ~ 79 歳 (28 歳)
背景疾患		
脳性麻痺	17 (89.5%) *	12 (48.0%)
気道疾患	1 (5.3%)	8 (32.0%)
その他	1 (5.3%)	5 (20.0%)
群		
気切	10 (52.6%)	9 (36.0%)
分離	9 (47.4%)	16 (64.0%)

(年齢 = 中央値)

* : p<0.05

全 44 名の気管内分泌物・口腔内分泌物・糞便より、すべての検体においてそれぞれ細菌叢・有機酸が検出された。これまで下気道内には感染以外の状態でも常在細菌叢が居ることは知られていたが、これらの働きがどうかや、腸管内と同様に有機酸の代謝を行っているかどうかは不明であった。本研究によって、下気道内分泌物にも腸管内と同様に細菌叢だけではなく有機酸の代謝が示唆される結果が得られた。

試験薬の投与前の気管内・口腔内・糞便中・血中の細菌叢や有機酸・pH の比較や、投与後におけるそれぞれの場所における細菌叢・有機酸濃度・pH の変化について解析を行った。また、投与菌のそれぞれの場所における定着率を評価した。

気管切開群未公表データを含むため、詳細については後日報告予定である。公表（論文・学会発表など）を行う予定としている。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------