

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月26日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792059

研究課題名（和文） 嚥下障害を有する児童の口腔細菌叢の解析と最新の分類法による誤嚥性肺炎原因菌の同定

研究課題名（英文） Analysis of oral bacterial flora of children with dysphagia, and identification of aspiration pneumonia causative bacteria by the latest classification.

研究代表者

佐藤 恭子（SATO KYOKO）

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：70404499

研究成果の概要（和文）：

気管切開が施されている6名の患者では、すべて緑膿菌が検出された。また胃瘻で栄養摂取している患者の7名と、経管栄養の4名からは緑膿菌が検出された。

これらのことから気管切開を行っている患児または経管栄養、胃瘻の患児と緑膿菌の感染には関連がある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, *P. aeruginosa* was detected in 6 patients with tracheostomy and in 11 patients with tube feeding.

Detection of *P. aeruginosa* was related to tracheostomy and tube feeding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科、細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：摂食嚥下障害、誤嚥性肺炎原因菌、分子生物学的解析

## 1. 研究開始当初の背景

誤嚥性肺炎は誤嚥により飲食物や唾液、それとともに口腔内に常在する細菌などが肺に進入することによって引き起こされる。とくに飲食物や唾液とともに細菌も誤嚥して感染性の肺炎が引き起こされたときは症状が重篤化することから、その起炎菌を検出同定することは誤嚥性肺炎の治療や予防を行う上で意義がある。

またその菌種同定により、その菌の病原因子をはじめとしたどのような生化学的性状を有するか、どこに生息してどのようなバイオフィルムを形成して存在するかを明らかにすることにつながるためとくに重要である。

申請者、および申請者の所属する研究室ではこれまで口腔細菌叢やこの細菌叢に起因する細菌性心内膜炎に関する研究

を行ってきた。その一方で障害児に摂食・摂食指導を行う際に感染性の誤嚥性肺炎の危険性を感じ、文献等を通じてその原因菌を検索してきたが、現在の細菌の分類学の立場では納得が出来る知見が得られなかった。これまで誤嚥性肺炎の起炎菌とされてきた *Peptococcus* 属、*Peptostreptococcus* 属は2000年代以降の分子生物学的手法を用いた系統分類により再分類され、臨床上意義がある菌種はほとんど残っていない。そうであるにも関わらず、誤嚥性肺炎の起炎菌に関する知見は1990年代までのものがそのまま採用されている。さらに誤嚥性肺炎だけでなく細菌性心内膜炎も引き起こす口腔内の常在菌である

*Streptococcus milleri* (*S. milleri*) や *S. viridans* は、正確な菌種名を示すものではないにも関わらずそのまま採用されており、前者は Anginosus group streptococci、後者は Mitis group streptococci をはじめとした溶血性を示さないレンサ球菌群を指す名称である。こうしたことから、細菌感染性の誤嚥性肺炎の起炎菌を現在の新しい手法に基づいた系統分類により再分類し、臨床の現場にフィードバックしていく必要がある。

近年、誤嚥性肺炎の予防のために口腔ケアの重要性が示唆されている。とくに脳性麻痺などにより摂食・嚥下障害を有する児童では、口腔衛生管理が難しいため齶蝕や歯周炎に罹患していることが多い。このような状態で誤嚥を起こすことから細菌感染性の誤嚥性肺炎を発症するリスクは健常児童よりも高い。

その一方で、これらの摂食・嚥下障害を有する児童は誤嚥を防ぐ目的から経口摂取が制限され、経鼻チューブや胃瘻などにより栄養摂取していることが多い。このことから、食事を経口摂取している健常児童とは異なった口腔細菌叢を有していると考えられる。したがって、通常の齶蝕や歯周病の原因菌が摂食・嚥下障害を有する児童においてそのまま誤嚥性肺炎の原因菌となることは考えにくい。こうしたことから応募者は摂食・嚥下障害を有する児童の口腔細菌叢を解析する必要があると考え、改めて誤嚥性肺炎の原因菌を同定しようという着想に至った。

## 2. 研究の目的

脳性麻痺などの原因疾患により摂食・嚥下障害を有する児童は誤嚥性肺炎を引き起こすリスクが高い。これらの肢体不自由児は食形態や摂取方法が健常児童と異なっており、口腔細菌叢も異なると考えられるため、これらの児童の口腔細菌叢を解析して誤嚥性肺炎の原因菌を同定し、誤嚥性肺炎の治療や予防に役立つ知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

平成22年度

### (1) 誤嚥性肺炎の起炎菌の同定

#### 1) 誤嚥性肺炎の起炎菌のサンプルの収集

誤嚥性肺炎を発症した患児で、すでに原因菌が分離されているときはその菌の供与をうけ、分離されていないときは喀痰や肺からの浸出液を採取し、誤嚥性肺炎の起炎菌の分離を行う。

#### 2) 誤嚥性肺炎の起炎菌の同定

分子生物学的手法として、①原核生物の種を越えて保存されている16SリボソームRNA遺伝子(16S rDNA)のシーケンスをまず行い、その塩基配列の結果から分離菌株の菌種の同定を行う。さらに②16S-23S intergenic spacer、*ddl*、*gdh*、*rpoB*、*sodA*、*gyrB* 遺伝子などのハウスキープ遺伝子の塩基配列も決定し<sup>2,3)</sup>、これらの結果を統合し遺伝系統学的手法により誤嚥性肺炎を発症させた分離菌株の菌種を確定する。また、③糖やアミノ酸の発酵能などの生化学的性状や血清型などの免疫学的性状もあわせて調査し、確定した菌種の性状や病原性と合致するものか検討する。

### (2) 誤嚥性肺炎を引き起こした患児および健常児の口腔細菌叢の微生物群集解析

①誤嚥性肺炎を引き起こした患児および健常児の口腔細菌叢を以下の分子生物学的手法を用いて解析し、得られた結果を統合して総合的に口腔細菌叢の微生物群集を検討するとともに

②誤嚥性肺炎を引き起こした患児と健常児の口腔細菌叢の微生物群集の比較を行って感染性の誤嚥性肺炎を引き起こしやすい口腔細菌叢のパターンを抽出する。

1) T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis)法による解析

複数の微生物が共生している口腔細菌叢から全ての菌種を単離培養することは不可能なため、プライマーを利用して細菌叢をプロファイリング出来る T-RFLP 法を利用する。

細菌叢の全微生物に共通に含まれる 16S rDNA を一括して PCR で増幅し、増幅された DNA 断片を数種類の制限酵素で消化する。この消化産物の解析を行って、種特異的な微細な塩基置換による多型による細菌叢のプロファイリングを行う。

### 2) 菌種特異的プライマーの利用による菌種の同定

誤嚥性肺炎リスク患児と健常児の唾液より抽出した細菌トータル DNA を鋳型に菌種特異的プライマーを使用して PCR を行い、その陽性・陰性により菌種の同定を行う。菌種特異的プライマーのターゲットとしては、申請者らが開発してきたデンタルプラークバイオフィルムの形成に関与する菌体外多糖合成酵素グルコシルトランフェラーゼをコードする *gtf* 遺伝子、および 16S-23S intergenic spacer 遺伝子等を用いる。

### 3) DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法による菌種の同定

同じくデンタルプラークより抽出した細菌トータル DNA を鋳型に利用し、GC クランプを付与したプライマーを片方に用いて PCR を行い、Denaturing Gradient Gel を用いて電気泳動を行うことで菌種の同定を行う。本手法では 16S rDNA よりも多様性があり、レンサ球菌をはじめ多くのグラム陽性菌および陰性菌が有する遺伝子である rod shape-determining 遺伝子 (*rodA*) を用いた手法を申請者の研究室では確立している<sup>4)</sup>。

平成 23 年度は前年度からの計画を継続して、

- (1) 誤嚥性肺炎の起炎菌の採集と最新の分類学的手法を用いた菌種同定と
- (2) 誤嚥性肺炎を引き起こした患児と健常児の口腔細菌叢の微生物群集解析を行う。

平成 24 年度は、これらの結果をまとめて誤嚥性肺炎の起炎菌と誤嚥性肺炎を引き起こしやすい口腔細菌叢のプロファイルのデータベース化し、

- (1) 誤嚥性肺炎を引き起こしにくい口腔細菌叢を構築するための歯科的アプローチのプランニングを行い、誤嚥性肺炎を予防するための口腔ケアに役立てる。
- (2) 脳性麻痺等があるリスク患児に対す

る誤嚥性肺炎予防に関するエビデンスに基づいたガイドラインを作成および発表を行う。

## 4. 研究成果

長崎大学病院小児歯科を受診した摂食嚥下障害を有する患者 30 名 (0 歳 6 か月～31 歳、女性 13 名、男性 17 名) の唾液を採取し、口腔内細菌叢を解析した。

患者らの原疾患の内訳は、脳性まひ 13 名、精神発達遅滞、精神運動発達遅滞 9 名、てんかん 12 名、脳症後遺症 5 名 (重複含む) であった。

誤嚥の既往が認められたのは 11 名で、そのうち 6 名には気管切開、3 名には気管喉頭分離が施されていた。

栄養摂取では、胃瘻が施されているのは 10 名、経管栄養は 5 名、経口摂取が可能なのは 15 名だった。

日和見感染菌である緑膿菌が 12 名、MRSA が 2 名、 $\beta$  溶レン菌が 1 名、肺炎桿菌 1 名、セラチア菌が 3 名、カンジダが 3 名から検出された。

日和見感染菌が検出されなかったのは、14 名、1 種類のみ 12 名、複数検出されたのは 4 名であった。

気管切開が施されている 6 名の患者では、すべて緑膿菌が検出された。

胃瘻で栄養摂取している患者の 7 名と、経管栄養の 4 名からは緑膿菌が検出された。

これらのことから気管切開を行っている患児または経管栄養、胃瘻の患児と緑膿菌の感染には関連がある可能性が示唆された。

## 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)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

[その他]

ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 恭子 (SATO KYOKO)  
長崎大学・大学病院・助教  
研究者番号：70404499

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

藤原 卓 (FUJIWARA TAKU)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
教授  
研究者番号：00228975

星野倫範 (HOSHINO TOMONORI)  
長崎大学・大学病院・講師  
研究者番号：00359960

齋藤 幹 (SAITOU KAN)  
長崎大学・大学病院・助教  
研究者番号：40380852

西口 美由季 (NISHIGUTI MIYUKI)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：10253676