

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591173

研究課題名(和文) 網羅的細菌叢解析を用いた細菌性肺炎における起因菌のエビデンスの構築

研究課題名(英文) Examination of evidence of causative pathogen in bacterial pneumonia using clone library analysis

研究代表者

迎 寛(Hiroshi, Mukae)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：80253821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、従来の培養法に依存しない新たな原因菌検索法として、16S rRNA遺伝子をターゲットとした細菌叢解析法を用い、市中肺炎および医療介護関連肺炎の原因菌について検討を行った。その結果、従来の培養法と比較し、口腔内常在菌および嫌気性菌が多く検出され、これらの菌が呼吸器感染症においてこれまで報告されている以上に重要な役割をはたしている可能性が示唆された。本法は培養条件などに依存しないため、肺炎の原因菌検索に有用であった。また、口腔内常在菌の割合が高齢者でより多く検出されることを提示した。

研究成果の概要(英文)：We evaluated causative pathogens of pneumonia in patients diagnosed with community-acquired pneumonia or healthcare-associated pneumonia using the clone library method as a cultivation-independent method using 16S ribosomal RNA gene sequencing analysis compared to conventional cultivation methods. Our result showed that relatively higher rates of anaerobes and oral bacteria were detected by the molecular method, especially in the elderly, than previously reported. It is speculated that the molecular method we used is a useful tool for detecting causative pathogens of pneumonia, and these bacteria may play more important roles in lower respiratory tract infections.

研究分野：呼吸器感染症

科研費の分科・細目：基盤研究C

キーワード：細菌叢解析 市中肺炎 医療介護関連肺炎 16S rRNA 口腔内常在菌 嫌気性菌

1. 研究開始当初の背景

肺炎は、現在本邦において死亡原因の第3位で、死亡者数は年間約10万人を超えている。さらに80歳以上の高齢者では死亡原因の第1~2位を占め、今後も高齢化に伴い肺炎の死亡率はさらに増加するものと予想される。

重症肺炎(人工呼吸器関連肺炎等)においては、特に初期治療の失敗は死亡率の増加に直結することが報告されている(Chest, 2006, Semin Respir Crit Care Med, 2009)。そのため、国内外の専門学会による肺炎の治療ガイドラインは、初期治療に広域抗菌薬による経験的治療を推奨している。一方で、広域抗菌薬の使用は、耐性菌の出現や菌交代症への誘導、医療経済への負担増が問題となり、広域抗菌薬による経験的治療から速やかに狭域抗菌薬による標的治療への変更(de-escalation)が重要となる。正確な起炎菌の把握はde-escalationのためにも必須である。

近年、医療ケア関連肺炎が注目を集めている。医療ケア関連肺炎とは、2005年のAmerica Thoracic Society (ATS)/Infectious Disease Society of America (IDSA)の院内肺炎ガイドラインに初めて「Healthcare associated pneumonia (HCAP)」として登場した概念で、「濃厚な医療」を受けている患者や「長期滞在型療養施設またはナースিংホーム」滞在者などに発症した肺炎患者では、院内肺炎ほどの高い死亡率は認められないが、多剤耐性菌の検出頻度(リスク)が市中肺炎と比べて高いことが示されている。一方、これまでの医療ケア関連肺炎の原因菌調査の報告では、約30-40%は原因菌不明とされている。その理由としては、嫌気性菌などの培養困難例、「口腔内細菌」や「弱毒菌」など原因菌としての判定不能例があげられる。つまり、「口腔常在菌」は、下気道から検出されても口腔との交通があるため、通常の培養検査では汚染菌との鑑別が困難である。このような判定不能例の場合、de-escalationが困難となるため長期に広域抗菌薬を使用せざるを得ない状況となり、これが耐性菌出現をさらに助長することとなる。したがって、医療ケア関連肺炎についても、より正確な原因菌情報は、適切な抗菌薬の選択において特に重要である。

2. 研究の目的

現在、肺炎は「市中肺炎」、「院内肺炎」、「医療介護関連肺炎」の3群に大別され、各群の原因菌頻度や病態を基にガイドラインでの経験的推奨治療が示されているが、方谷の30-50%以上が原因菌不明であり、培養困難例がその一要因として考えられる。そこで入院を要する肺炎を上記3群に分類し、培養に依存しない網羅的細菌叢解析を用いて、原因菌の検出頻度を評価し、新たな原因菌頻度の

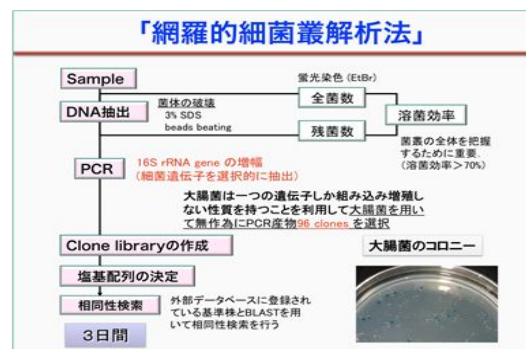
エビデンスを構築する。

3. 研究の方法

生体試料(気管支は違法洗浄液、咽頭ぬぐい液など)から培養を介さずに直接DNAを抽出する。そのDNAを精製した後、細菌のuniversal primerを用いてPCR法により約580bpの16S rDNAを増幅させる。TOPO TA cloning Kitを用いてEscherichia coli K12にクローニングし、クローンライブラリを作成する。各サンプルから96クローンを無作為に選択してそれぞれの塩基配列を決定し、当該教室で開発したin-houseデータベースと解析システムを用いて最も相同性の高い細菌の基準株を推定する。

また、検体1ml中の菌数を計測するために、エチジウムプロマイド蛍光染色を行い、溶菌前後の菌数を計測し、菌体破壊率を算出する。

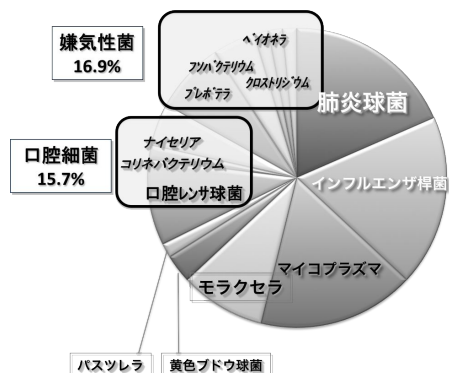
本研究は、産業医科大学の倫理審査委員会にて承認を得ている研究である。人の検体(気管支洗浄液)を用いるが、呼吸器感染症における原因菌検索を行う方法として、気管支内視鏡検査は病巣部より直接、検体採取する方法として広く用いられており、これによって得られる気管支肺胞洗浄液の培養が喀痰検査より正確な原因菌の同定が可能であると考えられる。以上の処置は通常行われる診療行為の範囲内であり、日常臨床からかけ離れているものではない。また、遺伝子工学的手法を用いるが、細菌遺伝子のみが対象であり、患者自身の遺伝情報は取り扱わない。



4. 研究成果

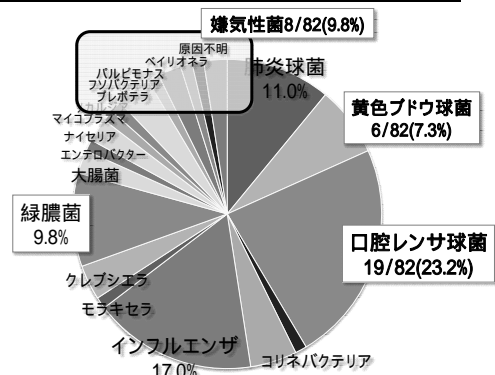
市中肺炎および医療介護関連肺炎患者に対して網羅的細菌叢解析法にて原因菌の検討を行った。市中肺炎の検討では、平均年齢62.4歳、男女比31/33例(計64名)であった。全例で気管支洗浄液を行い、気管支洗浄液の菌叢解析における最優先菌種としては、従来法と同様に肺炎球菌(19%)、インフルエンザ菌(19%)、マイコプラズマ(17%)が比較的多く認められた。従来法と比べ、Prevotella属、Fusobacterium属などの嫌気性群(16%)や口腔内常在菌(16%)が高い割合で検出された(PLoS One e631031, 2013)。

### 市中肺炎での細菌叢解析の結果



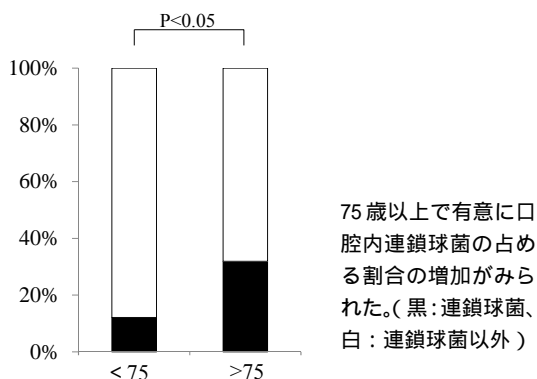
いっぽう、医療介護関連肺炎 82 例の検討では、平均年齢 75.5 歳、男女比 57/25 例であった。各症例の最優先菌種として、肺炎球菌 (11.0%)、インフルエンザ菌 (17.1%)、黄色ブドウ球菌 (7.3%) 緑膿菌が多く検出された。また、口腔内連鎖球菌が 19 例 (23.2%) を占め、特に 75 歳以上で口腔内連鎖球菌の関与がより多く認められた。また、培養法と比較すると、医療介護関連肺炎で問題視されている MRSA を中心とした多剤耐性菌に関しては、細菌叢解析の結果では検出頻度が低かった。(現在、投稿中)

### 医療介護関連肺炎での細菌叢解析の結果



本研究においては、市中肺炎・医療介護関連肺炎のいずれにおいても、これまでの報告と比べ、口腔内連鎖球菌、嫌気性菌が重要な役割を示すことを提示した。また、医療介護関連肺炎においては、市中肺炎と比べるとその原因菌は多彩であり、とくに、高齢者では口腔内連鎖球菌が重要な役割を果たすことが示唆された。

### 口腔内連鎖球菌が第一優先菌種である割合



本法では、検体内で網羅的に細菌由来の DNA を割合とともに検出することが可能であり、培養条件などにまったく依存しないため、肺炎の原因菌検索に有用であった。また、培養法と比較してさまざまな菌種の検出率が高くより詳細な情報が得られるため、今後、様々な種類の肺炎における原因菌の検出割合について新たなエビデンスの構築に大きく貢献できるものと考えられる。

### 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 7 件)

1. S. Noguchi, H. Mukae, et al. Pneumonia and empyema caused by streptococcus intermedius that shows the diagnostic importance of evaluating the microbiota in the lower respiratory tract. Internal Medicine; 53: 47-50, 2014. (査読有)
2. K. Yamasaki, H. Mukae, et al. Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. PLoS One; 6: e63103, 2013. (査読有)
3. 川波敏則, 迎 寛, 他: 肺炎診療のトピックス 菌叢解析による肺炎起炎菌の診断. Medicina; 50: 2042-2047, 2013. (査読有)
4. 川波敏則, 迎 寛, 他: 網羅的細菌叢解析を用いた肺炎の診断. 呼吸; 32: 522-527, 2013. (査読有)
5. 迎 寛: 肺炎診断への網羅的細菌叢解析の応用. 臨床と研究; 90: 829, 2013. (査読無)
6. 迎 寛: 網羅的細菌叢解析法による呼吸器感染症診断. 日本内科学会雑誌; 102: 2875-2881, 2013. (査読無)
7. 山崎 啓, 迎 寛: BALF を用いた病原体診断の新技术. 呼吸器内科; 24: 88-95, 2013. (査読無)

[学会発表](計 11 件)

1. 野口真吾, 迎 寛, 他: 細菌叢解析法を用いた Healthcare-associated pneumonia (HCAP) の原因菌の検討. 第 88 回日本感染症学会学術集会 (2014.6.18-20, ヒルトン福岡シーホーク, 福岡)
2. 野口真吾, 迎 寛, 他: CAP, HCAP での誤嚥性肺炎における口腔内常在菌の関与についての 16S rRNA 遺伝子解析法を用いた検討. 第 44 回日本嫌気性菌感染症学会 (2014.2.22, 沖縄県医師会館, 沖縄)
3. 迎 寛: ガイドラインに沿った肺炎の診断と治療. 第 26 回日本外科感染症学会総会学術集会(招待講演) 2013.11.26, 神戸国際会議場, 兵庫)

4. 迎 寛: 呼吸器感染症診断における網羅的再起層解析の応用. 第 56 回日本感染症学会中日本地方会学術集会(招待講演)(2013.11.6-8, 大阪国際会議場, 大阪)
5. 山崎 啓, 迎 寛, 他: 慢性下気道感染における嫌気性菌の関与. 第 83 回日本感染症西日本地方会学術集会(2013.11.6-8, 大阪国際会議場, 大阪)
6. 山崎 啓, 迎 寛: 細菌叢解析を用いた市中肺炎の起炎菌調査. 第 71 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会(2013.10.11, パピヨン 24, 福岡)
7. 迎 寛: 感染症治療の新たな展開 ヒト、微生物、薬剤を考えた感染症治療とマクロライド. 第 70 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部春季学術講演会(招待講演)(2013.6.29, 長崎ブリックホール, 長崎)
8. 川波敏則, 迎 寛, 他: 胸水の細菌叢解析により *Fuobacterium Necrophorum* による膿胸と診断し、外科的加療により救命できた Lemierre 症候群の一例. 第 70 回日本呼吸器学会九州支部春季学術講演会(2013.6.29, 長崎ブリックホール, 長崎)
9. 川波敏則, 迎 寛, 他: 胸水の細菌叢解析により *Fuobacterium Necrophorum* による膿胸と診断し、外科的加療により救命できた Lemierre 症候群の一例. 第 70 回日本呼吸器学会日本結核病学会九州支部春季学術講演会(2013.6.29, 長崎ブリックホール, 長崎)
10. 野口真吾, 迎 寛, 他: The significant role of oral bacteria in CAP an HCAP patients with aspiration pneumonia. The 28<sup>th</sup> international of chemotherapy and infection (2013.6.5-8, Pacifico Yokohama, 横浜)
11. 川波敏則, 迎 寛: 蛍光染色法による菌数計測と細菌感染症の関係性の検討. 第 53 回日本呼吸器学会総会学術講演会(2013.4.19-21, 東京国際フォーラム, 東京)

[図書](計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

迎 寛 (Mukae, Hiroshi)

産業医科大学呼吸器内科学 教授

研究者番号: 80253821