

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791120

研究課題名(和文) 新生児期集中治療による腸内環境変化の解析

研究課題名(英文) Fecal microflora composition change in neonates with intensive therapy

研究代表者

伊藤 尚志 (Ito, Takashi)

北里大学・生命科学研究所・研究員

研究者番号：90383629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生後早期の腸内細菌叢において、栄養法や抗菌剤の使用などの要素がその形成に影響を与える可能性が示唆される。16S rRNA PCRアッセイを用い、早産児の糞便検体より代表菌の変化を解析した。早産児33症例を対象とし、糞便検体よりDNAを抽出し代表的4菌種をRT-PCR法で解析した。結果、抗菌剤投与の有無で4菌種ともにコピー数の相違を認めなかった。プロバイオティクス群と完全母乳群では生後早期よりBifidobacteriumが認められ、完全母乳群では生後7日で黄色ブドウ球菌を認めなかった。早産児では、プロバイオティクスと母乳栄養が良好な腸内細菌叢形成に有効な可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The composition of microflora may be influenced by various factors, such as nutrition and antibiotics treatment. The aim of this study is to understand the sequential change of microbial flora in the feces from preterm baby through 16S rRNA PCR assay. The fecal samples were obtained from 33 infants(31.6±0.5weeks gestation, 1398±83g birth body weight). After bacterial DNA was extracted, subjected to PCR amplification. The result was that supplement of antibiotics did not influence the distribution of each bacterial species. In the group of probiotics treatment and the group of breast milk only, the colony of Bifidobacterium was found at very early postnatal day, and S.aureus was not colonized until the first week of life in the group of breast milk. In this study, probiotics and breast milk may work to compose the balanced microflora for preterm infants in NICU, long term observation is required to determine if this contribute to adverse outcome in future.

研究分野：新生児学

キーワード：腸内細菌叢 新生児 早産児

1. 研究開始当初の背景

ヒトは母体の胎内では無菌環境で育ち、出生直後より産道通過、外気への暴露、母児接触などを介して、皮膚や粘膜に微生物が定着する。新生児の消化管は出生直後無菌状態であるが、生後数日で腸内細菌叢を形成する。この腸内細菌叢を形成する細菌は互いに共生、拮抗しながら増殖を繰り返し、多様かつ複雑な腸管生態系を維持している。腸内細菌叢は腸管粘膜免疫システムの発達や維持に重要で、病原性微生物の侵入防御、腸疾患の抑制などに関与すると考えられている。さらに近年、腸管細菌が腸疾患ばかりでなく老化やがん、アレルギーといった疾患への関与が示唆されている (Eckburg PB, et al. *Science* 2005)。常在細菌叢は、正常新生児の場合生後数日から1週間で総腸内細菌数が急激に増加し、細菌叢の形成が開始される (秋山和範ほか、*日新学会誌* 1998)。生後3ヶ月頃になると、母乳栄養児ではビフィズス菌が最も優勢となり、嫌気性菌優位型の腸内細菌叢を形成する。しかし、何らかの疾患による病的新生児や超低出生体重児をはじめとする早産児は生直後より新生児集中治療室 (neonatal intensive care unit : NICU) へ入室し、治療・管理を受ける必要が生じる。これにより母児接触の阻害、医療従事者との接触の増加、複数のカテーテルの体内挿入、抗生剤の使用、経管栄養の使用、経腸栄養確立の遅延など、様々な誘因で正常細菌叢の形成が阻害され、ブドウ球菌類、緑膿菌など、比較的強毒菌優位の腸内細菌叢が確立されることが予測される。このような細菌叢バランスの乱れは、免疫担当細胞の機能低下、消化管を含む各種臓器発達の未熟性などと複雑に影響し合い、さまざまな合併症の発症機転になっていると考えられている。このように、新生児期は腸内細菌叢形成に非常に重要な期間であるが、NICU 等で集中治療を行った児の腸内環境に関する検討は十分になされていない。特

に超低出生体重児をはじめとする早産児における腸内環境の成立過程について、過去の報告は少ない。従来の腸内細菌叢解析手法は培養による増菌と生化学的菌種同定法によって行われ、多大な労力や費用が必要とされることが解析の妨げとなっていた。近年開発された分子学的手法では、少量の材料から細菌 DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子 (以下 16S rRNA) から定量的かつ包括的菌叢解析を行うことが可能になった (Matsuki T, et al. *Appl Environ Microbiol* 2004)。この分子生物学的解析手法を用い、NICU で管理を行う児を臨床的に分類し、生後の糞便検体中の代表菌株比率変化の解析を計画した

2. 研究の目的

本研究の目的は、新生児糞便検体中の代表菌株比率変化を測定し、NICU での全身管理が新生児期における児の腸内環境へ与える影響を解析することである。従来の菌培養法を用いた新生児腸内細菌叢形成に関する研究は存在するが、早産児をはじめ NICU 管理を行った新生児に対して本分子生物学的手法を用いた報告は少ない。得られた結果は腸内環境という新しい視点から、今後 NICU における適正な栄養法・抗菌剤使用の提言や、新生児へのプレバイオティクス・プロバイオティクスの適正な導入にむけた研究への足がかりとなると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 対象

北里大学病院 NICU に入室した新生児 (NICU 群) のうち、両親より本研究への試料提供の承諾を得られた児を対象とした (北里大学病院臨床研究倫理委員会に準ずる)。

(2) 糞便試料の採取

滅菌スプーンを用い対象新生児の糞便試料を採取し、滅菌スピッツに回収した。入院中4回採取 (日齢0, 7, 14, 30) とし、予定した検体採取日に検体を得られない (排便がない) 場合、翌日あるいは翌々日に採取した。

(3) 糞便試料からの DNA 抽出

QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) を用い糞便試料より DNA 抽出を行った。方法は Kit のプロトコールに準ずる。

(4) RT-PCR

新生児期腸内細菌叢形成において重要と考えられる代表菌 4 種 (*Bifidobacterium*、*Enterococci*、*Enterobacteriaceae*、*S. Aureus*) の特異的プライマー (作成済み) を用いて RT-PCR (Chromo4 System (BIO-RAD)) を施行し、各菌種の相対比を定量的に比較検討した。

(5) 臨床的評価項目

日齢ごとの腸内細菌叢の変動プロファイルに関して、以下の臨床項目で比較検討を行う。

抗菌剤使用

プロバイオティクスの有無

栄養法 (母乳、人工乳)

4. 研究成果

北里大学病院 NICU に入室した新生児のうち、両親より本研究への試料提供の承諾を得られ、4 回の検体採取が行われた 33 例の糞便検体をそれぞれ日齢 1.5 ± 0.2 、 7.1 ± 0.2 、 14.2 ± 0.3 、 30.3 ± 0.8 に採取した (mean \pm SEM)。本文グラフ縦軸は RTPCR によるコピー数、横軸が各日齢、棒グラフは Mean \pm SEM 表記とする。33 例のプロファイルを記す。

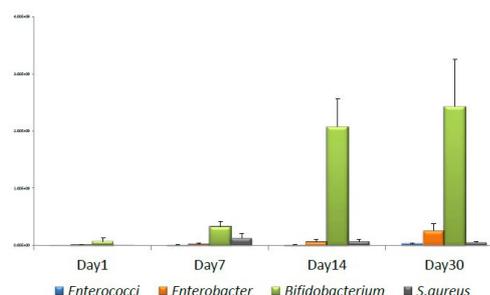
NICU 群 33 症例のプロファイル

- 性別：男 14 例、女 19 例
- 在胎週数：在胎 25 週 4 日 ~ 37 週 0 日 (31.6 ± 0.5 週)
- 出生体重：526 ~ 2256 g (1398 ± 83 g)
- 抗菌剤投与：有 25 例、無 8 例
- プロバイオティクス：有 28 例、無 5 例
- 栄養：母乳 (MM) のみ 12 例、母乳 + 人工乳 21 例
- *S. aureus*：陽性 12 例、陰性 21 例

(1) 4 菌種全体の日齢変化 (33 症例)

図 1 に各日齢 4 ポイントの 4 菌種のコピー数を示す。*S. aureus* を除く 3 菌種は日齢経過に伴い増加した。菌種での比較では、*Bifidobacterium* が最も多数であった。

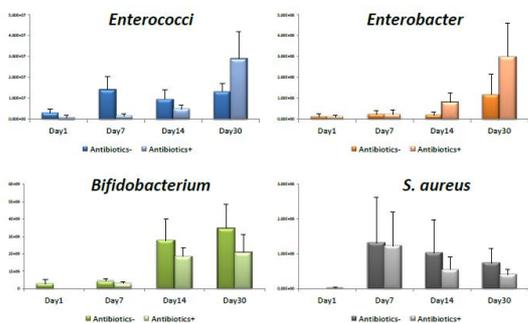
図 1：4 菌種プロファイル (33 症例)



(2) 抗菌剤投与の影響

抗菌剤投与の有無における、4 菌種の変化を比較検討した。今回の 25 症例中 24 症例は日齢 0 (出生直後) より抗菌剤を投与し、日齢 5~14 で投与を終了した (平均投与日数 6.8)。全例経静脈投与で、抗菌剤の種類は 32 症例がアンピシリン (ピクシリン® : ABPC) とゲンタマイシン (ゲンタシン® : GM) で、投与量はそれぞれ ABPC: 100 mg/kg/day (1 日 2 回投与)、GM: 在胎 30 週未満 2.5 mg/kg/day (1 日 1 回投与)、在胎 30 週以上 3.0 mg/kg/day (1 日 1 回投与) であった。残る 1 症例は、日齢 4 に重症感染症状を認め、日齢 4~9 までメロペネム (MEPM) 静注投与を行った (MEPM: 60mg/kg/day (1 日 3 回))。抗菌剤の種類が違う一症例は、実験結果に大きな変化を認めず、他の抗菌剤使用と同様に抗菌剤使用群として扱った。抗菌剤投与群 25 例と非投与群の各菌種の比較を図 2 に示す。今回の検討においては、抗菌剤投与による 4 菌種のプロファイルに有意な相違は認められなかった。

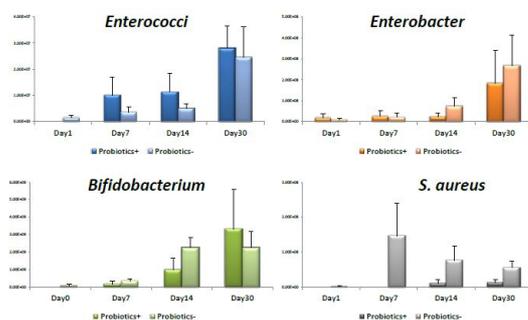
図 2：抗菌剤使用の影響



(3) プロバイオティクスの影響

北里大学病院 NICU では、在胎 32 週未満の早産児へビフィズス菌経管投与を行っている。ビフィズス菌製剤は B. breve M-16 (109 生菌/1g)、日齢 0 から 21 まで 0.5g/day (1 日 1 回) 投与を行っている。プロバイオティクス群 28 例と残りの 5 症例を比較検討した(図 3)。結果、*Bifidobacterium*、*Enterococci*、*Enterobacteriaceae* の 3 菌種は大きな相違を認めなかった。しかし、*S. Aureus* に関して、プロバイオティクス群ではいずれの日齢でもコピー数が少ない傾向を認め、プロバイオティクスによる腸内の黄色ブドウ球菌の減少効果が示唆された。今回の検討は対象の多くがプロバイオティクスを行う適応となる早産児であり、今後正常産児等との比較を行うなど、注意深い検討が必要と考えられる。

図 3：プロバイオティクスの影響



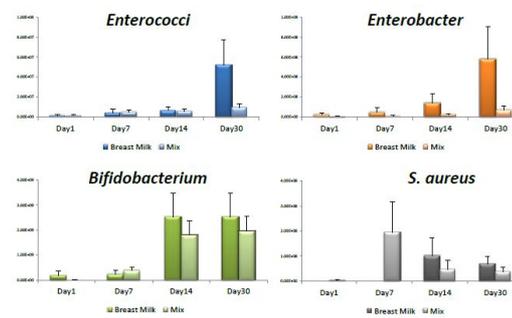
(4) 栄養法 (母乳、人工乳) の影響

昨今母乳栄養の利点が提唱され、世界的に母乳育児の推進が著しい。今回 33 症例中、母乳のみで栄養を行った 12 症例と、母乳と

人工乳で栄養を行った 21 症例を比較検討した。結果、母乳のみ群で日齢 30 の *Bifidobacterium*、*Enterococci*、*Enterobacteriaceae* の 3 菌種が母乳 + 人工乳群と比較して高い傾向を示した。さらに、日齢 7 において、母乳のみの群では *S. aureus* が一例も検出されなかった (図 4)。

当院 NICU では早期授乳と母乳育児を推進しているため、対象 33 例はいずれの日齢で全例母乳を使用していた (出生早期は donor milk 施行)。完全な人工乳のみ栄養の児との比較ではないため、今回の 2 群間での有意な相違は認めなかった可能性が考えられる。

図 4：栄養 (母乳のみ、母乳 + 人工乳) の影響



(5) *S. aureus* 陽性例の検討

33 例中 12 例で *S. aureus* が陽性となった。図 5 に *S. aureus* 陽性例のコピー数の日齢変化を示す。生後 7 日ごろに陽性となり、以降日齢経過とともに減少する傾向が見られた。また、*S. aureus* 陽性群と陰性群で他の 3 菌種 (*Bifidobacterium*、*Enterococci*、*Enterobacteriaceae*) のプロファイルと比較検討した(図 6)。結果、日齢 14 及び 30 で *S. aureus* 陽性群は *Enterococci*、*Enterobacteriaceae* が陰性群と比較して減少していることがわかった。さらに陽性群は、*Bifidobacterium* が日齢 14 に比べ日齢 30 で減少していた (図 7)。日齢早期における腸内細菌叢形成において、黄色ブドウ球菌が定着する率は低いとされて

いるが、何らかの理由で黄色ブドウ球菌定着した児では、この時期に増加する正常な細菌群の定着に影響を及ぼす可能性が示唆された。

図 5 : S. aureus コピー数の日齢変化

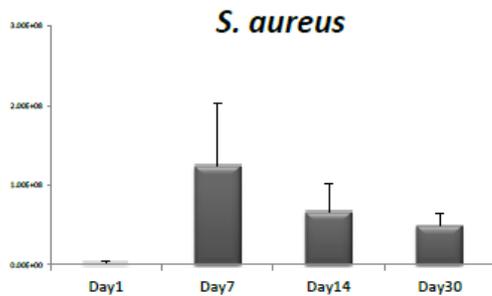
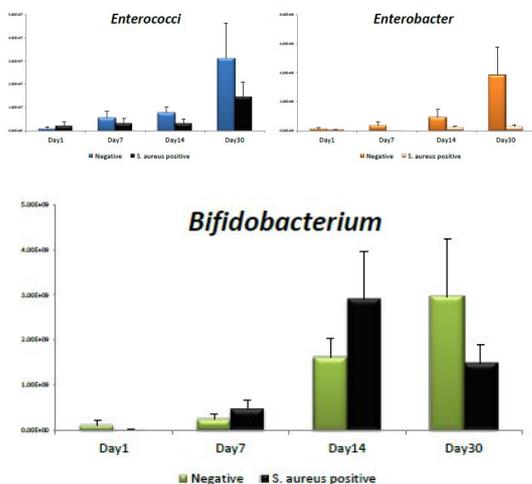


図 6: S. aureus 陽性例 3 菌種 (*Bifidobacterium*、*Enterococci*、*Enterobacteriaceae*) プロファイル



研究成果のまとめ

本研究より、以下の点が明らかとなった。

平均在胎 31.6 週出生の早産児において、日齢経過とともに *Bifidobacterium* をはじめとする腸内細菌は増加を示した。

抗菌剤の経静脈投与により、腸内細菌に大きな変化は認めなかった。

プロバイオティクス (*B. breve* 使用) 及び完全母乳栄養により、生後 7 日前後での黄色ブドウ球菌の定着が抑制される可能性が示唆された。

生後早期に黄色ブドウ球菌が定着した児では、その後日齢 30 前後での *Bifidobacterium* の定着に影響が出る可能性が示唆された。

今後、NICU 群と正常新生児検体とあわせた包括的なデータを論文報告していく予定である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

Ito Takashi, Bando Y, Oooka M, Nowatari M
FECAL MICROFLORA COMPOSITION
IN PRETERM INFANTS USING 16S
rRNA PCR

第 11 回世界周産期学会、2013 年 6 月 19 日、モスクワ (ロシア)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

北里大学 北里生命科学研究所 研究員
伊藤 尚志 (Ito Takashi)

研究者番号 : 90383629