

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 20 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17078

研究課題名(和文)16S rRNA遺伝子を用いた人工呼吸器関連肺炎の細菌叢解析

研究課題名(英文)Dynamics of microbiota in ventilated associated pneumonia

研究代表者

尾辻 健(Otsuji, Ken)

産業医科大学・大学病院・修練指導医

研究者番号：50770244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：誤嚥性肺炎は、嫌気性菌や複数の口腔内常在菌が起炎菌と考えられており、通常用いられる培養法での起炎菌同定は困難な場合が多い。本研究では、培養法に依存せずに検体中の細菌を網羅的、定量的に評価出来る16S rRNA遺伝子を用いて誤嚥性肺炎症例における治療経過中の細菌叢の変化を評価した。産業医科大学病院で人工呼吸器管理を行った誤嚥性肺炎22症例を対象とした。唾液は、経時的に大きな細菌叢の変化は見られなかった。一方、吸引痰に関しては、人工呼吸器管理中(抗菌薬投与前)に、嫌気性菌が有意に減少していた。酸素投与などの人工呼吸器管理に伴い誤嚥性肺炎症例の下気道の嫌気性菌が著減した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今、抗菌薬耐性菌の出現が世界的に問題となっており、抗菌薬の適正使用が求められている。今回の、遺伝子工学的手法により新たに得られた結果を踏まえると、誤嚥性肺炎症例の下気道において、人工呼吸器管理中に嫌気性菌が著減することを前提とした抗菌薬選択が必要であると考えられる。不適切な抗菌薬選択を減らすことが期待でき、抗菌薬耐性菌の出現防止、誤嚥性肺炎症例の生存率改善、さらには医療費削減にも期待できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is often difficult to identify the causative bacteria in patients with aspiration pneumonia via the culture method. To develop a treatment strategy for patients with aspiration pneumonia, we evaluated the changes in microbiota of oral cavities and lower respiratory tracts in cases of aspiration pneumonia using the clone library analysis based on highly accurate 16S rRNA gene sequencing. Twenty-two mechanically ventilated patients with aspiration pneumonia treated in University of Occupational and Environmental Health Japan were recruited. The changes of microbiota in the saliva were not clear. On the other hand, the proportion of anaerobes was significantly reduced during mechanical ventilation (before administration of antibiotics) in the tracheal aspirate. It is suggested that anaerobes in the lower respiratory tract were markedly reduced by mechanical ventilation including oxygen administration.

研究分野：細菌叢解析

キーワード：誤嚥性肺炎 細菌叢解析 嫌気性菌 人工呼吸器

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工呼吸器関連肺炎(Ventilator associated pneumonia 以下 VAP)は、発症頻度、致死率ともに比較的高い疾患の一つである。その起炎菌同定は培養法に依存しているが、嫌気性菌や複数の口腔内細菌が関与していると考えられているため、培養法で起炎菌を同定することは通常困難である。起炎菌の同定が困難であると患者の治療効果への影響だけでなく、昨今世界的に問題となっている、薬剤耐性菌の出現を助長してしまう懸念がある。

2. 研究の目的

今回の研究は、VAP 症例の吸引痰および唾液を採取し、16S rRNA 遺伝子を用いた網羅的細菌叢解析を行い、起炎菌の同定および起炎菌と口腔内の細菌叢との関連を明らかにすることを目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

産業医科大学病院で VAP と診断された症例を対象として研究を開始した。対象の唾液および吸引痰をもちいて網羅的細菌叢解析を開始したところ、人工呼吸器管理開始直後および抗菌薬投与直前の検体を解析出来た症例において、人工呼吸器管理開始直後は唾液と吸引痰の細菌叢は類似していたが、抗菌薬開始直前においては、唾液は著変を認めなかったにもかかわらず吸引痰に関しては嫌気性菌が著減しており細菌叢が大きく変化していた。そのため、ある一点の細菌叢の解析だけでなく、人工呼吸器管理開始直後(A)、抗菌薬開始直前(B)および抗菌薬開始 48-72 時間後(C)に唾液および吸引痰を採取して細菌叢の経時的变化を評価することとした。また、対象をより広義である誤嚥性肺炎とし解析を行った。対象から得られた検体は DNA 抽出後に、細菌の 16S rRNA 遺伝子の Universal Primer を用いて PCR を行った。PCR 産物は TOPO TA クローニングキットを用いてクローニングを行い、その中から無作為に選択した約 96 クローンの塩基配列を決定し、基準株との相同性検索を行い、検体中の細菌叢を解析した。また、細菌叢の変化に関しては主成分分析を用いて解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 誤嚥性肺炎の診断で人工呼吸器管理を行った 22 症例から得られた 116 検体中の細菌叢の解析を行った。全体で 9753 個の細菌由来の 16SrRNA 遺伝子を解析し、118 種類の細菌(属)が検出された。
- (2) 主成分分析を用いた唾液および吸引痰の細菌叢変化の結果を図 1 に示す。唾液に関しては経時的な変化は明らかではなかった。一方、吸引痰に関しては(A)から(B)にかけて PC1 軸のマイナス方向へシフトする傾向がみられた。PC1 および PC2 の固有ベクトル成分を確認したところ、PC1 のプラスの方へ偏性嫌気性菌の強い偏りを認めた(図 2)。吸引痰において(A)から(B)において嫌気性菌が減少した可能性が示唆された。

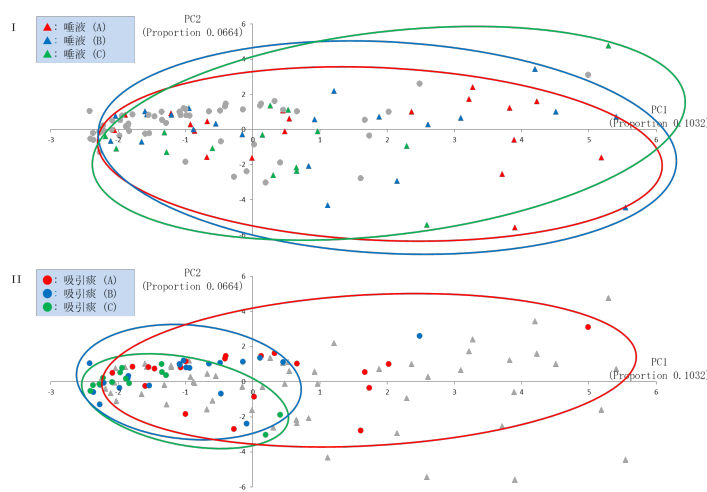


図1 唾液および吸引痰の細菌叢変化

PC1	PC2
Yersinia 0.323	Streptococcus 0.274
Prevotella 0.312	Veillonella 0.259
Actinomyces 0.276	Actinomyces 0.234
Orbivibrio 0.263	Bifidobacterium 0.191
Atopobacter 0.232	Genella 0.163
Legionella 0.232	Campylobacter 0.128
Stenotrophomonas 0.221	Legionella 0.122
Paenibacillus 0.228	Lactobacillus 0.117
Parvimonas 0.225	others 0.096
Lactomonas 0.222	Escherichia 0.067
Campylobacter 0.162	Mycobacterium 0.065
Parvimonas 0.162	Lactomonas 0.061
Dialister 0.153	unclassified 0.042
Mycobacterium 0.153	Leucostoea 0.037
others 0.152	Prevotella 0.032
Tropaeolum 0.15	Rothia 0.029
Corynebacterium 0.138	Mycobacterium 0.022
Genella 0.128	Spingomonas 0.017
Peptostreptococcus 0.127	Enterobacter 0.014
Streptococcus 0.097	Roseburia 0.006
Rothia 0.088	Corynebacterium 0.003
Mycobacterium 0.076	Atopobacter 0.009
Parvimonas 0.076	Corynebacterium 0.009
Moraxella 0.035	Mycobacterium 0.026
Mycobacterium 0.027	Serratia 0.014
Aggregatibacter 0.016	Klebsiella 0.015
Neisseria 0.023	Parvimonas 0.041
Serratia 0.023	Delfia 0.009
Leucostoea 0.04	Doligranulum 0.062
Roseburia 0.047	Prevotella 0.072
unclassified 0.047	Stenotrophomonas 0.077
Spingomonas 0.05	Staphylococcus 0.094
Haemophilus 0.051	Haemophilus 0.114
Granulicatella 0.069	Aggregatibacter 0.136
Delfia 0.074	Moraxella 0.136
Enterobacter 0.074	Orbivibrio 0.14
Corynebacterium 0.079	Dialister 0.176
Parvimonas 0.089	Atopobacter 0.189
Stenotrophomonas 0.089	Parvimonas 0.254
Doligranulum 0.09	Corynebacterium 0.257
Escherichia 0.091	Neisseria 0.261
Lactobacillus 0.106	Peptostreptococcus 0.279
Staphylococcus 0.113	Peptostreptococcus 0.298
Klebsiella 0.148	Parvimonas 0.348

図2 PC1およびPC2の固有ベクトル成分

- (3) 唾液および吸引痰において嫌気性菌の変化について解析を行った。それぞれの時点における嫌気性菌の割合は、唾液(A); 25.5% (421/1,650), (B); 24.7% (456/1,843), and (C); 16.6% (227/1,366), 吸引痰(A); 12.3% (206/1,678), (B); 3.9% (74/1,880), and (C); 2.6% (35/1,336)であった。唾液の(A)から(B)にかけて有意な嫌気性菌の割合の変化はみられなかった(IRR: 0.97, 95% CI 0.85-1.12, p=0.76)。一方、吸引痰に関しては(A)から(B)にかけて嫌気性菌の割合は有意に減少していた(IRR: 0.34, 95% CI 0.26-0.45, p<0.001)。図 3 に個々の症例の(A)から(B)における吸引痰中の嫌気性菌の割合の変化を示す。吸引痰における嫌気性菌の減少の程度は、

(A)と(B)を採取するまでの時間に依存していた。(A)から(B)の採取時間が2時間以内の場合は、有意な嫌気性菌の減少はみられなかった(IRR: 1.23, 95% CI 0.73-2.05, $p=0.43$)。ところが、(A)から(B)の採取時間が3~10時間では(IRR: 0.22, 95% CI 0.13-0.38, $p<0.001$)、11時間以上では(IRR: 0.23, 95% CI 0.15-0.35, $p<0.001$)と吸引痰(A)から(B)にかけて嫌気性菌は有意に減少していた(図3)。

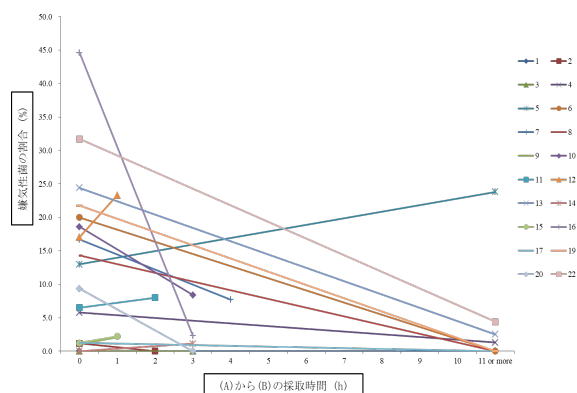


図3 (A)から(B)における吸引痰中の嫌気性菌の割合の変化

- (4) 抗菌薬投与後の検体にどのような細菌が多く検出されるか評価を行った。抗菌薬投与後の吸引痰(C)において、*Enterobacter* spp. [*asbriae* (99%), *cloacae* (98%)], *Corynebacterium* spp. [*propinquum* (99%), *acoolens* (99%)], *Pseudomonas aeruginosa* (99%), *Klebsiella pneumoniae* (99%), *Staphylococcus aureus* (99%), and *Granulicaterra adiacens* (99%)が新たに最優先菌として検出された(%は基準株との相対性を示す)。また、*Escherichia coli* (99%), *Serratia marcescens* (99%), and *Stenotrophomonas maltophilia* (99%)は、最優先菌ではないが抗菌薬投与後に新たに割合が20%以上に増加した。本研究で薬剤感受性については評価できていないが、これらの菌は抗菌薬に耐性を持っていると推定された。
- (5) 本研究の結果、人工呼吸器管理を行った誤嚥性肺炎症例において、人工呼吸器管理中(抗菌薬投与前)に下気道の嫌気性菌が著減するという結果が得られた。酸素投与などの影響で下気道の嫌気性菌は死滅した可能性が考えられた。また、抗菌薬投与後48-72時間の経過で抗菌薬に耐性を持つと推定される細菌の割合が増加していた。これらの菌は初期治療が奏効しない場合に起炎菌として考慮されるべきと考える。今回の、遺伝子工学的手法により新たに得られた結果を踏まえると、誤嚥性肺炎症例の下気道において、人工呼吸器管理中に嫌気性菌が著減することを前提とした抗菌薬選択が必要であると考えられる。不適切な抗菌薬選択を減らすことが期待でき、抗菌薬耐性菌の出現防止、誤嚥性肺炎症例の生存率改善、さらには医療費削減にも期待できる可能性がある。不必要に広域スペクトラムの抗菌薬投与を行うことは、世界的に問題となっている抗菌薬耐性菌の出現を助長する可能性があり、抗菌薬の適正使用が求められている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 4件)

日本細菌学会総会(第91回、2018年)

発表者: 尾辻 健、福田 和正、小川 みどり、藤野 善久、齋藤 光正、発表標題: Anaerobes in ventilated aspiration pneumoniae are markedly reduced by ventilatory management

日本集中治療医学会学術集会(第45回、2018年)

発表者: 尾辻 健、遠藤 武尊、金澤 綾子、内田 貴之、荒井 秀明、原山 信也、二瓶 俊一、相原 啓二、蒲地 正幸、発表標題: 誤嚥性肺炎症例の下気道の嫌気性菌は人工呼吸器管理で著減する

日本細菌学会九州支部総会(第70回、2017年)

発表者: 尾辻 健、福田 和正、波呂 薫、二階堂 靖彦、松本 正弘、小川 みどり、齋藤 光正、発表標題: 人工呼吸器管理による細菌叢変化

日本集中治療医学会九州支部学術集会(第1回、2017年)

発表者: 尾辻 健、福田 和正、倉津 諭、樋渡 智香子、清水 智子、遠藤 武尊、長田 圭司、原山 信也、二瓶 俊一、相原 啓二、小川 みどり、齋藤 光正、蒲地 正幸、発表標題: 16S rRNA 遺伝子を用いて口腔内および下気道の細菌叢変化を解析した誤嚥性肺炎の一例

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 福田 和正，小川 みどり，蒲地 正幸，齋藤 光正

ローマ字氏名： Fukuda Kazumasa, Ogawa Midori, Kamochi Masayuki, Saito Mitsumasa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。