

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08639

研究課題名(和文) 一般細菌・抗酸菌・真菌の網羅的菌叢解析による下気道感染症の病態の解明

研究課題名(英文) Research on the pathophysiology of lower respiratory tract infections caused by bacteria, acid-fast bacilli, and fungi, using 16S ribosomal RNA gene analysis

研究代表者

矢寺 和博 (Yatera, kazuhiko)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40341515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎患者(市中肺炎120名、医療ケア関連肺炎101名、院内肺炎73名)、慢性下気道感染症患者(31名)を対象に肺病巣部から直接採取した気管支肺胞洗浄液を用いて16S ribosomal RNA遺伝子をターゲットにクローンライブラリー法にサンガー法を組み合わせた手法で細菌叢解析を行い、患者背景別に検討した。

市中肺炎で嫌気性菌がより多く検出され、院内肺炎患者及び脳血管障害を有する肺炎患者でコリネバクテリウム属の細菌が多く検出された。慢性下気道感染症患者で、NTM検出群(14名)はNTM非検出群(17名)よりも嫌気性菌(特にプレボテラ属)の占める割合が多く、NTMと嫌気性菌の関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療ケア関連肺炎や院内肺炎は従来誤嚥の頻度が高く、嫌気性菌の関与が高い事が報告されてきたが、我々の解析結果では医療ケア関連肺炎や院内肺炎よりも市中肺炎において病巣部の細菌叢における嫌気性菌の検出頻度が高い事を示した。臨床において肺炎診療は原因菌がわかるまではガイドラインに基づいて抗菌薬選択が行われる場合が多いが、肺炎タイプ別、基礎疾患別の病巣部細菌叢の関わりが明らかになる事により、さらに基礎疾患を含めた患者背景まで考慮した抗菌薬選択を行うことでより正確な初期治療が可能になる可能性があり、社会的意義が深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed microbiome detected by the clone library method using the 16S rRNA gene sequencing in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) directly obtained from pneumonia lesions in 294 pneumonia patients (120 with community-acquired pneumonia: CAP, 101 with healthcare-associated pneumonia: HCAP and 73 with hospital-acquired pneumonia: HAP) and 31 chronic lower respiratory tract infection patients. Then, we also evaluated lung microbiome in the patient characteristics.

More obligate anaerobes were detected in CAP patients than HCAP or HAP patients. More *Corynebacterium* species were detected in HAP patients than CAP or HCAP patients, and in patients with cerebrovascular diseases. Among chronic lower respiratory tract infection patients, a higher proportion of anaerobic bacteria (especially *Prevotella* species) was detected in 14 patients with nontuberculous mycobacteria (NTM) than 17 patients without NTM, and this result suggested the association between NTM and anaerobic bacteria.

研究分野：呼吸器感染症

キーワード：16S ribosomal RNA 肺炎 慢性下気道感染症 非結核性抗酸菌症 嫌気性菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦の2019年の肺炎による死亡者数は年間約9万5千人で死亡原因の第5位、誤嚥性肺炎による死亡者数は年間約4万人で死亡原因の第6位であった。肺炎で死亡する患者の97%以上を65歳以上の高齢者が占め、高齢になるほど肺炎の死亡率は上がり、80歳以上の死亡原因の第3位である。本邦では今後ますます高齢化が進み、肺炎の死亡率の増加が予想される。

本邦の成人肺炎ガイドライン2017では、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に基づいて経験的推奨治療が示されている。中でも「医療介護関連肺炎」の概念の基となったのは、2005年のAmerica Thoracic Society(ATS)/Infectious Disease Society of America(IDSA)の院内肺炎ガイドラインでMRSAや緑膿菌といった耐性菌保有を予測するために登場した「Healthcare associated pneumonia(医療ケア関連肺炎)」であり、米国と高齢者の多い日本の疫学や医療制度の違いから「医療介護関連肺炎」の概念は出来た。しかしながら、MRSAや緑膿菌をカバーした抗菌薬選択が医療ケア関連肺炎患者の予後を改善せず、医療ケア関連肺炎の定義が耐性菌保有を正確に予測しない研究が複数報告されたため、2019年のATS/IDSA市中肺炎のガイドラインでは医療ケア関連肺炎の概念は使用されていない。本邦でも「医療介護関連肺炎」の概念をどのように扱うべきか議論が必要であるが、肺炎の病巣部の正確な細菌叢についてのデータは十分ではなく、議論する上で問題となる。

(2) 成人肺炎ガイドラインでは肺炎の原因菌検索で喀痰の培養検査が推奨されているが、喀痰は口腔内を経由するため口腔内細菌の混入が避けられず検出された細菌が口腔由来か肺炎の原因菌が識別することは困難である。また、肺炎患者の約半数では喀痰の喀出が困難であり、嫌気性菌等、培養法では検出することが困難な細菌もある。この培養法の問題点を解決するために我々は、呼吸器感染症患者の感染病巣から気管支鏡検査によって直接採取した気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid; BALF)を用いて、clone library法にSanger法を組み合わせた細菌叢解析法で原因菌の検索を行った。この手法では培養に依存せずに原因菌の評価が可能である。この手法で、これまで細菌感染関連胸水(Kawanami T, Yatera K, et al. *Chest*, 2011)、市中肺炎(Yamasaki K, Yatera K et al. *PLoS One*, 2013)、誤嚥性肺炎(Akata K, Yatera K, et al. *BMC Pulm Med*, 2016)、肺気腫の程度別の肺炎の原因菌(Naito K, Yatera K, et al. *Int J COPD*, 2018)について報告してきた。

(3) 非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacteria; NTM)は結核菌およびらい菌を除く抗酸菌の総称で、土壌や水中などの自然環境、水道や貯水槽などの生活環境に広く生息している。結核症とは異なりヒト-ヒト感染をきたさないが、発症すると多剤による少なくとも1年以上の長期抗菌薬治療が必要となるが、治療抵抗性の症例も多く、真菌感染症を含めた他の細菌感染症も合併しやすく、中には荒廃肺となり呼吸不全死を招来する患者もいる。我々は気管支肺胞洗浄液から網羅的細菌叢解析法を用いた手法で、嫌気性菌等を含めたNTM以外の一般細菌がNTMの病巣部から検出され、画像所見の増悪と関連することを報告し(Yamasaki K, Yatera K, et al. *Respirology*, 2015)、NTMの単独菌種感染と比較して異なるNTMが複数菌種感染することが喀痰などの臨床症状や画像所見の増悪、治療抵抗性と関連があることを世界で初めて報告した(Naito K, Yatera K, et al. *Chest*, 2020)。

### 2. 研究の目的

(1) 細菌性肺炎患者の肺炎病巣部の正確な細菌叢と肺炎タイプ(「市中肺炎」、「院内肺炎」、「医療ケア関連肺炎」及び「医療介護関連肺炎」)、背景疾患との関連性について明らかにすることが目的である。本邦の「医療介護関連肺炎」概念のガイドラインにおける取り扱いについて議論するにあたり、本研究のデータが有用になる。

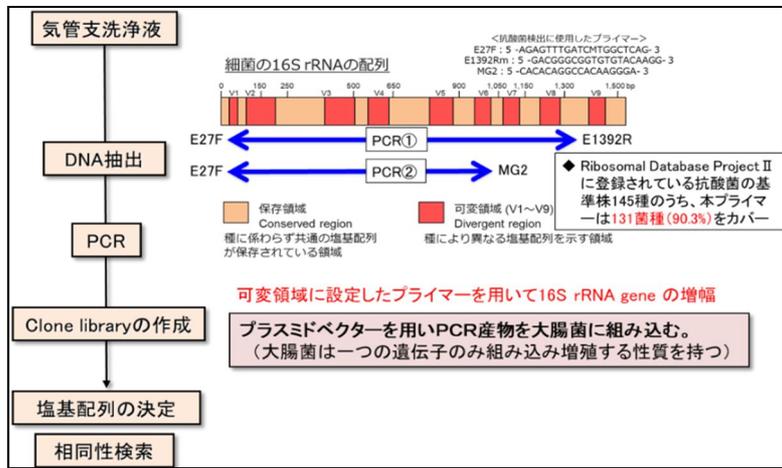
(2) 肺NTM症を含めた慢性下気道感染症患者における肺病巣部の一般細菌、抗酸菌の菌種を推定し、その割合、混合感染の違いによる臨床所見の経時的経過の違いや抗酸菌治療に対する治療反応性に加えて、治療前、治療中、治療後の肺病巣部菌叢変化を前方視的に明らかにすることで、肺NTM症の病態制御のための新たな評価基準や治療戦略を確立するための基礎的データ収集を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 産業医科大学病院呼吸器内科および関連施設に入院した肺炎患者及び、肺NTM症が疑われる慢性下気道感染症で気管支鏡検査を行った患者を対象とした。肺炎患者は、対象患者の肺病変から直接採取したBALFを用いて、clone library法にSanger法を組み合わせた網羅的細菌叢解析を行い、肺炎タイプ別(市中肺炎、医療ケア関連肺炎、院内肺炎)及び基礎疾患別に分けて細菌叢を比較した。肺NTM症が疑わしい慢性下気道感染患者は、一般細菌の網羅的細菌叢解析に加えて、抗酸菌について別で菌叢解析を行って得られたデータから単一NTM感染群と複数NTM感染群とに分け、胸部CT画像所見(空洞性病変やその周囲の気道病変)、臨床データ、治療反応性や予後との関連性を経時的(治療開始後から6か月、12か月、18か月、24か月、治療直後)に評価し、BALFを治療開始前、治療中は半年毎、また治療終了直後に採取して肺病巣内の菌叢の変化の解析を行った。

(2) 肺炎病巣部細菌叢を構築する各細菌の16S rRNA遺伝子を解析する為に、本研究で行っている clone library 法に Sanger 法を組み合わせた網羅的細菌叢解析法の概要を示す(上図)。

検体中に存在する細菌を3%ドデシル硫酸ナトリウムピーズ破砕法で溶菌し、DNAを抽出する。16S rRNA 遺伝子における V3-V5 領域ターゲットとしたプライマー・ペアを用いて16SrRNA 遺伝子の部分断片(約550bp)をPCRで増幅する。加えて、慢性下気道感染患者は『抗酸菌のみ』をターゲットとしたプライマー・ペアを用いて16SrRNA 遺伝子の部分断片をPCRで増幅する。



**網羅的細菌叢解析手法、及び抗酸菌検出に用いるプライマー**

抗酸菌検出は2種類プライマー(E27F-E1392R、E27F-MG2)によるPCRの重複(nested PCR)でNTM検出感度を上げる

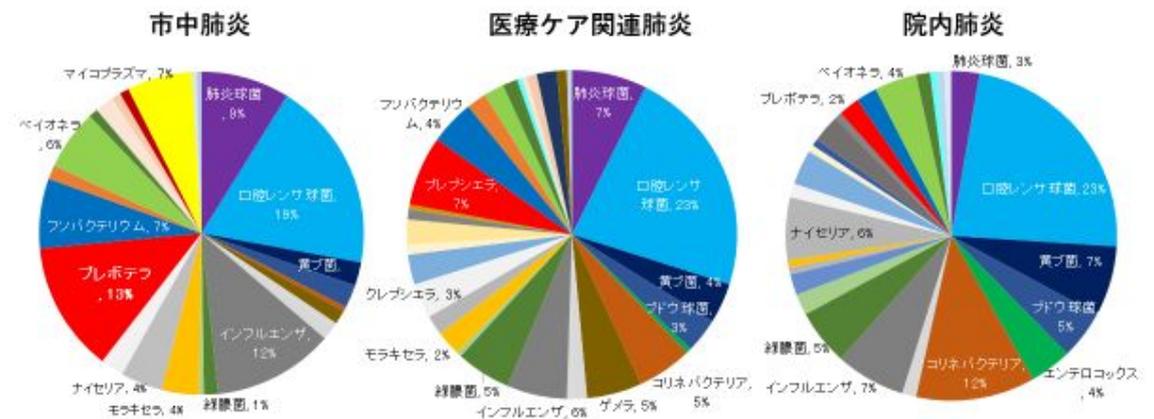
大腸菌を用いて clone library を作成する。クローン化された増幅産物の塩基配列を決定する。データベースに登録されている基準株に対して BLAST (Basic Local Alignment Searching Tools) アルゴリズムを用いて相同性を検索する、といった6つの工程からなる。また、quality control の為、蛍光染色法により、溶菌前後の細菌数を計測して溶菌効率を算出し、一定の溶菌効率を得られていることを確認した。

抗酸菌の同定は抗酸菌培養により確認出来た菌株を抗酸菌群核酸同定検査や質量分析法で解析するが、抗酸菌培養は培養時間が長期となることが多く、結果が出るまで時間が掛かる。我々の行っている細菌叢解析によるNTMの検出は、培養法に依存しない解析法であり、培養法に比較して早く解析でき、世界でも本学のみがこの手法を唯一確立しており、独自性は非常に高い。

**4. 研究成果**

(1) 市中肺炎(120名) 医療ケア関連肺炎(101名) 院内肺炎(73名)に対して、肺病変部から直接 BALF 検体を採取して網羅的細菌叢解析を行った。103名の患者が医療介護関連肺炎患者であり、その内101名は医療ケア関連肺炎患者であった。肺炎タイプ別に細菌叢を比較すると(下図)、口腔レンサ球菌が全ての肺炎タイプで一番多く検出され(21.3%)、市中肺炎患者における嫌気性菌の検出頻度が医療ケア関連肺炎や院内肺炎に比較して多く( $P < 0.001$ )、コリネバクテリア属が市中肺炎や医療ケア関連肺炎に比較して院内肺炎患者で多く検出された( $P < 0.001$ )。また、基礎疾患毎に細菌叢を比較すると、脳血管障害患者は脳血管障害の無い患者よりもコリネバクテリウム属が多く検出され( $P = 0.002$ )、気管支拡張患者では緑膿菌が気管支拡張の無い患者よりも多く( $P < 0.001$ )、糖尿病患者で肺炎球菌が糖尿病の無い患者よりも多く検出された( $P = 0.009$ )。(Nemoto K, Yatera K, et al. *J Infection and Chemotherapy*, 2022)

(2) 慢性下気道感染症患者の肺病変部の気管支肺胞洗浄液の細菌叢解析、及び臨床所見との比較について前向きに症例集積を行った結果、NTM 検出群(14名)がNTM 未検出群(17名)に比較して、細菌叢における嫌気性菌の占める割合(特に *Prevotella* 属の占める割合)が高い事を確認する事ができた。また、NTM が複数菌種検出される症例が存在する事を確認出来ており、このNTM が複数菌種検出される症例と単一菌種のみが検出される症例とにおいて、NTM の標準治療開始半年後の画像所見、臨床症状の差異について比較すると、複数抗酸菌種が検出された群において臨床症状の改善が乏しく、画像所見が悪化する傾向にある事を確認出来ている。この結果は以前に我々の検討の報告(Naito K, Yatera K, et al. *Chest*, 2021)と一致しておりさらなる症例集積を行い、今後結果のまとめを行った上で論文化予定としている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yatera Kazuhiro, Noguchi Shingo, Mukae Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Perspective on the clone library method for infectious diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 741 ~ 747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2021.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yatera Kazuhiro, Mukae Hiroshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Corynebacterium species as one of the major causative pathogens of bacterial pneumonia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 131 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2020.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yatera Kazuhiro, Mukae Hiroshi	4. 巻 58
2. 論文標題 Drastic change in the lung microbiome induced by mechanical ventilation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 425 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2020.07.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwanaga Yuto, Yamasaki Kei, Nemoto Kazuki, Akata Kentaro, Ikegami Hiroaki, Uchimura Keigo, Noguchi Shingo, Nishida Chinatsu, Kawanami Toshinori, Fukuda Kazumasa, Mukae Hiroshi, Yatera Kazuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Combined Radiographic Features and Age Can Distinguish Mycoplasma pneumoniae Pneumonia from Other Bacterial Pneumonias: Analysis Using the 16S rRNA Gene Sequencing Data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2201 ~ 2201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11082201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikegami Hiroaki, Noguchi Shingo, Fukuda Kazumasa, Akata Kentaro, Yamasaki Kei, Kawanami Toshinori, Mukae Hiroshi, Yatera Kazuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Refinement of microbiota analysis of specimens from patients with respiratory infections using next-generation sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98985-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi Shingo, Yatera Kazuhiro, Kawanami Toshinori, Ikegami Hiroaki, Hata Ryosuke, Yamasaki Kei, Fukuda Kazumasa, Mukae Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Association between obligatory anaerobes and empyema caused by Streptococcus anginosus group bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 686 ~ 690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2021.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naito Keisuke, Noguchi Shingo, Yatera Kazuhiro, Kawanami Toshinori, Yamasaki Kei, Fukuda Kazumasa, Ikegami Hiroaki, Akata Kentaro, Kido Takashi, Sakamoto Noriho, Saito Mitsumasa, Mukae Hiroshi	4. 巻 158
2. 論文標題 Coinfection With Multiple Nontuberculous Mycobacteria as a Possible Exacerbating Factor in Pulmonary Nontuberculous Mycobacteriosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chest	6. 最初と最後の頁 2304 ~ 2313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chest.2020.06.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ikegami Hiroaki, Yamasaki Kei, Kawanami Toshinori, Fukuda Kazumasa, Akata Kentaro, Nakamura Midori, Ikushima Issei, Fukuda Yoko, Noguchi Shingo, Yatera Kazuhiro	4. 巻 59
2. 論文標題 Pulmonary Mycobacterium parascrofulaceum Infection in a Patient with Chronic Progressive Pulmonary Aspergillosis: A Case Report and Literature Review.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1417 ~ 1422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3540-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hata Ryosuke, Kawanami Toshinori, Noguchi Shingo, Fukuda Kazumasa, Akata Kentaro, Yamasaki Kei, Saito Mitsumasa, Yatera Kazuhiro, Mukae Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical characteristics of patients with bacterial pleuritis in the presence of Streptococcus anginosus group and obligate anaerobes detected by clone library analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Clinical Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 267 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/crj.13127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hata Ryosuke, Noguchi Shingo, Kawanami Toshinori, Yamasaki Kei, Akata Kentaro, Ikegami Hiroaki, Fukuda Kazumasa, Hirashima Soichi, Miyawaki Akihiko, Fujino Yoshihisa, Oya Ryoichi, Yatera Kazuhiro, Mukae Hiroshi	4. 巻 91
2. 論文標題 Poor oral hygiene is associated with the detection of obligate anaerobes in pneumonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.19-0043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 根本一樹、赤田憲太郎、池上博昭、山崎 啓、野口真吾、川波敏則、矢寺和博、迎 寛
2. 発表標題 細菌叢解析法を用いた肺炎病巣における嫌気性細菌叢の肺炎タイプ別の比較
3. 学会等名 第51回日本嫌気性菌感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根本一樹、池上博昭、福田和正、内藤圭祐、赤田憲太郎、野口真吾、山崎 啓、川波敏則、迎 寛、矢寺和博
2. 発表標題 Clone library法による肺非結核性抗酸菌症における抗酸菌混合感染の臨床的意義の検討
3. 学会等名 第90回日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口真吾, 矢寺和博
2. 発表標題 口腔衛生・嚥下機能と誤嚥性肺炎の関係
3. 学会等名 第85回日本呼吸器学会・日本結核 非結核性抗酸菌症学会・日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会 九州支部秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口真吾、川波敏則、福田和正、池上博昭、畑亮輔、山崎啓、迎寛、矢寺和博
2. 発表標題 細菌性肺炎患者の病巣内の細菌叢における菌種間の関係性の検討
3. 学会等名 第89回日本感染症学会西日本地方会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢寺和博
2. 発表標題 呼吸器疾患における気道の細菌叢
3. 学会等名 第42回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 矢寺和博
2. 発表標題 新たな遺伝子診断技術による呼吸器病原微生物の網羅的解析と今後の方向性
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------