

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791236

研究課題名(和文) 早産児に対する最適かつ効果的なプロバイオティクス投与方法の確立

研究課題名(英文) Study of optimal method of probiotics supplementation for premature infants

研究代表者

久田 研 (Hisata, Ken)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10420853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：壊死性腸炎は、早産児において最も重篤な合併症のひとつである。早産児にプロバイオティクスを投与することで、壊死性腸炎の発症率が低下する。このため、多くの新生児集中治療室において、プロバイオティクスが使用されているが、その投与方法は多様化しているのが現状である。本検討の結果、賦形剤としてデキストリンが用いられている場合は、蒸留水での溶解が浸透圧の面から最適と考えられた。また、早産児へのプロバイオティクス投与は、投与終了後も腸内細菌叢に影響を及ぼすことが確認された。

研究成果の概要(英文)：Necrotizing enteritis is one of the severe complication of premature infants. Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants. Therefore, probiotics is supplied for premature infants in many neonatal intensive care units. However, those methods are various and different by each NICU. In this study, when dextrin was used as diluting agent, dissolution method with distilled water was thought to be optimal. In addition, we confirmed that probiotics have an influence on intestinal flora of infants after a discharge.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：Probiotics 新生児 投与方法 浸透圧

1. 研究開始当初の背景

近年の新生児医療技術の向上は、在胎 22 ~ 24 週、体重 500g 未満の早産児の生存をも可能とし、最近ではインタクトサバイバルを目指した早産児の管理に注目が集まっている。

早産児は、帝王切開での出生・母乳栄養の確立の遅れ・抗菌薬の使用などの影響により、正常な腸内細菌叢の形成が遅れ、病原細菌叢が優勢菌となりやすい。更に、腸管免疫や腸管粘膜バリア機能がいずれも未成熟であるため、腸内細菌叢の確立遅延とともに、bacterial translocation を介した敗血症や壊死性腸炎の発症リスクにつながっている。したがって、出生早期に正常な腸内細菌叢を確立することは、これら疾患の発症リスクを軽減すると考えられている。

そこで期待されているのが、プロバイオティクスである。プロバイオティクスとは、「宿主の腸内細菌叢の調整によって宿主に有益な影響を及ぼす微生物と、それらの増殖促進物質」と定義され、新生児領域においては、*Bifidobacterium* 属が主に用いられる。実際、正常な腸内細菌叢である *Bifidobacterium* 属が最優勢菌となる時期は、成熟新生児が生後 1 週以内であるのに対して、早産児では生後 1 ヶ月以上を要する。このため、本邦でも、より早期に正常な腸内細菌叢を確立させることを目的に、早産児に対しプロバイオティクスを投与する施設が増えている(日本新生児学誌 1994; 30: 130-137)。更に、プロバイオティクスには、正常な腸内細菌叢の確立に伴う病原細菌叢の抑制作用のみならず、便中有機酸・短鎖脂肪酸、免疫能への影響、蠕動運動の調節など様々な作用を有することが報告されている。そして、これらのプロバイオティクスの効果が複合して、早産児において死亡率の高い壊死性腸炎の発症を抑制することが、meta-analysis の結果から証明されている。(Cochrane 2008, Issue 1. CD005496)。

しかしながら、海外文献を review してみても、その投与菌種・投与菌数・溶解液・溶解量・1 日投与回数などは様々である。Meta-analysis 全体としては壊死性腸炎の抑制に寄与するが、実際、最適且つより有効性の高い溶解・投与方法、また、その安全性については明確な比較検討がなされていない。我々が実施した全国アンケート調査でも、国内における早産児に対するプロバイオティクスの使用状況は、投与方法・溶解方法・保存方法、いずれにおいても、各施設で様々であり、統一されたものがないのが現状となっていた。

『本邦での早産児に対するプロバイオティクスの投与方法の現状』

- ・1 日投与量
<0.5 包、0.5 包、1 包、<1 包、1.5 包
- ・1 日投与回数
1 日 1 回、分割投与

- ・溶解液
蒸留水、母乳・人工乳、5%糖や生理食塩水
- ・溶解液量
1ml 未満、2ml、3ml、4ml、1 日ミルク量
- ・溶解後の保存
直ちに投与、溶解し冷蔵保存、milk に溶解し保存
と様々である。

2. 研究の目的

本邦における新生児領域でのプロバイオティクスの使用方法は多岐にわたり、更に、各施設の投与方法を検証すると、少量の溶液での溶解、浸透圧の高い溶液での溶解など、浸透圧上昇による未熟腸管への悪影響が懸念される投与方法が散見される。また、投与回数を複数回にするため、冷蔵にて 24 時間保存し使用する施設もあり、生菌数が減衰する可能性も懸念される。このようにプロバイオティクスの投与方法が多様化する原因には、海外文献の review からみられるとおり、適正且つ安全な投与方法(1 日投与菌数、溶解液、溶解量、保存方法、1 日投与回数を詳細に検討した方法)が検討されておらず、明確な回答がないためである。以上、国内外を問わず、投与方法が確立していないプロバイオティクスの至適投与方法を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

浸透圧への影響
溶解液・溶解量の違いによる溶解後の浸透圧
・使用プロバイオティクス：ピフィズス菌 M-16V(*B.breve* M-16V 1×10^9 cfu/包；規格値)
・溶解液：a)蒸留水、b)母乳、c)人工乳、d)95%ブドウ糖
各溶解液 2ml・4ml・8ml(人工乳は 16-64ml 追加)に M-16V：1 包を溶解し、アドバンス社浸透圧計により浸透圧を測定した。

生菌数への影響
溶解液、保存方法を変えて、溶解後の生菌数を測定
各溶解液 4ml に M-16V：1 包を溶解し、a) 溶解直後、b) 溶解後に常温で 1hr、2hr 保存、c) 冷蔵で 12hr、24hr 保存
それぞれの溶液 1ml を RCA 培地で嫌気培養、SPC 培地で好気培養
生菌数をコロニーカウントし、残存生菌数を測定

プロバイオティクス投与後の腸内細菌叢への影響を非投与群と評価

- ・上記検討によって得られた至適投与方法に当院の投与方法を統一。
- ・対象：1500g 未満
退院後 1 ヶ月時の保護者の同意を得て採便。
- ・パイロシーケンス法により腸内細菌叢の構成を比較検討

4. 研究成果

溶解に伴う浸透圧の変動が懸念されるため、各溶解液、溶解量の違いによる浸透圧への影響を測定した。M-16V (B. breve 10⁹cfu/1.2g/包)を母乳、人工乳、蒸留水、5%ブドウ糖に溶解し、浸透圧を測定したところ、蒸留水 4ml への溶解では、浸透圧は等張を示した。しかし、母乳、人工乳、5%ブドウ糖への溶解は、いずれも高浸透圧となることが示され、更に、人工乳では溶解量を 16ml に増量しても浸透圧は 400mOsm を超える結果であった。また、保存による浸透圧への影響を検討するため、溶解液毎に保存時間を変えて 12 時間と 24 時間後に浸透圧を測定したところ、蒸留水、人工乳、5%糖では、保存による浸透圧への影響はないものの、母乳は溶解後の保存時間が長くなるほど浸透圧が上昇しており溶解後の保存には適さない結果であった。なお、蒸留水であっても、蒸留水 2ml への溶解では、高浸透圧となることから、蒸留水 4ml への溶解が等張であり、適切な溶解方法であることが示された。

しかしながら、溶解液 4ml の経腸投与は、出生体重がより少ない早産児の消化管への容量負荷となる可能性が懸念される。そこで、分割投与を念頭に置き、溶解後の保存時間による生菌数への影響を検討した。M-16V を蒸留水、母乳、人工乳、5%ブドウ糖の各溶解液 4ml に溶解し、溶解直後および 4、24 時間保存後の生菌数をカウントした。結果、母乳および人工乳では、生菌数は保存による影響を受けなかったが、蒸留水および 5%ブドウ糖では生菌数が減衰した。ただし、蒸留水における生菌数の減少率は 20-30%以内であった。

腸管の未熟性が強い 1500g 未満の早産児では、体重・日齢毎に投与可能な経腸栄養量は異なり、投与可能なプロバイオティクス溶液の投与量も制限される。蒸留水 4ml へのビフィズス菌の溶解は等張であり、適切な溶解方法であるが、一方で、生後早期における一括投与は困難である。したがって、体重や日齢に応じた分割投与が必要となるが、保存により生菌数が減弱するものの、その生菌数は、今までに検討されている早産児に対するプロバイオティクスとして投与されている菌数から逸脱しておらず、許容される菌数と考えられる。

以上、早産児の体重・日齢を考慮し、実際の臨床で可能な適切な溶解保存方法は、生後早期は M16-V 1 包を蒸留水 4ml に溶解し、冷蔵保存の上 0.5ml×8 回/日の分割投与、安定期には蒸留水 4ml に 1 包を溶解し、直ちに一括投与する方法と考えられた

上記の結果をもとに、プロバイオティクスの投与方法を以下のように提唱する。

早産児に対するプロバイオティクスの適正な投与方法(案)

例) B.breve M16-V 10⁹cfu/1.2g/包(規格値) 賦形剤：デキストリンの場合

1 包を蒸留水 4ml で溶解

・出生早期：溶解液 4ml を 4~8 分割投与(1回 0.5-1ml)

・安定期*：溶解液 4ml を一括投与

* 1 回経腸栄養量が 4ml 以上となり一括投与が可能となる時期

投与方法

・投与する菌種や菌数についての統一された基準はない。

・*Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属など様々な菌種が臨床研究されている。近年は複数菌を投与する報告が多い。また、ラクトフェリンやオリゴ糖を加えたシンバイオティクスも検討されている。

・報告の多くは 10⁹ cfu/日の菌数で投与されている。

・国内では *B. breve* を用いる施設が多いが他菌種を用いる施設もある。

・いくつかの製剤があるため、溶解・投与方法は各製剤の使用方法に従う。

注意 1) 賦形剤にデキストリンが用いられている場合、1 包を溶解する溶液の種類や量によっては浸透圧が上昇する。上記の製剤条件の場合、蒸留水 4ml で等張である。

注意 2) 賦形剤にコーンスターチが用いられている場合は、コーンスターチによるイレウスの報告があるため、溶解後に上清を用いることが望ましい。

安全性

・*Bifidobacterium* 属による血流感染の報告は少ない。有効性と安全性を各施設で検討したうえで投与する。

・多くの製剤は医薬品ではなく、食品に分類されるため、投与にあたっては各施設の規約に則って検討する必要がある。

投与期間についての検討

プロバイオティクスの投与方法を上述の溶解投与方法に統一した。その後の壊死性腸炎や投与菌による敗血症をはじめとする有害事象は認めなかった。1500g 未満の早産児を対象に、プロバイオティクス投与群(n=9)とプロバイオティクス非投与群(n=10)で、退院後の腸内細菌叢を比較検討した。その結果、非投与群の腸内細菌叢に比べ、投与群では有意に *Bifidobacteriaceae* が優勢菌となり *Enterobacteriaceae* を抑制した腸内細菌叢のパターンを示していた。プロバイオティクスの早産児に証明された効果は、壊死性腸炎の予防である。一般的に壊死性腸炎は 1500g 未満、特に 1000g 未満に多く、生後 2 週が好発時期である。今回の検討でプロバイオティクスは投与後一定期間、影響を及ぼすことが確認された。したがって、壊死性腸炎予防を目的としたプロバイオティクスの投与は、一部の施設で行われている生後 4 週間の投与期間でも妥当と考えられた。しかしながら、近年、

メタゲノム解析の飛躍的な発展により、疾病と腸 microbiome との関連が指摘されるようになってきている。早産児へのプロバイオティクスの投与は、投与後の腸内細菌叢にも影響を及ぼすことから、壊死性腸炎のみならず、今後のより長期的な影響を検討する必要性があり、その場合の投与期間は今後の検討課題である。

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)

〔雑誌論文〕(計1件)

久田研, 清水俊明. 【新生児医療-up to date】
プロバイオティクス 小児科診療 査読無
Vol175, No9, 2012, pp.1578-1585

〔学会発表〕(計1件)

久田研. NICUにおけるプロバイオティクスの
現状. 第114回小児科学会学術集会教育セミナー
2011年8月14日品川

6. 研究組織

(1)研究代表者

久田 研

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10420853