

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461172

研究課題名(和文) 網羅的細菌叢解析を用いた誤嚥性肺炎における原因菌のエビデンスの構築

研究課題名(英文) Configuration of bacteriological evidence of causative pathogens in patients with aspiration pneumonia using the bacterial floral analysis of 16S ribosomal RNA gene

研究代表者

迎 寛 (Mukae, Hiroshi)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：80253821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：気管支洗浄液を採取した肺炎患者(177名)を対象に16SrRNA遺伝子を用いた網羅的細菌叢解析法を用いて、誤嚥リスク因子の有無により分類し原因菌解析を行った。誤嚥リスク有群(83名)では口腔レンサ球菌が有意に多く検出され、その規定因子として、全身状態不良や1年以内の肺炎の既往が抽出された。これにより、口腔内常在菌として過小評価されてきたレンサ球菌が、誤嚥性肺炎の原因菌として重要なことを明らかにした。また、口腔衛生状態と原因菌との関連性の検討(n=34)では、口腔内衛生状態(OHI)が不良群で嫌気性菌の検出が有意に多く、口腔内不衛生が下気道検体の嫌気性菌の検出に關与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated causative bacterial species by the clone library method using 16S rRNA gene sequencing analysis of bronchoalveolar lavage fluid in pneumonia patients (n=177) with or without aspiration risks. Oral streptococci were significantly detected in patients with aspiration risks (n=83) compared with those without, and factors such as poor ECOG performance status, past history of pneumonia within one year were associated with a detection of oral streptococci. These results suggest that oral streptococci are more important as causative pathogens of pneumonia in patients with aspiration pneumonia than previously believed. In addition, studies evaluated the relationship between oral hygiene status and detected bacterial species showed that poor oral hygiene status was significantly related to higher detection of anaerobic bacteria, and therefore oral hygiene status might be important factor for detecting anaerobic bacteria in the lower respiratory tract infection.

研究分野：呼吸器感染症

キーワード：誤嚥性肺炎 口腔レンサ球菌 嫌気性菌 細菌叢解析 16S rRNA 口腔内衛生状態

1. 研究開始当初の背景

(1)本邦では肺炎による死亡者数が年間約 12 万人を超え、2011 年には死亡原因の第 3 位となった。肺炎で死亡する患者の 95%以上が 65 歳以上の高齢者であり、特に 70 歳以上の高齢者では肺炎の死亡率が極端に高くなることが知られている。本邦では、今後社会の高齢化がさらに進み、2060 年には 65 歳以上の人口割合(高齢化率)が約 40%に達すると推計されており、今後ますます肺炎の死亡率増加が予想される。このため、本邦の肺炎診療では「高齢者(誤嚥性)肺炎」に対する適切な予防や管理が重要な問題の一つと考えられ、特に肺炎の原因菌を含めた誤嚥性肺炎の正確な病態の把握は適切な診断及び治療管理において特に重要である。

(2) 一般的には肺炎の原因菌評価では喀痰の定量培養が推奨されており(嚥下性肺疾患の診断と治療[改訂版], 2013)、誤嚥性肺炎の原因菌としては、肺炎球菌、インフルエンザ菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌などの頻度が高いことが一般的に知られているが、50%近くで口腔細菌が検出されたとの報告もある(*Geriatr Med*, 2010)。また、嫌気性菌に関しては培養での検出は比較的困難であるため、従来培養を中心とした検査では、正確な原因菌の検索が困難であることが考えられる。さらに、従来喀痰を中心とした検体の培養では、検体が口腔内を経由するため口腔内細菌の混入が避けられず、通常の培養検査では培養された口腔内細菌が肺炎の原因菌であるのか汚染菌であるのかの鑑別が困難である。我々は、これまで本学微生物学教室との共同研究で、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洗浄液や胸水検体を用いて、培養に依存しない 16S rRNA 遺伝子配列を用いた網羅的細菌叢解析法による原因菌の評価を行ってきた。細菌感染関連胸水の検討では、従来考えられていたよりも嫌気性菌が原因菌として重要であることを示し(Kawanami T, et al. *Chest*, 2010)、また、市中肺炎患者の気管支洗浄液の検討(Yamasaki K, et al. *PLoS ONE*, 2013)では、既報の原因菌に加えて嫌気性菌やレンサ球菌が重要であることを明らかにした。従って、誤嚥性肺炎の原因菌の評価においても、我々の用いている培養に依存しない細菌叢解析法が肺炎の原因菌の正確な評価に有用であると考えられる。

(3)また、誤嚥性肺炎の原因として、脳血管障害やパーキンソン病などの神経疾患による嚥下機能障害に加えて、口腔内の不衛生も重要な因子であることが知られている。そこで、誤嚥性肺炎の基礎疾患、及び口腔内の衛生状態、さらには、下気道の細菌叢に加えて、口腔内の細菌叢(プラーク、舌ぬぐい液、咽頭ぬぐい液)の評価も誤嚥性肺炎における病態の解明や適切な治療の向上において重要であると考えられる。

2. 研究の目的

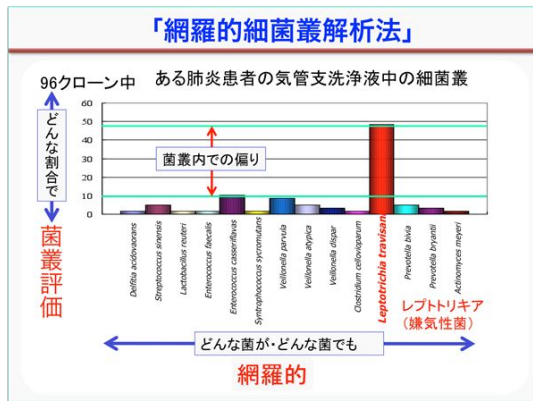
本研究は、今後ますます増加する誤嚥性肺炎における正確な診断法及び適切な治療法を確立するために、肺炎の原因菌の正確な情報の収集を行い、新たなエビデンスの構築を目的とした。また、本研究は、嫌気性菌や口腔内細菌の影響が大きいことが考えられる誤嚥性肺炎に焦点を当てて、培養に依存せずに 16S rRNA 遺伝子を評価することによるクローンライブラリー法(網羅的細菌叢解析法)を用いて原因菌検索を行う唯一のデータとなる。本研究で用いる細菌叢解析では、解析対象菌種を推定する必要がなく、無作為に選択した 96 クローンの塩基配列の解析から菌種の推定とそのクローン数の相対的比率から優占菌種(検体内での比率)の把握を行うことができる。さらには、これまで原因菌として評価することが難しかった口腔内常在菌や培養困難な嫌気性菌を含めて網羅的に検出することが可能である点が特徴である。しかしながら、細菌叢解析は、本学微生物学教室と呼吸器内科学教室における独自の解析法であり、どの施設でも行えるわけではない。そのため、我々が得た解析結果をもとに、誤嚥性肺炎の肺炎診療に関する新たなエビデンスを提供することで、社会に大きく貢献できることが期待された。

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(市中肺炎、医療ケア関連肺炎、院内肺炎)を対象とした。対象患者から気管支鏡により気管支肺胞洗浄液及び喀痰を採取し、それぞれの検体より 16S rRNA 遺伝子を用いた細菌叢解析法を行った。このうち、既報の誤嚥リスク因子(中枢性変性疾患、脳血管障害、認知症、頭頸部疾患、胃食道疾患)(Marik PE et al. *New Engl J Med*, 2001)を有する群と有さない群における検出された細菌叢を比較検証した。また、誤嚥性肺炎群と非誤嚥性肺炎群に分類し、誤嚥をきたしやすい病態(神経疾患、寝たきり状態、胃食道疾患、鎮痛薬・睡眠薬の内服等)や、胸部 CT 画像の評価を行い、嚥下造影検査を用いずに、誤嚥性肺炎の診断が可能かどうかを検討した。さらには、当院に入院した肺炎患者に対して、本学歯科口腔外科の協力のもと、口腔内衛生状態の評価を行い、口腔内の不衛生が肺炎の上気道及び下気道の細菌叢に与える影響を検証し、気管支洗浄液に加えて口腔検体(歯のプラーク、舌ぬぐい、咽頭ぬぐい)を用いて同様に網羅的細菌叢解析を行うことで、下気道及び口腔内の細菌叢の比較により口腔内細菌の肺炎の原因菌としての関連性を評価した。

(2)本研究で用いる細菌叢解析法の方法の概要は、検体中に存在する細菌を 3%ドデシル硫酸ナトリウムにビーズ破砕法を用いて溶菌する。DNA の抽出および精製する。ユニバーサルプライマーを用いて 16SrRNA 遺伝

子の部分断片(約 600bp)を PCR で網羅的に増幅する。大腸菌を用いてクローンライブラリーを作成する。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と BLAST(Basic Local Alignment Searching Tools)アルゴリズムを用いて相同性を検索する、という以上の6つの工程からなる。また、quality controlのため、臭化エチジウムを用いた蛍光染色法により、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。



4. 研究成果

(1)これまで我々が細菌叢解析法を用いて行った市中肺炎(64名)、医療ケア関連肺炎(82名)の原因菌の検証において、口腔レンサ球菌(Oral streptococci)が高齢者の肺炎で多く検出されたことに着目して、気管支洗浄液の細菌叢解析の結果を誤嚥リスク因子(Marik PE, et al. *New Engl J Med*, 2001)の有無によって分類し解析した。結果として、対象患者177名(上記146名を含む)のうち、誤嚥のリスク因子を有する患者は83名であり、誤嚥のリスクの有/無での年齢は、それぞれ76.6/64.5歳であり、誤嚥のリスク有で有意に高齢であった。また、誤嚥のリスク有/無での口腔レンサ球菌が第一優占菌種であった症例の割合はそれぞれ31.0/14.7%であり、誤嚥のリスクを有する群で有意に多くみられた($P=0.009$) (図1)。さらに、誤嚥のリスク有/無での各症例における口腔レンサ球菌の比率に関しても、誤嚥リスクを有する群($28.3 \pm 32.5\%$)で誤嚥リスク無群($15.2 \pm 27.0\%$)と比較して有意差をもって多かった($P=0.001$) (図2) (Akata K, et al. *BMC Pulm Med*, 2016)。

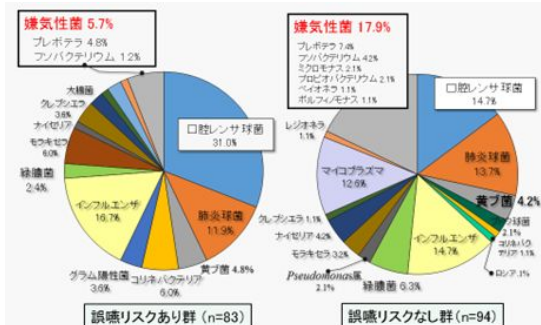


図1. 誤嚥リスクの有無による気管支肺胞洗浄液を用いた細菌叢解析の第一優占菌種の比較(n=177)

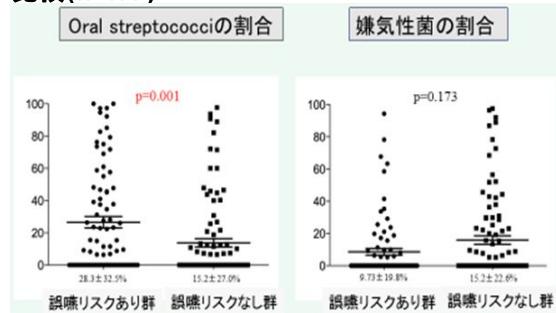


図2. 誤嚥リスクの有無による細菌叢の評価(n=177)

一方で、従来から誤嚥性肺炎で多いと考えられていた嫌気性菌は有意差はなかった(図2) (Akata K, et al. *BMC Pulm Med*, 2016)。

(2)口腔レンサ球菌の検出因子については、75歳以上、長期療養型病床群もしくは介護施設への入所、全身状態不良な患者(ECOG-performance status 3以上)、誤嚥のリスクあり、1年以内の肺炎の既往が単変量解析で有意差を認め、多変量解析の結果では、全身状態不良な患者(ECOG-performance status3以上) ($P=0.003$)、一年以内の肺炎の既往($P=0.041$)、が独立した検出因子であった。これらの結果から、これまで喀痰培養などで口腔内常在菌として病原性が過小評価されてきた口腔レンサ球菌が、誤嚥性肺炎において原因菌として従来考えられていたよりも重要であることを明らかにした(Akata K, et al. *BMC Pulm Med*, 2016)。

(3)これらの結果をふまえて、次の段階として、本学歯科口腔外科の協力のもと、口腔内衛生状態の評価を、歯数、齲蝕歯数、地域歯周疾患指数(Community Periodontal Index of Treatment Needs: CPITN)、口腔衛生指数(Oral Hygiene Index: OHI)、舌苔の評価、口腔乾燥度の各指標を用いて行い、これらの口腔衛生の評価内容と、細菌叢解析法を用いた肺炎の原因菌との関連性の検討、さらには、口腔内(プラーク、舌ぬぐい液、咽頭ぬぐい液)と下気道の細菌叢との比較を行った。現在、34症例が蓄積され検討中であるが、全症例での検討では、各種口腔内の衛生状態の指標と下気道の細菌叢解析による嫌気性菌検出との関連性については明らかではなかったが、細菌叢解析で下気道検体から嫌気性菌が有意に検出(従来の報告同様に5%以上の占有率と定義)された11例に限定して検討したところ、口腔衛生指数OHIが3以上、舌苔スコア2以上で、嫌気性菌の検出が有意に多かった。以上より、口腔内の不衛生がある肺炎患者において、肺炎の原因菌として嫌気性菌の関与が高くなる傾向がある可能性が考えられた。今後、さらに症例数を増やして解析を進める方針である。

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7件)

Yatera K, Noguchi S, Yamasaki K, Kawanami T, Fukuda K, Naito K, Akata K, Kido T, Ishimoto H, Sakamoto N, Taniguchi H, Mukae H. Determining the possible etiology of hospital acquired pneumonia using a clone library analysis in Japan. The Tohoku Journal of Experimental Medicine. 査読有、印刷中

Akata K, Yatera K, Yamasaki K, Kawanami T, Naito K, Noguchi S, Fukuda K, Ishimoto H, Taniguchi H, Mukae H. The Significance of Oral Streptococci in Patients with Pneumonia with Risk Factors for Aspiration: The Bacterial Floral Analysis of 16S Ribosomal RNA Gene using Bronchoalveolar Lavage Fluid. BMC Pulmonary Medicine. 16;1:79,2016. 査読有、DOI:10.1186/s12890-016-0235-z

Kawanami T, Yatera K, Yamasaki K, Noguchi S, Fukuda K, Akata K, Naito K, Kido T, Ishimoto H, Taniguchi H, Mukae H. Clinical Impact of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus on Bacterial Pneumonia; Cultivation and the Molecular Method of 16S ribosomal RNA gene Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid. BMC Infect Dis. 16;16:115,2016. 査読有、DOI:10.1186/s12879-016-1493-3

Mukae H, Noguchi S, Naito K, Kawanami T, Yamasaki K, Fukuda K, Akata K, Fukuda Y, Kido T, Ishimoto H, Sakamoto N, Taniguchi H, Yatera K. The importance of obligate anaerobes and the streptococcus anginosus group in pulmonary abscess a clone library analysis using bronchoalveolar lavage fluid. Respiration. 92;2:80-89,2016. 査読有、DOI:10.1159/000447976

矢寺和博、迎寛、【日常よく見る呼吸器感染症】誤嚥性肺炎の病態と臨床、呼吸器内科、査読無、28巻、2016、39-44、DOI:無

川波敏則、迎寛、特集「肺炎の現状と管理 2. 原因菌の変遷-最新技術を用いた解析-、化学療法の領域、査読無、32巻、2016、32-38、DOI:無

Noguchi S, Mukae H, Kawanami T, Yamasaki K, Fukuda K, Akata K, Ishimoto H, Taniguchi H, Yatera K. Bacteriological assessment of healthcare-associated pneumonia using a clone library analysis. PLoS One. 10:10,2015. 査読有、DOI:10.1371/journal.pone.0124697

[学会発表](計16件)

Kawanami T, Yatera K, Yamasaki K,

Noguchi S, Fukuda K, Akata K, Naito K, Kido T, Ishimoto H, Taniguchi H, Mukae H. Clinical Impact of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus on Bacterial Pneumonia: Comparison of the Results of Cultivation and the Molecular Method of 16S ribosomal RNA gene Analysis using Bronchoalveolar Lavage Fluid. American Thoracic Society International Conference 2016, 2016年5月13日~2016年5月18日、Moscone Center(San Francisco, USA)

内藤圭祐、野口真吾、赤田憲太郎、山崎啓、川波敏則、花香未奈子、生越貴明、西田千夏、城戸貴志、石本裕士、矢寺和博、迎寛、16S ribosomal RNA 遺伝子を用いた肺化膿症の細菌叢解析の検討、第56回日本呼吸器学会、2016年4月8日~2016年4月10日、国立京都国際会館(京都府京都市)

野口真吾、矢寺和博、川波敏則、山崎啓、内藤圭祐、赤田憲太郎、島袋活子、石本裕士、吉井千春、迎寛、Streptococcus anginosus group による呼吸器感染症の臨床的特徴の検討、第56回日本呼吸器学会、2016年4月8日~2016年4月10日、国立京都国際会館(京都府京都市)

川波敏則、赤田憲太郎、山崎啓、野口真吾、内藤圭祐、城戸貴志、石本裕士、矢寺和博、迎寛、細菌叢解析法を用いた細菌性肺炎における嫌気性菌の臨床的背景の検討、第90回日本感染症学会総会・学術講演会、2016年4月15日~2016年4月16日、仙台国際センター・新展示施設(宮城県仙台市)

川波敏則、野口真吾、赤田憲太郎、内藤圭祐、高木努、小田桂士、山崎啓、城戸貴志、迎寛、矢寺和博、細菌叢解析法を用いた細菌性肺炎における潜在性耐性菌の臨床的背景および危険因子の解析、第86回日本感染症学会西日本地方会学術集会・第64回日本化学療法学会西日本支部総会、2016年11月24日~2016年11月26日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県那覇市)

野口真吾、矢寺和博、川波敏則、山崎啓、迎寛、網羅的細菌叢解析からみた呼吸器感染症の原因菌(シンポジウム)、第56回日本呼吸器学会、2016年4月8日~2016年4月10日、国立京都国際会館(京都府京都市)

赤田憲太郎、矢寺和博、川波敏則、内藤圭祐、野口真吾、山崎啓、迎寛、成人肺炎における嫌気性菌関与を予測する因子の検討~網羅的細菌叢解析を用いて~、第46回日本嫌気性菌感染症学会総会、2016年3月4日~2016年3月5日、長崎大学医学部良順会館(長崎県長崎市)

迎寛、呼吸器感染症領域における嫌気性菌の重要性、第46回日本嫌気性菌感染症学会総会(招待講演)、2016年3月4日~2016年3月5日、長崎大学医学部良順会館(長崎県長崎市)

Akata K, Yatera K, Yamasaki K, Kawanami T, Naito K, Noguchi S, Fukuda K, Ishimoto

H, Taniguchi H, Mukae H. Bacteriological assessment of bronchoalveolar lavage fluid using clone library analysis of 16S rRNA gene revealed a significance of oral streptococci in patients with aspiration pneumonia. American Thoracic Society International Conference 2015, 2015年5月15日~20日, Denver (USA)

Naito K, Noguchi S, Yatera K, Akata K, Nishida C, Yamasaki K, Orihashi T, Kawanami T, Ishimoto H, Fukuda K, Taniguchi H, Mukae H. The bacteriological incidence of lung abscess using clone library analysis of 16S rRNA gene in bronchoalveolar lavage fluid, European Respiratory Society 2015, 2015年9月26日~2015年9月30日, Amsterdam (the Netherlands)

矢寺和博、野口真吾、川波敏則、山崎啓、内藤圭祐、赤田憲太郎、石本裕土、福田和正、谷口初美、迎寛、細菌叢解析を用いた院内肺炎(Hospital-Acquired Pneumonia; HAP)の原因菌の検討、第112回日本内科学会講演会、2015年4月10日~2015年4月12日、みやこめっせ(京都府京都市)

赤田憲太郎、川波敏則、矢寺和博、内藤圭祐、野口真吾、山崎啓、西田千夏、渡橋剛、川波由紀子、石本裕土、迎寛、細菌叢解析からみた肺炎における口腔内レンサ球菌の重要性、第89回日本感染症学会総会、学術講演、2015年4月16日~2015年4月17日、国立京都国際会館(京都府京都市)

野口真吾、矢寺和博、川波敏則、山崎啓、福田和正、赤田憲太郎、西田千夏、石本裕土、谷口初美、迎寛、Bacteriological assessment of healthcare associated pneumonia using a clone library analysis、第75回呼吸器学会九州支部秋季学術講演会、2015年10月2日~2015年10月3日、ホテルグランデはがくれ(佐賀県佐賀市)

迎寛、肺炎診療：細菌叢解析で分かった新たな知見～呼吸器感染症における嫌気性菌の役割、第85回日本感染症学会西日本地方会学術集会(招待講演)、2015年10月15日~2015年10月17日、奈良春日野国際フォーラム(奈良県奈良市)

川波敏則、野口真吾、山崎啓、赤田憲太郎、内藤圭祐、石本裕土、矢寺和博、迎寛、細菌叢解析法を用いた細菌性肺炎におけるMRSAの臨床的意義の解析、第85回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2015年10月15日~2015年10月17日、奈良春日野国際フォーラム(奈良県奈良市)

山崎啓、矢寺和博、赤田憲太郎、内藤圭祐、野口真吾、川波敏則、西田千夏、川波由紀子、石本裕土、迎寛、肺気腫における画像所見と細菌学的所見の臨床的検討、第85回日本感染症学会西日本地方会学術集会、2015年10月15日~2015年10月17日、奈良春日野国際フォーラム(奈良県奈良市)

〔図書〕(計4件)

川波敏則、迎寛、南江堂、呼吸器疾患 最新の治療 2016-2018、2016、総ページ数494(38-43)

野口真吾、迎寛、ヴァンメディカル、抗菌薬パーフェクトガイド、2016、総ページ数359(195-202)

野口真吾、迎寛、先端医学社、分子呼吸器病、2015、総ページ数148(48-50)

赤田憲太郎、迎寛、大道学館、臨床と研究、2015、総ページ数-(1514-18)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

迎寛 (MUKAE, Hiroshi)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：80253821

(2) 研究協力者

赤田 憲太郎 (AKATA, Kentaro)

川波 敏則 (KAWANAMI, Toshinori)

野口 真吾 (NOGUCHI, Shingo)

内藤 圭祐 (NAITO, Keisuke)

畑 亮輔 (HATA, Ryosuke)

西田 千夏 (NISHIDA, Chinatsu)

山崎 啓 (YAMASAKI, Kei)

城戸 貴志 (KIDO, Takashi)

矢寺 和博 (YATERA, Kazuhiro)