

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461645

研究課題名(和文) 小児周産期領域におけるESBL産生菌の疫学およびプロバイオティクスによる伝播予防

研究課題名(英文) Epidemiology of Extended Spectrum beta Lactamase-producing bacteria in perinatal and neonatal setting and probiotics to prevent vertical transmission

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：入院を必要とした新生児の退院後1か月時の腸内細菌叢を解析した。プロバイオティクス投与群は、コントロール群に比べ、腸内細菌科細菌の割合が有意に低くなる。当院NICUに入院した814名の新生児のESBL産生菌の分離率を調査した結果、その分離率は1%未満であった。また、産科施設の20名の母体と新生児のESBL産生菌の分離頻度を調査した。母体の便検体、生後4～5日目、生後一か月の新生児の直腸スワブ検体からは、いずれもESBL産生菌は検出されなかった。近年、成人におけるESBL産生菌の分離率は10～20%と高率である。これに対し、周産期領域でのESBL産生菌の分離頻度は低い可能性があることが判明した。

研究成果の概要(英文)：For neonates discharged from hospital, the intestinal microbiota at one month after discharge were analyzed. In the probiotic group, the proportion of Enterobacteriaceae was significantly lower than that in the control group. The isolation rate of ESBL producing bacteria from 814 neonates admitted to our NICU was less than 1%. In addition, the isolation rate of ESBL-producing bacteria of 20 pairs of mother and newborn at an obstetrics facility was investigated prospectively. ESBL-producing bacteria was not detected from stools of mother at birth, neonatal rectal swab at 4 or 5 days after birth and for one month of age. Recently, ESBL from samples derived from adult outpatients has been isolated with a high frequency as high as 10 to 20%. In contrast, it was found that the isolation rate of ESBL-producing bacteria from perinatal and neonatal population was low.

研究分野：新生児

キーワード：基質特異性拡張型 ラクタマーゼ産生菌 新生児 周産期 疫学

## 1. 研究開始当初の背景

抗菌薬に対する細菌の多剤耐性化、更には市中における多剤耐性菌の分離頻度の増加は世界規模で問題化している。近年では、カルバペネム系抗菌薬をも分解するニューデリー・メタロ・ラクタマーゼ-1 (NDM-1) 産生菌がインドから帰国したスウェーデン人から初めて分離され、イギリス国内への拡散が社会問題となった (Yong D, et al. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5046-54, 2009)。更にはインド・パキスタン・ Bangladeshにおいて NDM-1 産生菌が市中で蔓延している可能性も指摘され、世界的な問題として注目されている (Kumarasamy KK, et al. *Lancet Infect Dis* 10: 597-602, 2010)。同様に、病院感染起因菌の代表であったメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) も、入院歴のない健康小児の市中獲得型 MRSA による壊死性肺炎の報告を皮切りに、市中でも MRSA が蔓延していることが判明した (Hisata K, et al. *J Clin Microbiol.* 43: 3364-72, 2005)。そして、病院内への MRSA 持ち込みにより、病原性の強い市中型に病院内の MRSA が置き換わるなど (Mine Y, et al. *J Dermatol.* 38: 1167-71, 2011) 市中の状況が医療環境へも影響を及ぼし、更には初期治療の抗菌薬選択にまで影響を及ぼした。

このように、細菌の多剤耐性化は、病院環境に留まらず市中にも広がりつつあるのが現状である。そして、多剤耐性菌のひとつであり、今回の研究対象である ESBL 産生菌も、近年、一般健常人における保菌者の増加が指摘されており、その対策が急務とされている。

基質特異性拡張型 ラクタマーゼ (ESBL) は、第三・第四世代セフェム系薬やモノバクタム系薬をも分解する能力を獲得した酵素であり、この酵素を持つグラム陰性桿菌は、ペニシリン・セファロスポリン・モノバクタム系にも耐性を示すようになる。すなわち、ESBL 産生菌による感染症では、通常使用される抗菌薬が無効となり、カルバペネム系など重症感染症に使用される一部の抗菌薬しか抗菌活性ないため、初期治療に失敗する。実際、セファロスポリン系抗菌薬を用いた感染症治療の失敗の原因として ESBL 産生は重要な位置を占めており、病院感染のみならず市中発症の感染症においても、深刻な問題になりつつある (Lagacé-Wiens PR, et al. *Lancet Infect Dis* 8: 159-166, 2008)。そして、この ESBL 産生菌の日本国内における分離頻度は、2000 年頃が 0.3~0.5% (感染症学雑誌 74: 250-258, 2000) 2006 年頃までが 3% 程度であった。しかし、その後は 10% を超える分離率 (Yoshida I, et al. *Jpn J Antibiotics* 6: 457-479, 2010) となっている。そして、その影響は、成人領域のみならず小児・周産期の領域においても出始めている。実際に乳児の ESBL 産生菌による尿路感染症での治療失敗例や新生児集中治療室内における ESBL のアウトブレイクを経験する

ようになり、ESBL 産生菌を念頭においた治療選択の必要性や、病院内への持ち込みおよびアウトブレイクを防ぐための入院時スクリーニングの必要性などが問われるようになった。しかしながら、ESBL 産生菌の分離頻度の報告の多くは、入院患者と一般健常人の分離頻度を明確には区分しておらず、市中での分離頻度は明確ではない。また、妊娠母体や新生児を対象とした ESBL の分離頻度の報告はなく、小児・周産期領域における分離頻度、更には、母体から新生児への垂直伝播率は不明である。

## 2. 研究の目的

小児・周産期領域において ESBL 産生菌の分離頻度が高い場合、同領域における経験的抗菌薬としての第一選択薬を選択する場合の貴重な情報となり、また、病院内での水際対策を考慮した感染対策に対して意義を有する。逆に分離頻度が低い場合、海外のように蔓延する以前のデータとして貴重なデータになると考える。しかしながら、小児・周産期領域における市中の ESBL 産生菌の分離頻度は不明であることから、母体および新生児における現時点での ESBL 分離頻度を明らかにすることは意義の高いデータになると考える。そこで、新生児領域、特に新生児集中治療室 (NICU) における ESBL 産生菌の分離頻度を明らかにすることを目的に本検討を行う。

また、母体から新生児への ESBL 産生菌の垂直伝播率を検討した報告はない。今までの我々の検討では、乳児の尿路感染症から ESBL 産生菌が検出された 3 例は、いずれも母体と新生児由来の ESBL 産生菌のクローンが一致していたことから、新生児早期に分離される ESBL 産生菌の多くは垂直伝播により母体から新生児に伝播していくことが確認されている。すなわち、母体の耐性菌スクリーニングが新生児・乳児期の感染症において抗菌薬選択の重要な情報になると考えられ、垂直伝播がどのくらい起きているかを検討することは意義の高いデータと考える。そこで、母体から新生児への ESBL 産生菌の伝播を明らかにすることを目的に、一般産科施設を対象にし、母体と新生児のペアから ESBL 産生菌を分離し検討する。

そして、経膈分娩にて出生した新生児の腸内細菌叢は母体の膈の細菌叢に由来すると言われている (Dominguez-Bello MG, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 11971-5, 2010)。すなわち、母体に ESBL 産生菌が存在すれば、新生児の腸内細菌叢に常在化する可能性がある。したがって、ESBL 産生菌が腸内細菌として形成する以前に、プロバイオティクスを早期に投与し *Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属など、正常な腸内細菌叢を早期に誘導し、ESBL 産生菌が分類される *Bifidobacteriaceae* を抑制できれば、ESBL 産生菌の垂直伝播抑制に寄与するものと考

える。そこで、新生児に対するプロバイオティクスの腸内細菌叢に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、NICUに入院した新生児の退院後1か月の腸内細菌叢を群分けしたのち解析する。また、疫学調査の結果、ESBL産生菌の分離頻度が高いことが確認された場合には、母体から新生児へのESBL産生菌の伝播を抑制する方法として、前方視的にプロバイオティクスを投与しその抑制効果を明らかにすることも目的とした検討を考慮した。

### 3. 研究の方法

新生児集中治療室(NICU)におけるESBL産生菌の分離頻度

2014年4月～2018年3月の4年間にかけて順天堂大学医学部附属順天堂医院NICUに入院した新生児を対象に、入院時に臍からの擦過スワブと直腸スワブを検体として採取した。一般培養に提出するとともに、直腸スワブについては選択培地(クロモアガーESBL)に塗布し、目的菌を分離培養した。また、入院中に提出される便検体についても選択培地を用いESBL産生菌の分離培養を実施した。入院期間中に水平伝播が疑われる症例の菌株については、-80℃で保管し、薬剤感受性を検討するとともに、後述のESBL分子疫学解析を行い水平伝播の有無を検証する。

一般産科施設における母体および新生児の出生時(生後4～5日目)および生後1か月時点のESBL産生菌の分離頻度

2017年4月～2018年3月に産科施設に入院した母体および出生児を対象に、産科外来での母体健診時に書面を用いて同意を得る。経膈分娩にて出生した母体および出生児を最終的な対象として、出生時に得られた母体の糞便、出生した出生児は生後4～5日目および生後1か月後に直腸スワブを検体として採取した。検体は、同様に選択培地(クロモアガーESBL)に塗布し培養した。

プロバイオティクスによる腸内細菌叢におけるESBL産生菌の抑制効果:

当院及び当院関連施設NICUに入院した新生児に対して、生後より退院時まで*Bifidobacterium breve*: $1 \times 10^9$ cfu/包(賦形剤デキストリン)を投与した群と在胎週数と出生体重を調整したコントロール群に分け、退院後1か月時点での糞便を採取。パイロシーケンス法により腸内細菌叢解析を実施した。

[共通]

・検体:

母体糞便スワブ、新生児(直腸スワブ) 新生児(臍擦過スワブ) 新生児糞便

・検体処理:

スワブ検体は、滅菌スワブにて採取し、輸送用培地に挿入後、冷蔵保存し24時間以内を送付。

腸内細菌叢解析用新生児糞便は滅菌容器

に入れ-20℃にて保管し輸送。

・ESBLスクリーニング検査

ESBL検出用培地クロモアガーESBL(関東化学)に塗布し、37℃で24～48時間インキュベート(J Med Microbiol 57:310-315,2008)。

・ESBL産生確認検査

Double Disk synergy test(DDST):CLSI M100-S16の方法に従い、McFarland 0.5に調整した菌液をミューラーヒントン寒天培地に塗布し、薬剤diskを置き、35℃で18時間培養後、CAZ, CTX, CPFM, CPR diskのいずれかとCVAで阻止円の増大が認められたものをESBL産生菌と確定する。

・菌種同定

ESBL産生が確認された菌株については、MALD-TOF MSにて同定。

[母体と新生児のペア検体]

・ESBL耐性遺伝子typing

TEM+SHV multiplex PCR (FEMS Microb Lett 81: 19-26, 1991)、CTX-M 1型,2型,9型 multiplex PCR (Antimicrob Agents Chemother 41: 2606-2611, 1997)、TEM, SHV 陽性の場合にはシーケンスにて確認検査を追加。

・分子疫学解析:A)パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE):制限酵素(XbaI, SpeI) (J Clin Microbiol 43: 1776-1781, 2005)、B)Multi locus sequencing typing(MLST) (Trends Microbiol 7: 482-487, 1999) (<http://www.mlst.net/>)にてclone解析を予定

### 4. 研究成果

NICUにおけるESBL産生菌の分離頻度

対象期間中の入院患者数は、全814名(転院例242名)であった。年度別の入院患者数は2014年度:206名(転院例64名)、2015年度:202名(59名)、2016年度:194名(58)、2017年度:212名(61名)であった。ESBL産生菌の分離患者数は、2014年度:1例(0.5%)、2015年度:1例(0.5%)、2016年度:2例(1%)、2017年度:1例(0.5%)であり、4年間全体でのESBL産生菌の分離頻度は0.6%と低率であった。また、年次推移でも増加傾向は認められなかった。

[表1] NICUにおけるESBL産生菌分離頻度

年度	2014	2015	2016	2017	計
対象数	206	202	194	212	814
分離数	1	1	2	1	5
(%)	0.5%	0.5%	1%	0.5%	0.6%

一般産科施設における母体および新生児の出生時および生後1か月のESBL産生菌の分離頻度

2017年4月から2018年3月にかけて、一般産科施設において前方視的に疫学調査を実施した。妊娠後期の母体健診時に試験概要を説明し同意を得られた20名の母体に対し

て、出産時の母体の糞便採取、新生児の出生時（生後 4～5 日目）および生後 1 か月時の直腸スワブ検体を採取した。出生した 20 名の新生児の男女比は 7:13、平均の出生体重は 3188g、生後 1 か月時平均体重 4198g、完全母乳もしくは 80%以上の母乳率は 65%であった。出生時に母体から採便できたのは 6 名であったが、ESBL 産生菌はいずれも陰性であった。同様に、20 名の新生児の生後 4～5 日目および生後 1 か月時点の直腸スワブ検体も ESBL 産生菌はいずれも陰性であった。

同期間において、成人の外來患者由来の ESBL 産生菌の分離頻度を調査した結果、ESBL の分離頻度は 10～20%で推移しており、多くは過去の報告と同様に *E.coli*、次いで *K.pneumoniae* であった。これに対して、今回の疫学調査では、周産期および新生児における ESBL 産生菌の分離頻度は 1%未満と低率であり成人の分離頻度と乖離する結果であった。

プロバイオティクスによる腸内細菌叢における ESBL 産生菌の抑制効果

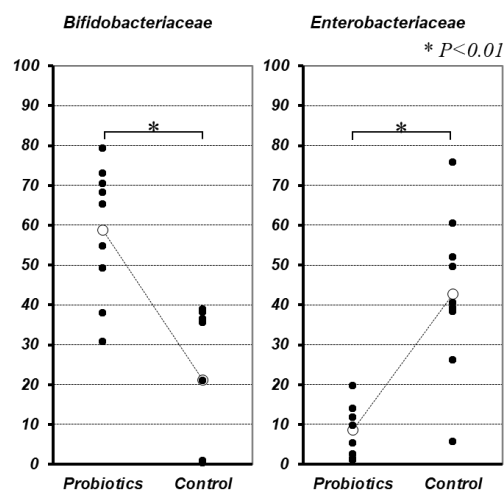
計 19 名の新生児において NICU 退院後 1 か月時点での採便を行った。生後から退院時までプロバイオティクスの投与があったプロバイオティクス群 (n=9) の平均在胎週数は 31 週、平均出生体重は 1404g であった。一方、プロバイオティクス投与歴のないコントロール群 (n=10) の平均在胎週数は 30 週、平均出生体重は 1096g であった。

Family level での腸内細菌叢解析では、read 割合は、Bifidobacteriaceae がプロバイオティクス投与群で  $58.8 \pm 21.1$ 、コントロール群で  $21.1 \pm 18.4$ 、Enterobacteriaceae がプロバイオティクス投与群で  $8.6 \pm 6.4$ 、コントロール群で  $42.4 \pm 19.0$  と有意差をもって、過去にプロバイオティクス投与歴のある新生児において Enterobacteriaceae が抑制されていることが確認できた [ 図 1 ]

今回検討した 19 名からは ESBL 産生菌は分離されていなかったため、ESBL 産生菌の直接的な抑制効果は証明できなかった。しかしながら、ESBL 産生菌の多くを占める *E.coli*、*K.pneumoniae* いずれも Enterobacteriaceae に分類される菌種である。そして、ESBL 産生の有無は耐性遺伝子を有するプラスミドの獲得が原因であり、細菌自体の染色体に大きな違いはない。すなわち、ESBL 産生菌であっても分類は Enterobacteriaceae であり、プロバイオティクスにより抑制可能と考えられた。

新生児領域において ESBL 産生菌の分離頻度が成人同様に 10～20%あった場合には、ESBL 産生菌が分離された母体から出生した新生児にプロバイオティクスを投与し、垂直伝播へのプロバイオティクスの効果を検討する予定であったが、分離頻度が 1%未満と低かったため検証できなかった。

[ 図 1 ] プロバイオティクスの有無による新生児の腸内細菌叢への影響



以上の結果より、新生児および周産期領域における ESBL 産生菌の分離頻度は、成人領域とは異なり低率である可能性が示唆される。しかしながら、本検討は単施設の検討であるため、地域的、社会的背景を考慮する必要があり、今後は多施設における検討が必要と考えられた。また、プロバイオティクスにより ESBL 産生菌が分類される Enterobacteriaceae を抑制することは確認できたが、ESBL 産生菌に対する直接的な抑制効果は、同様に多施設にて症例数を増やす必要性がある。

## 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 5 件)

低出生体重児の腸内細菌叢と疾病のリスク、*Neonatal Care* 30:65, 2017

NICU における抗菌薬適正使用を考える、*日本新生児育成医学会雑誌* 29:298-302, 2017

プロバイオティクス・プレバイオティクス【周産期医学必修知識第 8 版】新生児編、*周産期医学* 46: 1065-1067, 2016

【よくわかる小児感染症の基礎知識】特殊病態下での感染症診療 新生児、小児科診療 78: 675-683, 2015

【周産期感染症 2014】新生児からみた周産期感染症 基礎編 腸内細菌叢と感染防御、*周産期医学* 44: 268-272, 2014

### [ 学会発表 ] (計 5 件)

小児科領域における抗微生物薬の適正使用、新生児集中治療室 (NICU) での取り組み、第 66 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、2017 年 11 月、東京  
早産児の栄養管理のトピックス

Microbiota と予後、第 53 回日本周産期  
新生児医学会学術集会、2017 年 7 月、横  
浜

壊死性腸炎の発症予防 プロバイオティ  
クスおよび n-3 系多価不飽和脂肪酸による  
壊死性腸炎の予防、第 52 回日本周産期  
新生児医学会学術集会、2016 年 7 月、富  
山

プロバイオティクスと腸内細菌叢、第 30  
回日本母乳哺育学会、2015 年 10 月、東  
京

生後早期のビフィズス菌投与による腸内  
細菌叢の変化、第 15 回新生児栄養フォー  
ラム、2015 年、東京

三澤 成毅 (MISAWA, Shigeki)

順天堂大学・医学部・研究員

研究者番号：30465033

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

堀 賢 (HORI, Satoshi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80348937

近藤 成美 (KONDO, Shigemi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40205555