

学位論文

「Changes in Neonatal Microbiota Distribution Influenced by
the Environment of the Neonatal Intensive Care Unit in the First
Month of Life」

(新生児集中治療室 (NICU) 環境の影響による生後 1 か月の
新生児腸内細菌叢の変化)

DM12009 大岡 麻理

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 小児科学
指導教授 石井 正浩

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要 目

ヒトの腸内細菌は生涯にわたり健康維持に重要な役割を果たしており、細菌叢形成は出生後早期に開始され、成長とともに定着していく。しかしながら新生児期における腸内細菌叢の獲得過程はいまだ詳しく知られておらず、特に長期間新生児集中治療室(NICU)で管理された児についての報告は少ない。新生児期に全身管理された児の腸内細菌叢形成過程を検討するために、代表的な菌の経時的動態について分子学的手法 16SrRNA 遺伝子定量的 PCR により解析した。

NICU に入院した新生児は、生後早期の腸内細菌の菌数が少なかったが、日齢 30 には増加していた。なかでも *Bifidobacterium* は生後早期には最も菌数が少なかったにもかかわらず、日齢 30 には正常新生児とほぼ同等のレベルまで増加し最優勢菌となっていた。腸内環境下では病原性をもちうる *S. aureus* について検討したが、その定着により日齢 30 における *Bifidobacterium* の増加が妨げられることはなかった。分娩様式、抗菌薬治療、挿管人工呼吸管理などの臨床的因子は新生児期の腸内細菌叢形成に影響していた。全身状態が不良であったり、新生児期に外科的手術を必要としたりすることで経腸栄養が不十分となった児は、日齢 30 での *Bifidobacterium* が著しく少なく、他の菌が最優勢菌となっていた。不十分な経腸栄養は腸内細菌叢バランスを大きく崩す可能性が示唆された。

目次

1. 序論.....	2
2. 対象と方法	
2-1. 対象.....	2
2-2. DNA 抽出.....	2
2-3. 定量的 PCR.....	3
2-4. <i>Staphylococcus aureus</i> の解析.....	3
2-5. 統計学的解析.....	3
3. 結果	
3-1. 新生児期の腸内細菌叢形成.....	3
3-2. <i>Staphylococcus aureus</i> の検討.....	3
3-3. 臨床要因の影響	
3-3-1. 分娩様式の影響.....	4
3-3-2. 抗菌薬治療の影響.....	4
3-3-3. 挿管人工呼吸管理の影響.....	4
3-3-4. 栄養の影響.....	5
4. 考察.....	5
5. 総括.....	7
6. 謝辞.....	7
7. 引用文献.....	7
8. 業績目録.....	10
9. 図表.....	13

本文

1. 序論

ヒト腸内細菌叢は生活や健康に重要な役割を果たしており、新生児早期における腸内細菌叢の形成は特に重要である。胎児期の便は通常無菌であるが、分娩中より腸内細菌叢の形成が始まり、まず *E. coli* や *Streptococci* が出現し、次いで生後 4~7 日で *Bacteroides* や *Bifidobacterium*、*Clostridium* などの偏性嫌気性菌が現れる¹⁾。正常な母乳栄養児では生後 1 か月になると *Bifidobacterium* が最優勢菌として最も増加し、*E. coli*、*Streptococci*、*Bacteroides*、*Clostridium* は減少する²⁾。以降も腸内細菌叢は変化し、2~5 歳までには成人と同じ構成となる。成人の腸内細菌は $10^{14}/g$ 以上の細菌から形成され、その菌種は 400(報告によっては 500~1000)種類以上となる。腸内細菌叢は、ヒトを構成する細胞の 10 倍以上の細菌数、100~150 倍以上の遺伝子(genera)から構成されている。生後早期に腸内細菌叢形成に影響を受けることにより、その後の健康や疾患発症と関連する可能性が示唆されている^{3,4)}。

新生児腸内細菌叢の研究は、多くが古典的な細菌培養法を用いて行われてきた。この方法を用い、正常産児と早産児では腸内細菌叢に違いがあるという報告がある⁵⁾。しかし、定量的な結果が得られず、培養可能な菌種に限界があった。近年、16S ribosomal RNA (16SrRNA) を用いた分子生物学的手法が利用されている^{6,7)}。この方法を用いた新生児腸内細菌の報告はあるものの^{8,9)}、新生児期における腸内細菌叢形成の過程は不明な点が多く、特に長期間新生児集中治療室(NICU)で管理されていた児については報告が少ない。NICU に入院する児は、時として抗菌薬治療、挿管人工呼吸管理、外科的介入などの治療をうける¹⁰⁾。このような集中治療や、母親と引き離されることが新生児期の腸内細菌叢形成に影響を与えるであろうと予測した。さらに、我々は NICU でしばしば検出される MRSA を含む *S. aureus* の定着について着目した。

定量的 PCR(qPCR)を用いて、正常新生児と NICU に入室した児の生後 1 か月間の代表的腸内細菌の変化を検討した。

2. 対象と方法

2-1. 対象

2013 年 6 月から 2014 年 3 月に北里大学病院の NICU および産科病棟、北里大学メディカルセンターの産科病棟に入院し両親より同意が得られた 90 例から、便検体を採取した。北里大学病院の NICU に入院した 48 例は日齢 2.6 ± 0.1 、 31.6 ± 0.4 の 2 回検体を採取した。正常新生児の 42 例(北里大学病院 25 例、北里大学メディカルセンター 17 例)に関しては通常、生後 4~7 日で退院し、1 か月健診に来院するため、生後早期(日齢 2.0 ± 0.2)と 1 か月(日齢 30.2 ± 0.6)の 2 回、検体を採取した。検体は無菌のプラスチックチューブに採取し DNA を抽出するまで -80°C で保存した。

2-2. DNA 抽出

便検体 40mg に buffer ALS(Qiagen, Germany)を $700 \mu\text{l}$ 加え、Tissue Lyser II(Qiagen, Germany)で 5 分間、破碎懸濁した。懸濁サンプルから QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen, Germany)を用いて DNA を抽出し、 -20°C で保存した。

2-3. 定量的 PCR

Table2¹¹⁻¹⁴⁾に示したプライマーを用いて qPCR を行った。Sso AdvancedTM Universal SYBR Green Supermix を用いて、Chromo 4 system(BIO RAD, Japan)、multiplate96well plates で反応させた。

2-4. *Staphylococcus aureus* の解析

MRSA の判別は *mecA* および *nuc* のプライマー (table 参照) を用いた。

2-5. 統計学的解析

結果は中央値と平均値で表した。GraphPad Prism version 6.0 for Windows を利用して、2 群間では Mann-Whitney U 検定を、多群間では Kruskal-Wallis one-way ANOVA と Dunn's post hoc 検定を用いた。有意差については * $p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、*** $p<0.001$ とした。

3. 結果

3-1. 新生児期の腸内細菌叢形成

NICU 群 48 例と non-NICU 群 42 例の全 90 例で、日齢 0-3(2.3 ± 0.1)と 1 か月(31.0 ± 0.4)の 3 菌(*Bifidobacterium*、*Enterococcus*、*Enterobacteriaceae*)について qPCR を用いて定量的解析を行った。今回検討した 3 菌は腸内細菌叢の中で優位菌と知られている代表的な菌である¹⁻³⁾。これら 3 菌すべてにおいて、生後早期から 1 か月までに菌数が増加していた(Fig.1)。なかでも、*Bifidobacterium* は日齢 0-3 では *Enterococcus* や *Enterobacteriaceae* より少なかったが、その後著しく増加し日齢 30 では最優位菌となっていた。Kruskal-Wallis 検定による解析でも *Bifidobacterium* は他の 2 菌と比較して日齢 30 における菌数が有意に多かった($p<0.0001$, $U=182.9$)。NICU 群は日齢 0-3 の *Bifidobacterium*($p<0.001$)と *Enterobacteriaceae*($p<0.001$)が non-NICU 群と比較して有意に減少していた(Table3)。日齢 30 になると *Enterobacteriaceae* は NICU 群が少ないままであったが、*Bifidobacterium* は non-NICU 群とほぼ同等のレベルとなっていた($p=0.7644$)。

NICU 群では、在胎週数 33 週以前の症例は胃管チューブからプロバイオティクス(*B. breves*)が生後 0-7 日間投与されている。このため、プロバイオティクスの影響について検討した。プロバイオティクス投与群は 23 例で在胎週数 28.7 ± 0.6 、出生体重 $1051.2\pm 110.4\text{g}$ 、非投与群は 67 例で在胎週数 38.5 ± 0.2 、出生体重 $2794.0\pm 67.0\text{g}$ であった。

Bifidobacterium の菌数はプロバイオティクスの投与群と非投与群において、日齢 0-3 では優位に非投与群の方が少なかったが($p<0.05$)、日齢 30 では有意な差は認められなかった($p=0.9766$)。この結果から、在胎週数 34 週未満の早産児において *Bifidobacterium* は生後早期に少なくとも、生後 1 か月には正期産児と同等のレベルまで増加していることが示唆された。

3-2. *Staphylococcus aureus* の検討

S. aureus は最も一般的な常在菌のひとつであり、日和見感染をおこす早産児や全身状態が不良

な新生児に対して重症感染症を引き起こすことが知られている^{15, 16)}。 *S. aureus* についても特異的プライマーを用いて同様の qPCR 法によって解析を行った。全 90 例において、生後 1 か月までの間に一度でも *S. aureus* が検出されたのは 48.9%(44/90 例)であり、non-NICU 群では 50%(21/42 例)、NICU 群では 47.9%(23/48 例)であった。全 90 例について *S. aureus* がその他 3 菌(*Bifidobacterium*、*Enterococcus*、*Enterobacteriaceae*)に与える影響を検討した。日齢 0-3 では 3 菌に有意差は認めなかったが、日齢 30 では *S. aureus* 陽性群は陰性群より *Enterococcus* が有意に少なかった(Table4)。さらに、*S. aureus* 陽性群の中で *mecA* プライマーを用いて電気泳動を行った。*S. aureus* 陽性であった 44 例のうち 6 症例が *mecA* 陰性であり、38 例は MRSA であった。NICU 群で *S. aureus* 陽性であった 23 例はすべて MRSA であった。メチシリン耐性の有無による違いを検討するために、non-NICU 群の *S. aureus* 陽性群 21 例の中で *mecA* 陽性群 15 例と陰性群 6 例について比較したところ、3 菌に有意な差は認められなかった。NICU 群に注目してみると、*S. aureus* が陽性であっても陰性であっても日齢 30 において *Bifidobacterium* が優勢菌であった。新生児期の *Bifidobacterium* の増加は *S. aureus* の有無による違いがなかった。

3-3. 臨床的因子の影響

全症例を NICU での臨床診療において重要と考えられるいくつかのサブグループに分類して 3 菌(*Bifidobacterium*、*Enterococcus*、*Enterobacteriaceae*)について検討した。

3-3-1. 分娩様式の影響

37 例の経膣分娩(VB)の児と 53 例の帝王切開(CS)の児において、日齢 0-3 と 30 で比較したところ、日齢 0-3 の *Enterobacteriaceae*($p<0.0001$)が CS 群で有意に少なかった(Table5)。NICU 群では CS が 68.8%(33/48 例)と高率であったため、non-NICU 群において分娩様式の影響を検討した。non-NICU 群では CS 群(20 例)の方が VB 群(24 例)と比較して、日齢 0-3 の *Bifidobacterium* が有意に少なかったが($p=0.0025$)、日齢 30 では有意な差は認めなかった。

3-3-2. 抗菌薬治療の影響

早産児は周産期における重症感染症のリスクが高いため、しばしば生後数日間、広域抗菌薬が使用される。抗菌薬治療群 30 例(在胎週数 31.3 ± 0.9 、出生体重 1520.2 ± 190.3 g)の方が非治療群 60 例(在胎週数 38.3 ± 0.2 、出生体重 2762.9 ± 66.5 g)と比較して日齢 30 の *Enterobacteriaceae* が有意に少なかった(Table6A)。抗菌薬治療は早産児では行われる可能性が高いため在胎週数の影響を受けることが考えられる。このため、NICU 群の中で在胎週数 32 週以上の 28 例において検討したところ、抗菌薬治療群 10 例では非治療群 18 例と比較して日齢 30 の *Bifidobacterium* が有意に少なかった(Table6B)。

3-3-3. 挿管人工呼吸管理の影響

NICUにおいて、呼吸器疾患は最も重要で重症化に関与する問題のひとつといえる。NICUでは、しばしば呼吸障害により気管挿管され人工呼吸管理を必要とすることがある。挿管群 30 例(在胎

週数 31.6 ± 1.0 、出生体重 $1570.9 \pm 190.9\text{g}$)は、非挿管群 60 例(在胎週数 38.2 ± 0.3 、出生体重 $2737.5 \pm 73.5\text{g}$)と比較し、日齢 0-3 と 30 の *Enterobacteriaceae* と日齢 0-3 の *Bifidobacterium* が減少していたが、日齢 30 の *Bifidobacterium* に有意差はなかった(Table7A)。抗菌薬治療と同様に早産児であると挿管人工呼吸管理を行う頻度が高いため、在胎週数の影響を避けるため NICU 群のなかで在胎週数が 36 週以降の 21 例について検討した。挿管群 10 例は非挿管群 11 例と比較して日齢 30 の *Bifidobacterium* が少ない傾向にあったが、有意差はなかった($p=0.1301$)。興味深いことに、*S. aureus* の陽性率をみると挿管群では 60.0%(6/10 例)であったのに対し、非挿管群では 18.2%(2/11 例)であった。

3-3-4. 栄養の影響

腸内細菌叢の構成は食事に強い影響をうけることが報告されている¹⁷⁾。全 90 例を母乳栄養のみの群(25 例、在胎週数 33.1 ± 1.3 、出生体重 $1950.6 \pm 243.4\text{g}$)と、混合栄養(母乳と人工乳)の群(65 例、在胎週数 37.1 ± 0.4 、出生体重 $2510.7 \pm 94.3\text{g}$)に分類して比較した。どちらも日齢 30 において *Bifidobacterium* が最優勢菌となっており、2 群間で有意な差は認められなかった(Table8A)。

全 90 例のなかで 9 例が日齢 30 までの間に禁食となる、もしくは栄養が不十分($<100\text{ml/kg/day}$)であった。これらはすべて新生児期に外科的手術がなされた症例であり、6 例が先天性心疾患(4 例が動脈管開存症、1 例が完全大血管転移症、1 例が房室中隔欠損症)、1 例が巨大リンパ管腫、1 例が脊髄髄膜瘤、1 例が鎖肛であった。この 9 例は日齢 0-3 での 3 菌には差がなかったが、日齢 30 では *Bifidobacterium* がその他 2 菌と比較して有意に少なかった($p<0.05$)(Table8B)。特に、消化管手術を受けた症例においては日齢 30 の *Bifidobacterium* が $10^{10}/\text{g}$ と全体の平均と比較して極端に少なくなっており、*S. aureus* と *Enterobacteriaceae* が優勢菌となっていた。

4. 考察

NICU 群は生後早期の菌数が少なかったが、*Bifidobacterium* は日齢 30 に正常新生児とほぼ同等のレベルまで増加していた。これは、日齢 30 に全身状態が安定しており、経腸栄養が十分に確立されていた早産児が多かったことが関係していると考えられる。さらに在胎週数 34 週未満の症例にプロバイオティクスが生後 1 週間投与されていたこととの関連も示唆された。しかし、在胎週数 34 週未満でプロバイオティクス投与がなされていない症例がいなかったことから、プロバイオティクスの有無が *Bifidobacterium* に与える影響を検討することはできなかった。過去には早産児では腸内細菌叢の形成が遅れ、構成菌も異常であると報告されている^{18,19)}。早産児と正期産児の腸内細菌叢形成には有意な違いが現れる。その違いの中には多様性の減少や病原性を示す可能性のある菌が増加することも含まれており、このような変化は壊死性腸炎(NEC)の発症に関連すると考えられている^{20,21)}。Stewart らは²²⁾、分子生物学的手法を用いて、*Enterobacter* と *Staphylococcus* が NEC に関連している可能性を報告している。さらに、早産児は *Bifidobacterium* の定着が遅く、*S. aureus*、*Enterobacteriaceae*、*Enterococcus*、また *Lactobacillus* や *Weissella* などその他の乳酸菌が優勢であった²³⁾。今回の研究期間中に NEC と診断された症例はいなかった。これは *Bifidobacterium* が日齢 30 には正常新生児と同等のレベルまで増加していたことが関連し

ていると考えられた。しかし、新生児早期に正常新生児と比べて腸内細菌が少ないことは、腸内細菌叢バランスに変化をきたし NEC へと進展する可能性がある。

次に *S. aureus* について検討した。一般的に正常新生児は母親の肌や周囲環境から *S. aureus* を含む常在菌に暴露される。*Staphylococcus*、*Clostridia*、*Streptococci* は腸内環境で病原性を示すことがあるが、対照的に *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* は消化管のホメオスタシスを保つために必要な有益菌である^{1-4, 24})。病院環境で検出される *S. aureus* の大部分が院内感染の原因となる MRSA である。過去には 12 の主要な病院から検出された *S. aureus* の 50~80% がメチシリン耐性であったという報告もある¹⁵)。今回、*S. aureus* 陽性群において *mecA* 陽性群と陰性群で比較すると、*Bifidobacterium* や *Enterobacteriaceae* に大きな違いはなかった。*mecA* 陽性群で日齢 30 の *Enterococcus* が少なかったが、腸内細菌叢全体のバランスは保たれていた。これらの結果から MRSA を含む *S. aureus* が定着することだけでは、*Bifidobacterium* が増加し最優勢菌となることに影響を与えないと考えた。

最後に臨床要因が新生児の腸内細菌叢に与える影響について検討した。

分娩様式の違いは細菌叢形成における重要な因子であることが報告されている²⁵)。経膣分娩によって出生した児は、最初に母親の便や膣に存在する細菌が定着するが、帝王切開によって出生した児は病院という環境や医療従事者から暴露された菌が定着していく²⁶)。初期の定着菌の違いは幼児期も持続しており、帝王切開で出生した児は経膣分娩で出生した児より、アレルギーや喘息、I 型糖尿病、セリアック病、肥満などを起こしやすいと言われている²⁷)。今回、CS 群は VB 群より *Enterobacteriaceae* が少なく、これまでの報告と同様の結果であった²⁵)。この分娩様式に関する今回の結果は重要であり、新生児期以降の腸内細菌叢の構成や臨床的経過を引き続き観察していくことが望ましい。

NICU において抗菌薬投与は一般的な治療のひとつである。生後早期の抗菌薬治療は有益菌の最初の腸内細菌叢形成を妨げ、悪影響を及ぼすと報告されている^{17, 28})。本検討でも抗菌薬投与群は *Enterobacteriaceae* が有意に少なかった。また、在胎週数 32 週以降で検討すると抗菌薬投与群は日齢 30 の *Bifidobacterium* が有意に減少していた。生後早期に広域スペクトラムの抗菌薬を静脈投与することは、腸内細菌叢形成に影響を与え、将来的に様々な疾患を引き起こすリスクとなりうる可能性がある。

早産児を含む新生児腸内細菌叢に関するこれまでの報告では、分娩様式、栄養の種類、抗菌薬治療の影響について主に述べられていた^{9, 21, 29})。今回、NICU 管理されたなかでも重症で、より侵襲的な治療が必要であった児の腸内細菌叢について検討した。本検討では挿管群の *Enterobacteriaceae* は非挿管群と比較し日齢 0-3、30 ともに減少しており、在胎週数 36 週以降で見ると挿管群は *S. aureus* 陽性となる割合が高かった。人工呼吸管理によっておこる呼吸器関連肺炎(VAP)がよく知られているように、挿管人工呼吸管理によって呼吸器感染症や経口感染症のリスクが高まり³⁰)、さらに、新生児の腸内環境を変化させるリスクがあると考えられた。

母乳構成成分がもたらす様々なメリットは広く認められており、健康な正期産の母乳栄養児は有益菌である *Bifidobacterium* が腸内細菌叢の中で優勢となる^{21, 29})。本検討では母乳栄養でも混合栄養でも栄養方法に関わらず日齢 30 で *Bifidobacterium* が最優勢であった。それぞれの群にお

いて他の 3 菌のレベルに差はなかった。これは完全母乳栄養児と完全人工栄養児の比較ができなかったことや、症例の中に母乳栄養を積極的にすすめる超低出生体重児が含まれること、ほとんどが母乳栄養であっても経過中に 1 回でも人工栄養を摂取した児は混合栄養として扱ったことなどが影響していると考ええる。さらに、経腸栄養の中断が与える影響についても検討した。NICU での栄養管理のポイントとして、出生後早期に母乳で経腸栄養を開始することは、予後を改善し NEC を予防することができる³¹⁾。しかし、全身状態が不良であるため経腸栄養を継続することができなかった数症例があった。今回、生後 1 か月までの経腸栄養が不十分である群では日齢 30 の *Bifidobacterium* が有意に少ない結果であった。これらは全例が新生児期に外科的手術を受けた症例であった。外科的手術は新生児期の腹部環境に影響する可能性があり、腸管への直接侵襲、二次的な感染症、全身麻酔、腸管の環流や酸素化の障害、経腸栄養の中止など様々な要因が考えられる。経腸栄養の中止が腸内細菌叢形成に最も重要な要因である可能性を考えたが、本検討のみでは明確な回答は得られず、さらなる研究が望まれる。我々は過去に、十二指腸切除後の有益菌の増殖が、逆に D 乳酸アシドーシスやビタミン B12 欠乏性貧血などの複雑な病態をひきおこすことを報告した^{32,33)}。このような新生児期の腸内細菌叢の乱れは数年間持続すると報告されており³⁴⁾、長期的に腸内細菌構成や体重増加、成長発達への影響を経過観察することが望ましい。

5. 総括

90 例の新生児の便検体から、16SrRNA PCR 解析方法を用いて主要な腸内細菌を検討した。NICU に入院した新生児は生後早期の細菌数は少なかったが、日齢 30 には正常新生児とほぼ同等まで増加していた。さまざまな臨床要因が腸内細菌叢の形成に関与しており、なかでも不十分な経腸栄養は腸内細菌叢バランスが大きく崩れる要因となると考えられた。

6. 謝辞

本論文を作成するにあたり、この研究に協力してくださった新生児とそのご家族に感謝いたします。また、技術面でご協力いただいた株式会社明治、食機能科学研究所や、統計学的解析について助言してくださった、ビジネス・ブレイクスルー大学院大学 管民夫教授、株式会社アイスタット代表取締役副社長 志賀保夫氏、NEC や新生児の MRSA 感染について助言してくださった、すくすくあかちゃんこどもクリニック院長 野渡正彦先生、検体収集に協力してくださった、北里大学医学部小児科講師 釧持学先生、相模野病院小児科 横関祐一郎先生、北里大学医学部小児科助教 山口綾乃先生と、小児科研究室内の皆さまに心より感謝いたします。

7. 引用文献

- 1 Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;69(5):1035S-45S.
- 2 Mitsuoka T. Establishment of intestinal bacteriology. *Bioscience of microbiota, food and health*. 2014;33(3):99-116.

- 3 Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4578-85.
- 4 Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222-7.
- 5 Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *European journal of pediatrics*. 1985;144(2):186-90.
- 6 Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65(11):4799-807.
- 7 Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, et al. Development of 16S rRNA-Gene-Targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(11):5445-51.
- 8 Arboleya S, Ang L, Margolles A, Yiyuan L, Dongya Z, Liang X, et al. Deep 16S rRNA metagenomics and quantitative PCR analyses of the premature infant fecal microbiota. *Anaerobe*. 2012;18(3):378-80.
- 9 Brooks B, Firek BA, Miller CS, Sharon I, Thomas BC, Baker R, et al. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. *Microbiome*. 2014;2(1):1.
- 10 Sengupta S, Carrion V, Shelton J, Wynn RJ, Ryan RM, Singhal K, et al. Adverse neonatal outcomes associated with early-term birth. *JAMA pediatrics*. 2013;167(11):1053-9.
- 11 Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(6):3575-81.
- 12 Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(12):7220-8.
- 13 Rinttila T, Kassinen A, Malinen E, Krogus L, Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2004;97(6):1166-77.
- 14 Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, Makino S. Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 2005;67(10):1037-41.
- 15 Huang YC, Chou YH, Su LH, Lien RI, Lin TY. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

- colonization and its association with infection among infants hospitalized in neonatal intensive care units. *Pediatrics*. 2006;118(2):469-74.
- 16 Romaniszyn D, Rozanska A, Wojkowska-Mach J, Chmielarczyk A, Pobiega M, Adamski P, et al. Epidemiology, antibiotic consumption and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* infections--data from the Polish Neonatology Surveillance Network, 2009-2012. *BMC infectious diseases*. 2015;15:169.
- 17 Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51(1):77-84.
- 18 Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P. Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1999;80(3):F167-73.
- 19 Moles L, Gomez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 2013;8(6):e66986.
- 20 Arboleya S, Binetti A, Salazar N, Fernandez N, Solis G, Hernandez-Barranco A, et al. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;79(3):763-72.
- 21 Unger S, Stintzi A, Shah P, Mack D, O'Connor DL. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. *Pediatr Res*. 2015;77(1-2):205-13.
- 22 Stewart CJ, Marrs EC, Magorrian S, Nelson A, Lanyon C, Perry JD, et al. The preterm gut microbiota: changes associated with necrotizing enterocolitis and infection. *Acta Paediatr*. 2012;101(11):1121-7.
- 23 Collado MC, Cernada M, Neu J, Perez-Martinez G, Gormaz M, Vento M. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. *Pediatr Res*. 2015;77(6):726-31.
- 24 Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*. 2010;90(3):859-904.
- 25 Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev*. 2010;86 Suppl 1:13-5.
- 26 Madan JC, Farzan SF, Hibberd PL, Karagas MR. Normal neonatal microbiome variation in relation to environmental factors, infection and allergy. *Curr Opin Pediatr*. 2012;24(6):753-9.
- 27 Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial ecology in health and disease*. 2015;26:26050.
- 28 Arboleya S, Sanchez B, Milani C, Duranti S, Solis G, Fernandez N, et al. Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr*. 2015;166(3):538-44.

- 29 Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006;118(2):511-21.
- 30 Miller JD, Carlo WA. Pulmonary complications of mechanical ventilation in neonates. *Clin Perinatol*. 2008;35(1):273-81, x-xi.
- 31 Hay WW, Jr. Strategies for feeding the preterm infant. *Neonatology*. 2008;94(4):245-54.
- 32 Kaneko T, Bando Y, Kurihara H, Satomi K, Nonoyama K, Matsuura N. Fecal microflora in a patient with short-bowel syndrome and identification of dominant lactobacilli. *J Clin Microbiol*. 1997;35(12):3181-5.
- 33 Hojo K, Bando Y, Itoh Y, Taketomo N, Ishii M. Abnormal fecal *Lactobacillus* flora and vitamin B12 deficiency in a patient with short bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;46(3):342-5.
- 34 Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed *Bacteroidetes* colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*. 2014;63(4):559-66.

8. 業績目録

(I) 原著

1. 鈮持学, 宮地鑑, 山口綾乃, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 狐崎雅子, 高梨学, 藤武義人, 石井正治 : 超早産児の未熟児動脈管に対する内視鏡下動脈管閉鎖術の予後在胎 25 週以下を対象とした検討
日本周産期・新生児学会雑誌 51(4):1161-1166 2015
2. Kemmochi M, Kitsunezaki M, Yokozeki Y, Ohoka M, Yamaguchi A, Akiyama K, Ishii M : Changes in mortality rate of extremely preterm infants born at 22-25weeks of gestation in KITASATO University Hospital.
The Kitasato Medical J 44:69-73 2014

(II) 準原著・Proceedings なし

(III) 症例、臨床治験報告

1. 高梨学, 鈮持学, 山口綾乃, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 伊藤尚志, 狐崎雅子, 野渡正彦, 石井正浩 : ESBL 産生大腸菌による新生児の重症細菌性髄膜炎の 1 例.
日本周産期・新生児学会雑誌 51(4):1253-1259 2015

(IV) 著書 なし

(V) 総説、講座 なし

(VI) 研究報告書 なし

(VII) 学会発表

〈一般講演〉

1. 大岡麻理, 鈮持学, 山口綾乃, 横関祐一郎, 伊藤尚志, 野渡正彦, 石井正浩 : 当院における

- 出生体重 500g 未満の超低出生体重児の生命予後の検討. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 2013, 広島.
2. Kitsunezaki M, Ooka M, Ito T, Nowatari M, Kenmochi M, Bando Y, Ishii M : Analysis of Fecal Microflora Composition in Preterm Infant Using 16S RNA. Society for Gynecology Investigation 60th Annual Meetin2013.3 Orland, FL, USA
 3. 山口綾乃, 横関祐一郎, 大岡麻理, 鋸持学, 野渡正彦, 石井正浩 : Late Preterm 児における単胎・多胎での呼吸器疾患の比較検討. 第 32 回神奈川県新生児研究会 2013.5.25 横浜
 4. 山口綾乃, 鋸持学, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 石井正浩 : 在胎 20 週発症の PROM に反復羊水注入を行い後遺症なく退院した VLBW の一例. 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014.4.11 名古屋
 5. 鋸持学, 山口綾乃, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 孤崎雅子, 石井正浩 : 在胎 25 週以下の動脈管開存症に対する結紮術は慢性肺疾患を予防できるか. 第 59 回日本未熟児新生児学会学術集会 2014.11.10 愛媛
 6. 山口綾乃, 鋸持学, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 孤崎雅子, 石井正浩 : 日齢 3 に発症し持続的血液透析 (CHD) を施行し救命し得た重症オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症 (OTC 欠損症) の 1 男児例. 第 59 回日本未熟児新生児学会学術集会 2014.11.10 愛媛
 7. 横関祐一郎, 山口綾乃, 大岡麻理, 秋山和政, 孤崎雅子, 鋸持学, 石井正浩 : 当院での脳低温療法、導入前後の比較. 第 59 回日本未熟児新生児学会学術集会 2014.11.11 愛媛
 8. 孤崎雅子, 山口綾乃, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 鋸持学, 石井正浩 : 当院 NICU での在宅人工呼吸器の導入症例の検討. 第 59 回日本未熟児新生児学会学術集会 2014.11.10 愛媛
 9. 山口綾乃, 扇原義人, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 孤崎雅子, 鋸持学, 坂東由紀, 石井正浩 : 当院で経験した膠原病合併妊娠 75 症例の母体および児の特徴. 第 59 回日本未熟児新生児学会学術集会 2014.11.10 愛媛
 10. 山口綾乃, 扇原義人, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 孤崎雅子, 鋸持学, 緒方昌平, 坂東由紀, 石井正浩 : 当院で経験した膠原病合併妊娠 75 症例の母体及び児の特徴. 第 118 回日本小児科学会学術集会 2015.4.19 大阪
 11. 山口綾乃, 鋸持学, 高梨学, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 孤崎雅子, 金井雄二, 海野信也, 石井正浩 : 糖尿病母体より出生した、重症度の異なる尾部退行症候群の 2 例. 第 51 回日本周産期・新生児医学会 2015.7.11 福岡
 12. 鋸持学, 山口綾乃, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 孤崎雅子, 石井正浩 : 当院 10 年間の超低出生体重児における消化管穿孔を疑い外科的処置を行った症例の検討. 第 60 回日本

新生児成育医学会・学術集会 2015.10.24 盛岡

13. 狐崎雅子, 釧持学, 山口綾乃, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 大西庸子, 望月純子, 石井正浩, 海野信也 : NICU ベットの増床が地域周産期医療にもたらした影響. 第 60 回日本

新生児成育医学会・学術集会 2015.10.25 盛岡

14. 山口綾乃, 釧持学, 小阪裕佳子, 大岡麻理, 秋山和政, 横関祐一郎, 狐崎雅子, 藤武義人, 今井純好, 石井正浩 : late preterm 児の呼吸障害について. 第 60 回日本新生児成育医学会・学術集会 2015.10.25 盛岡

15. 釧持学, 横関祐一郎, 山口綾乃, 大岡麻理, 秋山和政, 狐崎雅子, 石井正浩 : NICU ベットの有効活用を目指した取り組み. 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.5.13 札幌

(VIII) 公開講座・教育講演 なし

(IX) 研究費の取得状況 なし

10. 図表

Table 1 症例プロフィール

Number of all cases	90
Perinatal	
Gestational age (mean weeks \pm SE)	36.0 \pm 0.5 (25.0 - 41.1 w)
Birth weight (mean g \pm SE)	2348.6 \pm 98.7 (542 - 4138 g)
Male/Female	47 / 43
PROM (%)	13 (14.4)
Other facilities birth (%)	5 (5.6)
Cesarean section (%)	53 (58.9)
Postnatal	
NICU (%)	48 (53.3)
Antibiotic use (%)	30 (33.3)
Probiotics (<i>Bifidobacterium breve</i>) use (%)	23 (25.6)
Brestfed (%)	25 (27.8)
Intubation for respiration management (%)	30 (33.3)
Operation (%)	10 (11.1)
Outcome	
Hospitalization at one month after birth (%)	29 (32.2)
Hospitalization days (mean days \pm SE)	40.0 \pm 6.2 (5* - 393 days)
Death	2 (2.2)

※Virginal birth : 4~5days, Cesarean section : 7~8days

Table 2 使用したプライマー

Target organism	strain used standard curves	Primer set	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Product temp (°C)	Reference
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> (JCM 1217 ^T =ATCC 15707)	g-Bifid-F	CTCCTGGAAACGGGTGG	550	60	[11]
		g-Bifid-R	GGTGTTCTTCCCGATATCTACA			
Enterobacteriaceae	<i>Escherichia coli</i> (JCM 1649 ^T =ATCC 11775)	Eco1457F	CATTGACGTTACCCGCCAGAAGAAGC	195	58	[12]
		Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC			
Enterococci	<i>Enterococcus faecalis</i> (JCM 5803 ^T =ATCC 19433)	Enc-F	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	144	58	[13]
		Enc-R	ACTCGTTGTACTTCCCATTGT			
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (JCM 2151=ATCC 6538P)	nuc-F1	GCGATTGATGGTGATACGGTT	267	55	[14]
		nuc-R2	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC			
MRSA		mecA F	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	284	50	[15]
		mecA R	AAGGTTGTAACCACCCCAAGA			

Table 3 NICU 入室群と非入室群の日齢 0-3 と 30 での腸内細菌叢

	n	GA(mean weeks ± SE)	BBW(mean g ± SE)
NICU (+)	48	33.5 ± 0.7	1812.0 ± 135.6
NICU (-)	42	38.8 ± 0.2	2961.9 ± 63.6

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	<0.0001***	0.2299	<0.0001***
	u	370.0	859.0	393.5
	Median(+)	5.98×10 ⁴	1.39×10 ⁷	1.445×10 ⁷
	Median(-)	6.65×10 ⁸	1.002×10 ⁸	2.68×10 ⁸
Day30	p	0.7644	0.6741	0.0036**
	u	970.5	955.5	653.0
	Median(+)	5.045×10 ¹²	3.245×10 ¹⁰	7.42×10 ⁸
	Median(-)	1.115×10 ¹³	2.735×10 ¹⁰	5.86×10 ¹⁰

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Table 4 *S. aureus* の影響

	n	GA(mean weeks±SE)	BBW(mean g±SE)
<i>S. aureus</i> (+)	44	35.8 ± 0.7	2228.1 ± 143.1
<i>S. aureus</i> (-)	46	36.1 ± 0.7	2463.9 ± 135.6

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	0.6273	0.8248	0.9565
	u	951.5	984.0	1005
	Median(+)	3.40×10 ⁵	3.91×10 ⁷	2.64×10 ⁷
	Median(-)	2.975×10 ⁵	7.845×10 ⁷	2.36×10 ⁷
Day30	p	0.8899	0.0145*	0.4734
	u	994.5	710.5	923.0
	Median(+)	6.625×10 ¹²	8.455×10 ¹⁰	4.885×10 ⁹
	Median(-)	6.605×10 ¹²	2.18×10 ¹²	1.93×10 ¹²

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Table 5 分娩様式の影響

	n	GA(mean weeks ± SE)	BBW(mean g ± SE)
Vaginally-born (VB)	37	38.1 ± 0.5	2729.6 ± 109.5
Cesarean section (CS)	53	34.5 ± 0.7	2082.7 ± 138.6

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	0.1281	0.6886	<0.0001***
	u	795.0	931.0	464.0
	Median(VB)	2.93×10 ⁷	9.63×10 ⁷	3.47×10 ⁸
	Median(CS)	1.80×10 ⁵	3.55×10 ⁷	1.86×10 ⁷
Day30	p	0.7736	0.2382	0.0559
	u	945.0	836.0	748.5
	Median(VB)	7.34×10 ¹²	2.00×10 ¹⁰	1.90×10 ¹¹
	Median(CS)	6.29×10 ¹²	4.55×10 ¹⁰	1.12×10 ⁹

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Table 6A 抗菌薬治療の影響

	N	GA(mean weeks ± SE)	BBW(mean g ± SE)
Antibiotics (+)	30	31.3 ± 0.9	1520.2 ± 190.3
Antibiotics (-)	60	38.3 ± 0.2	2762.9 ± 66.5

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	0.0074***	0.1721	0.0003***
	u	590.0	740.0	492.0
	Median(+)	1.34×10 ⁵	1.39×10 ⁷	1.094×10 ⁷
	Median(-)	1.215×10 ⁸	9.39×10 ⁷	4.375×10 ⁷
Day30	p	0.2182	0.3175	0.0006***
	u	755.5	782.5	505.0
	Median(+)	3.455×10 ¹²	3.435×10 ¹⁰	2.775×10 ⁷
	Median(-)	1.044×10 ¹³	2.735×10 ¹⁰	2.69×10 ¹⁰

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Table 6B 在胎週数 32 週以降における抗菌薬治療の影響(28 例)

	N	GA(mean weeks ± SE)	BBW(mean g ± SE)
Antibiotics (+)	10	37.6 ± 0.9	2585.8 ± 320.3
Antibiotics (-)	18	37.2 ± 0.5	2298.4 ± 101.3

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	0.3987	0.7950	0.3044
	u	72.0	84.0	68.0
	Median(+)	1.023×10 ⁵	1.39×10 ⁷	2.395×10 ⁷
	Median(-)	1.815×10 ⁴	3.053×10 ⁷	1.675×10 ⁷
Day30	p	0.0306*	0.7593	0.7502
	u	45.00	83.0	83.0
	Median(+)	2.683×10 ¹⁰	2.080×10 ¹⁰	2.51×10 ⁹
	Median(-)	8.345×10 ¹²	2.815×10 ¹⁰	4.23×10 ¹⁰

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Table 7A 挿管人工呼吸管理の影響

	n	GA(mean weeks ± SE)	BBW(mean g ± SE)
Intubation (+)	30	31.6 ± 1.0	1570.9 ± 190.9
Intubation (-)	60	38.2 ± 0.3	2737.5 ± 73.5

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	0.0063*	0.2362	<0.0001***
	u	584.5	761.0	422.5
	Median(+)	1.09×10 ⁵	1.39×10 ⁷	5.27×10 ⁶
	Median(-)	1.215×10 ⁸	9.915×10 ⁷	7.015×10 ⁷
Day30	p	0.2556	0.2647	0.0009***
	u	766.5	769.0	520.0
	Median(+)	3.455×10 ¹²	3.435×10 ¹⁰	2.775×10 ⁷
	Median(-)	9.435×10 ¹²	2.735×10 ¹⁰	2.69×10 ¹⁰

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Table 7B 在胎週数 36 週以降における挿管人工呼吸管理の影響(21 例)

	n	GA(mean weeks ± SE)	BBW(mean g ± SE)
Intubation (+)	10	38.6 ± 0.5	2727.2 ± 266.1
Intubation (-)	11	38.2 ± 0.4	2471.1 ± 131.7

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	0.6019	0.7560	0.7439
	u	47.0	50.0	50.0
	Median(+)	7.045×10 ⁴	2.43×10 ⁷	1.695×10 ⁷
	Median(-)	1.47×10 ⁴	7.95×10 ⁶	1.86×10 ⁷
Day30	p	0.1307	0.7917	0.3399
	u	33.0	51.0	41.0
	Median(+)	3.65×10 ⁹	2.08×10 ¹⁰	3.875×10 ⁹
	Median(-)	6.92×10 ¹²	3.09×10 ¹⁰	1.12×10 ⁹

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Table 8A 栄養の影響 母乳栄養と混合栄養

	N	GA(mean weeks ± SE)	BBW(mean g ± SE)
Brest-fed	25	33.1 ± 1.3	1950.6 ± 243.4
Combination	65	37.1 ± 0.4	2501.7 ± 94.3

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	0.0330*	0.6537	0.4371
	u	577.0	762.0	726.0
	Median(Brest-fed)	6.31×10 ⁷	9.15×10 ⁷	1.55×10 ⁷
	Median(Comb)	1.48×10 ⁵	3.55×10 ⁷	2.76×10 ⁷
Day30	p	0.7352	0.8738	0.0852
	u	774.5	794.5	622.0
	Median(Brest-fed)	3.66×10 ¹²	2.88×10 ¹⁰	1.12×10 ⁸
	Median(Comb)	6.92×10 ¹²	3.12×10 ¹⁰	4.95×10 ⁹

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Table 8B 栄養の影響 栄養不十分例

	n	GA(mean weeks ± SE)	BBW(mean g ± SE)
Insufficient nutrition (+)	9	33.2 ± 2.1	1986.2 ± 336.3
Insufficient nutrition(-)	81	36.3 ± 0.5	2388.9 ± 102.9

		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Enterobactereacea</i>
Day0-3	p	0.1087	0.4487	0.0689
	u	245.0	307.0	230.0
	Median(+)	1.46×10 ⁵	1.64×10 ⁷	2.66×10 ⁶
	Median(-)	5.95×10 ⁵	4.93×10 ⁷	2.76×10 ⁷
Day30	P	0.0116*	0.9703	0.1977
	U	180.5	361.5	268.0
	Median(+)	5.030×10 ¹⁰	3.26×10 ¹⁰	1.12×10 ⁸
	Median(-)	7.690×10 ¹²	3.08×10 ¹⁰	4.82×10 ⁹

※*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001

Figure1 日齢 0-3 と 30 の腸内細菌叢(全 90 例)

