

学 位 論 文 要 旨

氏 名

大岡 麻理



論 文 題 目

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)

指 導 教 授 承 認 印

石井正浩



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)

氏 名 大岡 麻理

[目的]

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。

[対象と方法]

北里大学病院(KUH)の産科病棟・NICU および北里大学メディカルセンター(KMC)の産科病棟に入院した新生児 90 例を対象とした。NICU に入院した 48 例は日齢 2.6 ± 0.1 、 31.6 ± 0.4 の 2 回、産科病棟に入院した 42 例(KUH 25 例、KMC 17 例)は日齢 2.3 ± 0.2 、 30.2 ± 0.6 の 2 回、それぞれ検体を採取した。

便検体から QIAmp DNA stool MiniKit(Qiagen)により DNA を抽出し、*Bifidobacterium*、*Enterococci*、*Enterobacteriaceae*、*S. aureus* の 4 菌に特異的なプライマーを用い、SYBR Green system にて RT-PCR を施行した。*S. aureus* については *mecA* と *nuc* のプライマーを用いて、MRSA の判別を行った。

[結果]

1. 新生児期の腸内細菌叢形成

全 90 例で *Bifidobacterium*、*Enterococcus*、*Enterobacteriaceae* の 3 菌を検討した。3 菌すべてで生後早期から 1 か月までに菌数が増加し、*Bifidobacterium* の増加は著名であった($p < 0.0001$)。NICU 群は日齢 0-3 の *Bifidobacterium*($p < 0.001$)と *Enterobacteriaceae*($p < 0.001$) が有意に減少していた。日齢 30 でも

Enterobacteriaceae は少なかったが、*Bifidobacterium* は正常新生児群とほぼ同等のレベルに達していた。

NICU では在胎週数 34 週未満の児に日齢 0~7 でプロバイオティクスが投与されている。投与群 23 例と非投与群 67 例で *Bifidobacterium* を比較すると、日齢 0-3 で投与群は有意に少なかったが($p<0.05$)、日齢 30 では有意差はなかった($p=0.9766$)。

2. *S. aureus* の検討

全 90 例で生後 1 か月までに *S. aureus* が検出されたのは 44 例(48.9%)であり、正常新生児群では 21 例(50.0%)、NICU 群では 23 例(47.9%)であった。*S. aureus* 陽性群 44 例は、日齢 30 の *Enterococcus* が減少($p=0.0074$)していた。さらに、*mecA* プライマーにより判別を行ったところ *S. aureus* 陽性群 44 例中 38 例が陽性であり、NICU 群 23 例はすべて陽性であった。

正常新生児 *S. aureus* 陽性群 21 例の *mecA* 陽性群 15 例と陰性群 6 例で他 3 菌に有意差はなかった。また、NICU 群において *S. aureus* の有無で日齢 30 の *Bifidobacterium* の増加に違いはなかった。

3. 臨床要因の影響

3-1. 分娩様式の影響

経膈分娩(VD)の児 37 例と帝王切開(CS)の児 53 例を比較した。日齢 0-3 の *Enterobacteriaceae*($p<0.0001$)が CS 群で有意に減少していた。NICU 群では CS が 68.8%と高いため正常新生児の CS 群(20 例)と VD 群(24 例)で比較したところ、CS 群では日齢 0-3 の *Bifidobacterium* が有意に減少していた($p=0.0255$)。日齢 30 では有意な差はなかった。

3-2. 抗菌薬治療の影響

抗菌薬治療群 30 例は非治療群 60 例と比較し、日齢 30 の *Enterobacteriaceae* が有意に減少していた($p=0.0006$)。抗菌薬治療は在胎週数の影響を受けることが考えられるため、NICU 群の在胎週数 32 週以上の 28 例で、抗菌薬治療群 10 例と非治療群 18 例の比較をした。抗菌薬治療群は日齢 30 の *Bifidobacterium* が有意に減少していた($p=0.0306$)。

3-3. 挿管人工呼吸管理の影響

挿管人工呼吸管理群 30 例は非挿管群 60 例と比較し、日齢 0-3 と 30 の *Enterobacteriaceae* と($p=0.0063$, $p<0.0001$)、日齢 0-3 の *Bifidobacterium* が減少していたが($p=0.0009$)、日齢 30 の *Bifidobacterium* に有意差はなかった($p=0.2556$)。挿管人工呼吸管理は在胎週数の影響を受けることが考えられるため、NICU 群の在胎週数 36 週以降の 21 例で、挿管群 10 例と非挿管群 11 例の比較をした。日齢 30 の *Bifidobacterium* が挿管群で減少傾向であったが有意差はなかった。*S. aureus* の陽性率は挿管群が 60%、非挿管群が 18.2%であった。

3-4. 栄養の影響

母乳栄養のみの群 25 例と混合栄養の群 65 例において、日齢 30 の *Bifidobacterium* に有意な差はなかった。

今回、日齢 30 までに栄養量が不十分であった症例が 9 例あった。全てが手術例であり、6 例は先天性心疾患(動脈管開存症が 4 例、完全大血管転位が 1 例、房室中隔欠損が 1 例)、1 例は巨大リンパ管腫、1 例は脊髄髄膜瘤、1 例は鎖肛であった。これら 9 例は栄養が十分であった症例と比較して、日齢 0-3 の 3 菌に有意差はなかったが、日齢 30 での *Bifidobacterium* が有意に減少していた($p<0.05$)。特に腹部手術をした症例では *Bifidobacterium* が $10^{10}/g$ 未満と極端に減少していた。

[考察]

NICU 群は生後早期の菌数が少なかったが、*Bifidobacterium* は日齢 30 日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 日に全身状態の安定や、十分な経腸栄養の確立が関係していると考えられる。さらに在胎週数 34 週末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。

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、このような優勢菌の定着過程の違いは、壊死性腸炎(NEC)の発症に関与すると考えられている。今回は NEC と診断された症例はなかったが、腸内細菌の絶対数が少ない時期に何らかのきっかけにより重症消化管機能障害へ発展していく可能性が示唆された。

次に *S. aureus* について検討した。通常は母親の肌や周囲環境から常在菌に暴露される。*Staphylococcus* は腸内環境で病原性を発揮することがある。病院環境で検出される大部分がメチシリン耐性 *S. aureus* であり(50~80%)病院出生正常児にも定着していることが知られている。本検討では *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 *Enterococci* が減少していたが、全体のバランスは保たれていた。これらの結果から *S. aureus* の定着は、*Bifidobacterium* の増加に影響を与えないと考えられた。

最後に臨床要因の影響を検討した。過去に分娩様式の違いにより細菌叢が異なることが報告されているが、本検討でも CS 群で *Enterobacteriaceae* が減少していた。

生後早期の抗菌薬投与は有益菌の発育を妨げると報告されている。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 週以降では抗菌薬投与群は日齢 30 の *Bifidobacterium* が有意に減少していた。挿管人工呼吸管理も NICU における治療のひとつである。本検討では挿管群の *Enterobacteriaceae* は非挿管群と比較し日齢 0-3、30 とともに減少していた。在胎週数 36 週以降では挿管群は *S. aureus* 陽性となる割合が高かった。これらのことから、生後早期の抗菌薬投与や挿管人工呼吸管理は腸内細菌叢形成に影響を与え、将来的に健康被害を与える可能性があることを認識する必要がある。

母乳構成成分がもたらす *Bifidobacterium* 増加のメリットは広く認められ、健康な正期産の母乳栄養児は *Bifidobacterium* が優勢である。本検討では栄養方法に関わらず日齢 30 は *Bifidobacterium* が最優勢であった。これは超低出生体重児が含まれることや、完全人工栄養児との比較ができなかったことが影響していると考えられる。さらに、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* が有意に減少していた。これらは全例が手術例であった。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、直接的な影響、二次的な感染症、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。

このような腸内細菌叢の乱れは数年間持続すると報告されており、体重増加や成長発達への影響を長期的に経過観察するべきである。

[結論]

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、不十分な経腸栄養は腸内細菌叢バランスの乱れにつながると考えられた。