

表紙

表題：

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

ランニングタイトル：

細菌叢解析と呼吸器感染症における嫌気性菌の位置付け (25/25 字)

著者：迎 寛

所属：産業医科大学呼吸器内科 (現 長崎大学大学院呼吸器内科学分野 (第二内科))

所在地：長崎市坂本1丁目12-4

キーワード：pneumonia, 16S ribosomal RNA gene, clone library, anaerobes, *Streptococcus*

論文形式：総説

著者連絡先：

住所；長崎市坂本1丁目12-4

氏名；迎 寛

TEL；095-819-7273

FAX；095-849-7285

Email；hmukae@nagasaki-u.ac.jp

要旨

肺炎は社会の高齢化を反映してその死亡者数は徐々に増加し、2011年に初めて本邦の死亡原因の第3位となった。肺炎による死亡者の95%以上が65歳以上の高齢者であり、入院を要する肺炎患者のうち、60歳代では約50%が誤嚥性肺炎と報告され、年代が上昇するごとにその割合は上昇すると報告されおり、「高齢者肺炎」や「誤嚥性肺炎」の治療も重要となる。

肺炎の「治療」の第一歩として、原因菌の把握は抗菌薬の選択の面からも極めて重要である。しかしながら、培養を中心とした従来法では十分に満足できるものではない。そこで、われわれは、これまで当大学微生物学教室との共同研究で、呼吸器感染症患者の呼吸器検体について、培養に依存しない遺伝子工学的的手法による網羅的な細菌叢の解析を行ってきた。細菌叢解析法とは細菌のみが保有する16S ribosomal RNA 遺伝子をPCRで網羅的に増幅し、PCR産物のクローンブラリーを作成した後に無作為に選択した96クローンの塩基配列を評価することで、その検体中の優占菌種を把握する手法である。

市中肺炎や医療ケア関連肺炎の気管支洗浄液を用いて細菌叢を解析したところ、既報の原因菌に加えて、嫌気性菌やレンサ球菌が多数認められたことを報告した。特に従来法において原因菌が不明であった症例では、嫌気性菌や口腔レンサ球菌が最優占菌種として検出された。さらに誤嚥リスクの有無による細菌叢の違いを後方視的に比較検討したところ、誤嚥リスク群では口腔レンサ球菌がより多く検出され、誤嚥リスクに最も関与が大きい可能性が見出された。一方で、以前から関連が指摘されていた嫌気性菌については、誤嚥のリスクの有無では検出率の差は見られなかった。

今回は、細菌叢解析を用いて、「高齢者肺炎」や「誤嚥性肺炎」を中心に、多方面から検討したデータを紹介し、呼吸器領域における嫌気性菌の位置づけについて概説する。

肺炎は社会の高齢化を反映してその死亡者数は徐々に増加し、2011年に初めて本邦の死亡原因の第3位となったが、それ以降も3位を維持している¹⁾。肺炎による死亡者の95%以上が65歳以上の高齢者であり、2060年の高齢化率（65歳以上の人口割合）が40%に達すると推計される現状²⁾では、ますます肺炎の死亡率は増加するものと予想される。

肺炎の「治療」の第一歩として、原因菌の把握は抗菌薬の選択の面からも極めて重要である。しかしながら、培養や血清診断、抗原検索といった従来の原因菌検索は必ずしも十分に満足いくものではなかった。2011年の本邦からの報告では、呼吸器専門医が所属する全国約200施設から症例を集積した1875例で原因菌の検討を行ったが、原因菌が判明したのは885例（47.3%）で、半数以上の症例で原因菌を把握することができなかった³⁾。以上より、これまで日常臨床で行われている既存の原因菌検索では限界が存在する。

近年、感染症の原因菌検索においても分子生物学的手法が用いられるようになってきたが、従来の培養法に比べてより高い検出率を示すことが報告されている。特にヒトには存在せず、細菌のみが保有する16S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子が注目されており、これを直接解析することで培養に依存せずに原因菌を検索することが可能となった。

われわれは、これまで当大学微生物学教室との共同研究で、呼吸器感染症患者の呼吸器検体について、培養に依存しない遺伝子工学的手法による網羅的な細菌叢の解析を行ってきた。細菌叢解析法とは細菌（および古細菌）のみが保有する16S rRNA 遺伝子をPCRで網羅的に増幅し、PCR産物のクローンライブラリーを作成した後に無作為に選択した96クローンの塩基配列を評価することで、その検体中の優占菌種及びその占有率を把握する手法である（Fig. 1）。

当科で行った市中肺炎64例の検討⁴⁾では、喀痰培養では73%（47/64例）が原因菌の把握が困難であった。一方で、気管支洗浄液を用いた検討では、培養法では31%（20/64例）で有意菌種は検出されなかったが、細菌叢解析法では全例で原因菌の推定が可能であった。細菌叢解析法における第一優占菌種で見ると、これまでの報告と同様に肺炎球菌（12例、約19%）、インフルエンザ菌（12例、約19%）、マイコプラズマ（11例、約17%）が多く認められた。さらに、細菌叢解析ではフソバクテリウム属、プレボテラ属などの偏性嫌気性菌群（10例、約16%）が高い割合で検出された（Fig. 2）。これらの結果から、培養法にて有意菌の検出が困難であった症例では、主にマイコプラズマ及び嫌気性菌が

検出された。重症度別にみると、重症例では肺炎球菌が、軽症例ではマイコプラズマが最優占菌種として多く検出された。また、嫌気性菌は軽症で多く検出され（8/45例、約18%）、中等症で25%（2/8例）、重症で0%（0/11例）と、重症度を増すほど検出率は低下した。

仮に1菌種で80%を超える占有率を示す場合を「単独感染」と定義し、80%を超えないものを「混合感染」と定義すると、症例を加えた市中肺炎94例中48例（51.1%）が単独感染で、残り46例（48.9%）が混合感染であった。単独感染例では、既知の主な肺炎の原因菌が検出された。混合感染例では、占有率の多寡にかかわらず、約70%の嫌気性菌の関与が多く認められた。嫌気性菌はβラクタマーゼを産生する菌種が多く存在することから、本来の原因微生物の直接的な病原性に加えて、嫌気性菌がβラクタマーゼ供給源として間接的に病原性を呈している可能性があり注意を要する。

また、2010年4月から2014年2月までに気管支洗浄を行った細菌性肺炎177例（市中肺炎83例、医療ケア関連肺炎94例）を対象に誤嚥リスク（脳血管障害の既往、中枢性変性疾患、認知症、頭頸部疾患、胃食道疾患）の有無による細菌叢の違いを検討した。誤嚥リスク保有群83例と非保有群94例であったが、第一優占菌種の比較では、嫌気性菌群の検出率はリスク保有群に比べて、非保有群が有意に高かった。一方で誤嚥リスクの有無と細菌叢の占有率を比較したところ、嫌気性菌では両群に有意差は見られなかったが、口腔レンサ球菌では誤嚥リスク保有群に有意に多く検出された。このことから、これまで報告された嫌気性菌よりも、口腔レンサ球菌の方が誤嚥性肺炎により関与している可能性が見出された。

肺化膿症についての検討を行ったところ、培養では約30%が原因菌不明であったが、細菌叢は全ての症例で原因菌が検出された。培養法では、肺炎球菌や黄色ブドウ球菌、*Streptococcus anginosus* 群が多く検出されたが、20%以上に3菌種以上が培養された。一方で、細菌叢解析法で嫌気性菌群（主にフソバクテリウム属）が最優占菌種として最も多く検出され、次いで、*S. anginosus* 群であった。また、*S. anginosus* 群検出例は非検出例に比べて高年齢で検出され、嫌気性菌検出例は非検出例に比べて低年齢で検出された。

細菌感染関連胸水42例での検討（Table 1）では、培養法では16例（38.1%）で、細菌叢解析では24例（57.1%）で原因菌が推定され、細菌叢解析が検出に優れていた。一方で、18例は両者ともに検出困難であった。培養法では、黄色

ブドウ球菌，口腔レンサ球菌等が検出されたが，嫌気性菌の検出は 1 例のみであった。細菌叢解析陽性であった 24 例のうち，嫌気性菌が 10 例（41.6%）で最も多く検出され，次いで口腔レンサ球菌が 7 例（29.2%）であった。黄色ブドウ球菌や口腔レンサ球菌は培養でも検出されるが，嫌気性菌の検出は細菌叢解析が優れていると考えられる。

最後に，肺炎ではある一定割合で嫌気性菌による肺炎と考えられ，特に混合感染例ではかなりの症例で嫌気性菌の関与があると思われる。また，これまで嫌気性菌の関与が知られている肺化膿症や細菌感染関連胸水においてはその半数程度に嫌気性菌が検出され，今まで以上に重要な役割を果たしていると考えられた。一方で，誤嚥性肺炎においては従来言われていたような嫌気性菌の関与は少ない可能性がある。特に，高齢者の呼吸器感染症では，嫌気性菌より口腔内常在菌が重要である可能性がある。呼吸器感染症ではやはり嫌気性菌をカバーできる抗菌薬の選択が重要である。

利益相反自己申告：著者は、第一三共株式会社、大日本住友製薬株式会社、杏林製薬株式会社、アステラス製薬株式会社、大正富山医薬品株式会社、塩野義製薬株式会社、MSD 株式会社、日本ベーリンガーインゲルハイム製薬株式会社から資金援助を受けている。

文献

- 1) 厚生労働省平成 26 年度人口動態統計月報年計 (概数), 2014
- 2) 内閣府平成 24 年版高齢社会白書 2012.
- 3) Kohno S, Seki M, Watanabe A; CAP Study Group: Evaluation of an assessment system for the JRS 2005: A-DROP for the management of CAP in adults. Intern Med 2011;50(11):1183-91
- 4) Yamasaki K, Kawanami T, Yatera K, Fukuda K, Noguchi S, Nagata S, Nishida C, Kido T, Ishimoto H, Taniguchi, H, Mukae H: Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. PLoS One 2013;8:e63103

New insights based on the microfloral analysis –a significance of anaerobes in respiratory infections

Hiroshi Mukae

Second Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine
1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8501, Japan

Abstract

The mortality of pneumonia is gradually increased with population aging in Japan, and pneumonia has been the third leading cause of death in Japan since 2011. It has been reported that over 95% of the deaths from pneumonia are the elderly over 65 years. In addition, about 50% of hospitalized patients with pneumonia over 60 years of age have aspiration pneumonia, and the rate of aspiration increases with age. Therefore, proper treatment of pneumonia in the elderly and aspiration pneumonia are important issues. Precise assessment of causative pathogens is extremely important for the first step of an adequate choice of antibiotics for the treatment of pneumonia. However, conventional cultivation methods are not fully satisfactory to estimate causative bacteria.

We have evaluated the bacterial flora in the respiratory samples obtained from patients with infectious diseases using the culture-independent molecular method, in collaboration with the Department of Microbiology, University of Occupational and Environmental Health, Japan. The microfloral analysis using the 16S rRNA gene was conducted as follows; the partial fragment of 16SrRNA gene (approximately 600bp) was amplified by PCR using the universal primer pair and a clone library was constructed. Nucleotide sequences of randomly chosen 96 clones for each specimen were determined and the homology with our in-house database was searched, then the percentages of detected bacterial phylotypes were identified.

So far, this microfloral analysis in the bronchoalveolar lavage fluid obtained from patients with community-acquired pneumonia (CAP), healthcare-associated pneumonia (HCAP) showed that anaerobes and oral bacteria were highly detected in addition to well-known pathogens of CAP or HCAP. Especially, in patients without any significant pathogens using conventional cultivation methods, anaerobes and oral bacteria were mainly detected as the predominant phylotypes by the microfloral analysis. In addition,

oral streptococci were more frequently detected than anaerobes in CAP and HCAP patients with aspiration risk(s), indicating that oral streptococci were the most important in patients with aspiration pneumonia. Anaerobes have been reported as one of the important pathogens in patients with aspiration pneumonia, but there were no significant differences of anaerobe detection between patients with or without the risk of aspiration in our study.

In this review, I will talk about the significance of anaerobes in the respiratory infections, especially in patients with “elderly pneumonia” and “aspiration pneumonia”, with the data of the microflora analysis.

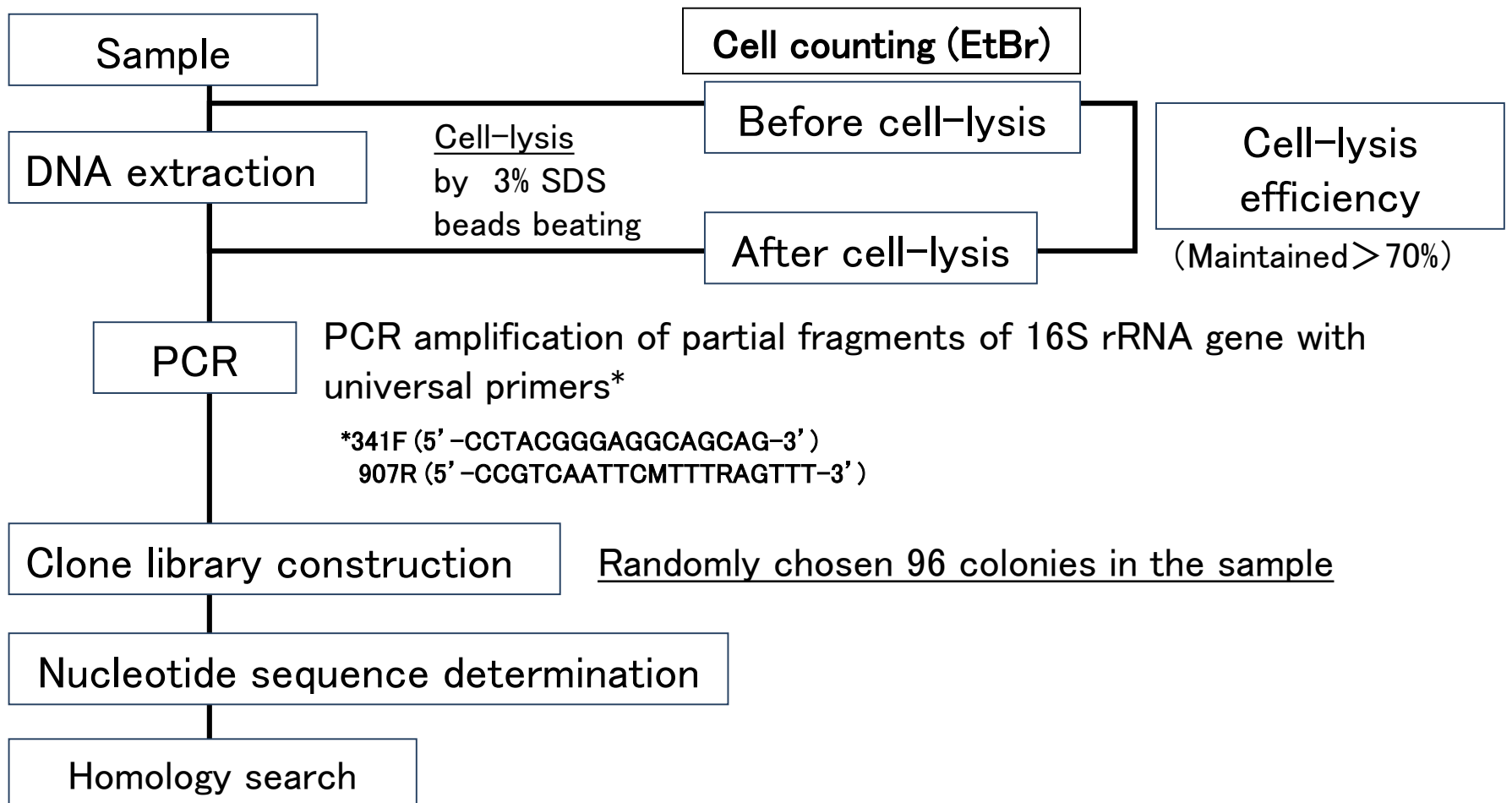


Fig. 1 Overview of the microfloral analysis with the 16S ribosomal RNA gene sequence. Approximately 600bp of 16S rRNA gene was amplified by PCR using universal primers and clone libraries were constructed. Nucleotide sequences of randomly chosen 96 clones for each specimen were determined and the homology with in-house data base was searched.

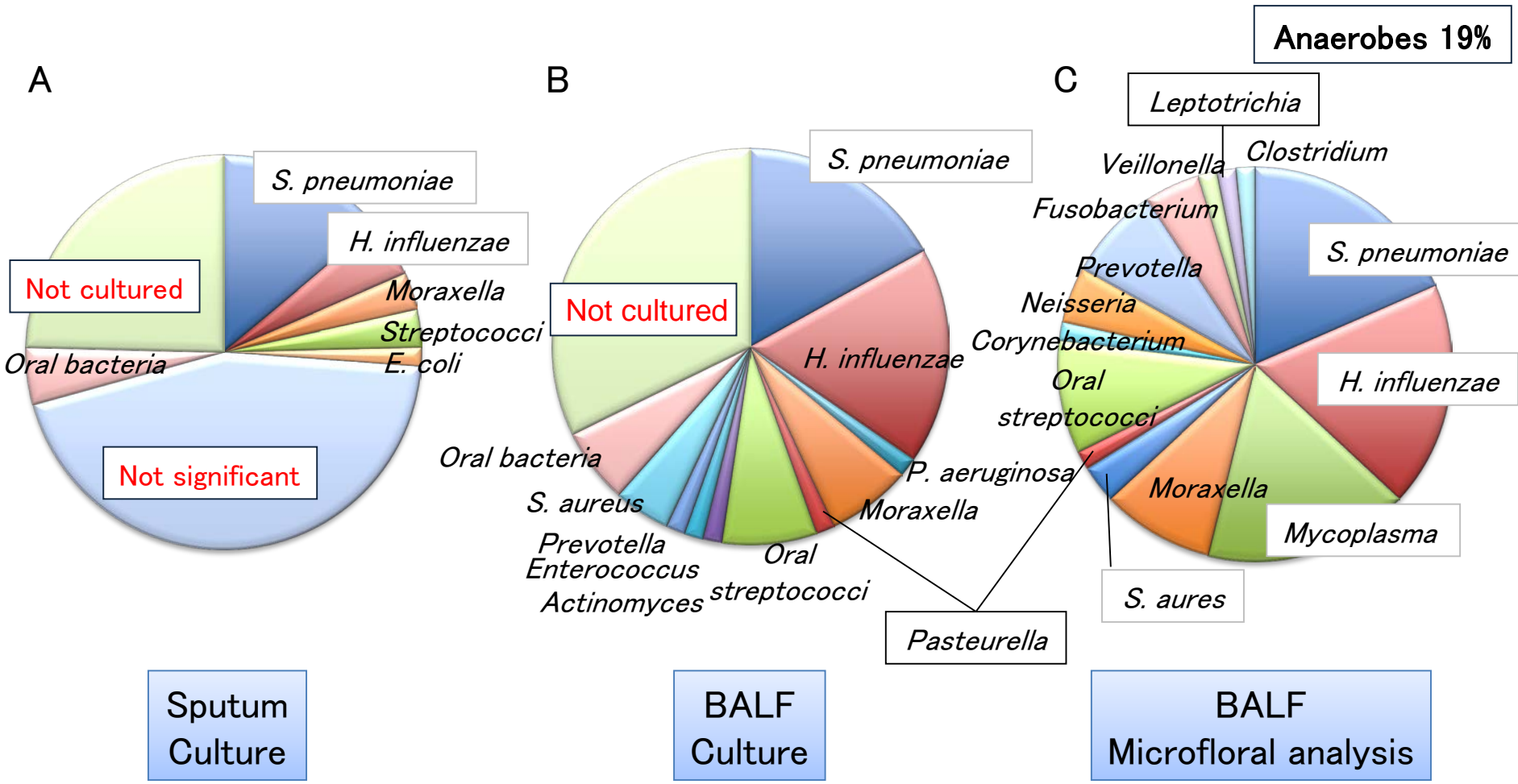


Fig. 2. Percentage of detected bacteria by sputum and bronchoalveolar lavage fluid cultivation and the molecular method in 64 patients with community-acquired pneumonia. The percentage of samples in which bacteria were detected by conventional cultivation (A), bronchoalveolar lavage (BAL) samples (B) and the molecular method using the 16S rRNA gene (C). Sputum cultivation detected no significant pathogens in three fourths of the cases. The molecular method detected causative bacteria in all BAL samples, and there were considerably higher ratios of anaerobes detected using the molecular method in comparison to culture methods in addition to *Mycoplasma pneumoniae*.

(Ref#4 modified)

Table 1. Comparison of bacteria between cultivation and the microfloral analysis using the 16S rRNA gene sequence.

	Age/gender	Gram stain	Cultivation	Microflora analysis (the percentage of clones, %)	
				The predominant phylotype	The second dominant phylotype
1	72/M	GNR 1+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3+	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (100%)	—
2	61/F	GPC 1+	MSSA 3+	<i>Staphylococcus aureus</i> (100%)	—
3	74/M	GPC 1+	MSSA 3+	<i>Staphylococcus aureus</i> (100%)	—
4	50/M	GPC 1+	MSSA +	<i>Staphylococcus aureus</i> (96.8%)	—
5	73/M	GPC 2+	MRSA 3+	<i>Staphylococcus aureus</i> (97.7%)	—
6	76/M	GPC 1+	<i>Streptococcus</i> sp. <+	<i>Streptococcus mitis</i> (100%)	—
7	60/M	GPC 2+	<i>Streptococcus agalactiae</i> 2+	<i>Streptococcus agalactiae</i> (100%)	—
8	73/M	GPC 3+	<i>Streptococcus</i> sp. 3+	<i>Streptococcus intermedius</i> (100%)	—
9	47/M	GPC 1+	<i>Streptococcus milleri</i> group 1+	<i>Streptococcus intermedius</i> (96.7%)	—
10	84/F	GPC 2+	<i>Streptococcus anginosus</i> 2+	<i>Streptococcus intermedius</i> (100%)	—
11	52/F	GPC 2+	<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (48.8%)	<i>Streptococcus intermedius</i> (41.5%)
12	74/M	GNR 3+	<i>Escherichia coli</i> 3+	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (33.8%)	<i>Prevotella oris</i> (24.3%)
		GPC 2+	<i>Streptococcus anginosus</i> 2+		
13	54/M	GNR 3+	<i>Prevotella melaninogenica</i> group <+	<i>Prevotella loescheii</i> (81.9%)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (18.1%)
			<i>Wolinella</i> spp. <+		
			<i>Fusobacterium nucleatum</i> <+		
			<i>Streptococcus mitis</i> <+		
14	60/M	(-)	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> <+	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (73.3%)	<i>Fusobacterium simiae</i> (18.6%)
15	57/M	GPC 3+ GNR 3+	<i>Streptococcus sp.</i> <+	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (36.3%)	<i>Prevotella oris</i> (20.0%)
			<i>Streptococcus constellatus</i> 3+		
			<i>Streptococcus anginosus</i> 3+		
16	81/M	(-)	<i>Bacteroides uniformis</i> 3+	<i>Morganella morganii</i> (97.0%)	—
17	69/M	(-)	<i>Staphylococcus</i> sp. +	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (100%)	—
18	66/M	(-)	No growth	<i>Streptococcus mitis</i> (35.1%)	<i>Neisseria elongata</i> (10.4%)
19	69/M	(-)	No growth	<i>Fusobacterium simiae</i> (71.7%)	<i>Filifactor alocis</i> (7.6%)
20	55/M	(-)	No growth	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (32.4%)	<i>Porphyromonas endocarditis</i> (23.5%)
21	58/M	(-)	No growth	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (54.7%)	<i>Parvimonas micra</i> (14.0%)
22	28/F	(-)	No growth	<i>Fusobacterium nechrophorum</i> (97.6%)	—
23	57/F	(-)	No growth	<i>Propionibacterium acnes</i> (28.6%)	<i>Atopobium parvulum</i> (14.3%)
24	60M	(-)	No growth	<i>Curvibacter delicatus</i> (14.0%)	—

In the 42 patients with bacterial pleurisy, 24 (57%) showed positive results for 16S rRNA sequencing analysis, of which 16 (38%) were also positive for cultivation method. In 10 (42%) of the 24 PCR-positive cases, obligate anaerobic phylotypes were predominantly detected. Nine (38%) cases showed concordant results between the cultured bacteria and the dominant clones by the molecular method. In eight patients with PCR-positive and cultivation-negative results, anaerobes were mainly detected as the predominant phylotype of the microfloral analysis. In some cases, the isolates by culture dominated only several percentages in microflora analysis of the clone library method.

rRNA gene, ribosomal RNA gene; PCR, polymerase chain reaction