

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861585

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析による中耳細菌叢評価と、鼓膜換気チューブ挿入の治療効果の検討

研究課題名(英文) Population shift of the middle ear microbiota of infants with acute otitis media.

研究代表者

杉田 玄 (Gen, Sugita)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20407274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、健常児鼻汁、急性中耳炎患児の鼻汁及び中耳貯留液検体を用い、細菌叢を網羅的に解析し、半定量的菌量分布を評価した。1．健常な鼻咽腔細菌叢の把握と肺炎球菌ワクチンの影響 2．上気道感染後の鼻咽腔細菌叢の把握と健常状態との比較 3．中耳細菌叢の存在と、同一症例における鼻咽腔細菌叢との比較 4．同一症例における抗菌薬投与前後の鼻咽腔細菌叢の変化について検討を加えた。健常児鼻咽腔には、常在菌優勢種の存在が示唆された。抗菌薬暴露後の鼻咽腔細菌叢は、全菌数が増加し3大起炎菌の占有率が高かった。中耳細菌叢の存在と、鼻咽腔・中耳共通菌種の存在が示された。

研究成果の概要(英文)：Results: In the nasopharynx, coexisting with causative pathogens and commensal consist bacterial flora, recently nominated as nasopharyngeal microbiota. The microbiome in the nasopharynx will be dramatically changed during the course of antimicrobial treatments, vaccination and acute phase of upper respiratory inflammation. Conclusion: Our previous study revealed the dramatic changes in the nasopharyngeal pneumococcal density during the course of upper respiratory infections. In this study, despite an abundance of data on incidence, prevalence and density of potential pathogens in NP microbiota of children and adults, the detailed composition of the NP microbial community, both during health and disease have not been studied. We, therefore, will discuss microbiota in the nasopharynx for better understanding the change of nasopharyngeal bacterial flora during various infectious situations.

研究分野：感染症

キーワード：microbiota 群集構造解析

1. 研究開始当初の背景

健常児においては、生後まもなく鼻咽腔にピリダンス連鎖球菌などの病原性を持たない常在細菌叢が形成される。その後、生後1歳までに上気道感染症の主な起炎菌である肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*; Sp)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*; Hi)、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*; Mc) が鼻咽腔細菌叢に加わる。これらの細菌に対して、宿主においては、鼻咽腔の粘液線毛系あるいは粘膜免疫応答などの局所感染防御機構が発達・成熟していく。細菌が鼻咽腔に定着すると、宿主は細菌表面に存在する種々の抗原の刺激を受け、細菌に対する免疫メモリーが獲得される。鼻咽腔では、生後早期より形成された細菌叢が、宿主の防御機構と反応しながら、粘膜上皮での定着・増殖・消失をダイナミックに繰り返している。

2. 研究の目的

本研究では、鼻咽腔・中耳細菌叢のダイナミズムを検討する目的で、健常児鼻汁、急性中耳炎患児の鼻汁及び中耳貯留液検体に対し、細菌特異的な16SrRNAに基づいた群集解析を行った。細菌叢を網羅的に解析し、菌種分布推定、半定量的菌量分布を評価し、
健常な鼻咽腔細菌叢の把握と
肺炎球菌ワクチン接種による影響
上気道感染後の鼻咽腔細菌叢
の把握と健常状態との比較
中耳細菌叢の存在と、同一症
例における鼻咽腔細菌叢との比較
同一症例における抗菌薬投与
前後の鼻咽腔細菌叢の変化
について検討を加えた。

3. 研究の方法

症例および検体採取

2012年1月から12月に日高総合病院ワクチン外来を受診した2ヶ月齢から2歳齢の健常児12名を対象に、7価肺炎球菌結合型ワクチン (7-valent pneumococcal conjugate vaccine: PCV7) 接種前、および3回接種後に、鼻汁検体を無菌的に採取した (健常児鼻汁群; healthy nasal wash: hNW)。また、耳鼻咽喉科を受診した反復性中耳炎患児53名 (1歳から4歳) より鼻汁 (抗菌薬暴露後鼻汁群; antibiotics exposed nasal wash: aNW) を、手術治療として鼓膜換気チューブ留置を行った反復性中耳炎患児12名 (1歳から4歳) より鼻汁 (aNW に含む) および中耳貯留液 (中耳貯留液群; middle ear effusion: MEE) を採取した。細菌培養検査を行った後、残余検体を用いてDNAを抽出し鼻咽腔細菌叢の群集解析に用いた。培養された優勢菌のうち、Sp, Hi, Mc は継代培養にて、薬剤感受性検査を行った後、スキムミルク下に-80℃で分離菌保存とした。

クローンライブラリ法による群集解析

(1) で得られた鼻汁および中耳貯留液からDNAを抽出し、ユニバーサルプライマーとして、E341F, E907R を使用してPCR増幅産物を得た。TOPO TA cloning kit for sequencing を用いて形質転換し、96クローンを釣菌してクローンライブラリを作成した。M13プライマーセットでPCR増幅した後、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 で反応を行い、サンガー法で配列解析を行った。公開されている基準種のみとのデータベースと、相同性解析をBLASTで行い菌種を推定した。

結果

群集解析結果は、1症例につき最高96クローンについて、菌種とそれぞれのクローン数分布を持つ集団として示した。ワクチン接種および抗菌薬投与による影響は、菌種とクローン数をヒストグラムで、菌数を折れ線グラフで示し比較した。また個々の症例は群集の構成要素の特徴に基づき、主成分分析を用いて2次元散布図上にプロットされた。

(1) PCV7 接種前後の健常児鼻咽腔細菌叢の変化

hNW では、小児急性中耳炎 3 大起炎菌とは異なる、*Dolosigranulum pigrum* および *Corynebacterium propinquum* の 2 つの優勢菌が存在することが明らかになった。PCV7 接種前(2ヶ月齢)と接種後(8ヶ月齢)で常在菌叢はワクチン接種の影響を受けなかった。

(2) 抗菌薬暴露後患児の鼻咽腔細菌叢、主成分分析

3ヶ月以内に一度以上抗菌薬暴露があった鼻咽腔細菌叢(aNW)に対し群集解析を行い、症例番号で散布図にプロットした。主成分分析により、3大起炎菌 *Hi*, *Mc*, *Spn* を固有ベクトルにもつ3群に分かれることが示された。また、*Mc* および *Hi* が併存して優勢種となる、移行帯というべき集団が見られた。

(3) 抗菌薬暴露後患児と健常児の鼻咽腔細菌叢比較

aNW と hNW の群集解析結果を同一の主成分分析で示した。2群はほぼ直交して集団を形成するため、明らかに

その構成要素が異なると考えられた。aNW は、hNW に比べ、細菌叢が多様性に富んでいた。aNW は hNW と比較すると、固有ベクトル *Hi* と *Mc* で特徴づけられる位置に存在した。

(4) 同一症例の鼻咽腔・中耳の菌叢比較

反復性中耳炎患児に対する鼓膜換気チューブ挿入時に、中耳貯留液と鼻汁を同時に採取し、群集解析を行った。全菌数は、鼻咽腔が中耳の10倍以上であったが、従来無菌状態と考えられていた中耳腔にも、多種の菌からなる菌叢が存在することが示された。起炎菌である *Hi* および、複数の常在菌が両部位に共通して存在し、経耳管感染による中耳炎の病態を支持するものとなった。

(5) TBPM PI および CVA/AMPC による細菌叢の変化

急性中耳炎患児に対する抗菌薬治療前後の鼻汁を群集解析し、菌叢構成の変化をヒストグラムで示し、全菌数の変化を折れ線グラフで示した。急性中耳炎患児に対する抗菌薬治療前後の鼻汁を検討すると、抗菌薬治療が奏功した症例では菌数が 1/2 から 1/5 程度に減少することが示された。

tebipenem pivoxil; TBPM PI 投与では、常在菌は大きく抑制され、*Hi*, *Mc* の 2 菌が残存する結果となった。

CVA/AMPC; clavulanic acid/amoxicillin) 投与では、全菌数の大幅な減少と、病原菌の抑制に成功し常在細菌叢の正常回復が見られた症例を認めた。

4. 研究成果

本研究では、健常児、急性中耳炎患

児に対して、鼻咽腔・中耳細菌叢の群集解析を行い、従来の培養検査では検出できなかった菌叢全体の網羅的な評価が可能となった。

健常な鼻咽腔細菌叢では優勢菌種が存在せず、病原性の少ない常在菌が穏やかなコミュニティを形成していると考えられてきたが、我々の解析結果では、全菌数は少ないものの *Dolosigranulum pigrum* および *Corynebacterium propinquum* の2つの優勢菌種が存在し、80%以上を単独菌が占める症例が多く見られた。また、その菌種構成はワクチン接種後もあまり変化しなかった。この結果は健常児鼻咽腔細菌叢に対する新たな知見であり、宿主免疫賦活における2菌の役割について今後検討の必要が示唆された。

抗菌薬暴露後の鼻咽腔細菌叢は、菌量が増加し、3大起炎菌が優勢を占める3つの集団に分かれ、群集解析によって抗菌薬曝露による細菌叢への影響がより明らかに示された。また、健常群との比較において菌叢構成が明らかに異なる結果が示された。このことは、病原性の高い細菌の鼻咽腔定着と抗菌薬治療が、菌叢をダイナミックに変化させることを示している。

過去、中耳貯留液より多様な菌叢の存在を示した報告はない。また、鼻咽腔細菌叢との比較では、経耳管感染中耳炎モデルを裏付ける共通菌種を、病原菌、常在菌ともに認めた。

抗菌薬投与による鼻咽腔細菌叢の変化を検討することは、起炎菌減量に基づく治療効果判定以外に、常在菌の抑制と回復という新たな視点を与える。今回の結果では、臨床所見の改善がみられた症例は、抗菌薬治療により

全菌数が減少していたが、病原菌の占有率については、70%以上を保ったものと、5%以下に抑制されたものに分かれた。病原因子の絶対量の低下が局所炎症の改善を導くと考えられるが、菌叢を構成する常在菌叢の回復が遅れた症例では、その後の病原体の再増殖のリスクが残存すると考えられた。

抗菌薬投与後の菌叢正常化機構を解明することは、いかに抗菌薬を投与するかではなく、いかに休薬期間を設定するかのエビデンスとなると考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

杉田 玄 (Gen Sugita)
和歌山県立医科大学 医学部 博士研究

員

研究者番号：20407274

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：