

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08649

研究課題名(和文) 下気道での細菌定着と重症喘息病態との関連性の解明：縦走的・包括的検討

研究課題名(英文) Elucidation of the relationship between bacterial colonization in the lower airway and the pathogenesis of severe asthma: a longitudinal and comprehensive study

研究代表者

松本 久子 (MATSUMOTO, Hisako)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：60359809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：喘息合併を含む気管支拡張症例における喀痰中黄色ブドウ球菌の検出は、菌由来エンテロトキシン感作を中心としたアレルギー性炎症や好酸球性炎症と関連した。一方でアレルギー性炎症と好酸球性炎症の分布は同一でないことも示された。重症喘息を含む閉塞性気道疾患例において、*γ*-Proteobacteria 綱、Haemophilus 属の喀痰内高占有は、好中球性炎症のみならず中等度までの好酸球性/2型炎症(混合性炎症)や喀痰症状と関連した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では重症喘息を含む閉塞性気道疾患例で、喀痰中 Proteobacterium 綱(G陰性桿菌)の検出は好中球性炎症と関係することが確認されたが、中等度までの好酸球/2型炎症も併存すること、強い好酸球性炎症例ではG陰性桿菌定着が少ないこと、喀痰症状にはG陰性桿菌と好酸球性炎症がともに寄与することを明らかにした。近年重症喘息のみならず、COPDや気管支拡張症でも末梢血好酸球数が管理指標の一つとなってきたが、本研究結果は末梢血好酸球数の解釈も含め、閉塞性気道疾患の長期管理において重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The detection of Staphylococcus aureus in sputum in patients with bronchiectasis, including those with asthma complications, was associated with allergic inflammation and eosinophilic inflammation, potentially via enterotoxin sensitization. On the other hand, the distribution of allergic and eosinophilic inflammation was not identical. In cases of obstructive airway diseases, including severe asthma, high sputum occupancy of *γ*-Proteobacteria and Haemophilus spp. was associated with not only neutrophilic airway inflammation but also moderate eosinophilic/type 2 airway inflammation (mixed inflammation) and sputum symptoms.

研究分野：呼吸器疾患

キーワード：閉塞性気道疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症喘息や COPD の下気道は無菌ではなく、健常人と異なる細菌叢が確認されその病態に関与している可能性が示されつつあるが、研究は緒についたばかりである。特に Th2 炎症と関連が深く、喘息の重症化に関わるとされる黄色ブドウ球菌由来エンテロトキシン(SE)への IgE 感作には黄色ブドウ球菌の下気道への定着が推察され、混合性(好中球・好酸球性)炎症の背景には、グラム陰性桿菌の下気道への定着が推察されるが、未だその関係は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、重症喘息を含む閉塞性気道疾患例における細菌の下気道への定着と 2 型/好酸球性炎症との関係を明らかにすることである。(1)下気道における黄色ブドウ球菌の定着が菌由来 SE への感作を介して好酸球/2 型炎症と関連するかを検証する。(2)インフルエンザ桿菌などグラム陰性桿菌(*Proteobacteria* 綱に含まれる)の定着は好中球性炎症を惹起し、グラム陰性桿菌の有するリポポリサッカライド LPS で刺激された好中球は好酸球の遊走を促進することが報告されている。これらから、混合性炎症(好中球と好酸球)が出現している場合はグラム陰性桿菌が定着している可能性があり、本研究で検証する。

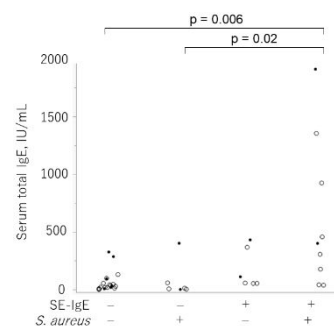
3. 研究の方法

京都大学通院中の気管支拡張症合併喘息例と気管支拡張症単独例を対象として、後ろ向きに喀痰・血清データを収集し、喀痰細菌培養結果、SE 感作・末梢血好酸球数・各種臨床指標との関連を解析した。京都大学および関連施設通院中の気流閉塞を伴う喘息、COPD 両疾患合併(ACO)例を前向きに登録し、喀痰・血清を収集した。喀痰は培養と 16SrRNA による細菌叢解析を行い、SE 感作との関連も解析した。喀痰症状と炎症・細菌叢との関係を解析した。尚、近年 COPD、気管支拡張症においても、好酸球性炎症を呈する一群が報告されてきたため、では気管支拡張症例を、では COPD 例も対象とした。

4. 研究成果

(1) 喀痰中黄色ブドウ球菌検出と SE 感作・好酸球性炎症との関係

の後ろ向き研究による喀痰培養との関連解析では、黄色ブドウ球菌と SE 感作(0.1 UA/mL)との関連が確認された。喀痰培養で黄色ブドウ球菌が検出された例では、非検出例に比し SE (特に SEA) への感作が有意に高頻度で、末梢血好酸球数は有意に高かった。肺炎球菌検出例でも同様に、非検出例よりも末梢血好酸球数は有意に高値であったが、モラキセラ菌、インフルエンザ桿菌、緑膿菌検出の有無で好酸球数に差はなかった。血清総 IgE 値は、喀痰中黄色ブドウ球菌と SEs 感作の両方が確認された例で、最も高値であった(右図気管支拡張症単独、気管支拡張症合併喘息例)。さらに喀痰の細菌検出パターンにより 4 群(黄色ブドウ球菌と緑膿菌ともに検出されなかった群、黄色ブドウ球菌のみ検出群、緑膿菌のみ検出群、両菌とも検出された群)に層別化し、SE-IgE 感作・総 IgE 値・末梢血好酸球数を比較したところ、黄色ブドウ球菌のみ検出群で最も SEA への感作が強く、総 IgE 値も高かった。末梢血好酸球数は緑膿菌と黄色ブドウ球菌がともに検出された群で高い傾向であった。



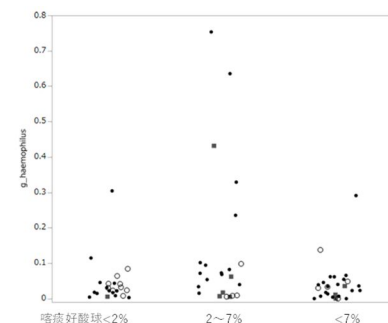
の前向き研究（気流閉塞のある喘息例を含む閉塞性気道疾患例を対象とした 16SrRNA による細菌叢解析）において、SE-IgE 感作頻度は COPD 26%、ACO 44%、喘息 32%と COPD で最も低かった。SEB-IgE 感作は非感作例群に比し、ステロイドを要する増悪が有意に多かった。また COPD 群では SEA-IgE 感作の有無で、*Proteobacteria* 綱の占有率が異なり、占有率は SEA-IgE 値と有意に負に相関した。

黄色ブドウ球菌の検出は、SE 感作を中心としたアレルギー性炎症と好酸球性炎症の存在を示唆する一方で、アレルギー性炎症と好酸球性炎症の分布は同一でないことも示された。近年末梢血好酸球数が COPD を含む慢性呼吸器疾患で治療薬選択のための指標となっているが、緑膿菌の定着例でも末梢血好酸球数は高くなりうる点に注意する必要がある。また SE-IgE 感作頻度は喫煙歴のある例で高いことが一般人口・喘息例で報告されているが、本研究でも ACO 群で最も高いことが確認された。一方 COPD 群では最も低く、COPD 群では SEA-IgE 値と *Proteobacteria* 綱占有率が負に相関した。COPD 例での SE（特に SEA）-IgE 非感作例は、Th2 炎症が惹起されにくい集団と考えられ、グラム陰性桿菌の定着に注意する必要性が推察される。

(2) 好酸球・混合性炎症と細菌叢との関係、喀痰症状との関係

喘息（全例 FEV₁/FVC<0.7、高用量 ICS に併用薬を要する重症例を 44%に含む）COPD、ACO 群で異なる細菌叢として、COPD で *Bacteroidetes* 門と *Porphyromonas* 属の占有率が、喘息・ACO 群に比し有意に高く、年齢等で補正後も同様であった。また FEV₁<50%の高度気流閉塞群は多様性が低下し、*Streptococcus* 属の高占有率と関連した。他に細菌叢の群間差はなく、以下炎症型の解析では 3 群をまとめて解析した。

喀痰好中球増多は *-Proteobacteria* 綱、*Haemophilus* 属の高占有率と関連し、いずれも疾患等で補正後も有意であった。一方、喀痰顆粒球率から、乏炎症型、好酸球優位型、好中球優位型、混合性炎症型の 4 群に層別化したところ、*-Proteobacteria* 綱、*Haemophilus* 属の占有率は混合型、好中球型の順であり、喀痰中に好酸球が軽度出現していてもグラム陰性桿菌が定着し混合性炎症を呈すると考えられた。また *Haemophilus* 属が高占有率（上位 1/4）例の 2 型炎症指標の平均値は残りの症例と同等～低い傾向ながら、喀痰好酸球比率は平均(SD) 4.9 (5.0) %、末梢血好酸球数は 337 (211) / μ L、呼気 NO(現喫煙者除く)は 42(26) ppb といずれもいわゆる 2 型炎症指標高値であった。*-Proteobacteria* 綱や *Haemophilus* 属の占有率について、高低の弁別に最もよい喀痰好酸球比率は 7%であり、喀痰好酸球比率<2%、2~7%、7%<の 3 群に層別化すると、*Haemophilus* 属の占有率は 3 群で有意に異なり、喀痰好酸球 2~7%群(90%が混合性炎症型)で最も高く、7%<群で最も低かった(右図、喘息、ACO、COPD)。尚、喀痰好酸球比率<2%、2~7%、7%<の 3 群の末梢血好酸球数は平均(SD) 188(168)、291 (212)、563(554) / μ L、呼気 NO(現喫煙者除く)は平均(SD) 28 (17)、48 (29)、76 (56) ppb と 2~7%群でも 2 型炎症指標は高値であった。



最後に喀痰症状と炎症・細菌叢との関係について、CAT 喀痰項目の 3 点以上を痰症状あり、3 点未満を痰症状なしと定義して解析を行った。*-Proteobacteria* 綱、*Haemophilus* 属の占有率、喀痰好酸球比率、呼気 NO、末梢血好酸球数はいずれも痰症状あり例で、なし例に比し有意に高かった。喀痰好酸球比率<2%、2~7%、7%<の 3 群に層別化すると、2~7%群

で最も痰症状あり例が多かった。 *-Proteobacteria* 綱または *Haemophilus* 属の占有率、喀痰好酸球比率または呼気 NO(現喫煙者除く)は年齢、性別、胃食道逆流問診点数で補正後も、独立して痰症状ありに寄与した。喀痰グラム陰性桿菌、特に *Haemophilus* 属の高占有は混合性炎症との関連が強く、喀痰症状の出現にも寄与した。

重症喘息を含む閉塞性気道疾患例において、 *-Proteobacteria* 綱、 *Haemophilus* 属の喀痰での高占有は、好中球性気道炎症のみならず中等度までの好酸球性/2 型気道炎症(混合性炎症)や喀痰症状と関連した。すなわち混合性気道炎症例では、好酸球のみならずグラム陰性桿菌の定着の可能性も認識すべきと考える。 *-Proteobacteria* 綱、 *Haemophilus* 属の占有率と抗菌薬を要する増悪頻度に関連はなかったが、インフルエンザ桿菌が培養陽性となった 4 例は全例 *Haemophilus* 属の高占有例であり、不適切な管理下ではインフルエンザ桿菌量が増加し感染エピソードにつながる可能性も懸念される。近年重症喘息に対するアジスロマイシン投与例において、 *Haemophilus* 属の DNA 量がアジスロマイシンによる増悪抑制率と関連していた結果も報告されており、重症喘息において喀痰中 *Haemophilus* 属の占有率に注意する必要があると考えられる。以上、本研究結果は閉塞性気道疾患の長期管理において重要な知見と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kogo M, Matsumoto H, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 The importance of central airway dilatation in patients with bronchiolitis obliterans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ERJ Open Res	6. 最初と最後の頁 00123-2021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/23120541.00123-2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tashima N, Matsumoto H, et al.	4. 巻 70
2. 論文標題 Airway clearance ameliorated the control of diffuse panbronchiolitis accompanied by asthma and leukocytoclastic vasculitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 131-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2020.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Morimoto C, Matsumoto H, et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 High serum free IL-18 is associated with decreased omalizumab efficacy: findings from a 2-year omalizumab treatment study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Asthma	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02770903.2020.1766061.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okayama Y, Matsumoto H, et al.	4. 巻 69
2. 論文標題 Roles of omalizumab in various allergic diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 167-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2020.01.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Role of serum periostin in the management of asthma and its comorbidities.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respir Investig	6. 最初と最後の頁 144-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2020.02.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konishi S, Yano T, Tanaka H, Mizuno T, Kanoh H, Tsukita K, Namba T, Tamura A, Yonemura S, Gotoh S, Matsumoto H, Hirai T, Tsukita S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Vinculin is critical for the robustness of the epithelial cell sheet paracellular barrier for ions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900414.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sunadome H, Matsumoto H, Izuhara Y, Nagasaki T, Kanemitsu Y, Ishiyama Y, Morimoto C, Oguma T, Ito I, Murase K, Muro S, Kawaguchi T, Tabara Y, Chin K, Matsuda F, Hirai T.	4. 巻 69
2. 論文標題 Correlation between eosinophil count, its genetic background and body mass index: The Nagahama Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 46, 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2019.05.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Niwamoto T, Handa T, Matsui S, Yamamoto H, Yoshifuji H, Abe H, Matsumoto H, Kodama Y, Chiba T, Seno H, Mimori T, Hirai T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Phenotyping of IgG4-related diseases based on affected organ pattern: A multicenter cohort study using cluster analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 235-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1703522.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato R, Handa T, Matsumoto H, Kubo T, Hirai T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Clinical significance of self-reported cough intensity and frequency in patients with interstitial lung disease: a cross-sectional study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pulm Med	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12890-019-1012-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Cui, Shilei ; Ito, Isao ; Nakaji, Hitoshi; Iwata, Toshiyuki; Matsumoto, Hisako; Oguma, Tsuyoshi; Tajiri, Tomoko; Nagasaki, Tadao; Kanemitsu, Yoshihiro; Izuhara, Hiromi; Mishima, Michiaki; Niimi, Akio	4. 巻 263
2. 論文標題 Induction of airway remodeling and persistent cough by repeated citric acid exposure in a guinea pig cough model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Physiology & Neurobiology	6. 最初と最後の頁 1, 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resp.2019.02.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishi Kenta, Matsumoto Hisako, Tashima Noriyuki, Terada Satoru, Nomura Natsuko, Kogo Mariko, Morimoto Chie, Sunadome Hironobu, Nagasaki Tadao, Oguma Tsuyoshi, Nakatsuka Yoshinari, Murase Kimihiko, Kawaguchi Takahisa, Tabara Yasuharu, Sonomura Kazuhiro, Matsuda Fumihiko, Chin Kazuo, Hirai Toyohiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Impacts of lipid-related metabolites, adiposity, and genetic background on blood eosinophil counts: the Nagahama study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-94835-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe Naoya, Sato Susumu, Oguma Tsuyoshi, Shima Hiroshi, Sato Atsuyasu, Muro Shigeo, Hirai Toyohiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Associations of airway tree to lung volume ratio on computed tomography with lung function and symptoms in chronic obstructive pulmonary disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-019-1047-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森本千絵、松本久子 他
2. 発表標題 COPD・ACO・喘息例における喀痰細菌叢の検討
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本千絵、松本久子、他
2. 発表標題 COPD・ACO・喘息例における喀痰細菌叢の検討
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Morimoto C, Matsumoto H, et al.
2. 発表標題 Roles of sensitization to Staphylococcus enterotoxin in patients with bronchiectasis
3. 学会等名 Eur Respir Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Matsumoto H	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 5
3. 書名 Roles of periostin in asthma. In: Kudo A, editor: Periostin	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊藤 功朗 (Ito Isao) (40447975)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	小熊 毅 (Oguma Tsuyoshi) (50601324)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関