

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11205

研究課題名(和文) 中耳常在菌叢データベース構築と、難治性慢性中耳炎メタゲノム解析による新規治療開発

研究課題名(英文) Microbiomes of the Normal Middle Ear and Ears With Chronic Otitis Media

研究代表者

南 修司郎 (Minami, Shujiro)

独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・その他部局等・医師

研究者番号：00399544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：人間の体には、多種多様な細菌叢が存在するが、その多くが従来の培養法による細菌検査では同定困難な難培養微生物とされる。16S rRNAメタゲノム解析手法では、難培養微生物も含めた全ての細菌叢に含まれるDNAを丸ごと解析し、細菌を検出・同定することが可能である。人工内耳手術など中耳に炎症の無い耳科手術症例からと、慢性中耳炎症例から手術時に中耳スワブサンプルを採取し、中耳細菌叢のプロファイリングを行った。人間のの中耳は、これまで考えられていたよりも多くの細菌種が存在することが明らかになり、また細菌叢の変化が、活動性中耳炎と関連していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的1は世界で初めて人の中耳常在菌叢を明らかにすることである。目的2は慢性中耳炎の患者を対象に中耳細菌叢を明らかにすることである。中耳に炎症の無い耳科手術(人工内耳手術など)を行った66症例からと、慢性中耳炎患者88例より手術時に中耳スワブサンプルを採取し、16S rRNAメタゲノム解析を完了した。正常な中耳の粘膜表面上の最も豊富な細菌門は、Proteobacteriaであった。慢性中耳炎では、Firmicutesの割合が高かった。人間のの中耳は、これまで考えられていたよりも多くの細菌種が存在することが明らかになり、また細菌叢の変化が、活動性中耳炎と関連していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The human body is colonized by a wide variety of microorganisms. It was realized that most of these microorganisms cannot be grown under laboratory conditions. Recent advances in Next-Generation Sequencing technologies have provided new tools for characterizing the highly complex microbial communities that colonize various sites of the human body. The aim of this study was to profile and compare the middle ear microbiomes of human subjects with and without chronic otitis media. All consecutive patients undergoing tympanoplasty surgery for chronic otitis media or ear surgery for conditions other than otitis media were recruited. Sterile swab samples were collected from the middle ear mucosa during surgery. The human middle ear is inhabited by more diverse microbial communities than was previously thought. Alteration of the middle ear microbiome may contribute to the pathogenesis of chronic otitis media with active inflammation.

研究分野：耳科学

キーワード：中耳細菌叢 メタゲノム 16S rRNA 慢性中耳炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人間の体はさまざまな微生物によって細菌叢が形成されている。実臨床の現場では培養培地を使用して細菌種を増殖させ菌種を同定しているが、微生物の大部分が通常の培養条件では増殖できないことが分かっている。次世代シーケンシング技術の進歩により、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA メタゲノム解析では、難培養微生物も含めた全ての細菌叢に含まれる DNA を丸ごと解析し、細菌を検出・同定することが可能である。慢性中耳炎 (COM) は、真珠腫性と非真珠腫性に分類され、また活動性と非活動性に分類することができる。慢性中耳炎の耳漏から最も頻繁に培養される細菌は、*Staphylococcus aureus*、*Proteus* 種、*Klebsiella pneumoniae*、およびジフテロイドであるが、難培養微生物の関与も疑われる。正常な中耳粘膜 (NME) および COM の細菌叢は現在のところわかっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は世界で初めて人の中耳常在菌叢のプロファイルを明らかにすること、目的は慢性中耳炎の患者を対象に中耳細菌叢を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究は東京医療センター倫理委員会の承認を得て行われている。また全成人被験者および小児被験者の保護者に本研究について説明し同意を得ている。研究デザインは、中耳に炎症のない耳科手術症例と、慢性中耳炎の鼓室形成術症例から、中耳粘膜スワブを試料とし、16S rRNA メタゲノム解析を行う観察研究である。155 人の対象より中耳粘膜スワブサンプルを採取した。67 人が中耳に炎症の無い耳科手術 (聾に対する人工内耳、耳硬化症、アブミ骨手術、ベル麻痺に対する顔面神経減荷術、中耳奇形に対する鼓室形成術) を行った際に採取した正常中耳粘膜サンプルである。88 人が慢性中耳炎患者で、手術時に中耳スワブサンプルを採取した。慢性中耳炎患者 88 人中 44 人に耳漏を伴う活動性の炎症を認めた。

16S rRNA メタゲノム解析はサンプルより DNA 抽出後 16S 遺伝子の可変領域 V4 を含む領域の PCR 増幅およびシーケンスを行い、それぞれの配列間の類似度から菌種の特定や菌叢全体の構造を解析した。155 の中耳試料のうち、1 つの試料中に OUT (Operational taxonomic units) が検出されなかったため、この試験から排除した。複数のシーケンシングセットを使用し、サンプルからの PCR フラグメントの異なる量 (10 または 20ng) を使用したこともあったため、各サンプルのタクソン数は数百から 200,000 を大幅に変動した。これは、サンプル群間のデータの直接的な比較を複雑にするため、希薄化試験に基づいて、各サンプルから最初の 2,000 リードのタクソン数を選択した。サンプルの細菌密度が低い場合、NGS を用いた PCR に基づく 16S rRNA 解析では、コンタミネーションの細菌種を検出できるため、ネガティブコントロールで 1% 以上を占めた 11 OTU を引いて実際のバクテリア組成を決定した。そのため、1 つの正常な中耳のサンプルは、陰性対照の OTU を差し引いた後に不十分なデータ読み取り数 (50 未満) を示したため、今後の解析から除外した。また独特な属の組成を示したサンプルも外れ値とみなされ、解析には含めなかった。

4. 研究成果

合計で、152 の中耳の細菌組成物中に 272 個の OTU が割り当てられた。各グループで特定された上位 10 属は、ブドウ球菌属 (34%)、コリネバクテリウム属 (23%)、ラウルテラ属 (11%)、セルロシミロビウム属 (4%)、ペトニフィラス属 (3%)、アナロッカス属 (2%)、*Acinetobacter* (2%)、*Ochrobactrum* (2%)、*Turicella* (2%)、および *Pedomicrobium* (1%) であり、データの約 84% を占めていた。

小児および成人の中耳常在菌叢

9 歳未満の被験者では、正常な中耳粘膜の最も豊富な細菌門は Proteobacteria (57%)、Actinobacteria (28%)、Firmicutes (8%)、Bacteroidetes (4%) であった。14 歳以上の被験者では、正常な中耳の最も豊富な細菌門は、Proteobacteria (47%)、Actinobacteria (29%)、Firmicutes (19%)、Bacteroidetes (3%) であった。PERMANOVA 試験に示されるように、小児および成人の正常な中耳の微生物は有意に異なっていた。合計 136 の細菌属を正常な中耳に認めた。

非活動性の慢性中耳炎の中耳常在菌叢

真珠腫を伴わない非活動性 COM 粘膜における最も豊富な細菌門は、Proteobacteria (35%)、Firmicutes (32%)、Actinobacteria (29%)、Bacteroidetes (4%) であった。真珠腫を伴った非活動性 COM における最も豊富な細菌門は、Proteobacteria (60%)、Actinobacteria (24%)、Firmicutes (13%) および Bacteroidetes (3%) であった。これらの 2 つの非活動性 COM 群は、互いに有意に違いはなかった。真珠腫のない非活動性 COM は、正常な小児群と有意差は認められたが、正常な成人群とは有意差はなかった。真珠腫を伴う非活動性 COM は、正常な小児または成人群と有意な差は認めなかった。合計 112 の属が、非活動性 COM を有する被験者の細菌叢に示された。

活動性の慢性中耳炎の中耳常在菌叢

真珠腫を伴わない活動性 COM 粘膜における最も豊富な細菌門は Firmicutes (36%)、Actinobacteria (31%)、Probobacteria (29%)、Bacteroidetes (2%) であった。真珠腫を伴う活動性患者では、Firmicutes が再び最も豊富で (50%)、Actinobacteria (33%)、Probobacteria (15%)、Bacteroidetes (1%) であった。この 2 群では、有意な差はなかったが、小児および成人の中耳常在菌叢および真珠腫を伴う非活動性 COM とは有意な差を認めた。

活動性 COM 群は、真珠腫のない非活動性 COM と有意差はなかった。活動性の慢性中耳炎の中耳常在菌叢として合計で 117 属が示された。

<考察>

出生以来、外界にさらされているヒトの体は、数多くの種類の微生物がコロニー形成されている。本研究では、小児および成人の中耳常在菌叢で優勢なのは Proteobacteria 門であった。しかし、いくつかの正常中耳の成人検体から Staphylococcus 属 (Firmicutes phylum) の発生率が増加しており、PERMANOVA 分析では NME 小児と成人で有意差が認められた。これらの差は、ブドウ球菌による鼻内コロニー形成が鼻炎などの事象で中耳の細菌叢を変える可能性が考えられる。非活動性 COM の中耳細菌叢は、成人中耳常在菌叢のものと大きく異なるものではなかった。非活動性 COM のいくつかは、ブドウ球菌 (Firmicutes phylum) またはコリネバクテリウム (Actinobacteria phylum) が優勢であった。

活動性 COM を有する患者は、Proteobacteria 門細菌の発生率が低く、Firmicutes 門の発生率は常在菌叢よりも高かった。中耳細菌叢のこの変化が、COM における活動性に寄与していると推測している。我々はまた、Firmicutes のブドウ球菌属およびペプチニッフィルス属が、活動性 COM で頻繁に認めることを見出した。鼓膜の慢性穿孔や真珠腫ポケットを介して外耳道から中耳に入ることが推測される。

<結語>

この研究で明らかにされた中耳常在菌叢および COM の微生物学的プロファイルは、COM の正確な病原性、活動性 COM のメカニズム、および COM の有効な治療法の開発および予防するための手段を提供すると考えている。COM 治療の前後における中耳の細菌性疾患の移行を評価する縦断的研究を含む追加の研究が必要である。

5 . 主な発表論文等

1. Minami SB, Mutai H, et al. Microbiomes of the normal middle ear and ears with chronic otitis media. *Laryngoscope*. 2017 Oct;127(10):E371-E377.
2. Shujiro B. Minami, Hideki Mutai, et al. Microbiomes of the Normal Middle Ear and Ears with Chronic Otitis Media. AAO-HNSF 2017 Annual Meeting, Chicago, 2017 年 9 月 10 日
3. 南修司郎, 務台英樹 中耳細菌叢のメタ 16S 解析 実験医学別冊 NGS アプリケーション メタゲノム解析 実験プロトコール (服部正平 編) 88-92 羊土社 2016

〔雑誌論文〕(計 7 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

〔図書〕(計 2 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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：務台英樹

ローマ字氏名：Mutai Hideki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。