

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2023

課題番号：17K11400

研究課題名(和文)扁桃陰窩細菌叢の群集解析による、扁桃炎反復・重症化の多細菌性発症モデルの検討

研究課題名(英文) Investigation of polybacterial onset model of tonsillitis repetition and severity by crowd analysis of tonsil crypt microflora

研究代表者

平岡 政信 (Masanobu, HIRAOKA)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80423945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：反復性・重症扁桃炎の陰窩細菌叢に対し菌叢解析を行い、扁桃炎発症の多細菌性発病モデルにつき新たな知見をもたらすことを目的として、扁桃摘出術41症例より、両側性に扁桃表面スワブ、陰窩深部より吸引採取したdebris検体を採取した。また、手術摘出標本より、組織片を採取し扁桃表面と陰窩深部に生息する陰窩深部より採取して、UCSD Microbiome CoreにてDNA抽出と次世代シーケンサーを用いた配列解析を行った。配列情報は、クラウドサービスのQiitaにアップロードした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

扁桃炎反復の機序解析を目的として、我々は、歯周病原菌とされる嫌気性菌Red Complexがsupporterとして陰窩に慢性炎症状態を作りだし、宿主粘膜上皮に細胞内寄生した化膿レンサ球菌(GAS)などのpathogenの増殖、組織内侵入を促し、二者を抑制するcompetitor乳酸菌との相互作用により発病に至るという多細菌性発症モデルを想定し実験をおこなった。この成果は陰窩洗浄などの抗biofilm治療やprobioticsの扁桃炎予防効果の根拠となると考える。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze the bacterial flora in the crypts of patients with recurrent and severe tonsillitis and to provide new insights into a multibacterial model of tonsillitis pathogenesis, debris samples were collected bilaterally from 41 tonsillectomy cases by swabbing the surface of the tonsils and aspirating from the deep crypts. Tissue fragments were also collected from surgical specimens and from the deep crypts inhabiting the tonsil surface and the deep crypts, and DNA extraction and sequence analysis using a next-generation sequencer with UCSD Microbiome Core were performed. Sequence information was uploaded to Qiita, a cloud service.

研究分野：菌叢解析

キーワード：microbiome 16S tonsil 菌叢解析 扁桃炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

扁桃炎の病原菌を同定・評価する上で、扁桃陰窩からの細菌検出については様々な議論が行われてきた。成人で頻出する細菌は、連鎖球菌およびブドウ球菌、嫌気性菌であり(第4回耳鼻咽喉科領域感染症臨床分離菌全国サーベイランス結果報告, 2009)、インフルエンザ菌の増加が指摘されている。しかし、起炎菌とされる溶連菌が扁桃陰窩培養より検出されることは少なく、何が扁桃炎を起こしているのかは、議論となってきた。培養検査において菌絶対量の増加があり、菌種が多種に渡る場合には、病原菌の特定に難渋し単一菌による炎症と断定しがたいことも多い。また、咽頭拭い液や扁桃擦過検体などを用いたルーティーン検査において、コスト・手技上の問題から嫌気培養は通常行われないため、病態に対する嫌気性菌の関与を評価することは困難である。

抽出 DNA を用いた非培養検査である菌叢解析では、嫌気性菌を含む多種多様な細菌叢全体が評価可能であり、菌叢構成の乱れや細菌間相互作用を想定した構成比の記述ができるため、多細菌性発症を視野にいれた扁桃炎機序解明に、新たな視点をもたらすと考えられた。

### 2. 研究の目的

菌叢全体の把握、構成変化を評価し、病原体、常在菌、宿主免疫能のバランスシートを検討する上で、菌叢解析は有用なツールであると考えられる。また、常在菌回復を指標とした抗菌薬適正使用の、新しい評価法となる可能性が示唆されていた。本研究では、反復性・重症扁桃炎の陰窩細菌叢に対し菌叢解析を行い、コントロールとして睡眠時無呼吸症候群(扁桃肥大)群と比較することで、扁桃炎発症における多細菌性発病モデルと溶連菌検出の関係につき新たな知見をもたらすことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、手術適応となる、反復性(重症)扁桃炎患者、扁桃病巣感染症患者、睡眠時無呼吸症患者より採取した検体に対し、細菌培養検査と、次世代シーケンサーを用いた 16SrDNA の超可変領域の配列解析を行った。

扁桃摘出術 41 症例に対して、両側摘出扁桃から無菌的に検体採取した。手術時に、扁桃表面スワブ、陰窩深部より吸引採取した debris(生理食塩水 200ul で調整し、一部はスワブを採取)、メスで無菌的に切り出した陰窩深部組織片を両側同時に採取した。扁桃表面と陰窩深部に生息する生菌の比較のため、病院検査での培養提出を行った。陰窩深部より採取した debris と組織片は、-30 度保存し、検体がすべて集まった状態で、外注検査へ提出した。UCSD Microbiome Core より得たデータは、クラウドサービスである Qiita へアップロードした。

### 4. 研究成果

2022 年 11 月から 2023 年 10 月において、和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科頭頸部外科でおこなった、全麻下、両口蓋扁桃摘出術症例 (n=41) より、検体を採取した。年齢性別等の基礎データは右のとおりである。

age	case
0-6	7
7-15	5
16-	29

23.3 ± 14.7 y.o.

sex	case
m	13
f	28

m:f = 1:2.2

疾患は 4 種類にわかれる(睡眠時無呼吸;OSAS、反復性扁桃炎;RT、IgA 腎症;IgAGN、掌蹠膿疱症;PPP) が、扁桃病巣感染症は慢性扁桃炎;chr. tonsillitis としてまとめ、3 群(扁桃肥大群 12 例、反復性扁桃炎群 19 例、慢性扁桃炎群 10 例)での比較を行うこととした。

扁桃表面、陰窩深部 debris、陰窩深部組織片の抽出 DNA、82 サンプルはユニバーサルプライマーを用いた 16SrDNA 領域の配列解析を行い、FASTQ ファイルとして、クラウドサービス Qiita へアップロードした。

group	case
OSAS	12
RT	19
IgAN	9
PPP	1

subgroup	case
hyperplasia	12
RT	19
chr. tonsillitis	10

今後、以下の処理を行う予定である。

wet 解析終了後のデータを開始検体として qiime2 パイプラインに沿って処理を行う。Qiita 上

でFASTQファイルから、96wellのうち必要なサンプルのみをsplitする。次に150bpへのtrimming, デフォルト設定でのdeblurを経てBIOMファイルを作成する。ウィンドウズ10上でVirtual machineを置き、ubuntuをOSとしてQiime2を実行する。コード編集・スクリプトを実行にはjupyter notebookを用い、データはEBI-ENAに登録、公開することを前提としたフォーマットとしている。

データベースの選定としては、green genes97%一致を優先とした。また、適宜チュートリアルを参考にし、Qiime2フォーラム等で質問を行った。

2014年7月から2016年11月に予備実験を行った。和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科にて、両口蓋扁桃摘出術を施行した成人9例(17-60歳, 中央値34歳)、小児1例(男性5例、女性5例)を用いた。

症例の年齢性別、疾患、培養結果は右の表に示した。

ID	age	sex	Diagnosis	culture
W-11	31	M	反復性扁桃炎	-
W-01	17	F	反復性扁桃炎	<i>S. gaolactiae</i>
W-10	34	M	反復性扁桃炎	<i>a-st-g. CNS, H. parainfluenzae, H. haeliticus, Veillonella parvula</i>
W-02	29	M	IgA腎症	-
W-03	17	F	IgA腎症	<i>MSSA, a-st-gs. Neisseria sp.</i>
W-05	34	F	IgA腎症	-
W-04	60	F	掌蹠膿疱症	<i>Paureginosa, MRSA,</i>
W-09	34	F	掌蹠膿疱症	<i>MSSA, E. cloacae, a-st-gs, Neisseria sp., H. parainfluenzae, Prevotella sp.</i>
W-07	42	M	OSAS	<i>a-st-gs. CNS, Neisseria sp.</i>
W-08	4	M	OSAS	<i>MSSA, H.parainfluenzae, a-st-gs</i>

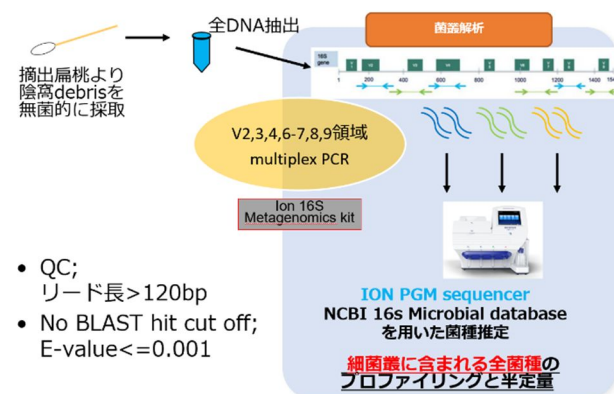
症例の年齢性別、疾患、培養結果は右の表に示した。

16SrDNA 超可変領域として、V2-9 を選択した(右図)

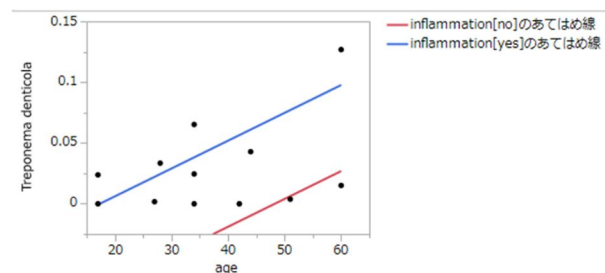
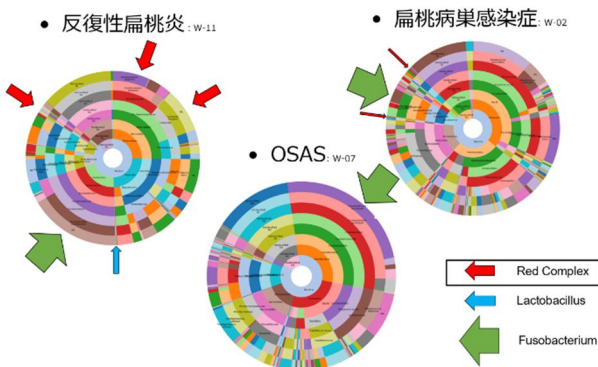
3群における菌叢結果をSunBurst図で示すと、培養検査では検出されにくい、*Fusobacterium nucleatum* は、すべての群で検出され(1.3-25.5%)、保菌あるいは病態への関与が疑われた。

群間の年齢調整を考慮して、有意差検定をおこなった。supporter と考えられる乳酸菌の比率は3群間で差が見られなかったが、歯周病関連偏性嫌気性菌(Red Complex)の比率では、反復性扁桃炎、扁桃病巣感染症群は、OSAS群と比較し、検出率が高く、炎症症例の方が、非炎症症例より、*Treponema denticola* の占有率が0.035(3.5%)高くなった( $p<0.01$ )。炎症を反復、遷延している扁桃陰窩においては、寛解期においてもRed Complexが増加しており、病原菌による感染発症をsupportしている可能性が示唆された。

パイロットデータで、RedComplexを含む複数菌での扁桃炎発症機序が推定されており、今後、本データを用い、標準的な解析方法である、Qiime2パイプラインに従って解析を進める予定である。



- QC;
- リード長>120bp
- No BLAST hit cut off;
- E-value<=0.001



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平岡政信
2. 発表標題 反復性扁桃炎における、扁桃陰窩細菌叢のRed Complexの増加と乳酸菌carbonhydrate utilization geneの発現
3. 学会等名 耳鼻咽喉科免疫アレルギー
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔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	杉田 玄  (Sugita Gen)  (20407274)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員   (24701)	
研究分担者	河野 正充  (Kouno Masamitsu)  (20511570)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授   (24701)	
研究分担者	保富 宗城  (Hotomi Muneki)  (90336892)	和歌山県立医科大学・医学部・教授   (24701)	

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
---------	---------