

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19734

研究課題名(和文)機械学習を用いたスギ舌下免疫療法に最適な鼻腔細菌叢モデル作成

研究課題名(英文) Ideal nasal microbiome for the treatment of sublingual immunotherapy of Japanese cedar by machine learning

研究代表者

藤枝 重治 (Fujieda, Shigeharu)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：30238539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：スギ舌下免疫患者105名の鼻腔の細菌叢を16S rRNAシーケンスで求め、舌下免疫療法の治療効果と検討した。スギ舌下免疫患者の鼻腔からは、Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria、Unclassified、Fusobacteria、Actinobacteriaの順で検出できた。舌下免疫療法で効果の高かった群と効果のなかった群を比較検討すると、鼻腔内細菌叢に2種類の嫌気性菌が検出された患者では舌下免疫療法の効果が有意に高かった。以上の結果からこの2種類の嫌気性菌は鼻内善玉菌であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2種類の嫌気性菌が、鼻内善玉菌であることが判明した。このことはこの2種類の菌を使った細菌カクテルの重要な成分であることを示している。しかしこれらが、どのような作用によって舌下免疫療法に相乗的な効果を認めるのかは、現在は不明である。これまで衛生仮説によって、TLR刺激が舌下免疫療法の治療効果に影響を及ぼすのかも知れないが、今後も検討していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Nasal microbiome was performed in the 105 Japanese cedar pollinosis patients treated with sublingual immunotherapy (SLIT) by 16S rRNA sequencing. At phylum level, nasal microbiome was composed of Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Unclassified, Fusobacteria, Actinobacteria, followed by others, suggesting that Firmicutes, Bacteroidetes, and Proteobacteria are three major phyla in Japanese. The composition ratio of two types of anaerobic bacteria was significantly higher in asymptomatic patients as compared with symptomatic patients after SLIT. These results showed that two types of anaerobic bacteria in the nose may be the probiotics for allergic rhinitis.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：花粉症 舌下免疫療法 細菌叢 マイクロバイオーム 花粉症治療 善玉菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症は、国民の約 4 割が発症している国民病であるが、その中で内服薬の効果に乏しい重症患者が舌下免疫療法を希望する。舌下免疫療法は唯一根治性のある治療として注目されているが、7 割に有効性が認められる一方で、2 年以上の長期治療にも関わらず 3 割程度は効果が乏しく、治療効果が予測できないため、十分な普及には至っていない。近年、酪酸菌を同時投与することによる相乗効果が報告されており、免疫療法の治療効果に関わる細菌叢があることが推察される。現在、消化管アレルギー性疾患では、腸内細菌叢破綻を回復するために健康なヒト糞便を患者へ移植する「糞便移植法」が行われ有効性が確認されている。さらにマウス実験では、17 株の善玉菌を集めた細菌カクテルを用いて糞便移植による治療効果が確認されている。アトピー性皮膚炎では、皮膚善玉菌の皮膚移植による治療効果が報告されている。アレルギー性鼻炎でも同様に、健康な鼻腔細菌叢から善玉菌を集めた細菌カクテルを作成し、患者の鼻腔へ移植することによって、従来の免疫療法の根治性を高めることを着想した。今まで腸内細菌では消化管疾患に関連する善玉菌の存在が指摘されているが、鼻腔ではほとんど報告がない。鼻疾患に関連する鼻内善玉菌の存在を示すことができれば、花粉症のほかにも副鼻腔炎など全ての鼻疾患において鼻内善玉菌が新たな治療ターゲットとなる可能性を秘めている。さらに、鼻内善玉菌を集めた細菌カクテルによる鼻腔細菌移植法は、花粉症に対する新たな治療法の開発であり、本研究が免疫療法の根治率を高めることにつながれば、花粉症の他にも気管支喘息など免疫療法によって多くのアレルギー疾患の克服が可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究の第一の目的として、舌下免疫療法の治療効果を高めるために、鼻内善玉菌を集めた細菌カクテルを作成し、鼻腔細菌移植法の開発を目指す。具体的には、スギ花粉症舌下免疫療法患者の鼻腔内の細菌叢解析を行い、治療への応答性・非応答性で患者の細菌叢を比較し「鼻内善玉菌」を選定する。さらに今後の展望として、選定した「鼻内善玉菌」を培養実験や動物実験で効果や副反応を確認し、善玉菌を菌種混合した細菌カクテルを作成し、鼻腔細菌移植法へ応用することを想定している。また、舌下免疫療法は 7 割に有効である一方で、2 年以上の長期治療を必要とするにも関わらず 3 割程度は効果が乏しく、治療前に効果予測ができない。そこで第二の目的として、得られる細菌叢データから、機械学習を用いて細菌叢から治療効果を予測する「予測モデル」を作成し、舌下免疫療法の開始前に治療効果を予測するシステムを構築する。

### 3. 研究の方法

本研究の対象は福井大学医学部附属病院、ゆたクリニックに通院しているスギ花粉舌下免疫療法患者 100 名とした。(1) 対象患者から、臨床データ(症状・薬物スコア)を収集し治療効果を判定した。(2) 対象患者から、鼻腔細菌を採取し、次世代シーケンサーMiSeq で細菌叢を解析した。(3) 治療への応答性・非応答性と細菌叢との関連解析を行い、治療効果に関連する鼻腔内における「鼻内善玉菌」を選定した。(4) 機械学習を用いて、治療効果と細菌叢データを使用し、細菌叢から治療効果を予測する「予測モデル」を作成した。

### 4. 研究成果

スギ舌下免疫患者 105 名の鼻腔から、滅菌綿棒を使用してブラッシングし鼻腔細菌叢を採取した。採取した検体から細菌由来 DNA を自動抽出機器 QIAcube により抽出を行った。抽出された DNA を使用してライブラリを作成し、次世代シーケンサーMiSeq を用いて 16S rRNA シークエ

ンスを行い、得られた塩基配列データはソフトウェア QIIME (Caporaso, Nat Method 2010) ・ Metagenome@KIN (World Fusion) を使用して、細菌の種レベルまで系統分類した。抽出した DNA 量と質は十分であった。同定できた細菌の門レベルでは、*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、Unclassified、*Fusobacteria*、*Actinobacteria* で順であった。舌下免疫療法を施行した患者においてその治療効果を VAS によるアンケート調査で検討した。舌下免疫療法で効果の高かった群と効果のなかった群を比較検討すると、鼻腔内細菌叢に 2 種類の嫌気性菌が検出された患者では舌下免疫療法の効果が有意に高かった。

以上の結果からこの 2 種類の嫌気性菌は鼻内善玉菌であることが判明した。しかしこれらの嫌気性菌が、どのような作用によって舌下免疫療法に相乗的な効果を認めるのかは、現在は不明である。これまで衛生仮説によって、TLR 刺激が舌下免疫療法の治療効果に影響を及ぼすのかも知れないが、今後も検討していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Osawa Y, Fujieda S, et al	4. 巻 69
2. 論文標題 Epidemiological study of oral allergy syndrome in birch pollen dispersal-free regions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int	6. 最初と最後の頁 246-252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.09.008.	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 Gotoh M, Fujieda S, et al.	4. 巻 69
2. 論文標題 Safety profile and immunological response of dual sublingual immunotherapy with house dust mite tablet and Japanese cedar pollen tablet.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Allergol Int.	6. 最初と最後の頁 104-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.alit.2019.07.007.	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 Fujieda S, Kato Y, Ninomiya T.	4. 巻 67
2. 論文標題 ALLERGIC RHINITIS・CHRONIC RHINOSINUSITIS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arerugi.	6. 最初と最後の頁 1379-1386.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15036/arerugi.67.1379.	査読の有無 無
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 Okamoto Y, Fujieda S, Okano M, Hida H, Kakudo S, Masuyama K.	4. 巻 30
2. 論文標題 Efficacy of house dust mite sublingual tablet in the treatment of allergic rhinoconjunctivitis: A randomized trial in a pediatric population.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatr Allergy Immunol.	6. 最初と最後の頁 66-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pai.12984.	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 Sakashita M, Fujieda S.	4. 巻 67
2. 論文標題 MECHANISMS OF ALLERGEN IMMUNOTHERAPY FOR INHALED ALLERGENS AND CLINICAL BIOMARKERS	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Alerugi.	6. 最初と最後の頁 987-994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15036/arerugi.67.987.	査読の有無 無
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 Imoto Y, Takabayashi T, Sakashita M, Tokunaga T, Morikawa T, Ninomiya T, Okamoto M, Narita N, Fujieda S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Combination therapy with montelukast and loratadine alleviates pharyngolaryngeal symptoms related to seasonal allergic rhinitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol Pract.	6. 最初と最後の頁 1068-1070
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaip.2018.07.034.	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤枝重治
2. 発表標題 難治性アレルギー性鼻炎、難治性花粉症の定義付けとガイドラインへの反映
3. 学会等名 第121回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤枝重治
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎の先制医療
3. 学会等名 第1回日本アレルギー学会中国・四国地方部会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤枝重治
2. 発表標題 アレルギー性鼻炎の先制医療
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019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	二之宮 貴裕  (Ninomiya Takahiro)  (30796199)	福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員   (13401)	
研究 分担者	野口 恵美子  (Noguchi Emiko)  (40344882)	筑波大学・医学医療系・教授   (12102)	