

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08173

研究課題名（和文）次世代シーケンサーとクローンライブラリー法によるPFAPA症候群の咽頭細菌叢解析

研究課題名（英文）Investigation on pharyngeal bacterial flora in patients with PFAPA syndrome using next-generation sequencer and clone library analysis

研究代表者

楠原 浩一（Kusuhara, Koichi）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：20243941

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）：PFAPA症候群患者から採取した咽頭ぬぐい液について16S ribosomal RNA遺伝子を標的とした網羅的細菌叢解析を行った。クローンライブラリー法では、発熱発作時においてはStreptococcus属が最優占菌種となる割合が発作間欠期よりも低かったが、シメチジン内服群では発熱発作時におけるその割合が上昇していた。次世代シーケンサーでは、Simpson Indexは、発熱発作時と発作間欠期、発熱発作時におけるシメチジン内服なしとありで有意差を認めなかった。LEfSe法による解析では、発熱発作時より発作間欠期で、シメチジン内服なし群よりあり群で、それぞれ特定の属が有意に高頻度で検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PFAPA症候群患者の咽頭細菌叢を発熱発作時と発作間欠期及びシメチジン内服の有無で比較し、細菌叢の多様度には違いがないがStreptococcus属が最優占菌種となる割合が異なること、発作間欠期全体、シメチジン内服例発熱発作時および発熱間欠期のそれぞれにおいて特定の細菌属が有意に高頻度で検出されることが明らかになった。これらの結果は、Streptococcus属の優占度と発熱発作との関連及びシメチジン内服による細菌叢の変化を示唆しており、本症における発熱発作の発生やそのシメチジンによる予防の機序解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We performed comprehensive analyses of bacterial flora targeting 16S ribosomal RNA gene in throat swab samples from PFAPA patients. Clone library analyses revealed that frequency of samples with genus Streptococcus being the most prevalent was lower in samples during febrile attack than those at intermittent period and that during febrile attack became higher in samples from patients with cimetidine prophylaxis than in those without. In analyses using next-generation sequencer, Simpson indexes were not significantly different between samples during febrile attack and at intermittent period or between samples from patients with cimetidine prophylaxis and those without. LEfSe analyses revealed that a specific genus was detected significantly more frequently in samples at intermittent period than those during febrile attack. Furthermore, other specific genera were detected significantly more frequently in samples from patients with cimetidine prophylaxis than those without.

研究分野：小児感染免疫学

キーワード：PFAPA症候群 咽頭 次世代シーケンサー クローンライブラリー 自己炎症性疾患 16S ribosomal RNA 細菌叢 網羅的

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis) 症候群は、アフタ性口内炎、咽頭炎、頸部リンパ節炎を伴って周期性発熱を繰り返す周期性発熱症候群である。1989年に Marshall らにより新しい疾患概念として提唱され、その後国内外で広く認識されるようになった自己炎症疾患であるが、現時点では、病因、病態は不明であり、診断に有用なバイオマーカーも判明していない。依然、他の発熱性疾患と鑑別することが容易ではなく、発熱発作を繰り返すことで本疾患を疑われ、Thomas らの報告した診断基準を用いて診断されるが、不要な抗菌薬使用や入院が繰り返されているのが現状である。治療法としては、シメチジン、ステロイド、扁桃摘出術が行われている。

PFAPA 症候群の病因は不明であり、これまで抑制性 T 細胞や好中球、組織球の異常などが推定されていた。近年の研究では、IL-1 産生の制御異常が本症の病態に関与しているという仮説を支持する成績が得られている (Brown et al. BMC Pediatr, 2010; Stojanov et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2011)。IL-1 産生の制御は、インフラマソームと呼ばれる分子複合体と密接に関連しており、インフラマソームは微生物の存在などの環境の刺激によって活性化される (Joly et al. J Immunol, 2009; Witzenthath et al. J Immunol, 2011)。しかし、本症の発症における微生物の関与については明らかではない。

発熱発作時は、咽頭炎および扁桃炎の所見を認めることが多いが、咽頭ぬぐい液の細菌培養では A 群溶血連鎖球菌やアデノウイルスなどの両疾患の原因となる微生物は検出されず、これまで PFAPA 症候群の原因として特定の病原体は同定されていない。一方、メカニズムは明らかになっていないが、PFAPA 症候群の治療として扁桃摘出術が有効であることが知られている。PFAPA 症候群の発症機序を知る手がかりを得る目的で、手術の際に摘出した口蓋扁桃の細菌学的解析が行われている。一般細菌培養による解析では、PFAPA 症候群患者の口蓋扁桃において黄色ブドウ球菌の分離率が対照群より有意に多かったと報告されている (Lantto et al. APMIS, 2015)。次世代シーケンサーを用いた細菌叢の解析では、*Cyanobacteria* の検出率と優占度が PFAPA 患者で高かったと報告されている (Tejesvi et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016)。しかし、これらの報告では、PFAPA 症候群の発症に直接関与していると考えられる細菌や細菌叢の特徴は見出されておらず、また、手術の際に摘出した扁桃を対象に行われたものであるため、発熱発作時の細菌叢に関しては解析されていない。

近年、probiotics の 1 つである口腔内常在菌 *Streptococcus salivarius* K12 株の使用が PFAPA 症候群の発熱発作の予防または軽減に有効であったことが報告された (Di Pierro et al. Altern Integr Med, 2016)。このことは、咽頭の常在細菌叢を変化させることにより PFAPA の病態を修飾させることができることを示すとともに、咽頭の常在細菌叢と PFAPA 症候群の発熱発作が関連している可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

PFAPA 症候群の発症機序や病態における咽頭常在細菌叢の役割を細菌の 16S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子をターゲットとした網羅的細菌叢解析法 (クローンライブラリー法及び次世代シーケンサー) を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象者からの検体採取

当科を受診し、本人または家族から同意が得られた PFAPA 症候群患者小児を対象とし、発熱発作時及び発作間欠期に咽頭ぬぐい液を採取した。

(2) 咽頭ぬぐい液の処理と細菌叢解析

- 1) 検体中に存在する細菌を 3% ドデシル硫酸ナトリウムにビーズ破砕法を用いて溶菌
- 2) quality control のため、臭化エチジウム (ethidium bromide) を用いた蛍光染色法により溶菌前後の菌数を計測し、溶菌効率を算出
- 3) DNA の抽出および精製
- 4) クローンライブラリー法による細菌叢解析
ユニバーサルプライマーを用いて 16S rRNA 遺伝子の部分断片 (約 600bp) を PCR により網羅的に増幅
4) の増幅産物から大腸菌を用いてクローンライブラリーを作成
クローン化された増幅産物の塩基配列の決定
細菌の基準株の 16S rRNA 遺伝子データベース (Ribosomal Database Project II) を基準として BLAST (Basic Local Alignment Searching Tools) アルゴリズムを用いて、決定した各塩基配列の相同性検索を行い、最も相同性の高い菌種を推定
- 5) 次世代シーケンサーによる細菌叢解析
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix を用いた 16S rRNA 遺伝子の増幅
TapeStation で の増幅産物の確認

4. 研究成果

(1) 対象検体

PFAPA 症候群患者から採取した咽頭ぬぐい液 25 検体を、発熱発作時検体 14 検体 (シメチジン内服なし [A-1 群] 6 検体、シメチジン内服あり [A-2 群] 8 検体)、発作間欠期 11 検体 (シメチジン内服なし [B-1 群] 3 検体、シメチジン内服あり [B-2 群] 8 検体) に分けて解析した。

(2) クローンライブラリー法による解析結果

第 1 優占菌種は、A-1 群では 3 検体で *Prevotella* 属 (36.5%、20.7%、12.8%)、残る 3 検体で各々 *Streptococcus* 属 (44.2%)、*Prevotellamassilia* 属 (31.5%)、*Fusobacterium* 属 (15.8%)、A-2 群では 3 検体で *Streptococcus* 属 (37.2%、27.7%、12.9%)、3 検体で *Fusobacterium* 属 (44.7%、35.5%、30.1%)、2 検体で *Prevotella* 属 (28.0%、22.3%)、B-1 群では 3 検体とも *Streptococcus* 属 (25.5%、21.1%、13.5%、全て *S. salivarius*)、B-2 群では 5 検体で *Streptococcus* 属 (49.5%、40.6%、33.7%、21.7%、18.9%)、残る 3 検体で各々 *Prevotella* 属 (28.4%)、*Prevotellamassilia* 属 (14.6%)、*Fusobacterium* 属 (11.7%) であった。以上より、発熱発作時においては *Streptococcus* 属が第 1 優占菌種となる割合が発作間欠期よりも低い、シメチジン内服群では発熱発作時におけるその割合が上昇していた。

(3) 次世代シーケンサーによる解析結果

1) 細菌叢の多様度

α 多様度の指標である Simpson Index の平均値は、発熱発作時 (A-1 群 + A-2 群) は 0.942、発作間欠期 (B-1 群 + B-2 群) は 0.938 であり、ほぼ同等であった。発熱発作時で比較すると、シメチジン内服なし (A-1 群) は 0.929、シメチジン内服あり (A-2 群) は 0.952 で、後者が高い傾向がみられたが、有意差は認めなかった。

2) LefSe (Linear discriminant analysis effect size) 法による解析

発熱発作時と発作間欠期の比較では、発作間欠期に *Actinobacillus* 属が有意に高頻度で検出された (図 1)。発熱発作時におけるシメチジン内服なしと内服ありの比較では、内服あり例において 5 種の細菌が有意に高頻度で検出された (図 2)。発熱間欠期におけるシメチジン内服なしと内服ありの比較では、内服あり例において 11 種の細菌が有意に高頻度で検出された (図 3)。これらの 5 種と 11 種に共通して含まれる属はなかったが、シメチジンの内服による細菌叢の変化が治療効果と関連している可能性が考えられた。

図 1 LefSe 法による発熱発作時と発作間欠期の細菌叢の比較

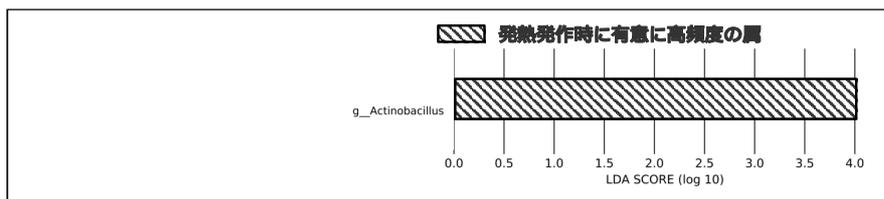


図 2 LefSe 法による発熱発作時におけるシメチジン内服の有無での比較

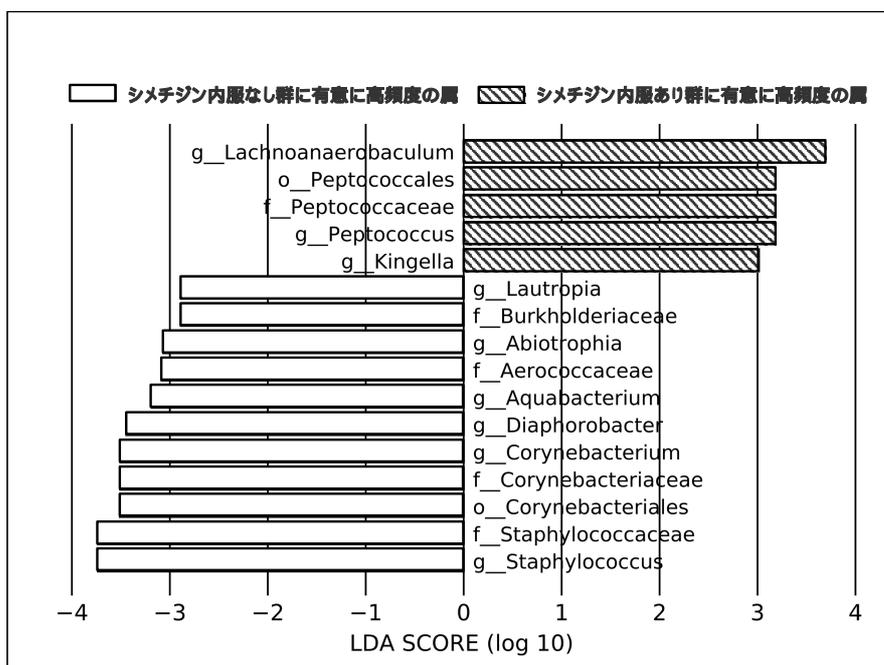
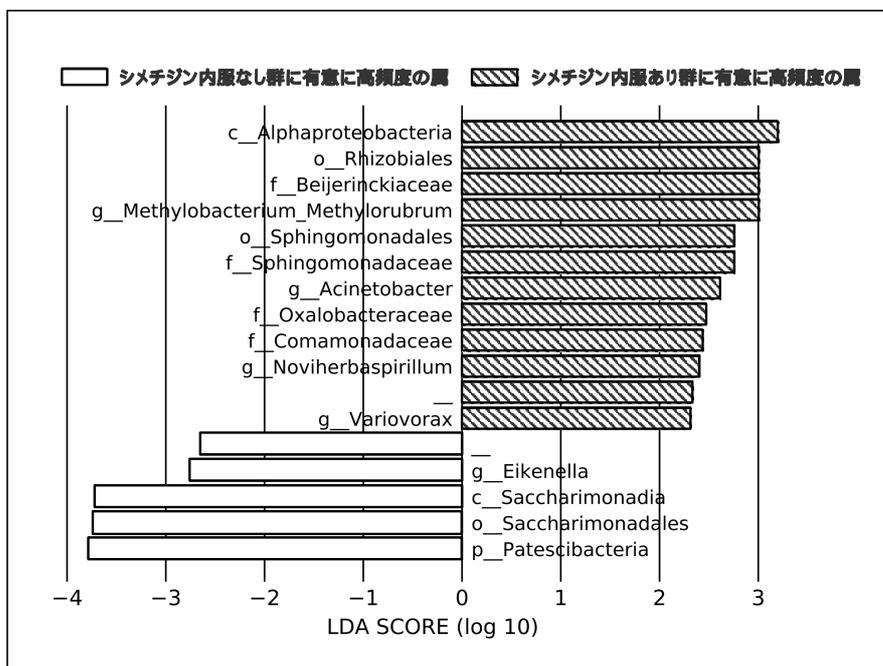


図3 LfSe 法による発熱間欠時におけるシメチジン内服の有無での比較



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ogawa M, Hoshina T, Abushawish A, Kusuhara K.	4. 巻 S1684-1182(23)00113-5
2. 論文標題 Evaluation of the usefulness of culture of induced sputum and the optimal timing for the collection of a good-quality sputum sample to identify causative pathogen of community-acquired pneumonia in young children: A prospective observational study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Microbiol Immunol Infect (Online ahead of print)	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmii.2023.05.005	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 Abushawish A, Haro K, Hoshina T, Kitajima N, Kusuhara K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Environmental factors related to differences in the microbiota in the upper respiratory tract in young children: Focusing on the impact of early nursery attendance.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Front Pediatr	6. 最初と最後の頁 1015872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2023.1015872	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 Ogawa M, Matsuki Y, Hoshina T, Kojiro M, Kusuhara K.	4. 巻 42
2. 論文標題 Usefulness of cervical computed tomography hounsfield units to differentiate Kawasaki disease from a deep-neck abscess.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatr Infect Dis J	6. 最初と最後の頁 e50-e51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.00000000000003761	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 Nagashio H, Yoneda T, Hoshina T, Saito R, Kusuhara K.	4. 巻 42
2. 論文標題 A pediatric case of previously unrecognized Streptococcus periodonticum-associated meningitis after cranial surgery.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatr Infect Dis J	6. 最初と最後の頁 e99-e100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.00000000000003787	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 Shimizu D, Hoshina T, Kawamura M, Tomita Y, Hidaka Y, Kojiro M, Muneuchi J, Kamizono J, Yamaguchi K, Fujino Y, Kusuhara K.	4. 巻 10
2. 論文標題 The possible association between epidemics of hand-foot-and-mouth disease and responsiveness to immunoglobulin therapy in Kawasaki disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Pediatr	6. 最初と最後の頁 968857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2022.968857	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 Nakamoto T, Hoshina T, Ishii M, Yamada G, Kusuhara K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Systemic corticosteroid as an adjunctive treatment for lower respiratory tract infection in children with severe motor and intellectual disabilities.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 384-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.11.013	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 Watanabe S, Hoshina T, Kojiro M, Kusuhara K.	4. 巻 40
2. 論文標題 The recent characteristics of influenza-related hospitalization in Japanese children.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Clin Microbiol Infect Dis	6. 最初と最後の頁 2011-2015
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10096-021-04208-3	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 Hoshina T, Kawase M, Watanabe S, Shibahara J, Kojiro M, Miyake T, Sakaguchi Y, Kajiwara Y, Kusuhara K.	4. 巻 63
2. 論文標題 Trends in voluntary vaccination coverage in a Japanese city.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 1466-1471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14712	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 Kawamura M, Hoshina T, Ogawa M, Yamamoto N, Haro K, Kumadaki T, Fukuda K, Kusuhara K.	4. 巻 100
2. 論文標題 The optimal duration of antimicrobial therapy for lower respiratory tract infection in patients with neuromuscular disorders based on a clone library analysis of the bacterial 16S rRNA gene sequence.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 396-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijid.2020.09.035	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 Nemoto K, Kawanami T, Hoshina T, Ishimura M, Yamasaki K, Okada S, Kanegane H, Yatera K, Kusuhara K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impaired B-Cell Differentiation in a Patient With STAT1 Gain-of-Function Mutation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Immunol	6. 最初と最後の頁 557521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.557521	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 Suga S, Hoshina T, Ichikawa S, Araki S, Kusuhara K.	4. 巻 2020
2. 論文標題 A survey of the implementation status of selected infection control strategies in neonatal intensive care units in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hosp Infect	6. 最初と最後の頁 200-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhin.2019.09.019	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Abushawish A, Haro K, Hoshina T, Kitajima N, Kusuhara K.
2. 発表標題 Environmental factors changing upper respiratory tract microbiome in young children.
3. 学会等名 第54回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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	保科 隆之 (Takayuki Hoshina) (30398078)	産業医科大学・医学部・准教授 (37116)	
研究 分担者	小川 将人 (Ogawa Masato) (80566414)	産業医科大学・医学部・非常勤医師 (37116)	

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