

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791808

研究課題名(和文)鼻・副鼻腔粘膜のmicrobiome解析

研究課題名(英文)Analysis of microbiome in the sinonasal mucosa

研究代表者

渡邊 荘 (WATANABE, SO)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20439491

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)：本研究は、副鼻腔粘膜における細菌叢をDNAレベルで解析を行い、副鼻腔炎と健常者における差を検討することを目的とする。副鼻腔炎患者12例(喘息合併例・非合併例それぞれ6例ずつ)、健常者6例からそれぞれ綿棒を用いて鼻内を擦過し、綿棒に付着した細菌を含む細胞などからDNAを精製、さらに16s rRNAをPCR増幅、制限酵素で切断を行い、得られた断片を末端標識制限酵素断片多型分析(T-RFLP)にて解析した。少なくとも1検体あたり20種前後の細菌が含まれ、細菌種数は健常者のほうが副鼻腔炎患者よりも多い傾向にあった。健常者では粘膜上で細菌が密に関わることで感染・炎症を抑えている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to compare the difference between sinusitis patients and healthy people on microbial flora of the sinonasal mucosa at DNA level. Bacterial samples were collected from 12 sinusitis patients and 6 healthy people. Bacterial-specific 16s rRNA was amplified by PCR and then digested by restriction enzyme. T-RFLP was performed and the data was analyzed. About 20 bacterial species were contained in each sample. Normal healthy people tended to have more bacterial species compared to sinusitis patients. In normal healthy people, more number of bacterial species were considered to get involved with prevention of disease development.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：副鼻腔炎 細菌叢 DNA T-RFLP

## 1. 研究開始当初の背景

慢性副鼻腔炎は鼻閉・鼻漏・後鼻漏を主徴とし、それらが8週～12週以上続く疾患である。重篤化すると周囲臓器である眼や脳にまで症状がおよぶこともある。病理組織学的には、以前は副鼻腔粘膜への好中球浸潤を主体とした炎症像が多くみられていたが、近年では生活様式の変化や環境の変化に伴ってアレルギー性疾患が増加し、それにより好酸球浸潤が主体の炎症像が多くみられるようになってきた。抗菌薬や抗アレルギー薬、副腎皮質ステロイド薬の投与により改善が見込まれるが、最近では難治性の症例も増えている。薬剤投与による疾患の治癒が見込まれない症例に対しては手術的治療が選択され、現在ではその多くが内視鏡下で行われている。我々はこれまでに副鼻腔炎の遷延化因子として、解剖学的・病理組織学的・生化学的なアプローチにより、副鼻腔粘膜への炎症細胞浸潤の時代に伴う変化、ウイルス・細菌・真菌の副鼻腔粘膜への影響、Toll-like Receptor の副鼻腔粘膜上皮や鼻茸上皮への過剰発現、日本人における副鼻腔の解剖学的変異、副鼻腔炎とHLA抗原との関わり、気管支喘息の慢性副鼻腔炎に及ぼす影響、各種サイトカインやケモカインに関する検討、副鼻腔粘膜のリモデリング、抗菌薬をはじめとする各種薬剤の副鼻腔炎に対する効果などを明らかにしてきた。しかしながら副鼻腔炎の発症、特に早期発見や予防に関わる因子についてはこれまでほとんど検討されてこなかった。

## 2. 研究の目的

近年、米国を中心として消化管や生殖器、

皮膚組織などのmicrobiome(宿主に生存する微生物コミュニティの構成ゲノムの総称)を検討し、疾患の発生や予防機序に応用する試みが行われており、特に肥満や糖尿病などの代謝疾患で研究が進んでいる。副鼻腔炎においても細菌をはじめとする微生物が発症に関わることは容易に想像がつくが、実際には培養して検出される微生物は地球に生息する全微生物の1%にも満たない。実際に培養不可能な細胞も副鼻腔炎の発症や遷延化に影響しているのではないかと思われる。

本研究では健常者と副鼻腔炎患者より採取した細菌よりDNAを抽出してDNAシーケンスを用い細菌種を同定し、健常者および副鼻腔炎患者との違いから副鼻腔炎の早期発見に関わるであろう因子を検出することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 慢性副鼻腔炎患者および健常者の中鼻道自然口ルートを綿棒で擦過して検体を採取した。気管支喘息合併例、非合併例を対象に患者からの検体採取を行った。並行して健常者の鼻内より検体の採取が行われた。DNAの抽出が行われるまでは-80℃で検体を保存した。

(2) 採取された綿棒に付着した細胞をすべて取り出し、DNA抽出キットを用いてDNAを精製した。得られたDNAはPCRに用いられるまで-20℃で保存された。次いでPCR法を用いて細菌特異的16s rRNA遺伝子を増幅し、PCR産物を確認するために、アガロースゲル電気泳動を行った。PCR産物を制限酵素 *MspI* で切断し、断片を末端標識制限酵素断片多型

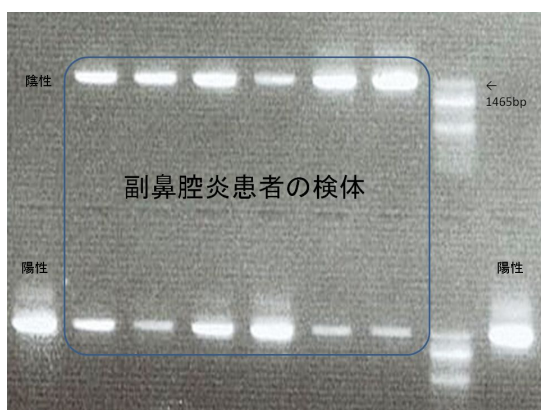
分析法 (T-RFLP) で解析、これによって断片のサイズ毎に得られるピークの数から検体に含まれる細菌種の数や種類を推定し、疾患群と健常者群で比較検討を行った。

(3) 得られた DNA を次世代シーケンス (Roche GS-FLX) にて解析し、細菌種の同定を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 慢性副鼻腔炎患者 12 例 (喘息合併・非合併それぞれ半数ずつ)、健常者 6 名から得られた検体を処理し、DNA を抽出した後にそれぞれ T-RFLP、GS-FLX にて細菌群のプロファイルを解析した。

(2) 得られた DNA サンプルから 16s rRNA 遺伝子を PCR にて増幅しアガロースゲル電気泳動にてバンドを確認したところ、全検体でバンドが確認された (下図)。



(3) PCR 産物を制限酵素 *MspI* で切断し、断片を T-RFLP にて解析したところ (結果の 1 例を下図に示す) 断片の長さごとにピークがみられ、そのピーク 1 つを細菌 1 菌種とした場合、副鼻腔炎患者群では平均 18.35 種類、健常者では平均 23.57 種類と、健常者におい

て検体に含まれる菌種の数が多い傾向にあった。



(4) GS-FLX を用いた細菌の同定を試みているが、現在もなお解析中であり、今後解析結果がまとまった段階で学会・論文にて報告を行う予定である。

(5) これまでの結果から、健常者と副鼻腔炎の患者の鼻内の細菌コミュニティを比較した場合、健常者の副鼻腔粘膜にはより多くの細菌種が生息し、それらが密に関わることで粘膜におけるバリア機能を形成し、感染・炎症の発症を抑えているのではないかと推測された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Suzaki H, Watanabe S, Pawankar R, Rhinosinusitis and asthma-microbiome and new perspectives, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 査読有, 13 巻, 2013, 45-49

DOI: 10.1097/ACI.0b013e32835b34f6

〔学会発表〕(計 1 件)

Choi C, Poroyko V, Watanabe S, Pinto JM, Allergen Exposure Affects Sinonasal Microbiota, *The 2013 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual*

Meeting、2013年2月24日、サンアントニオ  
(米国)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 荘 (WATANABE, So)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20439491

### (2) 研究協力者

洲崎 春海 (SUZAKI, Harumi)

比野平 恭之 (HINOHIRA, Yasuyuki)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：00238320

許 芳行 (KYO, Yoshiyuki)