

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462586

研究課題名(和文)上咽頭のマイクロバイオーーム解析

研究課題名(英文)Trial of the microbiome analysis in the nasopharyngeal flora

研究代表者

小川 洋(Ogawa, Hiroshi)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：70264554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：38例に対して上咽頭からの無菌的に細菌採取を行い細菌培養と原疾患、鼻汁好酸球、血中IgEの関係について調べた。20%で培養陰性であった。疾患と培養された細菌との間に関連性は見いだせなかった。鼻汁好酸球と培養された細菌との間に一定の傾向はなかった。血中IgE値と培養された細菌との間に一定の傾向はなかった。同時に上咽頭から採取されたサンプルでは培養により菌が同定されたものの、PCRで増幅できず、NGSでは解析不能であった。これらの研究結果から、成人における上咽頭は細菌数が少ない環境であり、成人における上咽頭細菌叢の全身に与える影響は鼻腔、口腔咽頭と比較すると大きくない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For 38 cases from a nasopharynx conducted bacilli sampling aseptically, and examined a bacilli culture and a primary disease, nasal discharge eosinophils, a connection of the serum IgE. A bacilli culture was negative in 20%. The association was not able to be found between disease and cultured bacteria. There was not the constant tendency among nasal discharge eosinophils, serum IgE level and cultured bacteria and cultured bacteria. It was not able to be analyzed in NGS without being able to amplify it in PCR although bacteria were identified with the sample obtained from nasopharynx at the same time by culture. From these results, the nasopharynx in adults was found to be environment with a few bacterial counts. Therefore, as for the effect to give a whole body of the nasopharyngeal flora in adults, a nasal cavity, the likelihood that there was a few in comparison with the oropharynx were suggested.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：上咽頭細菌叢 細菌培養

1. 研究開始当初の背景

無菌の状態である胎児が産道を通して出生する時から、ヒトの外界に接する皮膚、粘膜面には様々な細菌、真菌、ウイルスが定着して複雑な生態系を形成する。これを常在微生物叢というが、その主体を占めるのが細菌であるため常在細菌叢 (normal bacterial flora) とも呼ばれている。宿主は栄養と棲息場所を細菌に提供する一方、細菌が産生するビタミンKを利用するなど、基本的には共利共生の関係にある。しかし、この菌叢の中には minor population として病原菌も存在しており、時に疾患の原因となっている。その代表例が肺炎球菌であり、小児の半数、成人のおよそ 10% に常在するこの菌は、副鼻腔炎、中耳炎、気管支炎、肺炎、細菌性髄膜炎の主要な原因菌である。日本人の第3位の死因、肺炎の 25% がこの菌によるもので、健康被害を及ぼす主要な病原性常在菌である。コッホが固形培地を考案し、病原微生物の検索が可能となった 150 年前から、この分離培養という手法を用いてヒトに疾患を起こすおよそ 500 種の病原微生物が明らかにされてきた。培養によって正常細菌叢を調べる試みも古くから行われ、腸内や口腔内の細菌叢はおよそ 50~100 種の、腔の細菌叢は 20~50 種の菌からなると報告されてきた。ところが地球上に存在する 90% 以上の菌種は未だ培養する方法が明らかにされておらず、分離培養に頼る方法では菌叢の全貌は到底明らかにできないとも考えられてきた。近年、この分野に革命的な進歩がもたらされた。その原動力となったのは 1 度の解析で 1000 万本もの DNA 鎖をシークエンスできる次世代シークエンサーの登場である。この機器による菌叢の解析は以下のように行われる。まず、検体から直接 DNA を調整し、全ての菌の 16S ribosomal

RNA(16S rRNA)遺伝子を増幅できるプライマーで PCR を行う。この DNA 断片を 1 本 1 本網羅的にシークエンスし、相同性解析によってそれぞれの断片がどの菌種由来かを同定する。こうして得られるヒト常在菌叢ゲノム情報をマイクロバイームと呼ぶ。この解析は特に腸内細菌の分野で精力的に進められ、肥満、癌、糖尿病さらには自己免疫疾患やアレルギーなどの免疫疾患と腸内細菌叢の関連が次々と明らかとなってきた。その結果、プロバイオティクスや菌叢の制御で様々な疾患が予防・治療できる可能性も示されるようになってきた。以上のような研究の流れの中で、腸内細菌叢に対して行われている研究が腔常在細菌叢、口腔内常在細菌叢、結膜常在細菌叢の研究へと広がりを見せている。ところが腸と同様にリンパ組織に富む上咽頭のマイクロバイーム解析は進んでいない一部のヒトの上咽頭には肺炎球菌やインフルエンザ菌が常在し、気道感染症の原因となっている。こういった病原菌が常在する背景を知るうえで上咽頭のマイクロバイーム解析は重要なテーマである。しかしながら検体採取の困難さから上咽頭の細菌叢のマイクロバイーム解析はほとんど行なわれていない。

2. 研究の目的

上咽頭には上述した通り、ヒトの死因ともなる肺炎球菌やインフルエンザ菌のような菌が一部のヒトでは常在している。では、どのような菌叢を持つヒトにこういった病原菌が常在しているのだろうか？ また、咽頭の菌叢の違いが宿主の免疫能に影響を及ぼすことはあるのだろうか？ これらの問題を解明するために上咽頭の細菌叢を無菌的に採取し、次世代シークエンサーで解析し、) 正常人の上咽頭常在菌叢のデータベースの作成、) 様々なアレルギー疾患

や繰り返す感染症などと常在菌叢の関係を一部、腸内菌叢とも比較しながら総合的に解析することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

福島県立医科大学・会津医療センター・耳鼻咽喉科を受診し、研究への参加を承諾していただいた患者を対象とし研究をかいしした。最終的な対象患者は38例となった。年齢は38歳から80歳におよび、平均年齢は56.5歳（標準偏差12.6）であった。全例、全身麻酔による手術症例であり手術に先立って、鼻腔内にシリコンチューブを挿入し、チューブを介して上咽頭から検体を擦過して採取した。

手術対象となった疾患は真珠腫性中耳炎12例、慢性中耳炎6例、鼓室硬化症2例、外傷性耳小骨離断1例、顔面神経鞘腫1例、高度感音難聴1例、慢性扁桃炎5例、声帯ポリープ2例、喉頭蓋嚢胞1例、含歯性嚢胞1例、後鼻孔ポリープ1例、慢性副鼻腔炎3例、アレルギー性鼻炎1例、中咽頭腫瘍1例であった。

4. 研究成果

38例の細菌培養検査結果では MSSA20%, no groth 20%, Corynebacterium pseudodiphtheriticum18%, normal 13%, Staph. Epidermis10%, moraxella nonliquefaciens5%、Strep. parasanguinis2%, Enterobacter aerogenes3%, Corinebacterium jeikeium3%, MRSA 3% であった。培養同定された細菌は複数の場合があったが、20%で培養陰性であった。疾患と培養された細菌との間に関連性は見いだせなかった。鼻汁好酸球と培養された細菌との間に一定の傾向はなかった。血中 IgE 値と培養された細菌との間に一定の傾向はなかった。同時に上咽頭から採取

されたサンプルでは培養により菌が同定されたものの、PCR で増幅できず、NGS では解析不能であった。検体処理の問題か、極めて少量の検体量であったのか、今回の PCR の条件では DNA を増幅することはできなかった。

これらの研究結果から、成人における上咽頭は細菌数が少ない環境であることがわかった。このことから、成人における上咽頭細菌叢の全身に与える影響は鼻腔、口腔咽頭と比較すると大きくない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

第13回 信越セミナー 2017年3月4日
白馬東急ホテル

〔図書〕(計0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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

小川 洋 (Ogawa, Hiroshi)
福島県立医医科大学・会津医療センター・
教授
研究者番号：70264554

(2)研究分担者

錫谷 達夫 (Suzutani, Tatsuo)
福島県立医医科大学・医学部・教授)
研究者番号：40196895

石岡 賢 (Ishioka, Ken)
福島県立医医科大学・医学部・助教
研究者番号：50305356