

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861425

研究課題名(和文)慢性副鼻腔炎における鼻内細菌叢の評価

研究課題名(英文)Evaluation of nasal microbiota of chronic rhinosinusitis using the 16S Ribosomal RNA Gene Based Clone Library Method

研究代表者

寶地 信介 (HOHCHI, Nobusuke)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：90465758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：2014年～2015年に、鼻副鼻腔外来に通院中の好酸球性副鼻腔炎を含む12症例の鼻汁から、16SrRNAクローンライブラリー法を用いて鼻腔内の網羅的細菌解析を行った。一般細菌培養検査、好酸球性副鼻腔炎診断基準スコア、Lund-Mackay CT score、全身的な合併症の有無、なども同時に評価した。結果、16SrRNAクローンライブラリー法では一般細菌培養より多種多様な菌種が見られたが、特にCorynebacterium、Staphylococcus、Streptococcus属の検出が多く見られた。好酸球性副鼻腔炎の重症例ほどStaphylococcus属の検出率が高い傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed nasal microbiota by nasal mucus from 12 cases of rhinosinusitis and control using the 16S Ribosomal RNA Gene Based Clone Library Method. All cases were consulted in our hospital between 2014 and 2015 and 11 males and one female ranging in age from 26 to 75 years with an average age of 53.17. We also evaluated examination of microbial culture, eosinophilic rhinosinusitis diagnostic criteria score, Lund-Mackay CT score, systemic complications including bronchial asthma at the same time. 16S Ribosomal RNA Gene Based Clone Library Method detected more kinds of bacteria than examination of microbial culture especially a lot of Corynebacterium, Staphylococcus, Streptococcus were detected. The cases with high rate detection of Staphylococcus genus were higher Lund-Mackay CT score. Severe chronic eosinophilic rhinosinusitis tended to be high in a rate of detection of the Staphylococcus genus.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：慢性副鼻腔炎 クローンライブラリー法

1. 研究開始当初の背景

16SrRNA-クローンライブラリー法はすべての細菌が共通して保有する 16S リボソーム RNA 遺伝子を PCR (polymerase chain reaction) 法で網羅的に増幅し、無作為に選択した 96 クローンの塩基配列を決定し、相同性検索の上、検出されたそれぞれの菌種の占有率 (割合) を評価する方法である。培養に依存することなく、検体中の細菌をひとくりに叢 (flora) として把握評価できることから近年様々な臨床検体に用いられ新たな知見が得られている。

また、本法を起炎菌の検出が困難で治療に難渋している臨床症例に用いることにより、通常の細菌培養検査で見逃されている嫌気性菌や、常在菌による混合感染、抗原検査で網羅しきれない病原菌の存在、抗菌薬投与により培養困難になった病原菌等の、様々な感染症の実態が明らかにされている。

さらに、膣内、口腔内、排泄便等の非常に複雑な常在細菌叢が存在する検体においても、細菌叢の特徴を迅速に把握することが可能になりつつある。

そもそも鼻腔は、外的な微生物の影響を無視できず、またアレルギーの反応を起こす鼻粘膜には、本来、宿主に害を与えず他の病原菌の進入を防ぐなどの役目を持つ常在細菌を含め、多くの細菌が存在すると考えられている。複数の微生物がいる鼻内環境における、常在菌も含めた全体としての菌叢の変化を、副鼻腔炎の症例のごとに評価することで、副鼻腔炎の病態解明にさらに踏み込める可能性があると考えられるが、これまでの細菌培養検査では不可能であり、またそのような報告は皆無である。

また近年、これまでの古典的な感染性の慢性副鼻腔炎とは別に、治療に抵抗する難治性の好酸球性副鼻腔炎が急増している。好酸球性副鼻腔炎に対して細菌学的にアプローチした報告も少なくこれらの解析も急務と考える。

2. 研究の目的

慢性副鼻腔炎症例の鼻腔内から鼻汁を採取し、16SrRNA クローンライブラリー法を用いて鼻腔内の菌叢解析を行う。

特に好酸球性副鼻腔炎などに代表される難治例と、副鼻腔の炎症の軽微な症例での菌叢の差異を評価し、各種鼻科学的な検査の結果も併せて、副鼻腔炎の予後因子となりうる菌叢変化の有無や、副鼻腔炎の重症度や病理学的な性状によって生じる菌叢の違いなどを評価し、鼻副鼻腔炎症性疾患のさらなる病態解明を目的とする。

3. 研究の方法

2014 年 9 月 ~ 2015 年 9 月に、当科にて鼻副鼻腔外来に通院中の 12 症例の鼻汁 (鼻腔ぬぐい液) を採取し、16SrRNA クローンライブラリー法による網羅的細菌解析を行った。

鼻汁を採取したスワブ懸濁液をスクリュキャップチューブに移し、30% SDS 溶液およびガラスビーズを加え、ビーズ式細胞破碎装置にて遠心後、上清に TE 飽和フェノール溶液を加え、転倒混和し室温で遠心。上清を Amicon Ultra -0.5ml 100K で濃縮し、TE buffer で洗浄後、25 μ l の TE に懸濁して回収したものを抽出 DNA とした。

抽出した DNA 溶液を鋳型にして、16S ribosomal RNA 遺伝子の universal primer を用いて、PCR 法で 16S rDNA の約 580bp の DNA を増幅した。

決定した塩基配列を細菌基準株の 16S rDNA (5,878 件) データベースに対する相同性検索 (BLAST) を行った。BLAST 検索の条件は、Overlap length が 450bp 以上で matching % が 80% 以上の相同性が得られた配列は既知の菌種との類似性を認め、この条件を満たさない配列 (Matching % が 80% 以下のデータ) については Unclassified とした。

投入した塩基配列に対して BLAST 検索で最も高い相同性を示した生物種の階層分類表 (門、綱、目、科、属、種) を作成した。

16SrRNA クローンライブラリー法と併せて同時に採取した鼻汁より一般細菌培養検査、好酸球性副鼻腔炎診断基準スコア (両側発症、鼻茸の有無、CT での篩骨洞の優位性、末梢血好酸球数、病理検体からの組織中好酸球数) での採点、CT での重症度分類 (Lund-Mackay CT score)、喘息など全身的な合併症の有無なども同時に評価した。

4. 研究成果

12 例の内訳は、年齢は 26 歳 ~ 75 歳 (平均 53.17 歳)、男女比は 11 : 1、7 例が好酸球性副鼻腔炎症例で 5 例は副鼻腔炎のない症例であった。

16SrRNA クローンライブラリー法では一般細菌培養より多種多様な菌種が見られたが、特に *Corynebacterium*、*Staphylococcus*、*Streptococcus* 属の検出が多く見られた。これはクローンライブラリー法が、分子生物学的手法のため、培養法や検者の経験に依存せず、培養同定の困難な細菌や死菌を含めた細菌叢の網羅的解析が可能であるため、細菌培養検査と網羅的解析結果が異なると考えられた。

鼻副鼻腔は口腔内と同様に比較的多様な菌種の常在が認められる可能性も予想されていたが、今回の結果、特に鼻副鼻腔に炎症のない症例においては菌種も菌量も少なく、症例によっては鼻腔粘膜に常在する菌種はかなり限定されている、もしくは無菌に近い環境である可能性も示唆された。

好気的環境の副鼻腔炎のない鼻腔内においても、重症の好酸球性副鼻腔炎症例においても嫌気性菌の検出が見られた。

好酸球性副鼻腔炎症例の一般細菌培養検査では、黄色ブドウ球菌の検出が多く見られたが、同症例群の 16SrRNA クローンライブラ

リー法では菌種も多様であった。特に *Corynebacterium*, *Staphylococcus* 属の検出が多く見られた。*Staphylococcus* 属の検出率の高い症例は、CTでの重症度が高く、好酸球性副鼻腔炎の重症例では *Staphylococcus* 属の検出率が高い傾向があった。

全身的な喘息などの合併症の有無や、末梢血好酸球数と菌種や菌量との関連は認めなかった。

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 7 件)

Suzuki H, Hohchi N, 他 (6 名中 4 番目). Hearing outcome does not depend on the interval of intratympanic steroid administration in idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 査読有, 2016 Feb 15. PMID: 26879994

Suzuki H, Hohchi N, 他 (7 名中 7 番目). Electrical Impedance and Expression of Tight Junction Components of the Nasal Turbinate and Polyp.

ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 査読有, 78(1), 2016:16-25. doi: 10.1159/000442024.

北村 拓朗, 竈地 信介, 他 (4 名中 2 番目). 病態に及ぼす GERD の影響 鼻・副鼻腔炎. *JOHNS* 32 巻 2 号、査読無、2016、207-210.

竈地 信介, 他 (6 名中 1 番目). 経鼻内視鏡下切除術を施行した幼児髄膜脳瘤症例. *日本鼻科学会会誌* 54 巻 1 号、査読有、2015、18-24.

竈地 信介, 他 (5 名中 1 番目). 耳鼻咽喉科で主に用いられる治療薬とその使い方 NSAIDs. *JOHNS* 31 巻 9 号、査読無、2015、1117-1121.

竈地 信介, 他 (5 名中 1 番目). 再発性アフタ. *耳鼻咽喉科・頭頸部外科* 86 巻 13 号、査読無、2014、1068-1071.

Suzuki H, Hohchi N, 他 (8 名中 4 番目). Prediction of hearing outcomes by multiple regression analysis in patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss.

Ann Otol Rhinol Laryngol. 査読有、123(12)、2014:821-825.

doi: 10.1177/0003489414538606.

[学会発表](計 5 件)

鼻咽腔定着細菌と慢性中耳炎検出菌との関連について.

橋田 光二, 池寄 祥司, 小泉 弘樹, 竈地 信介, 鈴木 秀明
第 25 回 日本耳科学会. 2015 年 10 月 7

日~10 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

鼻副鼻腔における網羅的細菌叢の解析.
竈地 信介, 武永 芙美子, 田畑 貴久, 橋田 光二, 鈴木 秀明. 第 54 回 日本鼻科学会. 2015 年 10 月 1 日~10 月 3 日、広島国際会議場(広島県・広島市)

当科における鼻副鼻腔腫瘍の臨床統計.
竈地 信介, 山浦 明日香, 池寄 祥司, 田畑 貴久, 小泉 弘樹, 河口 倫太郎, 橋田 光二, 鈴木 秀明. 第 77 回耳鼻咽喉科臨床学会. 2015 年 6 月 25 日~6 月 26 日. アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

真珠腫性中耳炎における網羅的細菌叢検討.

橋田 光二, 喜瀬 祥啓, 田畑 貴久, 小泉 弘樹, 竈地 信介, 鈴木 秀明: 第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会. 2015 年 5 月 20 日~23 日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

鼻副鼻腔に生じた Phosphaturic Mesenchymal Tumor.

竈地 信介, 小泉 弘樹, 田畑 貴久, 武永 芙美子, 橋田 光二, 鈴木 秀明. 第 53 回日本鼻科学会. 2014 年 9 月 25 日~27 日、コングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竈地 信介 (HOHCHI, Nobusuke)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90465758

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者
橋田 光一 (HASHIDA Koichi)
産業医科大学・医学部・講師
研究者番号：90389461