

小児虫垂炎の炎症に関する腸内・口腔内細菌叢の
16S rRNA 遺伝子解析（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程

病理系感染制御科学専攻

生田稜

修了年 2024 年

指導教員 早川智

背景

急性虫垂炎は、年齢に関係なく発症する代表的な腹部救急疾患の1つである。小児では急性腹症の原因として最も多く、10～14歳に発症のピークがあり、男女比は1.5:1で男児に多い。成人も含めた急性虫垂炎の生涯発症率は7-8%と推定されている[1-4]。

急性虫垂炎の病因については、様々な仮説が検討されてきた。一般には虫垂内腔の機械的閉塞や狭窄が主要な原因と考えられている。虫垂内腔の閉塞の原因として糞石、異物、リンパ濾胞、虫垂の異常な屈曲や移動、腫瘍などがある。その閉塞により虫垂内圧を上昇させ、虫垂粘膜の循環を乱し、細菌が腸壁に侵入し、炎症の拡大を促進すると考えられてきた [5-8]。しかし、虫垂炎患者において全体の3分の1程しか機械的閉塞を示さないという報告があり、これは原因の一部でしかないと考えられる[9-11]。また、虫垂炎の家族歴のある人は家族歴のない人に比べて遺伝的罹患リスクが3倍高いこと[12]や、双生児において虫垂炎を発症したら30%の確率でもう一人も発症することが示されている[13]。他にも NEDD4L など特定の遺伝子が関与していることなども報告されている[14]。さらには虫垂炎には季節性があり夏に多く冬に少ないという傾向から季節性に流行するウイルス[15-17]、標高や気温差[18]が関係しているという報告があるが、さらに近年では腸内細菌叢との関連が注目されている[19]。

近年、次世代シーケンサーを使用した腸内細菌の研究が行われるようになってきてから、急性虫垂炎においても腸内細菌叢との関連が注目されている。次世代シーケンサーを用いることで、虫垂炎患者には通常では大腸に存在しない *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Gemella* といった口腔内常在菌が虫垂内に見られるという報告がなされた[20]。虫垂炎患者の口腔常在細菌が虫垂の微生物叢で頻繁に検出されるため、口腔から移行した細菌が虫垂の急性または慢性の炎症を引き起こす可能性があり[19, 21]、口腔内細菌叢との関連に注目されている。しかし、病原性や病態形成における役割はよくわかっていない[20, 22, 23]。これまで虫垂炎患者において口腔内および虫垂内細菌叢を同時に検討した報告はほとんどない。それは虫垂内細菌叢の検討は炎症を起こしている虫垂同士（重症度）の比較をしているからである。これは正常の虫垂はなかなかとることができないという理由がある。そこで我々はコントロールとして待機的虫垂切除をした虫垂を用いることとした。成人、小児に関わらずこれまで、緊急手術した群と炎症が落ち着いて時間が経過してから待機的虫垂切除した群で比較した報告はない。そこで本研究では、炎症に関与する細菌叢を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いて口腔および虫垂内細菌叢の解析を検討した。

対象と方法

2021年7月から2022年12月の間に、日本大学板橋病院または関連施設の小児外科で急性虫垂炎と診断され虫垂切除術を受けた小児患者を前向きに登録した。この研究は日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した(整理番号：RK-210713-3)。急性虫垂炎を診断するために、臨床症状、生化学的血液検査結果、腹部超音波検査または腹部造影CT検査による画像検査を行った。年齢、性別、血液検査、入院日数、手術期間など、さまざまな臨床的患者情報を収集した。全患者において、予期せぬ合併症等は起こらなかった。

急性期診断直後に採取した唾液と急性期虫垂切除時の虫垂内容物を緊急群とし、保存的加療後、非炎症期に待機的虫垂切除した際の唾液と虫垂内容物を待機群とした。患者25人のうち19人からこれらのサンプルを採取した。急性虫垂炎と診断された直後、滅菌綿球を2～3分間口腔内に置き、十分に湿らせた。清潔を保ちながら採取し、注射器を用いて採取した綿球から液体を抽出した。分析まで-80℃で凍結保存した。待機群では入院後、手術の前日または当日の手術前に唾液を採取した。その後は緊急群と同様に保存した。虫垂内細菌叢の解析には虫垂内容物を用いた。手術(虫垂切除)後、摘出標本から清潔操作にて虫垂の内部全体を滅菌綿棒で拭って回収した。回収後、綿棒を85℃、30分間で1回熱処理した後に-80℃で凍結保存した。

唾液および虫垂内容物からの DNA 抽出は、MORA-EXTRACT キット（極東製薬、日本）と FastPrep-24 5G（MP-biomedicals, USA）を用いて行った。DNA の量と質の評価には分光光度計 Nanodrop ND8000（Thermo Fisher Scientific, USA）を用いた。プライマーセットは 341f/R806[24, 25]を用いて細菌 16S rRNA の V3-V4 領域を増幅した。PCR による DNA 増幅には、98°Cで2分間の初期変性、65°Cで始まり 55°Cで終わる 15 秒間のアニーリング、68°Cで30秒間の伸長を 35 サイクル行った。各サイクルにおいて、アニーリング温度は 55°Cに達するまで 1°Cずつ下げ、残りのサイクルに使用した[26, 27]。その後、PCR で増幅した断片を次世代シーケンサーMiSeq（Illumina、米国）で解析し、MiSeq 試薬キットバージョン 3（600 サイクル）を用いて、2 x 284 bp サイクルでペアエンドケミストリーを行った。Cutadapt バージョン 1.18 [28]とそのデフォルト設定を用いて、プライマー配列を除去した。fastq-join[29]をデフォルトパラメーターで使用し、ペアエンド配列を調べた。Greengenes Database[30]バージョン 13.8 を QIIME2[31]バージョン 2020.6 および dada2 denoise-single[32]アルゴリズムバージョン 2017.6.0 とともに使用し、同定された分類群を推定した。

α 多様性解析では、多様性指標として Chao1、Shannon、Simpson を用い、 α 多様性の統計解析にはグルーピング情報に基づく Kruskal-Wallis 検定を用

いた。β多様性の統計解析には、主座標分析（PCoA）と類似距離（Bray-Curtis 距離）、量的・質的距離（Unweighted Unifrac 距離、Weighted Unifrac 距離）を用いた。類似性の分析（ANOSIM）は情報ベースの類似性尺度として利用した。ヒートマップ・クラスター分析には Ward 法を用いた。各細菌レベルで、緊急群と待機群における存在量比の比較を Mann-Whitney U 検定を用いた。その他の連続変数の比較には Mann-Whitney U 検定を、カテゴリー変数の比較には Fisher's exact 検定を用いた。多様性の計算と主成分分析（PCA）には QIIME2 を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

研究期間中、虫垂炎と診断され虫垂切除術を受けた患者 25 人のうち 19 人から唾液と虫垂内容物のサンプルを採取した。緊急群と待機群の患者の特徴については血液生化学検査における WBC ($p < 0.01$) と CRP ($p < 0.01$) が緊急群で有意に高いことが示された。その他の入院日数や手術時間などに有意差は認めなかった。

唾液と虫垂の内容物の α 多様性解析では、これらのサンプル間で Chao1 ($p < 0.01$)、Shannon ($p < 0.01$)、Simpson ($p < 0.01$) 指数に統計的に有意な差が認められた。さらに、β多様性分析では、Bray-Curtis ($p < 0.01$)、Weighted Unifrac ($p < 0.01$)、Unweighted Unifrac ($p < 0.01$) の間に、統計的に有意な差が認

められた。さらに、緊急群と待機群の唾液および虫垂内容物を比較した。

Simpson 分析では虫垂内容物 ($p=0.80$) または唾液 ($p=0.95$)、Shannon 分析では虫垂内容物 ($p=1$) または唾液 ($p=0.33$)、Chao1 分析では虫垂内容物

($p=0.68$) において、緊急群と待機群の間で α 多様性に有意差はなかった。しかし、唾液中の Chao1 指数には有意差があった ($p=0.039$)。Bray-Curtis 分析では虫垂内容物 ($p=0.391$) または唾液 ($p=0.407$)、Weighted Unifrac 分析では虫垂内容物 ($p=0.669$) または唾液 ($p=0.228$)、Unweighted Unifrac 分析では虫垂内容物 ($p=0.885$) または唾液 ($p=0.274$) には統計学的有意差は認められなかった。

門レベル細菌叢において全体では比率の高い方から Firmicutes (41.7%)、Proteobacteria (24.4%)、Bacteroidetes (14.6%)、Actinobacteria (8.9%)、Fusobacteria (4.3%) の順に検出された。患者を緊急群と待機群に分けると、緊急群では唾液中に Firmicutes (40.0%)、Proteobacteria (21.8%)、Bacteroidetes (12.2%)、Actinobacteria (13.9%)、Fusobacteria (4.5%) が検出された。待機群では、Firmicutes (49.7%)、Proteobacteria (12.6%)、Bacteroidetes (14.5%)、Actinobacteria (13.2%)、Fusobacteria (4.0%) が検出された。虫垂内容物では、緊急群では Firmicutes (39.0%)、Proteobacteria (27.7%)、Bacteroidetes (20.8%)、Actinobacteria (4.2%)、Fusobacteria (5.0%) が検出さ

れた。一方、待機群では、Firmicutes (35.9%)、Proteobacteria (41.0%)、Bacteroidetes (9.4%)、Actinobacteria (2.3%)、Fusobacteria (3.5%) が検出された。緊急群と待機群の各菌種を比較すると、緊急群では唾液中の Firmicutes が有意に少なかったが ($p=0.04$)、虫垂内容物では存在比に差はなかった ($p=0.31$)。

種レベルにおいても門レベルと同様に、唾液および虫垂内容物中の細菌の割合を緊急群と待機群で比較した。*Campyrobacter rectus* ($p<0.01$) および *Alistipes onderdonkii* ($p=0.0378$) は虫垂内容物における存在比率が高かったが、*Veillonella dispar* ($p<0.01$) および *Veillonella parvula* ($p=0.0375$) の存在比は低かった。唾液中では *C. rectus* ($p=0.045$)、*Capnocytophaga ochraceochracea* ($p=0.0294$)、*Selenomonas noxia* ($p<0.01$) が *Lachnoanaerobaculum orale* ($p=0.0401$) よりも多かった。

免疫組織化学染色では緊急群と待機群それぞれ 2 例ずつ、無作為に高倍率 6 視野を観察して粘膜固有層の腺組織周囲に Foxp3 抗体陽性細胞数をカウントした。緊急群では 6 視野の合計がそれぞれ 11、22 に対して待機群では 76、110 であった。待機群では制御性 T 細胞がより多く存在することが観察できた。

考察

本研究では、小児虫垂炎患者の口腔および虫垂微生物叢の解析を目的と

し、緊急群と待機群の 2 群に分け、多様性と細菌の存在比を解析した。その結果、血液生化学検査（WBC および CRP）を除いた入院期間や手術時間などの臨床的パラメータにおいて、緊急群と待機群の間に有意差は認められなかった。多様性については口腔内と虫垂内で α および β 多様性に有意差があった。これは消化管の部位が違うということが確認できた。そして、緊急群と待機群の比較では虫垂内では α および β 多様性の両方で有意差はなく *dysbiosis* は生じているとは言いがたい結果であった。ただし唾液においては β 多様性に有意差はなかったが、 α 多様性の一部のみで有意差を認めた。そのため口腔内においては *dysbiosis* が生じている可能性がある。

細菌の存在比について、種レベルの解析では興味深い結果が得られた。まず、緊急群の口腔および虫垂内細菌叢には、待機群に比べて *Campylobacter rectus* が有意に多く含まれていた。この菌種は、主に歯周病と関連することが知られているが [33]、最近では肺膿瘍[34]や中耳炎[35]などの他の炎症性疾患にも関与していることが報告されている。さらに、*Campylobacter rectus* は *Fusobacterium* と共存すると炎症を増強することが報告されている[36]。これらの結果は、緊急群において、口腔内の *Campylobacter rectus* が口腔から虫垂に移行し、虫垂炎に関連する炎症状態を悪化させる可能性を示唆している。

さらに、*Veillonella dispar* と *Veillonella parvula* は待機群の虫垂により多く存在していたが、これは炎症の抑制と関連している可能性がある。成人の虫垂細菌叢に関する最近の研究でも、複雑性虫垂炎の患者よりも、単純性虫垂炎の患者の方が、*Veillonella* がより豊富であることが報告されている[37]。*Veillonella* は、口腔内の常在菌でもある[38]が、母乳栄養児の腸管に多く存在し、食物アレルギーの発症を抑制していることが示唆されており、そのメカニズムとして短鎖脂肪酸の産生による制御性 T 細胞のリクルートが示唆されている[39]。重要なことは、制御性 T 細胞の数が局所の炎症の程度を反映することであり、制御性 T 細胞が少ないと虫垂穿孔につながることを報告されている[40]。本研究では免疫組織化学染色を行い、Foxp3 抗体をマーカーとすることで制御性 T 細胞が緊急群と比較して待機群に多い傾向にあることが判明した。この知見より、*Veillonella spp* が炎症の抑制と関連する可能性が示唆された。

まとめ

Campylobacter rectus は緊急群において虫垂内と口腔内双方に多く存在していた。*Campylobacter rectus* は歯周病のほかに中耳炎といった炎症疾患との関連が報告されており、虫垂炎の病態形成において炎症促進メディエーターとしての役割を果たしている可能性がある。一方で待機群の虫垂内に多く存在していた *Veillonella spp* は短鎖脂肪酸の産生による制御性 T 細胞のリクルートが報告

されている。本研究でも待機群に多く存在した *Veillonella spp* が制御性 T 細胞を介して炎症を抑制している可能性がある。

引用文献

1. Addiss DG, Shaffer N, Fowler BS, Tauxe RV: **The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the United States.** *Am J Epidemiol* 1990, **132**(5):910-925.
2. Stewart B, Khanduri P, McCord C, Ohene-Yeboah M, Uranues S, Vega Rivera F, Mock C: **Global disease burden of conditions requiring emergency surgery.** *Br J Surg* 2014, **101**(1):e9-22.
3. Lee JH, Park YS, Choi JS: **The epidemiology of appendicitis and appendectomy in South Korea: national registry data.** *J Epidemiol* 2010, **20**(2):97-105.
4. Ohene-Yeboah M, Abantanga FA: **Incidence of acute appendicitis in Kumasi, Ghana.** *West Afr J Med* 2009, **28**(2):122-125.
5. Bundy DG, Byerley JS, Liles EA, Perrin EM, Katznelson J, Rice HE: **Does this child have appendicitis?** *Jama* 2007, **298**(4):438-451.
6. Walker AR, Segal I: **What causes appendicitis?** *J Clin Gastroenterol* 1990, **12**(2):127-129.
7. Humes DJ, Simpson J: **Acute appendicitis.** *Bmj* 2006, **333**(7567):530-534.
8. Singh JP, Mariadason JG: **Role of the faecolith in modern-day appendicitis.** *Ann R Coll Surg Engl* 2013, **95**(1):48-51.
9. Arnbjörnsson E, Bengmark S: **Role of obstruction in the pathogenesis of acute appendicitis.** *Am J Surg* 1984, **147**(3):390-392.
10. Jones BA, Demetriades D, Segal I, Burkitt DP: **The prevalence of appendiceal fecaliths in patients with and without appendicitis. A comparative study from Canada and South Africa.** *Ann Surg* 1985, **202**(1):80-82.
11. Chang AR: **An analysis of the pathology of 3003 appendices.** *Aust N Z J Surg* 1981, **51**(2):169-178.
12. Ergul E: **Heredity and familial tendency of acute appendicitis.** *Scand J Surg* 2007, **96**(4):290-292.
13. Sadr Azodi O, Andrén-Sandberg A, Larsson H: **Genetic and environmental influences on the risk of acute appendicitis in twins.** *Br J Surg* 2009, **96**(11):1336-1340.
14. Gaitanidis A, Kaafarani HMA, Christensen MA, Breen K, Mendoza A, Fagenholz PJ, Velmahos GC, Farhat MR: **Association Between NEDD4L Variation and the Genetic Risk of Acute Appendicitis: A Multi-institutional Genome-Wide Association Study.** *JAMA Surg* 2021, **156**(10):917-923.
15. Wei PL, Chen CS, Keller JJ, Lin HC: **Monthly variation in acute appendicitis incidence: a 10-year nationwide population-based study.** *J Surg Res* 2012, **178**(2):670-676.
16. Ilves I, Fagerström A, Herzig KH, Juvonen P, Miettinen P, Pajajänen H: **Seasonal**

- variations of acute appendicitis and nonspecific abdominal pain in Finland. *World J Gastroenterol* 2014, **20**(14):4037-4042.
17. Hsu YJ, Fu YW, Chin T: **Seasonal variations in the occurrence of acute appendicitis and their relationship with the presence of fecaliths in children.** *BMC Pediatr* 2019, **19**(1):443.
 18. York TJ: **Seasonal and climatic variation in the incidence of adult acute appendicitis: a seven year longitudinal analysis.** *BMC Emerg Med* 2020, **20**(1):24.
 19. Aiyoshi T, Kakihara T, Watanabe E, Tanaka N, Ogata Y, Masuoka H, Kurokawa R, Fujishiro J, Masumoto K, Suda W: **A comprehensive microbial analysis of pediatric patients with acute appendicitis.** *J Microbiol Immunol Infect* 2023.
 20. Zhong D, Brower-Sinning R, Firek B, Morowitz MJ: **Acute appendicitis in children is associated with an abundance of bacteria from the phylum Fusobacteria.** *J Pediatr Surg* 2014, **49**(3):441-446.
 21. Blod C, Schlichting N, Schülin S, Suttkus A, Peukert N, Stingu CS, Hirsch C, Elger W, Lacher M, Bühligen U *et al*: **The oral microbiome-the relevant reservoir for acute pediatric appendicitis?** *Int J Colorectal Dis* 2018, **33**(2):209-218.
 22. Guinane CM, Tadrous A, Fouhy F, Ryan CA, Dempsey EM, Murphy B, Andrews E, Cotter PD, Stanton C, Ross RP: **Microbial composition of human appendices from patients following appendectomy.** *mBio* 2013, **4**(1).
 23. Blohs M, Mahnert A, Brunnader K, Flucher C, Castellani C, Till H, Singer G, Moissl-Eichinger C: **Acute appendicitis manifests as two microbiome state types with oral pathogens influencing severity.** *Gut Microbes* 2023, **15**(1):2145845.
 24. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG: **Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.** *Appl Environ Microbiol* 1993, **59**(3):695-700.
 25. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R: **Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108** Suppl 1(Suppl 1):4516-4522.
 26. Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M: **Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing.** *PLoS One* 2014, **9**(8):e105592.
 27. Hisada T, Endoh K, Kuriki K: **Inter- and intra-individual variations in seasonal and daily stabilities of the human gut microbiota in Japanese.** *Arch Microbiol* 2015, **197**(7):919-934.
 28. Martin M: **Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads.** *EMBnet journal* 2011(17):10-12.
 29. Aronesty E: **Comparison of sequencing utility programs.** *Open Bioinforma J* 2013(7):1-8.
 30. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D,

- Hu P, Andersen GL: **Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB.** *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**(7):5069-5072.
31. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F *et al*: **Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2.** *Nat Biotechnol* 2019, **37**(8):852-857.
 32. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP: **DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data.** *Nat Methods* 2016, **13**(7):581-583.
 33. Ihara H, Miura T, Kato T, Ishihara K, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K: **Detection of *Campylobacter rectus* in periodontitis sites by monoclonal antibodies.** *J Periodontal Res* 2003, **38**(1):64-72.
 34. Zhu X, Yu S, Kang Q, Qiu Y, Tian M, Cao E: ***Campylobacter rectus* Infection Leads to Lung Abscess: A Case Report and Literature Review.** *Infect Drug Resist* 2021, **14**:2957-2963.
 35. Kakuta R, Hidaka H, Yano H, Okamoto M, Ozawa D, Endo S, Kaku M, Katori Y: **First report of severe acute otitis media caused by *Campylobacter rectus* and review of the literature.** *J Infect Chemother* 2016, **22**(12):800-803.
 36. Thurnheer T, Karygianni L, Flury M, Belibasakis GN: ***Fusobacterium* Species and Subspecies Differentially Affect the Composition and Architecture of Supra- and Subgingival Biofilms Models.** *Front Microbiol* 2019, **10**:1716.
 37. Vanhatalo S, Munukka E, Kallonen T, Sippola S, Grönroos J, Haijanen J, Hakanen AJ, Salminen P: **Appendiceal microbiome in uncomplicated and complicated acute appendicitis: A prospective cohort study.** *PLoS One* 2022, **17**(10):e0276007.
 38. Abram AM, Szewczyk MM, Park SG, Sam SS, Eldana HB, Koria FJ, Ferracciolo JM, Young LA, Qadir H, Bonham AJ *et al*: **A Co-Association of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula/dispar* in Root Caries Patients and In Vitro Biofilms.** *Infect Immun* 2022, **90**(10):e0035522.
 39. Wang S, Wei Y, Liu L, Li Z: **Association Between Breastmilk Microbiota and Food Allergy in Infants.** *Front Cell Infect Microbiol* 2021, **11**:770913.
 40. Sucic L, Galati-Fournier V, Kym U, Pfeifle VA, Gros SJ, Schäfer KH, Holland-Cunz S, Keck S: **Increased regulatory T cells in pediatric acute appendicitis.** *Pediatr Allergy Immunol* 2018, **29**(1):104-108.