HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	下気道における偏性嫌気性菌の病原性の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	長岡, 健太郎
Description	配架番号：2100
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11228号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55644
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_Nagaoka_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　長　岡　健　太　郎

学 位 論 文 題 名

下気道における偏性嫌気性菌の病原性の検討

(Studies on pathogenicity of obligate anaerobes in lower respiratory tract)

【背景】肺炎は最も頻度の高い疾病の一つであり、特に高齢者での死亡頻度が高いことから、近年の本邦の高齢化に伴い、より重症な肺炎患者が増加することが懸念されている。高齢者の肺炎では、口腔内分泌物の誤嚥による誤嚥性肺炎の頻度が高い。しかしながら、誤嚥性肺炎では原因菌の同定が困難となることも少なくない。その理由として、誤嚥性肺炎の原因菌に口腔内の偏性嫌気性菌が含まれることが指摘されているが、下気道における偏性嫌気性菌の病原性については不明な点が多い。近年、遺伝子学的手法を用いた肺炎の原因微生物の解析では、従来の培養法と比較して口腔内の嫌気性菌が同定される頻度は高いとする報告もある。また、膿胸では、培養法、遺伝子学的解析のいずれの手法でも、偏性嫌気性菌は主要な病原菌と認識されている。
近年、歯周病が冠状動脈疾患、脳梗塞、糖尿病、間接リウマチ、早産・低体重児出産、骨粗しょう症、肺炎など、多岐にわたる疾患に影響を与えることが指摘されている。個々の歯周病原菌としては、*Fusobacterium nucleatum* などの歯周病原菌の生成物に含まれる酪酸が HIV や潰瘍性大腸炎の病態に重要な影響を与えうる可能性が指摘されている。また、最近の報告では、*F. nucleatum* は大腸癌における癌化にも重要な影響を与えることが指摘されている。
このように、重要な病原性が報告されている偏性嫌気性菌の一部は、呼吸器疾患においても分離同定されている。これらの偏性嫌気性菌は口腔内の常在菌でもあることから、誤嚥性肺炎の際には、偏性嫌気性菌が下気道に病的影響を及ぼしている可能性も考えられる。これより、偏性嫌気性菌の下気道での病原性については、今後検討が必要と考えられた。

【目的】　研究 1　呼吸器感染症において重要な偏性嫌気性菌を用いて、マウス感染モデルでの抗菌薬治療効果を検討する。
研究 2　*F. nucleatum* の培養上清を用いて、気道上皮細胞の粘液産生能への影響を検討する。

【方法】研究 1：*F. nucleatum*、*Fusobacterium necrophorum*、*Prevotella intermedia* について、経気管投与あるいは経尾静脈投与にて、BALB/c マウス（8 週齢、雄）に菌液を接種した。菌液接種後、体重、生存個体数、生菌数、組織学的評価をおこなった。感染が確認できた菌種のモデルについては、Levofloxacin (LVFX)、Sitafloxacin (STFX)、Metronidazole (MTZ)を用いた治療実験をおこなった。
研究 2：粘液産生については、気道上皮から分泌される主要な高分子成分であるムチンのコア蛋白である MUC5AC に注目し、検証をおこなった。気道上皮細胞である NCI-H292 細胞を、*F. nucleatum*

の培養上清で一定時間刺激した。その後、細胞の total RNA を抽出し、cDNA を合成後、リアルタイム PCR 法で MUC5AC の mRNA 発現量を定量的に解析した。細胞培養上清からは、分泌された MUC5AC タンパク質産生量を ELISA 法にて測定した。さらに、細胞内シグナル伝達経路の検証のため、ERK、p38、ＩκＢのリン酸化を Western Blot 法にて測定した。また、*F. nucleatum* 上清誘導性の MUC5AC 産生に対する薬剤による影響を、Clarithromycin (CAM)、Azythromycin (AZM)、MTZ、Clindamycin (CLDM)を用いて同様の方法で検討した。

【結果】研究 1：*F. necrophorum* を用いた感染実験で、感染性が認められた。経気管投与では、菌の接種による致死性の気道炎症の誘導が認められるも、膿瘍形成や経時的な菌の増殖は認められず、抗菌薬(LVFX、STFX)による治療効果は認められなかった。一方、*F. necrophorum* の経尾静脈投与では、肝に限局した膿瘍形成および臓器内生菌数の継時的な増殖がおこり、血流感染を介した肝膿瘍モデルを確立できた。同モデルでは、生菌数や体重変化による抗菌薬治療効果 (STFX、MTZ) の検証が可能であった。
研究 2：*F. nucleatum* 上清の刺激により、気道上皮細胞 NCI-H292 細胞からの MUC5AC の発現・産生が誘導された。*F. nucleatum* 上清による MUC5AC 亢進には、主要な細胞内シグナルとして、ERK のリン酸化が重要であった。*F. nucleatum* 上清により誘導される MUC5AC 量は、マクロライド系抗菌薬 AZM、CAM を暴露した細胞において、mRNA 発現、タンパク質産生量の両者において有意な抑制が認められた。一方、MTZ、CLDM では有意な減少はなかった。また、AZM、CAM では、*F. nucleatum* 上清誘導性の ERK リン酸化に対し、抑制効果が認められたが、CLDM、MTZ では認められなかった。

【考察】研究 1：本研究では、偏性嫌気性菌による肺感染モデルの確立は困難であったが、血流感染による膿瘍形成を伴う感染モデルが確立できた。今回の研究から、偏性嫌気性菌の感染・継時的な菌の増殖には、膿瘍形成が重要と考えられ、嫌気性菌の膿瘍病変に対する抗菌薬効果の検証に、貴重な基礎データが得られたものと考えられる。また、偏性嫌気性菌による膿瘍形成の病態機序の解明にも有用となることが期待される。
研究 2：*F. nucleatum* は、歯周病原因菌の一つであり、口腔内の常在菌である。また、膿胸などの呼吸器感染症でもしばしば分離されることがある。本研究では *F. nucleatum* の生成物が気道上皮の粘液産生を亢進することが示された。このことから、*F. nucleatum* が口腔内あるいは気道に存在した際に、気道の粘液過剰産生に寄与する可能性が考えられた。これまで、歯周病原菌と気道の粘液過剰産生について関連性を指摘した報告は乏しいため、本研究は粘液過剰産生についての新たなリスク因子を提案する、貴重な基礎データとなることが考えられる。また、マクロライドは CLDM、MTZ などの抗嫌気活性を有する抗菌薬とは異なる機序で、*F. nucleatum* による粘液過剰産生を抑制する可能性が示された。

【結論】偏性嫌気性菌の下気道への病原性として、菌自体による病的影響と、菌の生成物による病的影響のそれぞれを検証し、いずれも病原性を持ちうるものと考えられた。今後、偏性嫌気性菌が下気道に与える病的影響を検証する上で、菌体成分に加え、菌の生成物の影響についても検証していく必要があるものと考えられた。