



Title	下気道における偏性嫌気性菌の病原性の検討
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11228
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55645
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_Nagaoka.pdf



学 位 論 文

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)

2014 年 3 月

北海道大学

長岡 健太郎

学 位 論 文

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)

2014 年 3 月

北海道大学

長岡 健太郎

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
第1章 偏性嫌気性菌によるマウス感染モデルの検討	
第1節 研究背景	7 頁
第2節 実験方法	8 頁
第3節 実験結果	11 頁
第4節 考察	19 頁
第5節 本章の総括および結論	21 頁
第2章 <i>F. nucleatum</i> が気道上皮細胞に与える粘液産生能発現への影響の検討	
第1節 研究背景	22 頁
第2節 実験方法	23 頁
第3節 実験結果	25 頁
第4節 考察	32 頁
第5節 本章の総括および結論	34 頁
第3章 総括および結論	35 頁
謝辞	37 頁
引用文献	38 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Kentaro Nagaoka, Katsunori Yanagihara, Yosuke Harada, Koichi Yamada, Yohei Migiyama, Yoshitomo Morinaga, Koichi Izumikawa, Hiroshi Takeya, Masahiro Nakashima, Masaharu Nishimura, Shigeru Kohno.

Establishment of a new murine model of liver abscess induced by *Fusobacterium necrophorum* injected into the caudal vein.

J Med Microbiol. 62(Pt 11):1755-9. 2013.

2. Kentaro Nagaoka, Katsunori Yanagihara, Yosuke Harada, Koichi Yamada, Yohei Migiyama, Yoshitomo Morinaga, Hiroo Hasegawa, Koichi Izumikawa, Hiroshi Takeya, Masaharu Nishimura, Shigeru Kohno.

Macrolides inhibit *Fusobacterium nucleatum*-induced MUC5AC production in human airway epithelial cells.

Antimicrob Agents Chemother. 57(4):1844-9. 2013.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Kentaro Nagaoka, Katsunori Yanagihara, Yosuke Harada, Koichi Yamada, Yohei Migiyama, Yoshitomo Morinaga, Shigeru Kohno.

In vivo antianaerobe activity of DS-8587, a new fluoroquinolone, in a new murine model of *Fusobacterium necrophorum* liver abscess via injection into caudal vein.

第 52 回 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
2012 年 9 月 11 日 サンフランシスコ

2. Kentaro Nagaoka, Katsunori Yanagihara, Yosuke Harada, Koichi Yamada, Yohei Migiyama, Yoshitomo Morinaga, Shigeru Kohno.

Clarithromycin and azithromycin inhibit *Fusobacterium nucleatum*-induced cytotoxicity and MUC5AC induction in human airway epithelial cells

第 52 回 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy
2012 年 9 月 9 日 サンフランシスコ

緒言

肺炎と嫌気性菌

肺炎は現在本邦の死亡原因の第3位とされ、年間に98.8/100,000人が肺炎で死亡している¹。肺炎は、特に高齢者で死亡頻度が高くなり、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。

高齢者では、口腔内分泌物の誤嚥による、誤嚥性肺炎を発症することが少なくない。誤嚥性肺炎は、誤嚥の量、内容により、不顕性誤嚥、機械的閉塞、Mendelson 症候群（胃酸を主体に誤嚥した肺炎）などに分類されるが、誤嚥性肺炎の多くは、不顕性誤嚥による肺炎である。誤嚥性肺炎の特徴として、多くの場合で原因菌が不明であることがあげられる。この理由として、(1) 誤嚥性肺炎患者では喀痰の喀出が困難な場合があり、喀痰を用いた原因菌検索が困難となること、(2) 誤嚥性肺炎の原因菌に偏性嫌気性菌が含まれる場合が多くあり、嫌気培養による原因菌の分離は困難であること、(3) 様々な口腔内微生物を含む口腔内容物を誤嚥していることが多く、原因病原菌を同定することが困難とあること、などがあげられる。

肺炎の診療において、原因菌の正確な把握は診療上重要であるが、肺炎全体でみた場合にも原因菌が不明となることは多い。例として、市中肺炎では、10-48%で原因菌が不明と報告されている²⁻⁴。

一方、呼吸器検体中の病原微生物の遺伝子に注目した研究では、市中肺炎 64 例の呼吸器検体について従来の培養法に加え、菌種に特異的な領域である 16S rRNA 領域の PCR/シーケンスを行うことにより、嫌気性菌、口腔内細菌ともに検出率が増加したとする報告がある⁵。(嫌気性菌:0.0%から 15.6%、口腔内細菌:3.1%から 46.9%)

これらのことから、嫌気性菌や口腔内細菌による下気道感染は、現在その発生頻度が過小評価されている可能性があり、また今後高齢者の誤嚥性肺炎が増加することに伴い、ますます肺炎の主要な病原菌となってくる可能性がある。このため、嫌気性菌・口腔内細菌の下気道における病原性の理解は、今後の肺炎診療において重要といえる。

嫌気性菌が分離される呼吸器疾患

呼吸器感染症のうち、胸腔内に膿性滲出液が貯留した状態を膿胸という。膿胸は主に細菌性感染により発症し、従来の培養法では 17~42%で原因菌が分離され、そのうち偏性嫌気性菌は 4.9~74.2%に含まれるとされる⁶⁻⁸。原因菌として最も多く分離される菌種としては、*Streptococcus anginosus group* や

*Fusobacterium nucleatum*があげられる。一方、Kawanami らが膿胸患者 26 例の膿胸検体に 16S rRNA 領域の PCR/シーケンスをおこなった研究では、従来の培養法に対し、遺伝子を用いた解析で多く原因菌が検出され、また、43.8%の症例で、原因菌に嫌気性菌が検出されたとしている⁹。膿胸においては、従来の検査法に加え、遺伝子検索でも嫌気性菌が高率に原因菌として同定されており、今後さらに大規模な臨床研究などによるデータの集積が望まれる。

嚢胞線維症の呼吸器検体からは、*Prevotella intermedia*が高頻度で分離され、とする報告が近年なされている^{10,11}。*P. intermedia*の病原性については、その生成物（培養上清）が細胞毒性を有するとした基礎研究データもあるが¹²、その病的役割については不明な点が多く、一般的な呼吸器感染症で原因菌として検出されることは稀である。

歯周病原菌と全身感染症

歯周病は、歯肉溝に細菌が定着し、バイオフィルムを形成し、炎症を惹起する疾患をさす。歯肉溝は嫌気的環境となるため、病原菌に存在する細菌は偏性嫌気性菌が主体となり、これまで十数種類の菌種が病原菌と認識されている。主な歯周病原菌としては、*Porphyromonas gingivalis*、*P. intermedia*、*F. nucleatum*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*などがあげられる¹³。

近年、様々な疾患と歯周病および歯周病原菌との関連性を示唆する報告が相次いでなされている。歯周病との関連性が指摘されている疾患としては、冠動脈疾患¹⁴、脳梗塞¹⁵、糖尿病¹⁶、早産・低体重児出産¹⁷など、多岐にわたる疾患があがる。これらの報告は、歯周病に対する治療的介入が各疾患の予後を改善する、あるいは各疾患のコントロールが不良であった場合、歯周病のコントロールも不良であった、といった歯周病と各疾患の相関性を検証したものが多い。

一方、個々の歯周病原菌と口腔外疾患の関連性を指摘する報告としては、HIV ウイルスと歯周病原菌の関連性を報告したものがある。今井らは、*P. gingivalis*、*F. nucleatum*などの歯周病原菌の生成物に含まれる酪酸が、ヒストンデアセラーゼの阻害により潜伏 HIV ウイルスの活性化に寄与することを報告している¹⁸。興味深いことに、酪酸は潰瘍性大腸炎でも重要な病的役割を担うことが指摘されており、潰瘍性大腸炎では *Fusobacterium* 属の *F. varium* が重要とされている¹⁹。潰瘍性大腸炎では、多施設 2 重盲検試験にて、アモキシシリン、テトラサイクリン、メトロニダゾールによる抗菌薬治療が、活動性の潰瘍性大腸炎の寛解、ステロイド治療の中止などに有益であったことが示されている²⁰。

また、個々の歯周病原菌と口腔外疾患との関連性として、近年の大腸癌組織の遺伝子学的な細菌叢解析により、大腸癌では *Fusobacterium* 属が高頻度に検

出されることが指摘されている^{21, 22}。さらに、Rubinstein らにより、*F. nucleatum* が、大腸癌の癌化に関与するという基礎データも報告されている²³。大腸癌と *F. nucleatum* の関連性は、粘膜細菌叢の病原菌が大腸癌の発生に関与することを示すものであり、歯周病と大腸癌の関連性を指摘するものではないが、上述の通り *F. nucleatum* は主要な歯周病原菌で、下気道感染もおこす主要な偏性嫌気性菌でもあることから、大腸癌の癌化に寄与する病原性を有することは大変興味深い。

今後、歯周病と口腔外疾患との関連性においては、病的役割を担う個々の病原菌が同定され、さらなる病態解明が進むものと考えられる。

偏性嫌気性菌の下気道における病原性について

上述するように、一部の呼吸器疾患において分離される偏性嫌気性菌には、歯周病原菌でもある *Fusobacterium nucleatum* と *Prevotella intermedia* が含まれる。しかしながら現時点で、これらの嫌気性菌が、下気道でどのような病的影響を呼吸器に及ぼすかについては、不明な点が多い。

そこで、今回我々は、これらの偏性嫌気性菌によるマウス感染モデルの作成をおこない、その病原性を検証することを、第一章の目的とした。

また、上述のように、HIV ウイルス、大腸癌などへの重要な影響が示唆されている *F. nucleatum* に注目し、第2章では培養上清を用いて気道上皮細胞への影響を検証し、*F. nucleatum* の生成物が下気道へ及ぼしうる病的影響について検討した。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AZM — azithromycin

CAM — clarithromycin

CLDM — clindamycin

ELISA — Enzyme Linked Immuno Solvent Assay

Fn Sup — Supernatant of *F. nucleatum*

GAM — Gifu anaerobic medium

MTZ — metronidazole

第1章 偏性嫌気性菌によるマウス感染モデルの検討

第1節 研究背景

偏性嫌気性菌は、種々の内因性感染の原因となり、未治療となった場合、死亡に至るケースも少なくない²⁴。嫌気性菌感染の特性として、正常細菌叢の一部を構成する菌種が多く、感染時に原因菌を分離・特定することが難しい面があげられる。また、嫌気性菌は感染時に膿瘍を高頻度に形成するため、治療にドレナージを要する場合が多く、嫌気性菌に対する抗菌薬単独の治療効果は評価が難しい²⁵。近年、新規に開発された抗菌薬について、in vitroでの抗嫌気活性が新たな治療効果としてしばしば報告されているが、in vivoでの抗嫌気活性を検証した報告は乏しい²⁶⁻²⁸。

これまで報告された偏性嫌気性菌による感染モデルは、Abeらによる*Fusobacterium necrophorum*の腹腔感染モデルが知られている²⁹。この感染モデルは、*F. necrophorum*の腹腔内注入により腹腔を介して膿瘍病変を形成するもので、膿瘍形成は数日の内に腹腔から肝、脾、肺に及ぶ。腸管穿孔後の腹腔膿瘍に類似した感染様式であり、このモデルに対し抗菌薬投与を行い、体重減少の改善、生存率、感染臓器の数により、治療効果を評価するものであった。しかしながら、臨床における*F. necrophorum*の腸管穿孔を介した腹腔膿瘍は複数菌感染であることが多く、実際の臨床に即したモデルとは言い難いことや、感染が腹腔を含む多臓器にまたがるため、単独の臓器における生菌数での治療効果判定が困難であるといった問題点も含まれていた。

そこで、我々は抗菌薬の治療効果判定により適した偏性嫌気性菌による感染モデルを確立することを目的とした実験を行った。

第2節 実験方法

【微生物】

本研究では以下の偏性嫌気性菌株を使用した。

Fusobacterium necrophorum)

FNU89 (長崎大学病院検査部 臨床分離株)

GAI00184 (岐阜大学生命科学総合支援センター 嫌気性菌分野より供与)

Prevotella intermedia)

PINU046 (長崎大学病院検査部 臨床分離株)

PINU499 (長崎大学病院検査部 臨床分離株)

Pi17 (大阪歯科大学 細菌学講座より供与)

Fusobacterium nucleatum)

FNU191 (長崎大学病院検査部 臨床分離株)

GAI0317 (岐阜大学生命科学総合支援センター 嫌気性菌分野より供与)

FM (長崎大学病院検査部 臨床分離株)

【動物】

日本 SLC (Shizuoka, Japan) から購入した BALB/c SPF マウス (オス、8 週齢) を用いた。全ての動物実験に関する手技及び実験プロトコールは国立大学法人長崎大学動物実験に関する規定及び長崎大学動物実験実施マニュアルに基づき、長崎大学動物実験委員会の承認を経て施行された。

【感染方法】

感染実験については、経気管投与あるいは経尾静脈投与のいずれかの方法で、菌液を接種した。菌液接種後、体重、生存個体数について、24 時間ごとに観察を行った。

・菌液作成方法

上記細菌株を、PV 添加ブルセラ培地 (極東製薬) に塗付し、嫌気チャンバーにて 48 時間培養し、その後菌を釣菌、modified GAM 培地 (日水製薬) に添加し、各菌株の late log phase まで嫌気チャンバー内で静置培養した。

回収した modified GAM 培地を、3000 回転/分で 10 分遠心し、上清を破棄した。これに滅菌された生理食塩水を加え、最終的に菌量が $2-8 \times 10^9$ CFU/mL となるよ

う、比濁計を用いて調整し、作成した。

- ・気道感染方法

マウスをペントバルビタールにて麻酔し、四肢をプラスチックの台に固定。輪ゴムを用いて頸部を後屈固定した後、蛍光ライトを搭載した耳かきで喉頭展開し、24G のサーフロカテーテル外筒を気管に挿入した。注射筒内の菌液が呼吸にあわせて振動されることを目視にて確認後、菌液を気管内に注入した。

接種する菌液量は 0.05mL/mouse とし、接種菌量は $1-4 \times 10^8$ CFU/mouse とした。

- ・血流感染方法

マウスを固定後、尾静脈に菌液を 0.2mL 注入した。接種菌量は $1.6 \times 10^7 - 1.6 \times 10^8$ CFU/mouse とした。

【生菌数および組織学的評価】

各菌液を接種されたマウスの臓器における生菌数および組織を以下の方法で評価した。

- ・生菌数評価

マウス感染後、頸椎脱臼にて安楽死させ、臓器（肺、肝、脾、腎）を無菌環境下で採取し、1mL の滅菌生理食塩水に収集した。血液は、ヘパリンコートしたシリンジを用いて右室穿刺にて採取した。採取された臓器はポリトロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし、得られた菌液はアネロコロンビア培地に定量的に接種され、その後嫌気チャンバー内で培養された。生菌数の検出下限は、50 CFU/mL であった。

- ・組織評価

細菌試験と同様に臓器を採取後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

【抗菌薬による治療実験】

・Levofloxacin、DS8587 (Sitafloxacin 注射製剤新薬)、Sitafloxacin (いずれも第一三共) を使用した。それぞれ滅菌生理食塩水で溶解し、100mg/kg を菌液接種後 12、24、36 時間後に腹腔内投与した。コントロール群 (Untreated 群) には、同量の滅菌生理食塩水を投与した。

・Metronidazole (MTZ ; ナカライテスク) を使用した。5%酢酸を含む滅菌生理食塩水に溶解し、0.05、5 mg/kg を菌液接種後 24、48、72 時間後に腹腔内投与した。コントロール群には、5%酢酸を含む滅菌生理食塩水を腹腔内投与した。

【統計解析】

2 群間の比較を行う場合、Mann-Whitney U 検定を用いた。生存率は Kaplan-Meier 法で示し、ログランク検定にて統計学的解析をおこなった。P<0.05 を統計学的有意とした。

第3節 実験結果

経気管投与による感染実験結果

【菌液接種後の生存率、細菌試験について】

各菌株を経気管的に接種した予備実験の結果を Table 1 に示す

Table 1. 各嫌気性菌の経気管投与による致死率と 24 時間後の肺内生菌数

Microorganism	Strain	Lethality on BALB/c mice	Bacterial recovery from lungs 24 hours after inoculum
<i>F. necrophorum</i>			
	FNU89	100%	positive (max 10^6 cfu/lungs)
	GAI00184	100%	positive (max 10^6 cfu/lungs)
<i>P. intermedia</i>			
	PINU046	none	positive (max 10^5 cfu/lungs)
	PINU499	none	positive (max 10^3 cfu/lungs)
	Pi17	60-100%	none
<i>F. nucleatum</i>			
	FNU191	none	none
	GAI0317	none	none
	FM	none	none

各嫌気性菌の菌液を経気管投与したところ、*F. necrophorum* を投与した場合のみに、致死感染が誘導されており、他の偏性嫌気性菌と比較し、強い病原性が認められた。Pi17 は、*P. intermedia* の中でも、著しい粘性をもった生成物を産生し、強い病原性をもつ菌株である。しかしながら、Pi17 では経気管投与にてマウスに致死性の炎症をもたらすも、肺内生菌数の評価が困難であり、肺での感染の確認は困難であった。これより、偏性嫌気性菌のマウス肺感染モデルの作成については、*F. necrophorum* に注目して、以下の実験をおこなった。

肺感染時の菌株の病原性を均一にするため、*F. necrophorum* について、菌株のマウスへの馴化をおこない、最終的に、*F. necrophorum* の健常 BALB/c マウスへの経気管接種では、全個体が致死性的となることが確認された。(Figure 1)

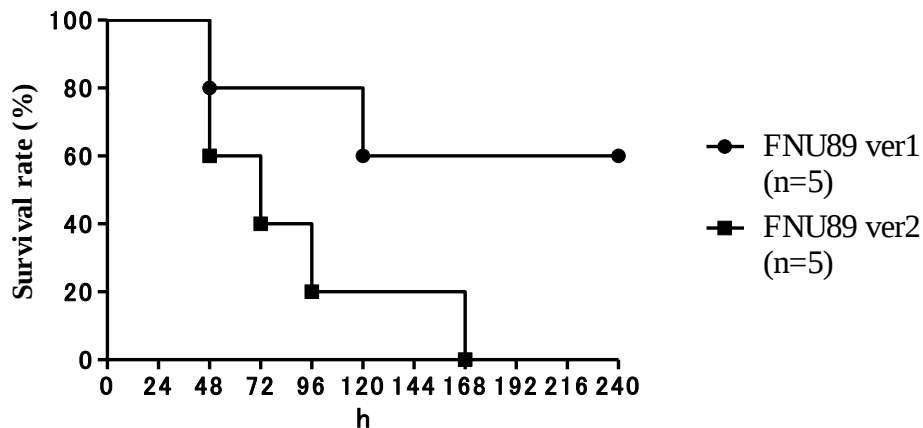


Figure 1. *F. necrophorum* (FNU-89) 経気管投与後の生存率

FNU ver 1: マウス馴化前の保存株

FNU ver 2: マウス馴化後の保存株

次に予備実験として、*F. necrophorum* 経気管投与 (4×10^8 CFU/mouse) 24、72 時間後の肺内生菌数を検証したところ、接種後 24 時間で生菌数は 10^{3-4} CFU/mouse に減少し、72 時間後にはほぼ検出感度以下となった。(Figure 2)

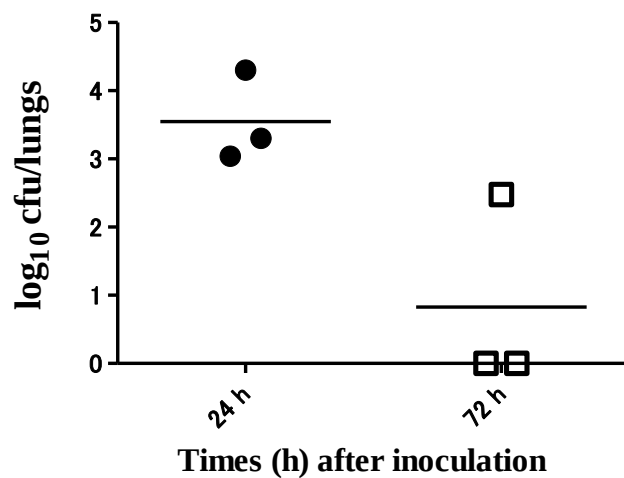


Figure 2. *F. necrophorum* (FNU-89) 経気管投与後の肺内生菌数

これらの結果から、*F. necrophorum* 経気管投与による感染モデルでは、菌液投与 48 時間後からマウスが死亡し、感染個体であっても 72 時間後には菌自体がほぼ wash out されることが示された。このため、本モデルを使用した抗菌薬による治療実験は、菌液接種 12 時間～36 時間の間に抗菌薬投与を行い、治療効果を生存率で検証することとした。

使用した *F. necrophorum* 菌株への微量希釈法で得られた MIC (最少発育阻止濃度) は LVFX $1 \mu\text{g/mL}$ 、DS8587 $0.04 \mu\text{g/mL}$ であった。

F. necrophorum 経気管投与 (4×10^8 CFU/mouse) 後、12、24、36 時間後に LVFX、DS8587 を 100mg/kg 量を腹腔内投与した治療実験の結果を Figure 3 に示す。

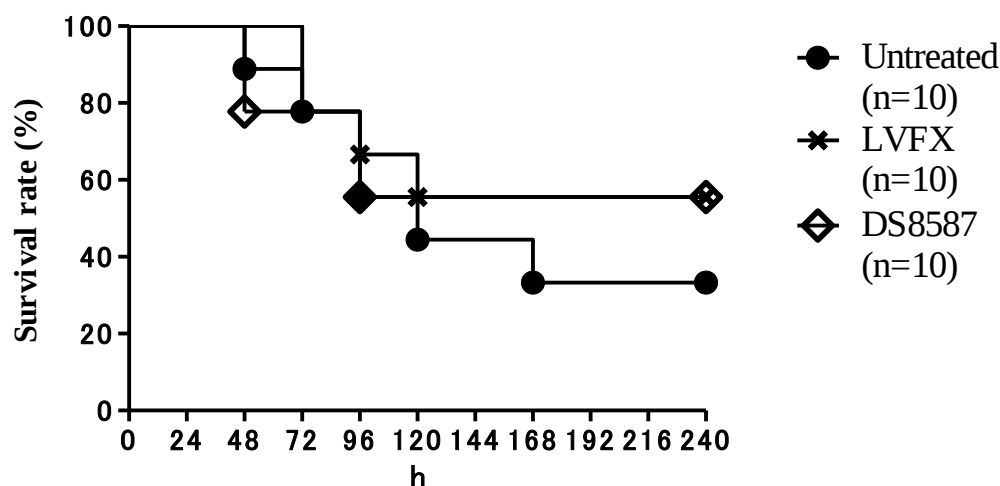


Figure 3. *F. necrophorum* (FNU-89) 気道感染モデルに対する LVFX、DS8587 投与後の生存率

F. necrophorum 気道感染モデルにおいて、LVFX、DS8587 を投与したいずれの群でも、無治療群と比較して生存率の改善は認めなかった。

経尾静脈投与による感染実験結果

【菌液接種後の体重変化について】

抗菌薬評価に適した嫌気性菌による感染モデル確立のため、経気管投与した感染実験で最も病原性の高かった *F. necrophorum* を用いて、経尾静脈投与による血流感染実験を行った。菌株は FNU89 株を用いた。

F. necrophorum 菌液 1.6×10^8 CFU/mouse を経尾静脈投与したところ、感染 48 時間後からコントロール群と比較して有意な体重減少を呈した。感染後 14 日目までの観察で、体重低下は持続された (Figure 4)。一方、*F. necrophorum* 菌液 1.6×10^7 CFU/mouse を経尾静脈投与した群では、接種 24 時間後に体重はやや減少したが、その後増加し、菌液接種後 14 日までコントロール群と有意な体重差は認められなかった。

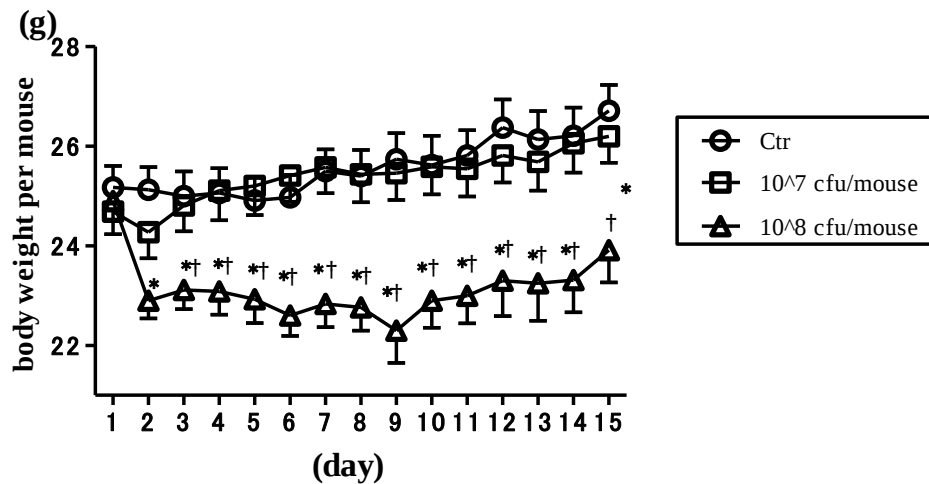


Figure 4. *F. necrophorum* (FNU89 株) 経尾静脈投与後の体重変化

*: $P < 0.05$; Control vs 1.6×10^8 CFU/mouse 投与群

†: $P < 0.05$; 1.6×10^7 CFU/mouse 投与群 vs 1.6×10^8 CFU/mouse 投与群

【菌液接種後の臓器内生菌数について】

F. necrophorum 菌液 1.6×10^8 CFU/mouse を経尾静脈投与後、体重減少が認められた個体には、全個体で肝に肉眼的膿瘍病変の形成が認められた。そこで経時的な肝内での生菌数の変化を検証するため、菌液接種6時間後、1、3、5、7、14日後に肝内生菌数を計測した。肝内生菌数は菌液接種直後から1～3日目にかけて菌数の有意な増加を呈し、接種後7日まで維持された。接種後14日目では、一部の個体で肉眼的病変の消失と菌量の低下が認められた (Figure 5)。

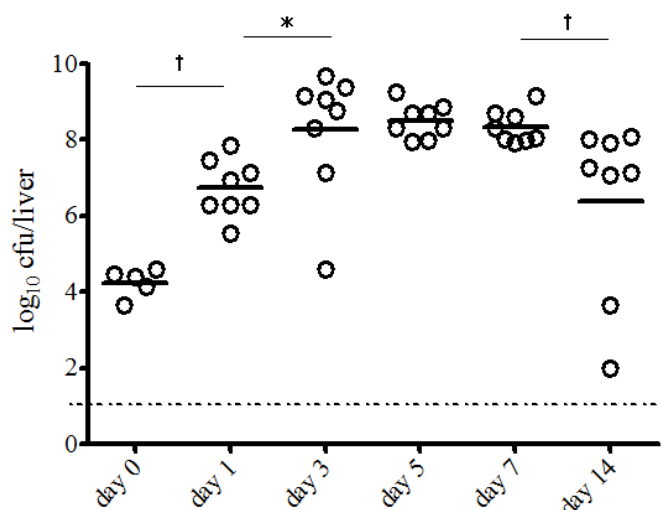


Figure 5. *F. necrophorum* (FNU89 株) 経尾静脈投与後の肝内生菌数

*: $P < 0.05$, †: $P < 0.005$

さらに、菌量がおおよそ最大値となる菌液接種後4日目に肝以外の臓器内生

菌数を評価した。結果を Table 2 に示す。肉眼的膿瘍病変は肝以外では認められず、臓器内生菌数は肝と比較して肺、脾、腎のいずれも低い値を示した。また血中生菌数はほぼ検出感度以下となった。

Table 2. *F. necrophorum* (FNU89 株) 経尾静脈投与 4 日後の各臓器内膿瘍病変と生菌数の比較

	Gross identification of abscesses (positive/total)	Bacterial recovery from organ (positive/total)	Bacterial load (log ₁₀ cfu/mL or organ)
Liver	13/13	13/13	8.16 ± 0.56
Blood	—	2/13 [†]	0.75 ± 0.84 [†]
Lungs	0/13 [†]	10/13	3.13 ± 1.76 [†]
Spleen	0/13 [†]	11/13	3.68 ± 1.91 [†]
Kidneys	0/13 [†]	11/13	2.68 ± 1.63 [†]

*:P<0.05 vs Liver、†:P<0.005 vs Liver.

これより、*F. necrophorum* (FNU89 株) 経尾静脈投与後には、肝に膿瘍形成と経時的な菌の増殖がおこることが示された。

【肝内膿瘍病変の組織学的所見について】

次に *F. necrophorum* 経尾静脈投与後の、肝内の膿瘍病変の組織学的所見を経時的に検証した実験結果を Figure 6 に示す。

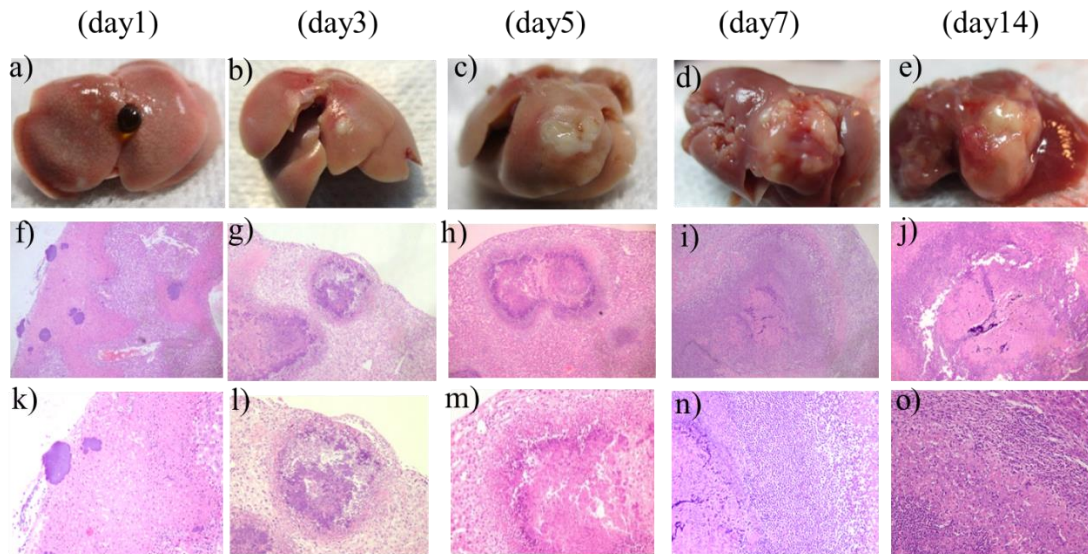


Figure 6. *F. necrophorum* (FNU89 株) 経尾静脈投与後の肝内膿瘍病変の病理学的所見 (a-e) 肉眼的所見、ヘマトキシリン・エオジン染色 (f-j) 40 倍、(i-l) 400 倍.

肉眼的所見としては、菌液接種後 1 日目より肝表面に白斑様病変が出現し、3 日目以後、境界明瞭な壊死性病変が肝表面に突出、癒合性に増大し、5-7 日目までに 2-10mm 大となった。7 日目以後は周辺組織との癒着も認められた。肺、腎、脾を含む他臓器には肉眼的膿瘍形成は認められなかった。

組織学的所見としては、菌液接種後 1 日目に細菌塊が肝内に散見され、3 日目から病巣内部に細菌塊とともに好中球浸潤が認められ膿瘍病変となり、5 日目から病巣内部に融解壊死の所見が認められるようになった。膿瘍病変の周囲には、3 日目には好中球主体の細胞浸潤がみられ、5 日目にはマクロファージも散見されるようになり、7 日目には肉芽層の形成がみられた。

【メトロニダゾールによる治療効果について】

F. necrophorum 菌液 1.6×10^8 CFU/mouse を経尾静脈投与後、メトロニダゾールを 0.05 mg/kg 投与群、5 mg/kg 投与群 (BALB/c 体重 25g/mouse とし計算) の 2 群にわけて治療実験をおこなった。結果を Figure 7 に示す。

メトロニダゾール 5 mg/kg 投与群では、コントロール群、0.05 mg/kg 投与群と比較して、菌液接種 4 日目 (治療終了 1 日後) から体重の有意な増加を認めた。メトロニダゾール 0.05 mg/kg 投与群では、菌液接種 12 日後からコントロールと比較して有意な体重増加を認めた。また、菌液接種後 4 日目 (治療終了 24 時間後) での各群の肝内生菌数を比較したところ、メトロニダゾール 5 mg/kg 投与群で、コントロール群、0.05 mg/kg 投与群と比較して、生菌数の有意な低下

を認めた。また、メトロニダゾール 5 mg/kg 投与群では、全個体で肉眼的肝膿瘍の消失を認めた。(Figure 8)

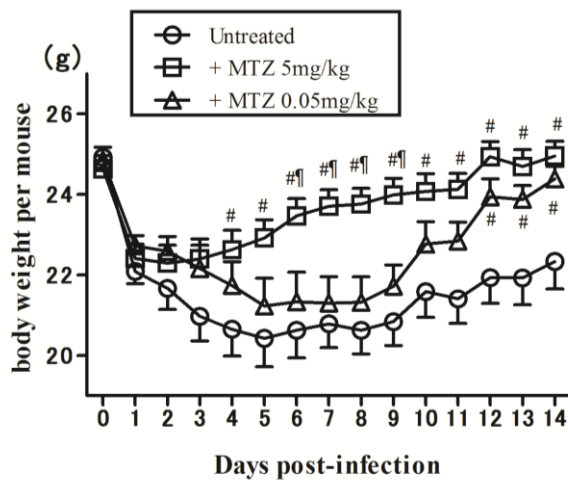


Figure 7. *F. necrophorum* (FNU89 株) 血流感染モデルに対するメトロニダゾール投与後の体重変化

#: $P < 0.05$ vs Control 群

†: $P < 0.05$ vs MTZ 0.05 mg/kg 投与群

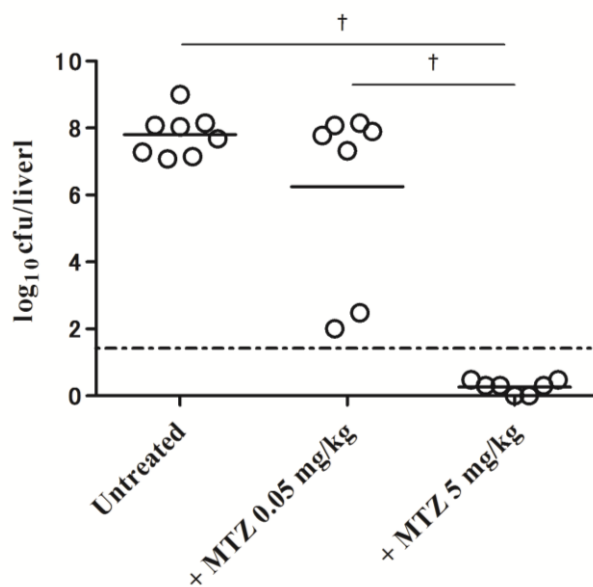


Figure 8. *F. necrophorum* (FNU89 株) 血流感染モデルに対するメトロニダゾール投与後の肝内生菌数.

† : $P < 0.05$.

【LVFX、STFX による治療効果について】

本モデルを用いて、LVFX、STFX の治療実験をおこなった。

F. necrophorum 菌液 1.6×10^8 CFU/mouse を経尾静脈投与 24 時間後より、LVFX、STFX を 12 時間ごと 3 日間に各 100 mg/kg 量を投与した。結果を Figure 9 に示す。

治療終了後 24 時間後（菌液接種 96 時間後）、LVFX 治療群では肝内生菌数が無治療群とほぼ同量残存していたのに対し、STFX 治療群では生菌数の消失が認められた。また、無治療群、LVFX 治療群では全個体で肉眼的肝膿瘍の残存が認められたが、STFX 治療群では全個体で消失していた。

LVFX、STFX の治療実験については、体重変化を観察するための実験は行わなかった。

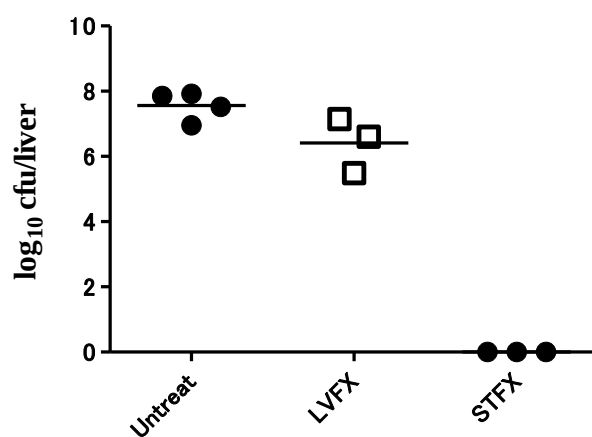


Figure 9. *F. necrophorum* (FNU-89) 肝膿瘍モデルにおける LVFX、DS8587 投与後の肝内生菌数.

第4節 考察

本研究では、抗菌薬による治療効果の評価により適した偏性嫌気性菌感染モデルの作成を目指した。

はじめに、ヒトの呼吸器疾患でしばしば分離される偏性嫌気性菌である、*F. necrophorum*、*F. nucleatum*、*P. intermedia*を用いて、呼吸器感染モデルの作成を試みた。これらの菌種のうち、*F. necrophorum*が高頻度に致死性気道感染を発症した。しかしながら、肺での同菌の継時的な増殖は認められず、抗菌薬の治療効果を評価することは困難であった。

一方、経尾静脈注射で *F. necrophorum* を接種した肝膿瘍モデルについては、菌接種後に経時的な肝内生菌数の増加と肉眼的膿瘍の形成を認めた。さらに、このモデルでの肝内生菌数は個体間で生菌数、膿瘍形成の時期が均一であり、生菌数の評価による抗菌薬治療効果の判定が可能であった。

F. necrophorum はヒトと動物に病原性を示す偏性嫌気性菌であり、ヒトではレミエール症候群（喉頭炎を契機とした内頸静脈炎）、動物では主に肝膿瘍が問題となる^{30,31}。いずれも、*F. necrophorum* が特定の臓器に定着～増殖後に正常環境の破壊がおこり、血管浸潤を経て血行性に散布された遠隔臓器に膿瘍形成を発症する病態によるものと考えられている。*F. necrophorum* は様々な病原因子を菌体内に含むとされ、特に Leukotoxin が重要な病原因子として知られている。Leukotoxin は、牛、馬の好中球、マクロファージ、肝細胞、ヒトの好中球に細胞毒性を持ち、感染初期に貪食細胞～好中球走化への菌側の防御機構として働く³¹。Leukotoxin が肝細胞への毒性を有するため、牛や馬では肝膿瘍を起こしやすいものと考えられており、これまでヒトやマウスでの *F. necrophorum* による肝膿瘍についての報告は乏しい。

今回の我々の検証では、ヒト由来の *F. necrophorum* 臨床分離株を用いた血流感染で、マウスに肝膿瘍が形成されることが認められた。血流感染が成立するためには、比較的多量の菌量を接種することが必要であり、一定の菌量に達しない場合、菌接種後肝膿瘍の形成は認められず、感染は起こらなかった。また、経尾静脈後の膿瘍形成は肝に局限していた。この理由として、*F. necrophorum* が偏性嫌気性菌であり、感染～増殖には臓器内に嫌気的な環境を形成する必要があるため、感染した個体に膿瘍形成を伴ったものと考えられた。膿瘍形成が肝に局限した理由として、*F. necrophorum* が上述の肝細胞へ毒性を有する Leukotoxin などの毒素を有することに加えて、尾静脈を経由した血流感染では解剖学的に肝に高い菌量が集積することが考えられた。

一方、*F. necrophorum* の経気管投与では、致死性の気道感染は誘導されたものの、経時的な肺での菌の増殖、肉眼的膿瘍の形成は認められなかった。この

理由として、もともと酸素を豊富にふくむ大気と交通のある気道では偏性嫌気性菌の発育は困難であること、血流を介した肝膿瘍モデルであっても高い菌量接種が感染成立に必要なことから、感染成立に必要な菌量を単回の経気管投与で接種することは困難であることが考えられた。*F. necrophorum*の経気管投与では肺内での菌の継時的な増殖がなく、投与後に肺内に留まった菌体内毒素などの病原因子に反応して致死的炎症が惹起されている可能性が考えられた。このため、抗菌薬治療では*F. necrophorum*気道感染の炎症を抑制することができず、生存率の改善が乏しかったものと考えられた。

本研究の問題点として、*F. necrophorum*による肝膿瘍感染が起こる病態機序の詳細が明らかではないことがあげられる。菌株による感染性の違い、感染成立に重要となる病原因子などを、今後さらなる研究にて検証する必要があるものと考えられた。また、抗菌薬治療効果の検証については、抗菌薬の投与開始時期、投与期間などによる膿瘍病変に対する治療効果の違いなどを検証していく必要があるものと考えられた。

偏性嫌気性菌による肺感染モデルについては、今回の経気管投与による感染方法では確立が困難であり、今後はアガービーズ法による肺膿瘍モデルなど、別の感染方法での肺感染モデルの検証が望まれる。

第5節 本章の総括および結論

I 本研究から得られた新知見

F. necrophorum 血流感染を介した肝膿瘍モデルを確立した。肝膿瘍モデルでは、肝に局限した膿瘍形成および臓器内生菌数の継時的な増殖が得られ、生菌数や体重変化による抗菌薬治療効果の検証が可能であった。偏性嫌気性菌肺感染モデルについては、*F. necrophorum* を含めて抗菌薬治療効果判定に適したモデルの確立は困難であった。

II 新知見の意義

偏性嫌気性菌は、ヒトへの感染時に膿瘍病変を高頻度で形成することが知られている。一旦膿瘍を形成すると、抗菌薬治療に加えて、ドレナージの併用を要するため、嫌気性菌感染症に対する抗菌薬治療効果の評価は临床上では難しいことも少なくない。本研究で確立された感染モデルの使用により、嫌気性菌の膿瘍病変に対する抗菌薬効果を検証に貴重な基礎データが得られるものと考えられる。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。

III 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

- ・様々な抗菌薬の in vivo での抗嫌気活性を検証する。
- ・偏性嫌気性菌による膿瘍形成の病態機序を検証する。

IV 今後の課題

肝膿瘍モデルにおいて、*F. necrophorum* が肝に感染する機序が明らかになっていないため、さらなる検証が必要である。

第2章

*F. nucleatum*が気道上皮細胞に与える粘液産生能発現への影響の検討

第1節 研究背景

近年、常在細菌叢が産生する生成物に含まれる酪酸が、HIV や潰瘍性大腸炎などの疾患に、病的影響を持つとする報告がなされている^{18,19}。

主要な酪酸産生細菌として、*Fusobacterium nucleatum* や *Porphyromonas gingivalis* といった歯周病原菌が知られている。歯周病原菌は、菌の生成物質が唾液を介して気道に流入することで、下気道に病的影響をもつ可能性が指摘されている³²。健常人においても、睡眠中に唾液の不顕性誤嚥が起こっているとする報告もなされており³³、近年その病原性が注目されている酪酸産生歯周病原菌も、生成物を介し呼吸器に何らかの病原性を有する可能性が考えられる。

しかしながら、これまでの研究で、呼吸器と酪酸産生歯周病原細菌との関連性を検証した報告はない。そこで我々は、主要な酪酸産生歯周病原菌である *Fusobacterium nucleatum* の培養上清が、気道上皮産生細胞の粘液産生能に与える影響を検証した

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、検証を行った。

また、今回我々は、*F. nucleatum* によって誘導される気道上皮細胞の粘液産生に対し、マクロライドや抗嫌気活性をもつ抗菌薬が与える影響を併せて検証した。マクロライドは、気道粘液産生亢進が問題となる慢性呼吸器疾患に対し、免疫修飾作用を介して治療効果を有するとされる抗菌薬である。また、クリンダマイシンやメトロニダゾールは、いずれも偏性嫌気性菌感染時に用いられる抗菌薬である。*F. nucleatum* は、最も頻繁に呼吸器感染の原因菌となる偏性嫌気性菌であり、マクロライドに自然耐性を有する菌種である。このため、抗嫌気活性をもつ抗菌薬と比較して、マクロライドが *F. nucleatum* による粘液産生亢進を抑制するようであれば、治療に際して有用な知見が得られるものと考えた。

第2節 実験方法

【使用菌株、培養条件】

F. nucleatum は、長崎大学病院検査部にて保存されている臨床株 (FNU-191 株)を用いた。*F. nucleatum* の培養は、以下の通り行った。

冷凍保存株を PV 添加ブルセラ培地にて嫌気チャンバーで 48 時間培養し、その後、modified GAM 培地に添加し、嫌気チャンバーで 48 時間静置し、培養を行った。培養上清は、10,000 rpm、50 分で遠心分離し、0.22 μ m pore membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA)にて濾過滅菌した。

【細胞培養】

気道上皮細胞である NCI-H292 細胞を使用した。

培地は、RPMI 培地にウシ胎児血清 (10%)を添加し、ペニシリン 100 単位/mL とストレプトマイシン 100 μ g/ml を加え、培養を行った。

細胞は、5% CO₂ 下 37°C に設定した CO₂ インキュベーターで培養した。

MUC5AC 産生能を検証する際には、*F. nucleatum* の培養上清を加えて刺激を行った。コントロールとして、modified GAM 培地を用いた。

【抗菌薬】

アジスロマイシン (AZM ; ファイザー製薬)、クラリスロマイシン (CAM ; 大正富山製薬)、クリンダマイシン (CLDM ; ナカライテスク)、メトロニダゾール (MTZ ; ナカライテスク)を使用した。

各薬剤は DMSO に溶解し、最終濃度を 1-100 μ g/mL で実験に用いた。MTZ は酢酸に溶解し、同様の濃度に調整した。

【ELISA】

NCI-H292 細胞を 24 ウェルプレートにて培養、刺激後、細胞培養上清を収集し、96 ウェルプレートに 40°C で乾燥固定した。

その後、ウシ胎児血清 2%にてブロッキングを行い、1 次抗体として抗 MUC5AC 抗体 (MONOSAN, Netherland)、2 次抗体として HRP-conjugated anti-goat IgG (BIO-RAD, 東京)を使用し、ELISA を行った。吸光度は 450 nm で計測した。

【細胞内シグナル伝達抑制】

細胞内シグナル伝達の検証のため、ERK インヒビター U0126、p38 MAP kinase インヒビター SB203580、特異的 NF κ B インヒビター caffeic acid phenethyl

ester (CAPE) を使用して抑制実験を行った (いずれも Calbiochem, San Diego, California)。インヒビターを用いた実験時は、*F. nucleatum* 上清刺激 30 分前にこれらのインヒビターを加え、細胞内シグナルへの関与を評価した。

【RT-PCR】

MUC5AC mRNA の発現を RT-PCR 法にて以下の方法で検証した。

NCI-H292 細胞を 6 ウェルプレートで培養後、QuickGene-Mini80 and QuickGene RNA cultured cell kits (FUJIFILM Co., Tokyo, Japan) を使用して全 RNA 抽出を行った。RNA (1 μ g) は oligo(dT) プライマーと SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、cDNA 合成へ逆転写した。その後、リアルタイム PCR にて DNA 量を評価した。

プライマー、プローブは以下のものを使用；

Forward primer: 5' -CAGCCACGTCCCCTTCAATA-3'

Reverse primer: 5' -ACCGCATTGGGCATCC-3'

Taqman probe: 5' -6-FAM-CCACCTCCGAGCCCGTCACTGAG-TAMRA-3'

PCR は、LightCycler system (Roche) を用いて、40 サイクル (95°C 15 秒、30 秒 60°C) 行った。MUC5AC の標準化のため、human porphobilinogen deaminase (hPBGD) を hPBGD primer set (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて測定した。mRNA についてのデータは、hPBGD に対する MUC5AC 発現量の相対比で表記した。

【Western Blot 解析】

NCI-H292 の細胞内蛋白の Western Blot 解析を以下の方法で行った。

蛋白抽出後、12% アクリルアミドゲルを使用し、SDS-PAGE を行った。その後、10% ウシ胎児血清でブロッキングし、1 次抗体にてインキュベート (overnight) を行い、次に 2 次抗体にてインキュベート (1 時間) を行い、発光基質溶液にてインキュベート (15 分) 後、測定を行った。

※1 次抗体として、以下の抗体を使用した

anti-human ERK1/2、anti-phospho-ERK1/2、anti-human p38、anti-phospho-p38、anti-human I- κ B、anti-phospho-I- κ B antibodies

(いずれも、Cell Signaling Technology、Tokyo, Japan)。

【統計学的解析】

2 群間の比較には t 検定を用いた。群間比較には 1 元配置の分散分析 (ANOVA) を用いた。P 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

第3節 実験結果

【*F. nucleatum* 上清刺激による MUC5AC 発現亢進】

F. nucleatum 上清が H292 細胞のムチン産生へ与える、濃度依存性、時間依存性の影響について、蛋白量、mRNA 量を測定し検証した。

濃度依存性の影響について検証した実験結果を Figure 1 に示す。

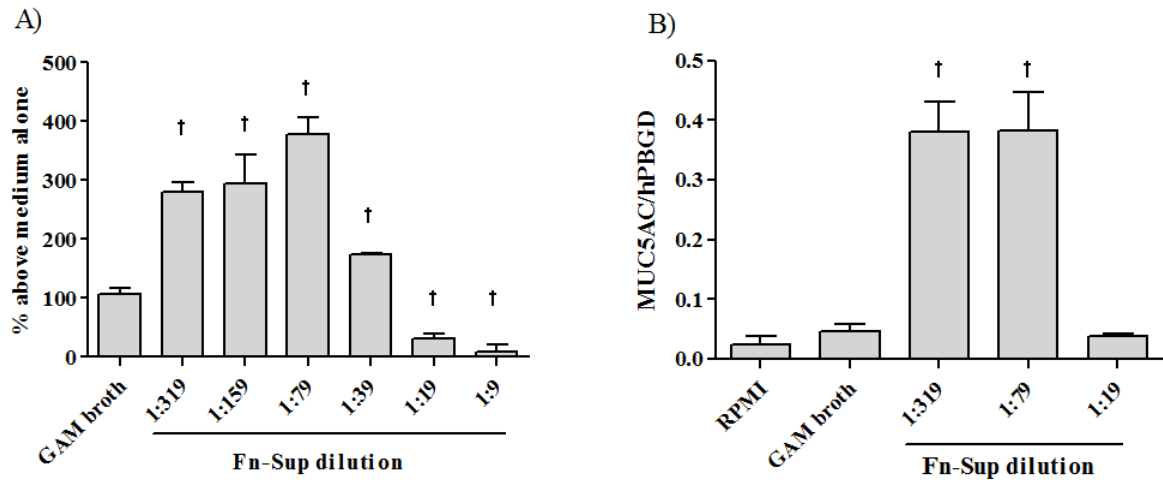


Figure 1.

A: *F. nucleatum* 上清の希釈濃度別に刺激した MUC5AC 蛋白量発現の比較

(各群:n=3)

B: *F. nucleatum* 上清の希釈濃度別に刺激した MUC5AC mRNA 量発現の比較

(各群:n=3)

†: P < 0.01 vs GAM broth (control) 群

Figure 1A では、*F. nucleatum* 上清が、H292 細胞の MUC5AC 蛋白発現を高濃度 (1:9、1:19 希釈) で抑制し、比較的 low 濃度 (1:79 以下) で促進的に作用する結果となった。Figure 1B では、*F. nucleatum* 上清刺激後 12 時間での mRNA 量発現を測定しており、mRNA 量においても Figure 1A と同様の結果が示されている。これらの結果より、*F. nucleatum* 上清は 1:79 希釈において、MUC5AC 発現が最大に亢進することが示された。*F. nucleatum* 上清の MUC5AC 発現への影響を検証するため、以後の実験は Fn Sup を 1:79 希釈したものを使用することとした。

次に、時間依存性の影響について検証した実験結果を Figure 2 に示す。

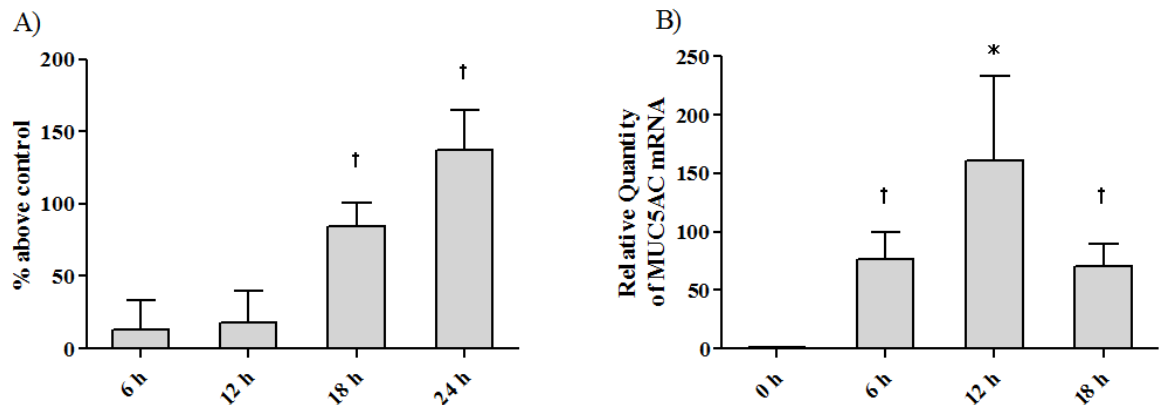


Figure 2.

A: *F. nucleatum* 上清刺激後の時間経過ごとの MUC5AC 蛋白量発現の比較 (各群 n=4)

B: *F. nucleatum* 上清刺激後の時間経過ごとの MUC5AC mRNA 量発現の比較 (各群 n=3)

*: $P < 0.05$ vs 0 h (Control) 群、†: $P < 0.01$ vs 0 h (Control) 群

Figure 2A では、*F. nucleatum* 上清による刺激後、H292 細胞の MUC5AC 蛋白発現は 24 時間後まで亢進される結果となった。別の実験で、36 時間後の蛋白発現をみた結果では、24 時間から 36 時間にかけては明らかな蛋白発現の亢進はみられなかった。Figure 2B では、*F. nucleatum* 上清刺激後 12 時間で mRNA 量発現が最大値となった。これらの結果より、*F. nucleatum* 上清は刺激後 12 時間で MUC5AC mRNA 発現が最大となり、刺激後 24 時間で蛋白量発現が最大となることが示された。これより、*F. nucleatum* 上清の MUC5AC 発現への影響は、蛋白量については上清刺激後 24 時間、mRNA 量については上清刺激後 12 時間で検証することとした。

【*F. nucleatum* 上清刺激による細胞内シグナル伝達への影響と MUC5AC 発現との関連性】

F. nucleatum 上清が、H292 細胞の細胞内シグナル伝達へ与える影響と、細胞シグナル伝達と MUC5AC 発現の関連性について、Western Blot およびシグナルインヒビターを用いた蛋白量発現を測定し、検証した。

細胞内シグナル伝達への影響について、Western Blot にて検証した実験結果を Figure 3 に示す。

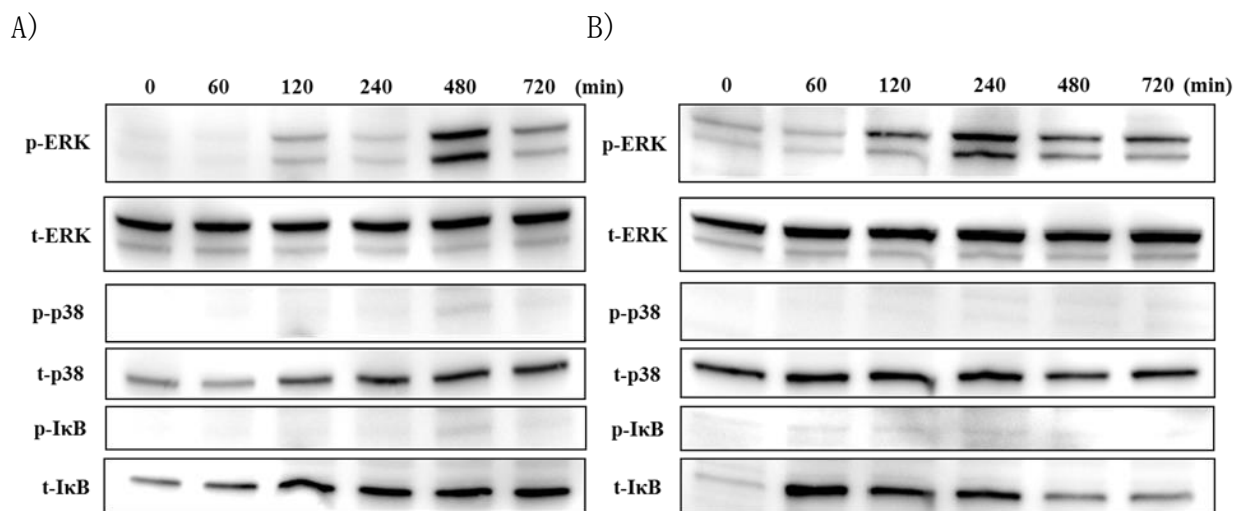


Figure 3.

A: Control による刺激後の時間経過ごとの細胞内シグナル蛋白の比較

B: *F. nucleatum* 上清刺激後の時間経過ごとの細胞内シグナル蛋白の比較

Figure 3 A、B に、Control(培地)、*F. nucleatum* 上清による刺激後 60 分、120 分、240 分、480 分、720 分後の、H292 細胞内の細胞内伝達シグナルの Western blot 法での検出結果を示す。ERK、p38、IκB の 3 つのシグナルについて検証したところ、培地のみの刺激では 480 分後に ERK のリン酸化がみられるのに対し、*F. nucleatum* 上清では 240 分後に ERK のリン酸化が顕著となった。一方、p38、IκB については、明らかなリン酸化は観察されなかった。これより、*F. nucleatum* 上清は H292 細胞に対し、ERK の発現を亢進することが示された。また、培地に含まれる成分のみの刺激でも ERK は up regulate されることも示された。

次に、細胞内シグナルインヒビターを使用した、細胞内シグナル伝達と MUC5AC 発現の関連性を検証した実験結果を Figure 4 に示す。

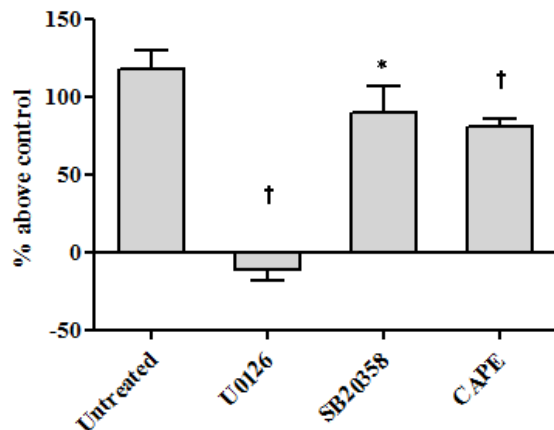


Figure 4. *F. nucleatum* 上清に誘導される MUC5AC 蛋白発現に対する、細胞内シグナルインヒビターの影響の比較 (各群:n=4).

*:P<0.05、†:P<0.01

MUC5AC 発現は、U0126 を使用した群で最も抑制され、SB20358、CAPE でも抑制がみられた。Western Blot の結果とあわせ、*F. nucleatum* 上清による MUC5AC 発現には、ERK が強く関連するものと考えられた。P38、NF κ B については、ERK と比較すると関連性は弱く、インヒビターによる MUC5AC 発現の抑制は、微小な細胞内シグナルの抑制を反映した結果と考えられた。MUC5AC 発現の亢進は、培地のみの刺激でも生じ、*F. nucleatum* 上清は、培地を含めた複合的な成分を含んでいるため、複数の細胞シグナルへの影響が生じることと考えられた。

以上の結果から、*F. nucleatum* 上清は H292 細胞の MUC5AC 発現に促進的に作用し、その主要経路は ERK を介したものであることが示された。この刺激に対する、抗菌薬の効果を確認するため、以下の実験を行った。

【*F. nucleatum* 上清による MUC5AC 発現に対する抗菌薬の影響について】

F. nucleatum 上清に CAM、AZM、CLDM、MTZ をそれぞれ 1、10、50、100 μ g/mL を添加し、MUC5AC 蛋白量の発現を比較した結果を Figure 5 に示す。

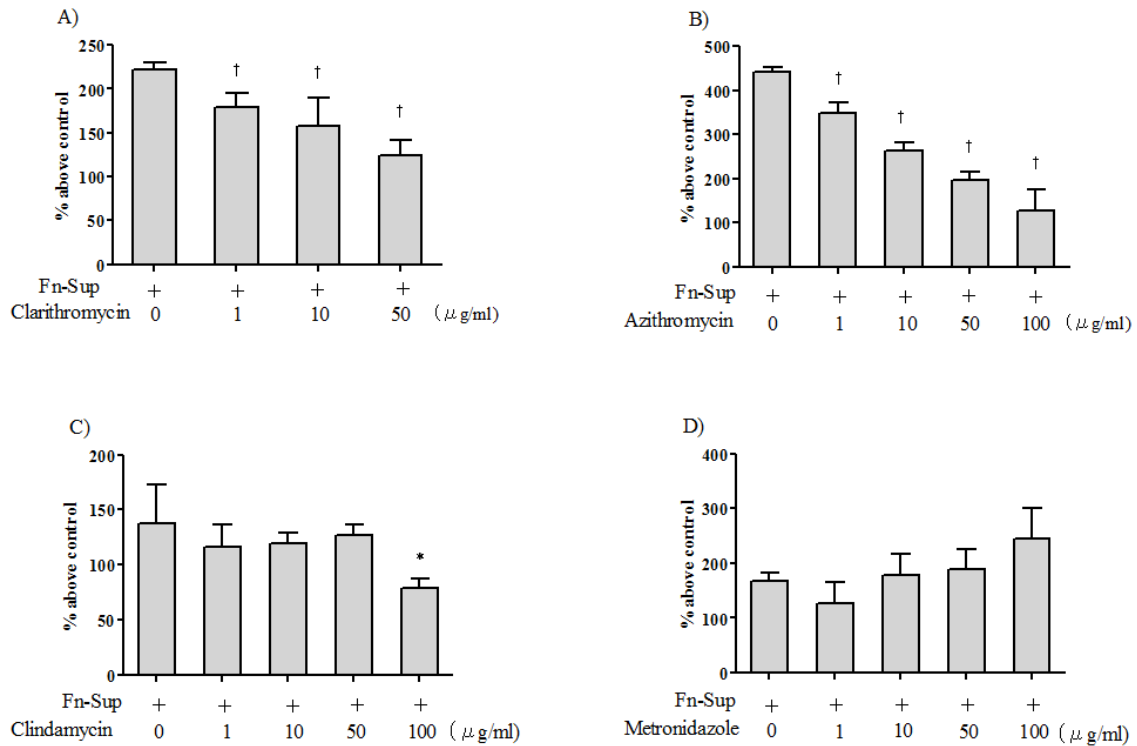


Figure 5.

A: *F. nucleatum* 上清刺激による MUC5AC 蛋白発現量への CAM の効果 (各群:n=4)
 B: *F. nucleatum* 上清刺激による MUC5AC 蛋白発現量への AZM の効果 (各群:n=4)
 C: *F. nucleatum* 上清刺激による MUC5AC 蛋白発現量への CLDM の効果 (各群:n=4)
 D: *F. nucleatum* 上清刺激による MUC5AC 蛋白発現量への MTZ の効果 (各群:n=4)
 *:P<0.05 vs 各 0 μg/mL 群、†:P<0.01 vs 各 0 μg/mL 群.

CAM、AZM を加えた群で、全容量群でコントロール群と比較して有意な MUC5AC 蛋白発現の低下が認められた。MUC5AC 発現量は薬剤容量に伴った減少がみられた。一方で、CLDM 群は 100 μg/mL を加えた群でのみ、MUC5AC 蛋白の有意な減少がみられた。MTZ 群では全容量で MUC5AC 蛋白発現量に減少は認められなかった。なお、この治療実験において、CAM は 100 μg/μL に溶解することが困難であったため、50 μg/mL までの測定となった。コントロール群には、対照群と同量の DMSO を添加した。MTZ については、酢酸で溶解したため、コントロール群には同量の酢酸を添加した。

次に、*F. nucleatum* 上清に誘導された MUC5AC 産生に対する薬剤効果を、mRNA で検証した実験結果を Figure 6 に示す。この実験に際しては、各薬剤はそれぞれ AZM、CLDM、MTZ 100 μg/mL、CAM 50 μg/mL を使用した。

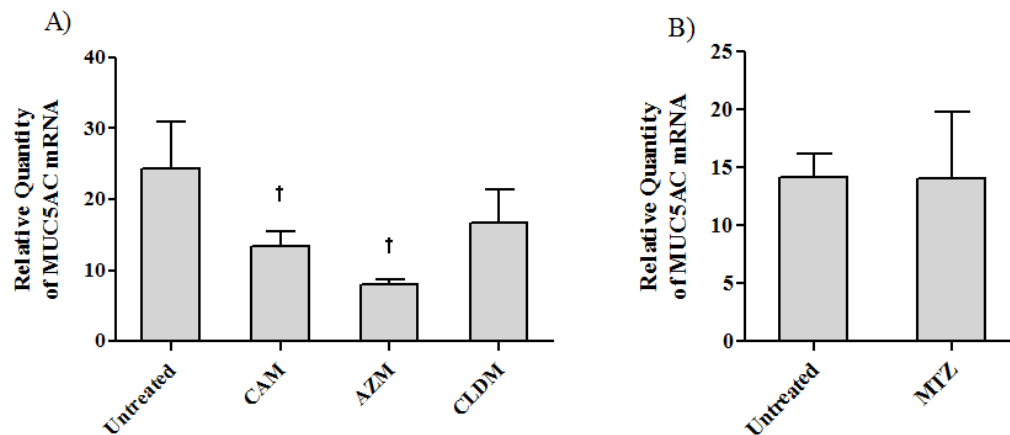


Figure 6.

A: *F. nucleatum* 上清刺激による MUC5AC mRNA 発現への CAM、AZM、CLDM の効果 (各群 : n=5)

B: *F. nucleatum* 上清刺激による MUC5AC mRNA 発現への MTZ の効果 (各群 : n=5)

† : $P < 0.05$ vs Untreated group.

この実験においては、CAM、AZM を加えた群で有意な MUC5AC RNA 量の低下が認められた。

これらの結果から、マクロライド系抗菌薬である CAM、AZM により、*F. nucleatum* 上清に誘導された MUC5AC 産生が、蛋白量、mRNA 量ともに抑制されることが示された。

【*F. nucleatum* 上清誘導性の ERK リン酸化に対する抗菌薬の効果について】
 最後に、*F. nucleatum* 上清に誘導された ERK リン酸化に対する各薬剤の効果を検証した実験結果を、Figure 7 に示す。この実験に際して、各薬剤はそれぞれ AZM、CLDM、MTZ 100 μ g/mL、CAM 50 μ g/mL を使用した。

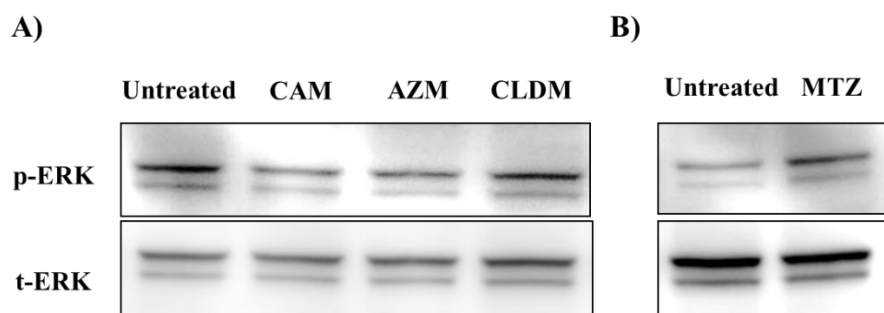


Figure 7.

A: *F. nucleatum* 上清刺激 6 時間後の ERK リン酸化に及ぼす CAM、AZM、CLDM の影響の比較

B: *F. nucleatum* 上清刺激 6 時間後の ERK リン酸化に及ぼす MTZ の影響

この実験では、CAM、AZM を加えた群で、ERK のリン酸化の抑制が認められた。これより、CAM、AZM は、CLDM、MTZ とは異なる作用により、*F. nucleatum* 上清刺激により亢進する ERK リン酸化を抑制することが示された。

第4節 考察

今回の *F. nucleatum* 上清を用いた MUC5AC 発現の検証では、以下の 2 点が示された。(1) *F. nucleatum* 上清は、MUC5AC 誘導を蛋白量、mRNA 量ともに促進した。(2) *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 のリン酸化が重要と考えられた。

また、*F. nucleatum* 上清に誘導される MUC5AC 発現への薬剤効果を検証した実験結果より、以下の 3 点が示された。(1) CAM、AZM は容量依存性に、*F. nucleatum* 上清誘導性の MUC5AC 産生を抑制した。(2) CAM、AZM は、*F. nucleatum* 上清誘導性の ERK のリン酸化を抑制した。(3) CLDM、MTZ では、CAM、AZM と同様の効果は認められなかった。

気道における粘液産生は、病原体や刺激物に対する宿主防御機構として重要である。一方、粘液の過剰産生は、喘息、嚢胞線維症、びまん性汎細気管支炎、COPD などの慢性呼吸器疾患において、気道閉塞やガス交換の障害を引き起こすため、粘液過剰産生の抑制は、こうした疾患において有益となる^{34,35}。今回、*F. nucleatum* の上清は比較的低濃度で、気道上皮細胞の粘液産生を亢進する結果が認められた。*F. nucleatum* は、歯周病の原因菌として知られる偏性嫌気性菌であり、口腔内細菌叢の一部を形成する菌種である。研究背景でも記述したように、健常人でも、睡眠中などには少量の口腔内容物の不顕性誤嚥を生じる。今回の我々の研究結果から、口腔内に存在する *F. nucleatum* は、その生成物の下気道への微量な誤嚥を介して、粘液過剰産生に寄与する可能性が示唆された。

本研究では、*F. nucleatum* 上清誘導性の MUC5AC 産生が、マクロライド系抗菌薬により抑制される結果も示された。マクロライド系抗菌薬の長期間の内服は、びまん性汎細気管支炎や嚢胞線維症において抗炎症作用を介し有益な効果があることが知られている^{36,37}。最近、CAM の静脈注射が人工呼吸器関連肺炎患者の有症状期間や生存率を改善することが、多施設 2 重盲検ランダム化試験で報告されており、マクロライドは慢性呼吸器疾患以外に、急性期の肺炎にも有益であることが示唆されている³⁸。

これまで、気道上皮細胞の MUC5AC 産生については、*Hemophilus influenzae*、緑膿菌、LPS などの刺激による粘液産生をマクロライドが抑制的に作用する報告がなされている³⁹⁻⁴¹。一方、クリンダマイシンやメトロニダゾールは、細菌による炎症性サイトカインの亢進を抑制する作用を有することが、基礎実験で報告されているものの、気道上皮細胞の粘液産生への効果については、報告されていない^{42,43}。

今回、*F. nucleatum* 上清誘導性の MUC5AC 産生は、マクロライドで抑制され、CLDM、MTZ では有意な抑制が観察されない結果となった。マクロライドによる

MUC5AC 産生の抑制は、MUC5AC 産生の主要な細胞内シグナル伝達経路として知られる ERK を介してなされる可能性が示唆された。このことから、抗嫌気活性をもつ抗菌薬と比較して、マクロライドはクリンダマイシン、メトロニダゾールとは異なる機序で、*F. nucleatum* による粘液産生亢進を抑制する可能性が示された。

本研究の問題点として、以下の 3 点があげられる。(1) *F. nucleatum* の上清が複合的な成分を含んでおり、複数の細胞内シグナル伝達活性を誘導したため、細胞内シグナル伝達の詳細を検証することが困難であった。(2) *F. nucleatum* が実際のヒトの気道にどのように存在し、どの程度の生成物を産生するのかが不明であり、今回の研究結果の臨床的意義が不明であった。(3) *F. nucleatum* の上清が、H292 細胞以外の細胞や、in vivo で及ぼす病的影響についても、さらなる検討が必要と考えられた。

これらの問題点については、今後、酪酸など、*F. nucleatum* 上清中の個々の成分に注目し詳細な病態機序を解明し、さらに臨床検体中に含まれる *F. nucleatum* や生成物の頻度などに注目した研究を展開していくことが望まれる。

第5節 本章の総括および結論

I 本研究から得られた新知見

F. nucleatum 培養上清により、MUC5AC 産生亢進が誘導された。*F. nucleatum* 培養上清により誘導される MUC5AC 産生は、マクロライドで抑制され、クリンダマイシン、メトロニダゾールでは抑制されなかった。*F. nucleatum* 培養上清により誘導される MUC5AC 産生においては、ERK のリン酸化が重要であり、マクロライドはこれを抑制した。

II 新知見の意義

F. nucleatum は、歯周病原菌の一つであり、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。

III 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

- ・ *F. nucleatum* 上清中の個々の成分に注目し詳細な病態機序を解明する。
- ・ 臨床検体中の *F. nucleatum* や生成物と、気道粘液産生についての関連性を検証する。

IV 今後の課題

F. nucleatum の生成物がどのような機序で MUC5AC 産生亢進に寄与したかが十分解明されていないため、さらなる見当が必要である。

第3章

総括および結論

偏性嫌気性菌は、近年、遺伝子学的診断法の開発に伴い、従来と比較して、膿胸や肺炎の原因菌として高い頻度で検出されるようになっている。また、大腸癌における *Fusobacterium nucleatum*、潰瘍性大腸炎における *Fusobacterium varium* など、一部の偏性嫌気性菌については、慢性疾患の病態に重要な役割を果たしうるとの報告が相次いでいる。そこで、呼吸器感染症の日常臨床にあたる著者は、呼吸器感染での原因菌でもあり、近年特に注目されている偏性嫌気性菌である、*F. nucleatum*、*P. intermedia* や *F. necrophorum* に着目して、下気道での病原性を検討することを目的とした。研究は、菌自体が下気道に及ぼす病原性を *in vivo* 実験にて、菌の生成物が下気道に及ぼす病原性を *in vitro* 実験で検証した。今回の研究で明らかになった新知見を以下にまとめた。

1. *F. necrophorum* 血流感染を介した肝膿瘍モデルを確立した。(第1章)
2. *F. necrophorum* の生体内での増殖には、膿瘍形成などの嫌气的環境が形成されることが必須と考えられた。(第1章)
3. *F. nucleatum* の生成物は、下気道の粘液産生亢進に寄与する可能性がある。(第2章)
4. マクロライド系抗菌薬は、*F. nucleatum* に誘導される粘液産生亢進を抑制し、クリンダマイシンやメトロニダゾールとは異なる機序で、治療効果をもつ可能性がある。

今後の研究課題として、実際に下気道感染や呼吸器疾患を有するヒトにおいて、*F. nucleatum* や *P. intermedia* がどのような頻度で存在するかを検証したい。これにあたっては、歯周病原菌のサーベイランスに用いられるリアルタイムPCR法を用いて、呼吸器検体中に含まれる上記菌種の遺伝子を検索することを考えている。また、*F. nucleatum*、*F. necrophorum*、*P. intermedia* については、その生成物に注目した研究を考えている。*F. nucleatum* が気道粘液産生へ与える影響については、重要な病的成分である酪酸に注目した検証を考えている。ほかに、偏性嫌気性菌の生成物の病原性を *in vivo* で検証することも考えている。

偏性嫌気性菌の下気道における病原性についての研究として、今回は嫌気性菌研究の基本となる、菌の扱いを確認した意味合いが強い。しかしながら、今後の偏性嫌気性菌の病態を理解する上で、菌自体による病的影響と、菌の生成

物による病的影響を区別した考え方が重要であると整理されたことは、大きな収穫であったと考える。今後、嫌気性菌の菌体成分、生成物についてさらに研究を進め、下気道における嫌気性菌の病的役割の解明を目指していきたいと考えている。

謝辞

本研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究科内科学講座呼吸器内科学分野、西村正治教授に深謝致します。ならびに、適切な助言と直接の御指導を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座、河野茂教授、展開医療科学講座病態解析・診断学分野、柳原克紀教授に感謝の意を表します。

参考文献

1. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Summary of Vital Statistics; Trends in leading causes of death. Website. Available: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai11/kekka03.htm>. Accessed 2013 November 26.
2. Saito, A. *et al.* Prospective multicenter study of the causative organisms of community-acquired pneumonia in adults in Japan. *J. Infect. Chemother.* 12, 63-9 (2006).
3. Johansson, N. *et al.* Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. *Clin. Infect. Dis.* 50, 202-9 (2010).
4. Cillóniz, C. *et al.* Microbial aetiology of community-acquired pneumonia and its relation to severity. *Thorax.* 66, 340-6 (2011).
5. Yamasaki, K. *et al.* Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. *PLoS One* 6; 8:e63103. doi: 10.1371/journal.pone.0063103 (2013).
6. Ahmed R.A., Marrie, T.J. & Huang, J.Q. Thoracic empyema in patients with community-acquired pneumonia. *Am. J. Med.* 119, 877-83 (2006).
7. Barnes, T.W. *et al.* Low yield of microbiologic studies on pleural fluid specimens. *Chest.* 127, 916-21 (2005).
8. Boyanova, L. *et al.* Anaerobic microbiology in 198 cases of pleural empyema: a Bulgarian study. *Anaerobe.* 10, 261-7 (2004).
9. Kawanami, T. *et al.* A higher significance of anaerobes: the clone library analysis of bacterial pleurisy. *Chest.* 139, 600-8 (2011).
10. Tunney, M.M. *et al.* Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 177, 995-1001 (2008).
11. Worlitzsch, D. *et al.* Antibiotic-resistant obligate anaerobes during exacerbations of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 454-60 (2009).
12. Ulrich, M. *et al.* Relative contribution of *Prevotella intermedia* and *Pseudomonas aeruginosa* to lung pathology in airways of patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 65, 978-84 (2010).
13. Socransky, S.S. *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin.*

Periodontol. 25, 134-44 (1998).

14. Friedewald, V.E. *et al.* The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Periodontol.* 80, 1021-32 (2009).

15. Wu, T. *et al.* Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. *Arch. Intern. Med.* 160, 2749-55 (2000).

16. Demmer, R.T., Jacobs, D.R. Jr. & Desvarieux, M. Periodontal disease and incident type 2 diabetes: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiologic follow-up study. *Diabetes. Care.* 31, 1373-9 (2008).

17. Matevosyan, NR. Periodontal disease and perinatal outcomes. *Arch. Gynecol. Obstet.* 283, 675-86 (2011).

18. Imai, K., Yamada, K., Tamura, M., Ochiai, K. & and Okamoto, T. Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria. *Cell. Mol. Life. Sci.* 69, 2583-92 (2012).

19. Ohkusa, T. *et al.* Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut.* 52, 79-83 (2003).

20. Ohkusa, T. *et al.* Newly developed antibiotic combination therapy for ulcerative colitis: a double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 1820-9 (2010).

21. Castellarin, M. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome. Res.* 22, 299-306 (2012).

22. Kostic, A.D. *et al.* Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome. Res.* 22, 292-8 (2012).

23. Rubinstein, M.R. *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell. Host. Microbe.* 14, 195-206 (2013).

24. Wilson, J.R. & Limaye, AP. Risk factors for mortality in patients with anaerobic bacteremia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 310-6 (2004).

25. Giamarellou, H. Anaerobic infection therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16, 341-6 (2000).

26. Ednie, L. M. & Appelbaum, P. C. Antianaerobic activity of sulopenem compared to six other agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53, 2163-70 (2009).

27. Tanaka, K. *et al.* In vitro activity of tomopenem (CS-023/RO4908463) against anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53, 319–22 (2009).
28. Tran, C. M. *et al.* In vitro antimicrobial activity of razupenem (SMP-601, PTZ601) against anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55, 2398–402 (2011).
29. Abe, P. M., Lennard, E. S. & Holland, J. W. *Fusobacterium necrophorum* infection in mice as a model for the study of liver abscess formation and induction of immunity. *Infect. Immun.* 13, 1473–8 (1976).
30. Hagelskjaer, Kristensen, L. & Prag, J. Human necrobacillosis, with emphasis on Lemierre's syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 31, 524–32 (2000).
31. Tadepalli, S. *et al.* *Fusobacterium necrophorum*: a ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. *Anaerobe.* 15, 36–43 (2009).
32. Azarpazhooh, A. & Leake, J.L. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *J. Periodontol.* 77, 1465–82 (2006).
33. Marik, P.E. & Kaplan, D. Aspiration pneumonia and dysphagia in the elderly. *Chest.* 124, 328–36 (2003).
34. Dohrman, A. *et al.* Mucin gene (MUC 2 and MUC 5AC) upregulation by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1406, 251–9 (1998).
35. Shimizu, T. *et al.* In vivo and in vitro effects of macrolide antibiotics on mucus secretion in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 168, 581–7 (2003).
36. Kudoh, S. *et al.* Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 157, 1829–32 (1998).
37. Saiman, L. *et al.* Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA.* 290, 1749–56 (2003).
38. Giamarellos-Bourboulis E.J. *et al.* Effect of clarithromycin in patients with sepsis and ventilator-associated pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 46:1157–64 (2008).
39. Imamura, Y. *et al.* Azithromycin inhibits MUC5AC production induced by the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone in NCI-H292 Cells. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48, 3457–3461

(2004).

40. Araki, N. *et al.* Azithromycin inhibits nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced MUC5AC expression and secretion via inhibition of activator protein-1 in human airway epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 644, 209-214 (2010).

41. Nakamura, S. *et al.* High-dose tobramycin inhibits lipopolysaccharide-induced MUC5AC production in human lung epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 659, 67-1 (2011).

42. Pichereau, S. *et al.* Concentration-dependent effects of antimicrobials on *Staphylococcus aureus* toxin-mediated cytokine production from peripheral blood mononuclear cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 123-9 (2012).

43. Rizzo, A. *et al.* Effect of metronidazole and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. *Int. Immunopharmacol.* 10, 744-750 (2010).