

基礎系教育講演

口腔細菌 *Streptococcus intermedius* の新展開

弘田 克彦

キーワード：oropharyngeal bacteria, aspiration pneumonia, *Streptococcus intermedius*, IP-10, IL-8

New Development in the Research on Oral Bacterium, *Streptococcus intermedius*

Katsuhiko HIROTA

Abstract : It is believed that the reduction of the number of bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida* and periodontopathogenic bacteria, and forming the healthy oropharyngeal flora by oral health care are effective in preventing aspiration pneumonia. These bacteria are often isolated and cultured from the aspiration pneumonia recurrence-prone patient's pharynxes at the same time. However, the microbiological analyses regarding the aspiration pneumonia have not been performed sufficiently. We have developed the studies on *S. intermedius*, one of the aspiration pneumonia-causing bacteria and these findings are shedding light on the mechanisms for diabetes mellitus, Sjögren's syndrome and chronic thyroiditis, and the prevention of influenza as well as aspiration pneumonia.

はじめに

私たちは、口腔ケアが誤嚥性肺炎の発症を予防できるかどうかを検証する手がかりとして、口腔ケアの効果を咽頭細菌数の変動でとらえて観察してきた。その結果、誤嚥性肺炎予防には、口腔ケアにより咽頭での総細菌数を健康なヒトの平均的なレベルにまで改善することが有効と思われた。また、長年にわたり咽頭細菌の分離培養に携わってきた経験から、誤嚥性肺炎を繰り返す予後不良高齢者の咽頭からは、*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus intermedius* がなぜかセットで同時に分離培養される確立が高いことを見出した(図1)。しかしその理由に関する細菌学的な解析はほとんどなされていなかった。

私たちは、口腔細菌 *S. intermedius* に関する研究をすすめることで、上記の細菌学的な解析だけでなく、インフルエンザ重症化予防、さらには原発性胆汁性肝硬変(PBC)や糖尿病のメカニズム解明の一助となる可能

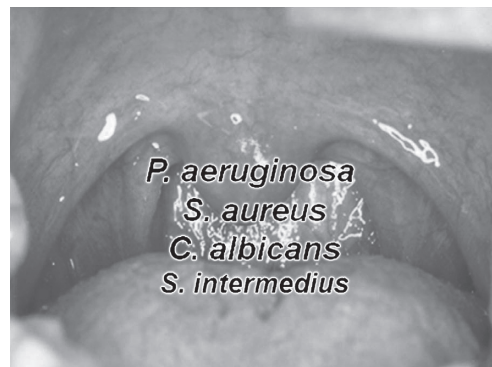


図1 誤嚥性肺炎を繰り返す予後不良患者の咽頭からは、*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus intermedius* がなぜかセットで同時に分離培養される確立が高い。

性のある知見を得ている。これらの知見を多くの方々に知っていただきたい。

1. マイクロバイオームの乱れは、免疫を通じて健康や病気に直結する

近年、細菌叢をまとめて調査するメタゲノム解析により、その全体像が浮かび上がってきた。それによると、ヒトはそれぞれ固有の細菌叢をもち、その違いは個人識別に使えるほどである。しかもマイクロバイオームの乱れは、免疫を通じて健康や病気に直結することも解明され始めた。

口腔ケアが要介護高齢者の誤嚥性肺炎の発症を予防できるかどうかを検証する手がかりとして、まず長野でのパイロット・スタディ¹⁾では、口腔ケアの効果を朝起床後洗口前の咽頭細菌数の変動でとらえて観察した。咽頭細菌叢の選択にあたっては、当時、疑問を投げかけられたこともあったが、後日になって正しかったことが示されている²⁾。長野でのパイロットスタディをふまえて、1998年10月より6カ月間にわたり、浜松市の特別養護老人ホーム2施設および老人保健施設1施設において、口腔ケアによる口腔内状態改善研究モデル事業を、厚生省老人保健強化推進特別事業として行った。その結果、緑膿菌、ブドウ球菌、カンジダの検出率の明らかな低下がみられた³⁾。これらにより示された口腔ケアによる緑膿菌、ブドウ球菌、カンジダなどの咽頭からの検出率の明らかな減少は、口腔ケアにより高齢者の肺炎が減少するという Yoneyama ら⁴⁾の研究結果の裏付けとなるものであった。また後の人工呼吸器関連性肺炎 (ventilator associated pneumonia; VAP) 予防の実施にあたっては大きな指針の一つとなっている。

平成15年度、16年度の厚生労働省医療技術評価総合研究事業に関する研究協力から、摂食嚥下傷害を伴う脳血管障害患者の咽頭からは緑膿菌が検出されやすいことが示された⁵⁾。検出されやすい理由の1つは、摂食嚥下傷害のあることで本来定着する確立の少ない緑膿菌が、咽頭に定着しやすい要因が増加しているものと推定される。摂食嚥下傷害のある脳血管障害患者は誤嚥性肺炎にかかりやすいことから、リスク回避には緑膿菌対策を考慮した口腔ケアが是非とも必要と思われる。

2. *Streptococcus intermedius* と biofilm 感染症

S. anginosus group (本邦では *S. milleri* group として知られている) は、以前より、肺炎、肺化膿症、膿胸などの呼吸器感染症の起原菌として注目されてきた。*S. intermedius* は、*S. anginosus* group に属している⁶⁾。*S. anginosus* group は口腔、咽頭、腸管、膣などの粘膜に存在する菌群である。*S. intermedius* は、初代分離では嫌気培養でのみ発育することが多いので、臨床検査時の好気培養ではたとえ化膿の原因菌であったとしても検出されないことがほとんどである。さらに *S. intermedius* は多様な glycosidase 活性があり、特に sialidase は *S. anginosus* group のなかで *S. intermedius* だけの特徴である。Hyaluronidase は、結合組織をつくるヒアルロン酸

を分解し、組織での菌の侵入や拡散に関わっている。

S. intermedius はバイオフィルムを形成する⁷⁾。バイオフィルム感染症では菌体外 DNA (extracellular DNA; eDNA) と複合体を形成する菌体外 HLP (extracellular histone-like DNA binding protein; eHLP) が重要であることが示され始めた⁸⁾。*S. intermedius* バイオフィルム感染症に菌体外 eDNA と複合体を形成する菌体外 Si-HLP (extracellular *S. intermedius* histone-like DNA binding protein; eSi-HLP) が関与することを明らかにする研究は我々独自のものである。

3. 過剰な eSi-HLP は予期しない炎症や自己免疫反応を惹起する?

Histone-like DNA binding protein (HLP) は、細菌の DNA の複製、組み換え、修復等に DNA シャペロンとして関与しているが、リポタイコ酸 (LTA) とも結合しやすく、LTA と HLP の複合体は、単球・マクロファージに対しては炎症性サイトカインの産生を誘導する⁹⁾。そのため、HLP は本来の機能とは別に、免疫に重要な役割を果たすものと注目されている。私たちは HLP が免疫に及ぼす未知なる機能を解析するため、*S. intermedius* の *hlp* gene をクローニングして、大腸菌内で rSi-HLP を発現誘導させるところまでは既に確立している。

私たちは、*S. intermedius* 感染症の重症化に関して、宿主応答の観点から、自然免疫の過剰応答ならびにケモカインに焦点を当てて研究している。具体的には、0, 100 ng/ml, 1, 10, 50 µg/ml 濃度の rSi-HLP の作用による培養ヒト単球様細胞 (THP-1) 変化を、GeneChip® DNA マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現解析をしている。単球は細胞性免疫に大きく関与する。さらにその表面には IgG receptor, C3 receptor および IgE receptor が存在し、アレルギー反応への関与も示されている^{10, 11)}。そのため、末梢血単球が誤嚥性肺炎の発症機序に関与するかどうかは、非常に興味ある問題であった。

Bio-plex 測定法を用いて、rSi-HLP が THP-1 細胞のサイトカイン発現に及ぼす影響についての予備実験を行った。その結果、驚いたことに、IL-8 とインターフェロン誘導タンパク質-10 (IP-10) の mRNA 発現およびタンパク質産生量が共に異常なほど上昇することを見出した。IP-10 は、形質細胞様樹状細胞 (Plasmactoid dendritic cell; pDC) の遊走因子であり、最新の知見では、pDC, 単球・マクロファージ、リンパ球の集積異常が種々の自己免疫反応の始まりとも考えはじめられている。

4. 過剰な IL-8 と咽頭粘膜上の負の連鎖

過剰な IL-8 は、好中球の過剰活性化を誘導し、気道炎症のさらなる増悪を誘導する¹²⁾。私たちは、rSi-HLP により THP-1 において MEK-ERK1/2 及び SAPK/JNK 経路を介して、炎症性サイトカインの産生を増強することを見出している⁹⁾。この現象が咽頭粘膜で生じた場合

には、気道粘液ムチンの sialyl-Lewis x 量が増加するものと推定される。その根拠の一つは、気道炎症の発症時には好中球の shedding に加え、気道粘液ムチンの sialyl-Lewis x が増加¹³⁾ するためである。sialyl-Lewis x はムコイド型 *P. aeruginosa* のエピトープ¹⁴⁾ であるため、*S. intermedius* の増加により単球や好中球が多量にリクルートされると、ムコイド型 *P. aeruginosa* が咽頭でバイオフィルムを形成し易い環境が生まれると推定される。*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. intermedius* がセットで同時に培養される謎を解く鍵の一つが、*P. aeruginosa* と *C. albicans* との拮抗作用¹⁵⁾、*P. aeruginosa* と *S. aureus* との拮抗作用¹⁶⁾、*S. aureus* が産生する毒素と sialyl-Lewis x との結合作用¹⁷⁾、*S. intermedius* と sialyl-Lewis x の結合作用¹⁸⁾ から推察して、sialyl-Lewis x にあるのではないかと考えている (図2)。

緑膿菌を先行感染させた慢性気道感染マウスにインフルエンザウイルスを重複感染させた場合では、感染の重症化が見られるが¹⁹⁾、インフルエンザウイルスのエピトープも sialyl-Lewis x であるとの報告が増加している²⁰⁾。

多くの家族単位の研究からも自己免疫疾患に遺伝的要因が重要であることは裏づけられている。しかし遺伝的要因が重要であるにもかかわらず自己免疫疾患の多くの症例が散発的に発症することは、非遺伝的な要因、すなわち環境要因の関与が大きいことを示すものと言える。私たちが *S. intermedius* に関する研究から、自己免疫疾患である原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis; PBC) に類似した疾患に本菌の Si-HLP が関与する可能性を見出した²¹⁻²⁴⁾。口腔細菌である *S. intermedius* は当然のことながら家族内伝播する。菌種が同じでも菌株間の特徴は大きく異なり、これが家族間で引き継がれていく。ある意味での遺伝的要因といえるのではないだろうか。

現在までの私たちの多くの免疫組織化学染色結果とあわせて考察すると、PBCにも IP-10 や pDC が関与する可能性が非常に高く、これらを含めたケモカイン動態変化が、PBC および関連自己免疫疾患の免疫寛容破綻機構に関連する可能性が推測される。是非とも詳細に解析することでこれらの関連性を解明したい。

さらに本実験動物中の一部に自己免疫性膵炎が生じることが見出されているが、IP-10 はヒト 1 型糖尿病患者血清において高値をとる²⁵⁾。この発症機序に関してもケモカイン動態が関与すると考えられる。そのため rSi-HLP が β 細胞と結合し細胞内へ取り込まれる分子イメージを、蛍光色素でラベルした rSi-HLP を用い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察し解析している。次に、細胞内へ取り込まれた rSi-HLP が、小胞体異常を惹起するかどうか併せて検討している。

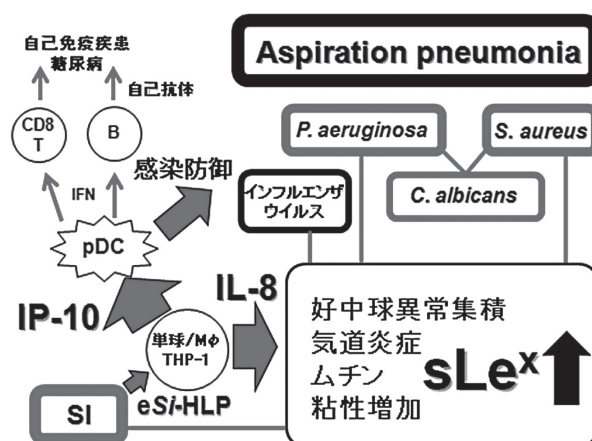


図2 *S. intermedius* を研究していくことは、誤嚥性肺炎予防だけでなく、インフルエンザ重症化予防や糖尿病と肝疾患のクロストーク解明の一助となる。

まとめ

S. intermedius に関する研究を新展開させていくことは、誤嚥性肺炎予防だけでなく、インフルエンザ重症化予防や糖尿病と肝疾患のクロストーク解明の一助になると考えている (図2)。今後は *S. intermedius* 研究から得られたいくつかの仮説を立証するため、さらなる研究が必要と考えている。

参考文献

- 1) 弘田克彦, 米山武義, 太田昌子, 橋本賢二, 三宅洋一郎: プロフェッショナル・オーラル・ヘルス・ケアを受けた高齢者の咽頭細菌数の変動. 日本老年医学会雑誌 34, 125-129 (1997)
- 2) Marik PE: Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. N Engl J Med 344, 665-671 (2001)
- 3) Ishikawa A, Yoneyama T, Hirota K, Miyake Y and Miyatake K: Professional oral health care reduces the number of oropharyngeal bacteria. J Dent Res 87, 594-598 (2008)
- 4) Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T and Sasaki H: Oral care and pneumonia Lancet 354, 515 (1999)
- 5) Hirota K, Yoneyama T, Sakamoto M, Miyamoto H, Kurihara M, Kayama S, Murakami K, Yumoto H, Matsuo T and Miyake Y: High prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* from oropharyngeal biofilm in patients with cerebrovascular infarction and dysphagia. Chest 138, 237-238 (2010)
- 6) 弘田克彦, 三宅洋一郎: アンギノサス群レンサ球菌とは?. 歯科展望 100, 1348-1349 (2002)
- 7) 弘田克彦, 村上圭史, 根本謙, 三宅洋一郎:

- Streptococcus intermedius* の付着, 凝集時における histone-like protein の局在. *Bacterial Adherence & Biofilm* 16, 27-32 (2002)
- 8) Goodman S.D, K.P Obergfell, J.A. Jurcisek, L.A. Novotny, J.S. Downey, E.A Ayala, N. Tjokro, B. Li, S.S. Justice and L.O. Bakaletz: Biofilm can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunology* 27, 1-13 (2011)
 - 9) Liu D, Yumoto H, Murakami K, Hirota K, Kayama S, Taniguchi T, Yamamoto A, Ono T, Matsuo T and Miyake Y: Heterologous expression of a histone-like protein from *Streptococcus intermedius* in *Escherichia coli* alters the nucleoid structure and inhibits the growth of *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett* 288, 68-75 (2008)
 - 10) Huber, H., Polley, M. J., Linscott, W. D., Fundenberg, H. H. and Muller-Eberhard, H. J: Human monocytes: distinct receptor sites for the third component of complement and for immunoglobulin G. *Science* 162, 1281-1283 (1968)
 - 11) Melewicz, F. M. and Spiegelberg, H. L: Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. *J. Immunol* 125, 1026-1031 (1980)
 - 12) Bautista MV, Chen Y, Ivanova VS, Rahimi MK, Watson AM and Rose MC: IL-8 regulates mucin gene expression at the posttranscriptional level in lung epithelial cells. *J Immunol* 183, 2159-2166 (2009)
 - 13) 石橋祐二, 井上義雄, 谷口彰良: 気道炎症の発症・増悪に関する粘液中糖鎖の役割とその発現調節機構. *YAKUGAKU ZASSHI* 132, 699-704 (2012)
 - 14) Xia B, Sachdev GP and Cummings RD: *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strain 8830 binds glycans containing the sialyl-Lewis x epitope. *Glycoconj J* 24, 87-95 (2007)
 - 15) Hogan DA and Kolter R: *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* 296, 2229-2232 (2002)
 - 16) Shirtliff ME, Peters BM and Jabra-Rizk MA: Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 299(1), 1-8 (2009)
 - 17) Baker HM, Basu I, Chung MC, Caradoc-Davies T, Fraser JD and Baker EN: Crystal structures of the staphylococcal toxin SSL5 in complex with sialyl Lewis X reveal a conserved binding site that shares common features with viral and bacterial sialic acid binding proteins. *J Mol Biol* 374, 1298-1308 (2007)
 - 18) Hirota K, Osawa R, Nemoto K, Ono T and Miyake Y: Highly expressed human sialyl Lewis antigen on cell surface of *Streptococcus gallolyticus*. *Lancet* 347, 760 (1996)
 - 19) Seki M, Higashiyama Y, Tomono K, Yanagihara K, Ohno H, Kaneko Y, Izumikawa K, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Tashiro T and Kohno S: Acute infection with influenza virus enhances susceptibility to fatal pneumonia following *Streptococcus pneumoniae* infection in mice with chronic pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol* 137, 35-40 (2004)
 - 20) Meisen I, Dzudzek T, Ehrhardt C, Ludwig S, Mormann M, Rosenbrück R, Lümen R, Kniep B, Karch H and Müthing J: The human H3N2 influenza viruses A/Victoria/3/75 and A/Hiroshima/52/2005 preferentially bind to α 2-3-sialylated monosialogangliosides with fucosylated poly-N-acetylactosaminyl chains. *Glycobiology* 22, 1055-1076 (2012)
 - 21) Murakami K, Hirota K, Nemoto K, Ono T, Matsuo T and Miyake Y: Pathogenicity of an oral bacterium *Streptococcus intermedius* in liver disease. *J Dent Res* 77, 728 (1998)
 - 22) Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Kato H, Hirota K, Kobayashi M, Miyake Y, Uchiyama T, Yagi J and Shiratori K: A possible role of histone-like DNA-binding protein of *Streptococcus intermedius* in the pathogenesis of bile duct damage in primary biliary cirrhosis. *Clin Immunol* 127, 245-251 (2008)
 - 23) Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Nakamura M, Miyakawa H, Hirota K, Shibata N, Kato H, Arimura Y, Kato Y, Uchiyama T, Nagamune H, Kobayashi M, Miyake Y, Shiratori K and Yagi J: Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. *Lab Invest* 90, 577-588 (2010)
 - 24) Haruta I, Kikuchi K, Nakamura M, Hirota K, Kato H, Miyakawa H, Shibata N, Miyake Y, Hashimoto E, Shiratori K and Yagi J: Involvement of Commensal Bacteria may Lead to Dysregulated Inflammatory and Autoimmune Responses in a Mouse Model for Chronic Nonsuppurative Destructive Cholangitis. *J Clin Immunol* 32, 1026-1037 (2012)
 - 25) Shimada A, Morimoto J, Kodama K, Suzuki R, Oikawa Y, Funae O, Kasuga A, Saruta T and Narumi S: Elevated serum IP-10 levels observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24, 510-515 (2001)