

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18592286
 研究課題名（和文） 高齢者における術後肺炎への口腔微生物の関与
 研究課題名（英文） The research of the relationship between oral microorganism and postoperative pneumonia in old patients
 研究代表者
 清浦 有祐（KIYOURA YUSUKE）
 奥羽大学・歯学部・教授
 研究者番号：90194951

研究成果の概要：

食道癌患者術後肺炎発症における口腔微生物の関与を調べた。その結果、歯周病原性細菌が肺組織中に移行して肺炎を起こす菌になる可能性が示唆された。さらに、歯周病原性細菌の2菌種を同時にマウスの肺に感染させると単独感染よりも強い炎症症状をおこすことを認めた。また、高齢者の口腔内に常在する *Candida albicans* が術後肺炎を起こす可能性を検討するために、マウスの感染実験をおこなった。その結果、歯周病原性細菌よりも強い炎症反応が病理組織所見で確認できた。この結果から、高齢者の口腔内の *C. albicans* は術後肺炎の原因菌となる可能性が高いことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,600,000	0	2,600,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	330,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：*Candida albicans*, interleukin-6, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, 高齢者, 歯周病原性細菌, 嚥下性肺炎, 術後肺炎

1. 研究開始当初の背景

食道癌はわが国の癌死亡の第6位に位置し、患者のピークは60歳代で70歳以上が患者の30%を占めていた。食道癌の手術はその侵襲の大きさから術後の合併症を生じる危険性が高く、中でも術後肺炎は術後の直接死亡原因の第1位であった。誤嚥性肺炎の原因として口腔内の微生物が考えられていた。食道癌手術は呼吸器の機能低下、嚥下障害を招きやすく、

誤嚥性肺炎による術後肺炎を起こしやすい。口腔内にはさまざまな種類の微生物が存在している。手術予定の食道癌患者に口腔ケアを徹底させることで術後肺炎の発症率を低下させる試みが行われ始めていた。また、要介護高齢者の介護施設でも誤嚥性肺炎の予防対策として口腔ケアを導入したことで肺炎の発症を抑制したという報告があった。しかし、どの微生物がいかなるメカニズムで嚥下性肺炎

を発症させるかは明確にされていなかった。我々はすでに歯周病原性細菌の同定と量的把握のためのPCR法およびリアルタイムPCR法によるアッセイシステムを確立していた。それらを用いたシステムを食道癌患者の検体にも応用することで明確な検査結果が得られる。また、口腔内の *Candida albicans* に関しても我々はすでに唾液中の抗カンジダ因子の量的および質的低下が口腔カンジダ症の誘引となることを示唆する研究をおこなってきた。また、高齢者の口腔内に存在する *C. albicans* は宿主の感染防御機構が破綻すれば重篤な口腔カンジダ症をおこす危険性もマウスモデルを使用して指摘した。したがって、それらの口腔内に常在性の *C. albicans* が嚥下を繰り返すことで肺に感染して重篤な肺炎をおこすことは十分に考えられた。特に術後の食道癌患者のように嚥下機能が障害を受け、感染防御機能も低下している者ではその危険性がさらに高まる。その危険性をなくすためにも術後肺炎の起炎症微生物の同定と科学的感染防御方法の確立が急務であった。

2. 研究の目的

歯周病原性細菌と *C. albicans* に注目してそれらと術後性肺炎との関係について検討する。特に歯周病原性細菌に関しては、術後性肺炎患者の検体について詳しい解析はおこなわれていないので、PCR法を用いて具体的に詳しく検索する。なお、食道癌患者からの検体の採取は、東京都港区の虎ノ門病院消化器外科の協力で行った。この件に関しては虎ノ門病院倫理審査委員会による審査を受け、すでに承諾を得ていた。さらに高齢者の口腔内には *C. albicans* が常在する割合が高く、それによる口腔カンジダ症の発症率も高くなることが報告されている。そこで *C. albicans* のマウス感染実験も併せておこない、術後性肺炎の原因菌となる可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 食道癌患者の唾液と喀痰中の歯周病原性細菌の検索：食道癌患者の術前術後の唾液と喀痰を採取する。唾液採取時期は術前術後とする。喀痰の採取も術後肺炎の有無にかかわらず術後第3病日に唾液と同様のチューブに採取した後、凍結させる。術後肺炎がおきた場合には患者の喀痰を即時に上記と同様に採取して輸送する。唾液と喀痰を試料としてPCR法によって歯周病原性細菌の検出をおこなう。(2) 各種歯周病原性細菌と *Candida albicans* の実験的肺炎マウスモデルを使用した病原性の評価：*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* の6菌種をそれぞれ単独および2菌種ずつ混合で感染させる。感染後24時間、48時間、72時

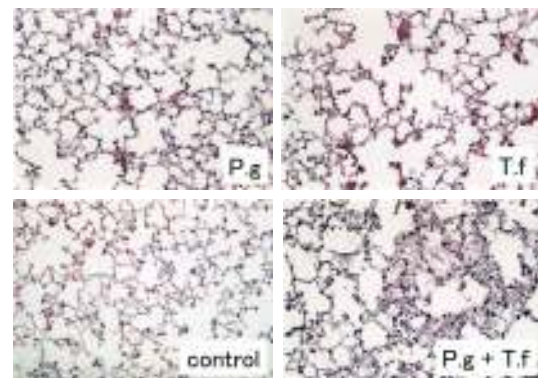
間、96時間後にマウスの頸椎を脱臼させてから、①肺を摘出してただちに固定して、ヘマトエオジン染色標本を作製して組織検索をおこなう。②肺を摘出後、生理食塩水中でほぐしたものをサンプルとしてリアルタイムPCR法によって各種歯周病原性細菌の菌数を測定する。③肺をほぐしたサンプル液を使用して炎症性サイトカインの測定を行う。④ *C. albicans* を用いて、上記①②③と同様の実験を行う。

4. 研究成果

(1) 食道癌患者術後肺炎発症における口腔微生物の関与を調べるため、まず術後の食道癌患者喀痰中の歯周病原性細菌をPCR法で検索した。その結果、38名の喀痰中 *T. forsythia* (T. f) は29名 (76.3%)、*T. denticola* (T. d) は18名 (47.3%)、*F. nucleatum* (F. n) は16名 (42.1%)、*P. gingivalis* (P. g) は6名 (15.7%)、*A. actinomycetemcomitans* (A. a) は5名 (13.1%)、*P. intermedia* (P. i) は0名 (0.0%) で、歯周病原性細菌が肺組織中に移行して起炎症菌になる可能性が示唆された。

(2) *P. g* と *T. f* を同時に *in vivo* でマウスの肺に感染させると強い炎症症状をおこすことを認めた。

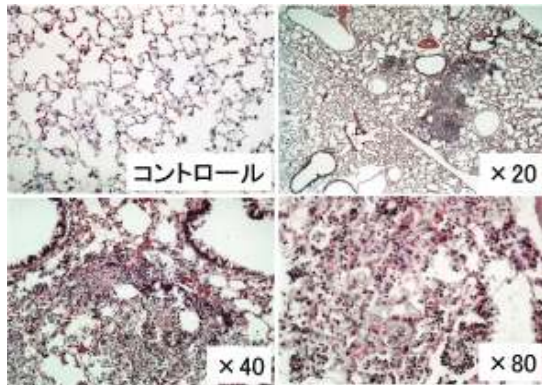
○ *P. g* と *T. f* 感染 1 日後の肺組織



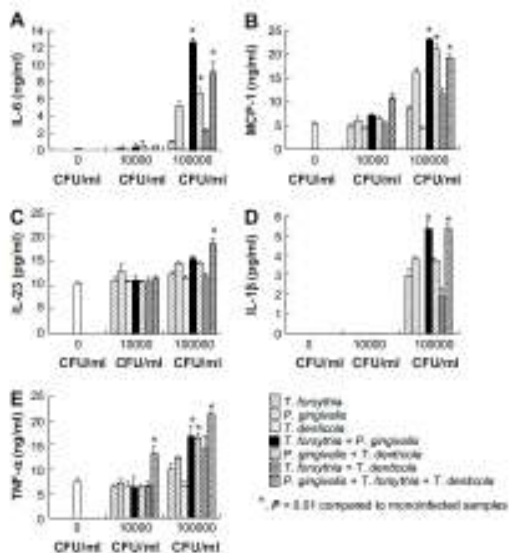
(3) マウスマクロファージ様細胞 J774.1 に *T. f* と *P. g* を感染させると炎症性サイトカインである IL-6 の産生が単独で菌を感染させた場合よりも増強された。しかしながら、IL-1 β , TNF- α , IL-23 および MCP-1 の産生は複合感染で増強されなかった。したがって、IL-6 の特異的な産生増強が *P. g* と *T. f* の混合感染による病態形成に関与する可能性が考えられる。(4) 高齢者の口腔内に常在する *C. albicans* (*C. a*) が術後肺炎を起こす可能性を検討するために *in vivo* でマウスの感染実験をおこなった。その結果、歯周病原性細菌よりも強い炎症反応が病理組織所見で確認できた。さらに感染マウスの肺組織中では TNF- α と IL-1 の強い産生が認められた。以上の結果から、高

齢者の口腔内のC. aは術後肺炎の原因菌となる可能性が高いことが示唆された。

○ C. a 感染 1 日後の肺組織

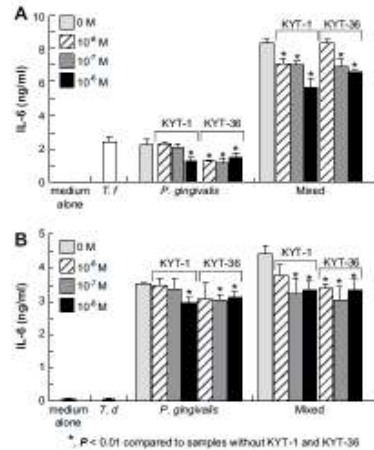


(5) P. g, T. f および T. d は歯周ポケットで高頻度に検出される。さらに、術後の食道癌患者喀痰中から上記 3 菌種が PCR 法で検出されたので、この 3 菌種の混合感染による炎症増強の可能性を検討した。その結果、各菌単独感染で、J774.1 細胞の IL-1 β , IL-6, IL-23, MCP-1 および TNF- α 産生誘導がみられた。さらに、10⁵ CFU/ml の *P. gingivalis* と *T. forsythia* または *T. denticola* の混合感染によって、IL-6 産生に対する相乗作用がみられた。しかしながら、他のサイトカインでは、混合感染による相乗的な産生増加はみられなかった。以上の結果から、IL-6 が歯周病原性細菌の混合感染による炎症増強作用を担うことが示唆される。



(6) P. g が菌体表面および菌体外に産生する代表的なプロテアーゼにジンジパインがある。この酵素は、IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, TNF- α および IL-12 を分解することが報告されている一方で、protease-activated receptors を介してシグナル伝達を行うことが知られている。そこで、ジンジパインインヒビターである KYT-1 および KYT-36 を用いて、P. g 単

独、そして、T. f または T. d との混合感染による IL-6 産生を検討した。その結果、10⁵ CFU/ml の P. g 単独または混合感染による IL-6 産生は KYT-1 または KYT-36 で抑制された。この結果から、10⁵ CFU/ml の場合、ジンジパインがシグナル伝達を惹起し、10⁶ CFU/ml では、IL-6 の分解が起きていたことが示唆された。



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 2 件)

- (1) TAMAI Riyoko, DENG Xue, KIYOURA Yusuke.
Porphyromonas gingivalis with either *Tannerella forsythia* or *Treponema denticola* induces synergistic IL-6 production by murine macrophage-like J774.1 cells.
Anaerobe 2009;15:87-90, 査読有り
- (2) ABE Yukihiro, AMBE Kimiharu, NAKAGAWA Toshihiro, KAMATA Masayasu, KIYOURA Yusuke.
Experimental aspiration pneumoniae caused by *Candida albicans* in mice.
Japanese Journal of Gerodontology 2006;21:188-193, 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

- (1) TAMAI Riyoko, DENG Xue, KIYOURA Yusuke.
Cytokines induced by mixed infection with periodontal pathogenic bacteria. 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008年7月5日, Metro Toronto Convention Centre (カナダ)
- (2) 玉井利代子, DENG Xue, 清浦有祐.
3種の歯周病原性細菌による炎症性サイトカイン産生の動態, 第81回日本細菌学会総会, 2008年3月24日, 国立京都国際会館
- (3) TAMAI Riyoko, DENG Xue, KIYOURA Yusuke.

Low concentrations of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* induced synergistic IL-6 production by murine macrophage-like J774.1 cells. 第 37 回日本免疫学会総会・学術大会, 2007 年 11 月 21 日, 東京品川グランドプリンスホテル新高輪

- (4) 玉井利代子, DENG Xue, 清浦有祐. IL-6 産生における *Porphyromonas gingivalis* と *Tannerella forsythia* の相乗効果, 第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2007 年 8 月 31 日, 北海道大学学術交流会館
- (5) 玉井利代子, 清野晃孝, 鎌田政善, 清浦有祐. 歯周病原細菌による実験的肺炎メカニズムの解析, 第 18 回日本老年歯科医学会, 2007 年 6 月 21 日, 札幌市教育文化会館
- (6) 阿部行洋, 清浦有祐. マウスを用いた実験的嚥下性肺炎の病態解析, 第 55 回日本口腔衛生学会・総会, 2006 年 10 月 7 日, 千里ライフサイエンスセンター
- (7) 小平杏子, 阿部行洋, 安部仁貴, 中川敏浩, 岡田 萌, 清浦有祐. 実験的嚥下性肺炎の新たなマウスモデルの開発, 第 48 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2006 年 9 月 23 日, 鶴見大学記念館
- (8) 阿部行洋, 安部仁貴, 中川敏浩, 岡田萌, 小平杏子, 清浦有祐. *Candida albicans* による嚥下性肺炎の検討, 第 48 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2006 年 9 月 23 日, 鶴見大学記念館
- (9) 阿部行洋, 小平杏子, 岡田 萌, 清浦有祐. *Candida albicans* による実験的嚥下性肺炎のマウスモデル作製とその検討, 第 60 回日本細菌学会東北支部総会, 2006 年 8 月 24 日, コラッセふくしま
- (10) 白井やよい, 阿部行洋, 清野晃孝, 岡田仁美, 山内恵理子, 影山勝保, 鎌田政善, 清浦有祐. *Candida albicans* を用いたよる実験的嚥下性肺炎のマウスモデルに関する研究, 第 17 回日本老年歯科医学会総会・学術大会, 2006 年 6 月 1 日, 沖縄コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清浦 有祐 (KIYOURA YUSUKE)
奥羽大学・歯学部・教授
研究者番号：90194951

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者