

令和元年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21198

研究課題名(和文) 口腔細菌と緑膿菌がもたらす誤嚥性肺炎の重篤化機構の解明～肺炎予防を目指して～

研究課題名(英文) Elucidation of serious mechanisms for aspiration pneumonia caused by oral bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*-aim for the prevention of pneumonia-

研究代表者

藤原 奈津美 (FUJIWARA, Natsumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：50596913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：易感染性宿主となりうる高齢者・有病者は口腔衛生状態が悪化しやすいことに加え、緑膿菌が高率検出される。緑膿菌は日和見感染菌として捉えられ、肺炎のリスク因子としても知られている。本研究にて我々は、歯周病原菌の1つである *Fusobacterium nucleatum* の培養上清を加えることにより、緑膿菌の病原因子であるピオシアニン産生が有意に上昇することを示した。また、培養上清に熱を加えることによりその効果は減弱したことから、熱に不安定な分泌タンパクであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欧米人に多い嚢胞性線維症患者や要介護高齢者の口腔や気道には、緑膿菌定着が著しいことが知られている。緑膿菌からはピオシアニンという病原因子が産生され、これが気道に流入した異物のクリアランスが阻害し、肺炎を起こすと考えられている。本研究では、口腔に生息する *F. nucleatum* が緑膿菌との相互作用により、ピオシアニン産生が増強することが明らかになった。これは肺炎リスクをさらに高める因子となる可能性を示す初めての報告である。本研究結果の視点から、口腔ケア・専門的口腔健康管理は重要であることを示しており、今後の口腔管理の重要性を啓発するためのツールになる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： *Pseudomonas aeruginosa* is detected highly in elderly people and compromised patients in addition getting poor oral hygiene conditions. *P. aeruginosa* is regarded as an opportunistic bacterium, and is also known as a risk factor for pneumonia. In this study, we showed that adding the culture supernatant of *Fusobacterium nucleatum*, which is one of the periodontal pathogens, significantly induces the pyocyanin production which is a pathogen of *P. aeruginosa*. Moreover, the effect was attenuated by adding heat to the culture supernatant, which suggested that it was a heat-labile secreted protein.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：ピオシアニン 緑膿菌 肺炎 *Fusobacterium nucleatum*

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺炎は日本における死因の第3位で、特に高齢者や有病者は免疫力の低下・嚥下機能の低下に伴い口腔細菌を誤嚥することにより誤嚥性肺炎を引き起こし、重篤化することが問題視されている。さらに、日常生活動作 (ADL) の低下により口腔清掃が十分に実施できないことから、口腔環境が不衛生になりやすい。

本研究で着目する緑膿菌は日和見感染に関わる細菌で、高齢者や有病者の不十分な口腔清掃と免疫機能の低下に伴って口腔内で増加する。実際に、申請者らは緑膿菌が脳血管疾患と嚥下障害を有する患者の咽頭部から緑膿菌が有意に検出されることを報告した (Hirota K et al, CHEST, 2010)。また、予後不良な肺炎である医療・介護関連肺炎 (NHCA) において高頻度に緑膿菌が検出されることから、口腔内で増加した緑膿菌が誤嚥性肺炎の発症やその重篤化に関与する可能性は否定できない。近年、歯周病原性菌の全身疾患への関連に対する研究は活発に行われているが、口腔内は、800種以上ともいわれる複雑な細菌叢を構成しているにもかかわらず、その他の口腔細菌に着目した研究は少ない。本研究において、口腔に存在する細菌の誤嚥性肺炎の発症や重篤化への関与を明らかにすることは、歯科界が果たすべき喫緊の大きな課題・責務であると考えられる。ピオシアニン、緑膿菌のバイオフィーム形成に重要な代謝産物で、青～緑色のフェナジン色素である。また、緑膿菌による感染症の発症病態に深く関わり、クオラムセンシング (Quorum-sensing, QS) と呼ばれる細菌の情報伝達機構によりその産生が制御されている。QSは、細菌の産生するホルモン様物質を介し、環境変化、特に自身が存在する環境において的確に細菌密度を感知し、その変化に応じて遺伝子の発現を巧妙に制御する。緑膿菌が気道上皮細胞へ侵入すると、産生されたピオシアニンにより、細胞内活性酸素や炎症性サイトカイン産生上昇による細胞傷害や、呼吸器疾患罹患時に高発現する分泌型ムチン (MUC5AC) の産生量増大による肺炎の重篤化を招く (Rada et al, Trends Microbiol., 2014)。このようにピオシアニンは、緑膿菌感染症のみならず呼吸器疾患の重篤化にも関わっていることから、肺炎の病態確立に極めて重要な病原因子であると認識されている。

近年、ピオシアニンは歯周病原性菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) と関連することが報告された (Benedyk M et al, PLOS ONE., 2015)。*P.g* はグラム陰性黒色色素性嫌気性桿菌で、その発育には赤血球中のヘミンが必要であるが、ピオシアニンは赤血球中のヘモグロビンを酸化させメトヘモグロビンを形成することにより *P.g* のヘミン獲得や *P.g* の病原因子であるジンジパイン産生を促進させ、歯周病原性細菌の病原性発揮にも関与することが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、易感染性宿主である高齢者・有病者に高率で認められる緑膿菌に着目し、「口腔細菌が緑膿菌の病原因子であるピオシアニン産生を促進させ、誤嚥性肺炎の重篤化をもたらす」という仮説のもとに、口腔細菌が緑膿菌との相互作用によりピオシアニン産生を促進するか、またそのメカニズムの解明とともに、ピオシアニンの気道感染における病原性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

Pseudomonas aeruginosa PA01 を用いた。口腔細菌は、口腔レンサ球菌の *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, 歯周病原菌として *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P.g*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* を用いた。*P.a* および口腔レンサ球菌は好気培養、歯周病原菌は嫌気培養を行った。すべての菌株は 37℃ にて培養した。

(2) ピオシアニンの産生量の測定

各種の口腔細菌培養液を遠心し、培養上清をさらにフィルター濾過滅菌した液 (filtrated culture medium; FCM) をピオシアニンアッセイに用いた。*P.a* は 18 時間振盪培養した菌液を用いた。ピオシアニン産生量測定のためにキング A 培地を用い、キング A 培地と FCM が 1:1 となるように調整し、これに前培養した *P.a* を加え、振盪培養を 20 時間行った。その後、培養液上清を抽出し、OD₆₉₅ にて吸光度測定を行った。対照は、キング A 培地と FCM で用いた培地溶液を 1:1 で調整した溶液とした。

(3) ピオシアニン暴露における肺胞上皮細胞への影響

肺胞上皮細胞である A549 にピオシアニン (SIGMA, USA) を各濃度 (5, 25, 50 μM) で 6 および 24 時間刺激し、その後細胞を回収し RNA 抽出、DNA に逆転写後、IL-8, CCL20, MUC2, MUC5AC の発現を検討した。また、MTT アッセイを行い、A549 に対する至適ピオシアニン濃度を検討し

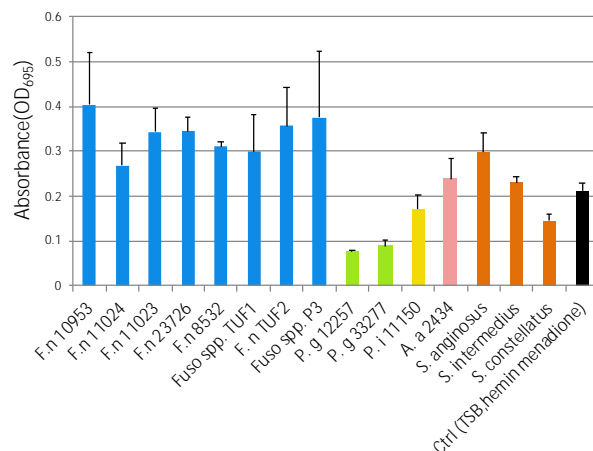


図1 口腔細菌との共培養におけるピオシアニン産生量の比較

た。

4. 研究成果

(1) 緑膿菌と口腔細菌との非接触共培養系におけるピオシアニン産生量変化

各種細菌の FCM を用いて緑膿菌を 20 時間振盪培養したところ、対照サンプルに比べてピオシアニン産生量が変化することが示された (図 1)。特に、*F. nucleatum* の培養液中にピオシアニン産生を促進する物質が含まれることが予想された。しかしながら、*F. nucleatum* の亜種にはピオシアニン産生量に影響を与えなかった。本研究者は *F. nucleatum* が与える緑膿菌が産生するピオシアニンに着目することとした。*F. nucleatum* の FCM は、培養時間の長さによりピオシアニン産生が促進することが示された。また、FCM の量依存的にピオシアニン産生が促進された。さらに、ピオシアニン産生促進につながる *F. nucleatum* の FCM 中の物質を予想づけるために、FCM を加熱したものをを用いてピオシアニンアッセイを行ったところ、FCM を加熱するとピオシアニン量が対照群と同じ産生量まで抑制された。これらのことから、ピオシアニンの産生を促進するのは、*F. nucleatum* 培養液中に含まれる熱に対して不安定なタンパク質である可能性が示唆された。現在、*F. nucleatum* を大量培養したうえで FCM 中のタンパクを分画し、ピオシアニン産生促進因子の探索を行っている。

(2) ピオシアニン暴露における肺胞上皮細胞への影響

ピオシアニンが肺での細胞に及ぼす影響を検討した。肺胞細胞である A549 を 10%FBS 添加された DMEM にて subconfluent に培養し、ピオシアニンを各濃度 (5, 25, 50 μM) で 24 時間刺激したところ、25, 50 μM で A549 は細胞死を起こしていた。次に、細胞が死滅しないピオシアニン濃度を検討するために、MTT アッセイを行ったところ、10 μM 以下が至適濃度であることが示された。これまでに、ピオシアニンは肺の細胞で様々な炎症性サイトカインやムチンを分泌することが知られているため、本研究では A549 を用いてピオシアニン (10 μM) を作用させた際の IL-8, CCL20, MUC5AC, MUC2 の発現を検討した。しかしながら、10 μM ピオシアニンの添加では、コントロール (0 μM) と比較して各種の発現に影響を与えていなかった。また種々のムチンも同様に、コントロールと比較して発現に影響を与えていなかった。今後は、気管支上皮細胞で同様の検討を行い発現に影響を与える指標をスクリーニングするとともに、*F. nucleatum* の培養上清を添加し産生させたピオシアニンをを用いた検討を行う予定である。

欧米人に多い嚢胞性線維症 (Cystic Fibrosis) 患者や要介護高齢者の口腔や気道には、緑膿菌定着が著しいことが知られている。その緑膿菌よりピオシアニンが大量に産生されることで気道からムチンが産出され、気道に流入した異物のクリアランスが阻害され、肺炎を起こすと考えられている。本研究では、同様の消化器官である口腔に生息する *F. nucleatum* が緑膿菌との相互作用により、ピオシアニン産生を増強することが明らかとなった。本研究結果の視点からも、口腔ケア・専門的口腔健康管理は非常に重要であることを示しており、今後の口腔管理の重要性を啓発するためのツールになる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Fujiwara N, Yumoto H, Miyamoto K, Hirota K, Nakae H, Tanaka S, Murakami K, Kudo Y, Ozaki K, Miyake Y.: 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-polymer suppresses an increase of oral bacteria: a single-blind, crossover clinical trial. *Clin Oral Investig.* 23:739-746, 2019. DOI: 10.1007/s00784-018-2490-2. 査読有
2. Tada H, Fujiwara N, Tsunematsu T, Tada Y, Arakaki R, Tamaki N, Ishimaru N, Kudo Y.: Preventive effects of mouthguard use while sleeping on recurrent aphthous stomatitis: Preliminary interventional study. *Clin Exp Dent Res.* 3:198-203, 2017. DOI: 10.1002/cre2.88. 査読有
3. 中江 弘美, 吉岡 昌美, 藪内 さつき, 土井 登紀子, 藤原 奈津美, 伊賀 弘起, 日野出 大輔: 徳島県内の回復期病院における看護師の口腔ケアに対する認識 - アンケート調査結果から -. 四国公衛会誌, 62:95-99, 2017. 査読有
4. Sekita Y, Murakami K, Yumoto H, Hirao K, Amoh T, Fujiwara N, Hirota K, Fujii H, Matsuo T, Miyake Y, Kashiwada Y. Antibiofilm and Anti-Inflammatory Activities of *Houttuynia cordata* Decoction for Oral Care. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017:2850947, 2017. DOI: 10.1155/2017/2850947. 査読有
5. Fujiwara N, Murakami K, Nakao M, Toguchi M, Yumoto H, Hirota K, Matsuo T, Sano S, Ozaki K, Miyake Y.: Antibacterial and antibiofilm effects of Reuterin-Related Compounds to periodontopathic bacteria. *J Oral Health Biosci.* 30:8-17, 2017. https://doi.org/10.20738/johb.30.1_8 査読有
6. Fujiwara N, Murakami K, Nakao M, Toguchi M, Yumoto H, Amoh T, Hirota K, Matsuo T,

- Sano S, Ozaki K, Miyake Y. : Novel reuterin-related compounds suppress odour by periodontopathic bacteria. *Oral Dis.* 23:492-497, 2017. DOI: 10.1111/odi.12638. 査読有
7. 中江 弘美, 吉岡 昌美, 藪内 さつき, 土井 登紀子, 藤原 奈津美, 伊賀 弘起, 日野出 大輔: 回復期病院職員が抱える口腔ケアについての悩み - 他職種へのアンケート調査より -. 日口腔ケア会誌, 11:30-34, 2016. <https://ci.nii.ac.jp/naid/40021055764/> 査読有
 8. Sekita Y, Murakami K, Yumoto H, Amoh T, Fujiwara N, Ogata S, Matsuo T, Miyake Y, Kashiwada Y. : Preventive Effects of *Houttuynia cordata* Extract for Oral Infectious Diseases. *Biomed Res Int.* 2016:2581876, 2016. DOI: 10.1155/2016/2581876. 査読有
 9. Noguchi M, Tagaya A, Sakoda A, Komatsuzawa H, Fujiwara N, Sugai M. : Effectiveness of Oral Health Education Program on Prevention of Periodontal Disease in Japanese Pregnant Women. *Open Journal of Nursing.* 6: 282-293, 2016. DOI: 10.4236/ojn.2016.64029 査読有
 10. Takamura H, Yoshida K, Okamura H, Fujiwara N, Ozaki K. : *Porphyromonas gingivalis* attenuates the insulin-induced phosphorylation and translocation of forkhead box protein O1 in human hepatocytes. *Arch Oral Biol.* 69:19-24, 2016. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.05.010. 査読有
 11. Tsunematsu T, Fujiwara N, Yoshida M, Takayama Y, Kujiraoka S, Qi G, Kitagawa M, Kondo T, Yamada A, Arakaki R, Miyauchi M, Ogawa I, Abiko Y, Nikawa H, Murakami S, Takata T, Ishimaru N, Kudo Y. : Human odontogenic epithelial cells derived from epithelial rests of Malassez possess stem cell properties. *Lab Invest.* 96:1063-1075, 2016. DOI: 10.1038/labinvest.2016.85. 査読有
 12. Kudo Y, Tada H, Fujiwara N, Tada Y, Tsunematsu T, Miyake Y, Ishimaru N. Oral environment and cancer. *Genes Environ.* 38:13, 2016. DOI: 10.1186/s41021-016-0042-z. 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 藤原 奈津美 : 撥菌効果を有するポリマーを用いた口腔疾患予防への応用について, 2018 年度ダイバーシティ推進研究交流発表会及び情報交換会, 2019 年 2 月 15 日(徳島県鳴門市)
2. 吉田 賀弥, 瀬山 真莉子, 藤原 奈津美, 尾崎 和美 : *Porphyromonas gingivalis* 感染したマクロファージが由来の膜小胞が肝臓糖代謝に及ぼす影響, 第 61 回 秋季日本歯周病学会学術大会 2018 年 10 月 27 日(大阪府北区)
3. 尾崎 和美, 瀨田 邦美, 湯浅 雅志, 藤原 奈津美 : 要介護者の個別課題を共有・管理する ICT システムの開発, 第 61 回 秋季日本歯周病学会学術大会 2018 年 10 月 27 日(大阪府北区)
4. 三浦 久美子, 尾崎 和美, 柳沢 志津子, 白山 靖彦, 藤原 奈津美 : ICT を活用した歯科衛生士による要介護高齢者の口腔健康管理について, 第 61 回 秋季日本歯周病学会学術大会 2018 年 10 月 27 日(大阪府北区)
5. 吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 尾崎 和美, 内部 健太, 池亀 美華, 岡村 裕彦 : *Porphyromonas gingivalis* 感染したマクロファージが産生する膜小胞が肝臓糖代謝に及ぼす影響, 第 60 回 日本歯科基礎医学会学術大会 2018 年 9 月 6 日(福岡県博多市)
6. 藤原 奈津美, 村上 圭史, 吉田 賀弥, 工藤 保誠, 弘田 克彦, 尾崎 和美, 藤猪 英樹, 湯本 浩通 : MPC ポリマーコーティングによる義歯用レジンのカンジダ付着(撥菌)効果, 第 60 回 日本歯科基礎医学会学術大会, 2018 年 9 月 5 日(福岡県博多市)
7. Kaya Yoshida, Natsumi Fujiwara, Kazumi Ozaki, Kenta Uchibe, Mika Ikegame, Hirohiko Okamura : Extracellular vesicles from *Porphyromonas gingivalis*-infected macrophages include histone proteins and translocate to the liver, 第 10 回日本 RNAi 研

究会・第5回日本細胞外小胞学会, 2018年8月30日(広島県広島市)

8. Natsumi Fujiwara, Hiromichi Yumoto, Keiji Murakami, Yasusei Kudo, Hiromi Nakae, Katsuhiko Hirota, Kazumi Ozaki, Yoichiro Miyake: 2-methacryloyloxyethyl-phosphorylcholine (MPC)-polymer suppresses the adherence of oral bacteria, 2018 IADR/PER General Session, 27 July, 2018, London, England)
9. 瀬山 真莉子, 吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 尾崎 和美: *Porphyromonas gingivalis* の分泌小胞は肝臓の糖代謝に影響を与える, 第61回春季日本歯周病学会学術大会, 2018年6月1日(東京都新宿区)
10. 藤原 奈津美, 尾崎 和美, 柳沢 志津子, 瀬山 真莉子, 松村 祐季, 河野 りか, 白山 靖彦: 徳島県那賀町における口腔ケア実施の実態調査と支援職員への口腔ケア研修会の取り組み, 第67回日本口腔衛生学会・総会, 2018年5月19日(北海道札幌市)
11. 藤原 奈津美, 湯本 浩通, 弘田 克彦, 村上 圭史, 尾崎 和美: MPC ポリマーによる口腔細菌の抑制効果, 第59回歯科基礎医学会学術大会, 2017年9月17日(長野県塩尻市)
12. 藤原 奈津美, 土井 登紀子, 中江 弘美, 十川 悠香, 吉岡 昌美, 高橋 侑子, 真杉 幸江, 尾崎 和美, 日野出 大輔: 本学歯科衛生学生の病棟口腔ケア臨床実習の取り組みとその効果, 第14回日本口腔ケア学会総会・学術大会, 2017年4月23日(沖縄県宜野湾市)
13. 藤原 奈津美, 村上 圭史, 湯本 浩通, 弘田 克彦, 三宅 洋一郎: 歯周病原菌に対する新規化合物の効果, 第69回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2016年10月15日(香川県高松市)
14. 池田 真己, 中上 久美子, 三野 聖子, 榎 恵子, 一宮 麗子, 井手口 英章, 藤原 奈津美, 尾崎 和美, 岩田 貴: スキルス・ラボを活用した歯科衛生士の教育効果, 日本歯科衛生教育学会, 2016年10月(東京都文京区)
15. 藤原 奈津美, 中江 弘美, 吉岡 昌美, 十川 悠香, 高橋 侑子, 田口 侑子, 渡辺 朱理, 土井 登紀子, 尾崎 和美, 日野出 大輔: 某大学における周術期口腔機能管理の臨床実習の取り組みとその効果, 日本歯科衛生学会第11回学術大会, 2016年9月18日(広島県広島市)
16. 藤原 奈津美, 村上 圭史, 湯本 浩通, 弘田 克彦, 尾崎 和美, 三宅 洋一郎: 歯周病原菌に対する新規化合物の効果, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年8月25日(北海道札幌市)
17. 吉田 賀弥, 藤原 奈津美, 廣島 佑香, 阿部 佳織, 木戸 淳一, 尾崎 和美: *Porphyromonas gingivalis* は SOCS3 や IRS-1 を制御して肝臓におけるインスリンシグナルを抑制する, 第59回春季日本歯周病学会学術大会, 2016年5月(鹿児島県鹿児島市)
18. 中江 弘美, 藪内 さつき, 藤原 奈津美, 柳沢 志津子, 吉岡 昌美, 吉田 賀弥, 竹内 祐子, 渡辺 朱理, 土井 登紀子, 松山 美和, 伊賀 弘起, 尾崎 和美, 日野出 大輔, 中野 雅徳, 白山 靖彦: 健口体操ポスターを活用した口腔機能向上の取り組み, 第13回日本口腔ケア学会総会・学術大会, 2016年4月23日(千葉県千葉市)

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当者なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者 該当者なし

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。