

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 岡部 徹平
論文題目 <i>Porphyromonas gingivalis</i> の菌体成分 / 分泌物の <i>Streptococcus pneumoniae</i> 感染マウス肺炎に及ぼす影響 の検討	

## I. 緒言

肺炎は、一般的な感染症であり、特に高齢者において主要な死亡原因となっている。細菌性肺炎の主な原因は、グラム陽性通性嫌気性双球菌である *Streptococcus pneumoniae* である。高齢者の肺炎に医療・介護関連肺炎(NHCAP)という概念が提唱されており、NHCAPの主原因である誤嚥性肺炎(AP)は口腔咽頭にコロニー形成している細菌が誤嚥により肺に侵入することで発症するとされている。

また、*S. pneumoniae* とともに起因菌と考えられているのが歯周病原細菌である。この中で、*Porphyromonas. gingivalis* は歯周炎におけるキーストーン細菌であると考えられ、APにおいてもキーストーン細菌として病態形成に関与している可能性がある。しかし、*P. gingivalis* が AP の直接的な病因となることは稀であり、AP の発症に与える影響は明らかにされていない。*P. gingivalis* は肺のような好気的環境下では増殖しにくく、防御機構によって排除される。したがって、*P. gingivalis* 生菌の増殖によって肺炎を引き起こすのではなく、その菌体成分や生成物が *S. pneumoniae* など感染力を増強させ、その相乗効果によって肺炎が成立している可能性がある。したがって、*S. pneumoniae* の呼吸器感染においては *P. gingivalis* などの歯周病原菌が、感染性を増強させる効果を発揮するのではないかと考えた。本研究の目的は、歯周病原菌である *P. gingivalis* が *S. pneumoniae* 感染マウス肺炎モデルにおける呼吸器感染症に対して相乗効果を発揮するかどうかを明らかにすることである。

## II. 対象および方法

### 1. 菌株および培養条件

*S. pneumoniae* を血液寒天培地で 37°C にて 24 時間嫌気培養後、調製した Trypticase Soy Broth (sTSB) にて対数増殖期後期まで嫌気培養した。その後、遠心分離により細菌を採取し、リン酸緩衝生理食塩水で再懸濁した。得られた懸濁液の OD600 を測定後、sTSB で希釈して 1.0 に調製した。

*P. gingivalis* も血液寒天培地で 37°C にて 7 日間嫌気培養後、*S. pneumoniae* と同様に懸濁液を調製した。*P. gingivalis* の培養上清 (PgSup) は、*P. gingivalis* を sTSB で 37°C にて 24 時間嫌気培養し、その菌体懸濁液を、sTSB に添加し 24 時間嫌気培養後、遠心分離により細菌を除去して上清を回収し、さらにろ過滅菌し調製した。

### 2. 実験動物

実験動物には 6 週齢雄性 C57BL/6J マウスを用いた。すべてのマウスは、特定病原体を含まない条件で飼育され、6 週齢から 8 週齢の間に使用された。

### 3. 動物実験のデザイン

AP を再現するために、三種混合麻酔 (塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルフェノール) を腹腔内投与後、気管支から直接菌体懸濁液を投与した。

*S. pneumoniae* と *P. gingivalis*、*S. pneumoniae* と PgSup の混合感染実験では、各マウスに 0.05 mL の菌体懸濁液を接種した。

*S. pneumoniae* は、マウスに接種する前に同量の *P. gingivalis*、PgSup または sTSB と混合した。

### 4. 感染後生存率

生存率の確認のため、接種後各群 (n=32) にて 2 週間飼育し、マウス生存数の経時的変化を解

析した。

#### 5. 組織学的解析

感染 24 時間後マウスを屠殺、肺を回収した。肺をホルマリン溶液で固定後、通法に従い、パラフィン包埋、連続組織切片を作製した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、組織学的解析を行った。

#### 6. フローサイトメトリー解析

感染 24 時間後マウスを屠殺、肺を回収した。回収した肺組織をホモジナイズし、処理後、単一細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を前処理後、表面染色し、肺組織中のマクロファージと好中球を検出した。

#### 7. 肺の細菌数

感染 24 時間後マウスを屠殺、肺を回収した。回収した肺をホモジナイズ後、段階希釈を行い、血液寒天培地に播種し、肺組織 1 g あたりの Colony Forming Unit (CFU) を測定した。

#### 8. 肺の遺伝子発現解析

感染 24 時間後マウスを屠殺、肺を回収した。回収した肺をホモジナイズ後、total RNA を抽出し、cDNA を合成した。Tnf、CXCL1 および CXCL2 の遺伝子発現を qPCR にて解析した。

#### 9. 肺のサイトカイン産生解析

感染 24 時間後マウスを屠殺、肺を回収した。回収した肺をホモジナイズ後、遠心分離を行った。上清を回収後、Quantikine mouse TNF- $\alpha$ 、KC、MIP-2、IL-17、IL-1 $\beta$  enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit を用いて解析を行った。

#### 10. 統計解析

データの解析には、PASW Statistics ソフトウェア (version 18.0; SPSS Japan, Tokyo, Japan) を使用した。グループ間の差は、一元配置分散分析 (ANOVA) および Kruskal-Wallis 検定により調べた。独立した 2 群間の比較は、対応のない t 検定を用いて行った。データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で表した。有意性については  $p < 0.05$  で有意差ありとした。

### III. 結果

#### 1. 生存率

*S. pneumoniae* 感染マウス肺炎モデルにおける生存率を評価した。コントロールマウス、PgSup 単独投与マウスはすべての個体が生存していた。*S. pneumoniae* と PgSup の混合感染マウス、*S. pneumoniae* 感染マウスは規定日数でほぼ全ての個体が死亡したが、両群に有意な差は認められなかった。

#### 2. 肺組織における病理組織学的所見

*P. gingivalis* と *S. pneumoniae* の混合感染を行い肺を回収後、肺切片を作製した。その後、肺組織の HE 染色による病理組織学的評価を行った。*S. pneumoniae* 感染マウスおよび *S. pneumoniae* と *P. gingivalis* の混合感染マウス共に、間質の肥厚や炎症細胞の浸潤を認めた。しかし両者に明らかな差は認めなかった。

この結果から、肺は好気的な環境であるため、偏性嫌気性の *P. gingivalis* の感染は難しいと考えられた。そこで、以降は、*P. gingivalis* ではなく、PgSup を使用した。*S. pneumoniae* と PgSup の混合感染マウスから採取した肺組織の HE 染色による病理組織の評価を行った。コントロールマ

ウスと PgSup 単独投与マウスでは、炎症所見は認められなかったが、*S. pneumoniae* 感染マウスおよび *S. pneumoniae* と PgSup の混合感染マウスでは、間質の肥厚や炎症細胞の浸潤が認められた。また、*S. pneumoniae* と PgSup の混合感染マウスではより炎症が増強することが確認された。

### 3. 肺組織における浸潤炎症細胞のフローサイトメトリー解析

病理組織像より、感染群において炎症細胞の浸潤を認めたことから、肺における好中球/マクロファージ分画の解析を行った。*S. pneumoniae* と PgSup の混合感染マウスではコントロールマウス、PgSup 投与マウスと比較すると有意に好中球数、マクロファージ数の増加を認めた。しかし、*S. pneumoniae* と PgSup の混合感染マウスでは *S. pneumoniae* 感染マウスに比べると好中球数の増加傾向は認めるものの有意差は認めなかった。

### 4. 肺における *S. pneumoniae* の菌数

*S. pneumoniae* と PgSup の混合感染マウス (n=31) の肺組織 1 g あたりの CFU は、*S. pneumoniae* 感染マウス (n=30) の CFU に比べて有意に増加していた (p<0.01)。

### 5. 肺組織における遺伝子発現解析

*S. pneumoniae* 感染群と *S. pneumoniae* と PgSup の混合感染群の肺では、TNF- $\alpha$ 、CXCL1、CXCL2 の mRNA 発現がコントロール群に比べて有意に増加していた (p<0.01)。一方、PgSup 群では、肺における TNF- $\alpha$ 、CXCL1、CXCL2 の mRNA の発現は、コントロール群と比較して増加しなかった。混合感染群の TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量は、*S. pneumoniae* 感染群に比べて有意に増加していた (p<0.05)。また、混合感染群の肺における CXCL1 と CXCL2 の mRNA 発現量は、平均値は高くなったが *S. pneumoniae* 感染群に比べて有意な差は認めなかった。

### 6. 肺組織におけるサイトカイン産生解析

肺における TNF- $\alpha$ 、KC、MIP-2、IL-17 および IL-1 $\beta$  は、*S. pneumoniae* 感染群と混合感染群で上昇した。コントロール群と PgSup 群では、これらのサイトカインはほとんど検出されなかった。肺における TNF- $\alpha$ 、IL-17 の産生量は、混合感染群では、*S. pneumoniae* 感染群に比べて有意に増加した (p<0.05)。

## IV. 考察

本研究では、*S. pneumoniae* 感染による肺炎に対する PgSup の作用について検討した。*S. pneumoniae* と PgSup の混合感染マウスでは、*S. pneumoniae* 感染マウスと比較し、炎症細胞の浸潤が増加していた。さらに、PgSup は、*S. pneumoniae* 感染マウスの肺における炎症性サイトカイン/ケモカインの遺伝子発現およびタンパク質産生を促進することを示した。PgSup の単独添加では肺の炎症反応は起こらなかったことから、*P. gingivalis* の菌体成分/分泌物が間接的に *S. pneumoniae* 感染による炎症反応を促進することが示唆された。

肺への感染後 24 時間に、PgSup は *S. pneumoniae* 感染マウスの肺での TNF- $\alpha$ 、IL-17 発現を有意に増加させ、CXCL1/KC、CXCL2/MIP-2、IL-1 $\beta$  の発現も有意ではないものの、増加傾向があることを見出した。TNF- $\alpha$  は初期免疫に関与する IL-1 $\beta$  等を誘導し、CXCL1/KC、CXCL2/MIP-2、IL-17 は好中球の活性化や遊走を引き起こす。つまり、*P. gingivalis* の菌体成分/分泌物は、好中球の遊走を促進し、肺炎を増悪化したと考えられる。

混合感染群では、感染防御に関与する TNF- $\alpha$  や IL-17 などの炎症性サイトカインの発現が増加しているにもかかわらず、感染 1 日後の肺内の *S. pneumoniae* の数は増加していた。このことか

ら、PgSup は、生体の *S. pneumoniae* 除菌能を低下させることが示唆された。

*P. gingivalis* は、リポポリサッカライド(LPS)、ホスホリパーゼ、線毛、ジンジパインなどの病原因子を発現しており、これらの因子が宿主細胞を活性化し、炎症巣の形成に大きな役割を果たしている。これらの病原因子の中で特に、ジンジパインは、宿主の細胞外マトリックスの分解、細胞障害性および防御機構の回避にも関与しているとされている。本研究では、細菌の培養上清を用いたため、肺の好気性環境の影響を受けずに、肺感染による相乗効果を調べることができた。今回の結果から、*S. pneumoniae* と PgSup を接種したマウスの肺感染は、*P. gingivalis* が産生するジンジパインが肺胞上皮細胞の細胞外マトリックスを損傷し、*S. pneumoniae* の組織内への侵入を容易にして炎症反応を亢進させることが原因である可能性が考えられたが、さらなる検討が必要である。

*S. pneumoniae* は、血小板活性化因子受容体 (PAFR) などの宿主受容体と結合することで肺胞上皮に感染し、肺炎を引き起こすことが知られている。また、PgSup で刺激したヒト肺胞上皮細胞で PAFR の発現が誘導されること、ジンジパイン欠損変異体の培養上清で刺激すると PAFR の発現が抑制され、肺胞上皮細胞への *S. pneumoniae* の接着が阻害されることを報告されている。これらのことから、今回の実験では、PgSup に含まれるジンジパインが PAFR の発現を誘導し、*S. pneumoniae* の接着を促進することで、肺の炎症反応が亢進したと考えられる。これらの確認は今後の検討課題である。

## V. まとめ

本研究では、PgSup が *S. pneumoniae* による肺炎を増強することを明らかにした。このことから、歯周炎が AP などの呼吸器感染症の増悪に及ぼす影響には、*P. gingivalis* 由来の病原因子が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。