

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593175

研究課題名(和文) 誤嚥性肺炎を予防するための自然免疫に抵抗性をもつ口腔常在菌の検出方法の確立

研究課題名(英文) Detection method to the oral normal flora with resistance on innate immunity for prevention of aspiration pneumonia.

研究代表者

堀内 俊克 (Horiuchi, Toshikatsu)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：90454165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アンギノースレンサ球菌の選択培地の開発を目的とし、3種類の抗菌剤(スルファメタジン、アストレオナム、バシトラシン)をTS培地に濃度を変え添加させることにより、最適なバシトラシンの濃度とその検出率を検討した。アンギノースレンサ球菌の増殖が可能な2.0U/mlのバシトラシンをTS培地に添加した新しいTS-sab培地を作製した。アンギノースレンサ球菌の高い検出率が確認された。

研究成果の概要(英文)：To develop a new selective culture medium specifically for *S. anginosus*, three antibiotics, (sulphamethazine (s), aztreonam (a), and bacitracin (b),) were tested by adding to Tryptic Soy (TS) agar at different concentration. A minimal inhibitory concentration (MIC) test and detection rate was examined. The MIC of bacitracin was found to be 2.0 U/ml, which was the concentration used to make TS-sab agar, a medium potentially more selective for *S. anginosus*. It was demonstrated high detection rates of *S. anginosus*.

研究分野：口腔外科

キーワード：アンギーザス群レンサ球菌 選択培地

1. 研究開始当初の背景

要介護高齢者などの誤嚥性肺炎は、口腔ケアをすることにより発症率を抑制できるといわれている。最近では、がん患者の手術・抗がん剤治療に伴う、誤嚥性肺炎、口腔粘膜炎等の副作用の軽減、QOLを向上させることを目的に、国立がんセンターと日本歯科医師会が歯科治療・口腔ケアの治療連携を構築するなど、口腔ケアは国民の健康に利益をもたらす、近年、特に注目されている。これらの治療成績をより向上させるために、口腔の溶血細菌をできるだけ少なくする必要があるとわれわれは考えた。起炎性を持つ溶血細菌のうち強毒性細菌は、A群レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* (化膿性レンサ球菌) である。しかし、この菌はヒト口腔の自然免疫物質ディフェンシン耐性がないため検出頻度が低い。ヒトからの分離頻度の高いA群抗原を保有する溶血レンサ球菌に関しては *S. pyogenes* 以外にアンギノサス群レンサ球菌の一部の菌が保有している。アンギノサス群レンサ球菌とは、ディフェンシン耐性があるため乳児期から検出されヒト口腔内細菌叢の一部を形成する菌群であり、現在 *S. anginosus* *S. constellatus* *S. intermedius* の3菌種に分類されている。本菌群は、口腔内において溶血性のほかに溶血性とディフェンシン耐性を示し、宿主との共存を果たしている。近年では、脳や肝臓などの重要臓器の膿瘍など重篤な感染症の起炎菌となっていると報告されている。これらの菌種のなかでも特に *S. anginosus* は、上部消化器がんや肺炎の発症と関連があり注目されている。また、口腔領域においてはデンタルプラーク内の本菌が扁平上皮がんの発症に関与している可能性も指摘されている。Sasakiらは口腔がん患者46名中19名において採取した口腔がん組織に *S. anginosus* のDNAが認められたことを報告している。口腔扁平上皮がん患者のがん組織中に高率に *S. anginosus* の感染が認められることのみでは、感染とがん発症の因果関係を証明できないが、さまざまな感染症や悪性腫瘍の病状悪化と関連をもつ本菌の臨床的な重要性は高い。しかしながら、現在、本菌の選択培地が存在しないことから菌を単離することが困難であり *S. anginosus* の研究が進まない大きな要因となっている。

2. 研究の目的

本研究では *S. anginosus* の選択培地の開発を行うことにより、本菌を分離培養し病原性の特徴、関連する疾患の病態解明、臨床研究、除菌方法の確立とその応用を目的とした。

3. 研究の方法

供試細菌として、*S. anginosus* の臨床分離

株3菌種を含む24菌種の細菌を用いた(表1)。TS寒天培地あるいはMS寒天培地を基本培地とし、2種の抗菌剤スルファメタジン(s) (1mg/ml) およびアズトレオナム(a) (0.2mg/ml) を加えた培地をそれぞれTS-sa、MS-saとし、これにバシトラシン(b) を添加してTS-sab、MS-sabを作製した。対照培地はTS培地を用いた。

最小発育阻止濃度試験:バシトラシンの最適濃度を決定するために、TS培地に0~12.8U/mlのバシトラシンを加えた希釈系列を96ウェルプレートに準備した。各菌種の全培養液10μlを各ウェルに播種し、気相が10%水素+10%二酸化炭素+80%窒素の嫌気ボックス内で37、36時間培養した。培養後、540nmにおける濁度を測定し、菌の成長が観察できない濃度を最小発育阻止濃度(MIC)とした。

その結果を参考にしてバシトラシンを0~6.4U/ml含むTS-sab寒天培地を作製し、各菌種の前培養液5μlを各寒天培地上に滴下・播種し、嫌気ボックス内で37、36時間培養して各菌種の増殖の有無を観察した。

相対検出率の算定:各細菌の前培養液をPBSで適度に希釈してTS、TS-sab培地に自動播種器を用いて播種し、嫌気培養条件下で37、36時間培養した。培養後、コロニー形成単位(CFU)を算定した。TS培地上的CFUの比率を相対的検出率とした。

表1. 使用した口腔細菌24菌種

<i>S. anginosus</i>	<i>S. cricetus</i>
ATCC 33397	ATCC 19642
<i>S. anginosus</i>	<i>S. downei</i>
TU-C20	ATCC 33748
<i>S. anginosus</i>	<i>S. macacae</i>
TU-C21	ATCC 35911
<i>S. anginosus</i>	<i>S. mitis</i>
TU-C25	ATCC 6249
<i>S. intermedius</i>	<i>S. salivarius</i>
ATCC 27335	ATCC 9759
<i>S. constellatus</i>	<i>S. oralis</i>
ATCC 27823	ATCC 35037
<i>S. mutans</i>	<i>S. gordonii</i>
ATCC 25175	ATCC 10558
<i>S. sobrimus</i>	<i>S. sanguinis</i>
B13N	ATCC 10556
<i>S. sobrimus</i>	<i>S. pyogenes</i>
ATCC 33478	GTC 262
<i>S. sobrimus</i>	<i>S. agalactiae</i>
6715	GTC 1234
<i>S. rattus</i>	<i>S. pneumonia</i>
ATCC 19645	ATCC 33400
<i>S. ferus</i>	<i>Staph. aureus</i>
ATCC 33477	Cowan 1

4. 研究成果

TS、TS-sa、MS、MS-sa培地における20

菌株の増殖を調べた結果、TS-sa 培地では、*S. anginosus* を含む 8 菌株の増殖がみとめられ、60%の菌株の増殖は抑えられた(表 2)。

表 2. 基本培地での口腔細菌の増殖

菌株	TS	TS-sa	MS	MS-sa
<i>S. anginosus</i> ATCC 33397	+	+	+	+
<i>S. anginosus</i> TU-C20	+	+	+	+
<i>S. intermedius</i> ATCC 27335	+	+	+	+
<i>S. constellatus</i> ATCC 27823	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	+	-	+	-
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	+	+	+	+
<i>S. rattus</i> ATCC 19645	+	-	+	-
<i>S. ferus</i> ATCC 33477	+	+	+	+
<i>S. cricetus</i> ATCC 19642	+	+	+	+
<i>S. downei</i> ATCC 33748	+	+	+	+
<i>S. macacae</i> ATCC 35911	+	-	+	-
<i>S. mitis</i> ATCC 6249	+	-	+	-
<i>S. salivarius</i> ATCC 9759	+	-	+	-
<i>S. oralis</i> ATCC 35037	+	-	+	-
<i>S. gordonii</i> ATCC 10558	+	-	+	+
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	+	-	+	+
<i>S. pyogenes</i> GTC 262	+	-	+	-
<i>S. agalactiae</i> GTC 1234	+	-	+	-
<i>S. pneumonia</i> ATCC 33400	+	-	+	-
<i>Staph. aureus</i> Cowan 1	+	-	+	-

24 菌株の MIC を調べると、41%菌株が 3.2U/ml 以上のバシトラシン耐性を示した。そこで適正なバシトラシン濃度を定めるために 0~6.4U/ml の範囲で検討し、用いたすべての *S. anginosus* の増殖が可能な 2.0U/ml のバシトラシンを TS-sa 培地に添加した新しい TS-sab 培地を作製した(表 3)。この新選択培地の選択性を検討するため、TS 培地を対照培地として、TS-sab 培地における各菌株の相対検出率を調べた。その結果、*S. anginosus* の 2 菌株株で 90%以上の相対検出率が確認された。その他の *S. anginosus* のそ

れは 55%および 0.3%で臨床分離株 1 株の検出率が低かった。*S. anginosus* 以外では、*S. intermedius* と *S. sobrinus* が検出されたがそれらの検出率は 0.01~0.1%と低かった(表 4)。

表 3. TS-sab 培地でのアンギノサス群レンサ球菌の増殖可能なバシトラシン濃度

濃度*	2.3	2.2	2.0	1.0	0
<i>S. anginosus</i> ATCC 33397	+	+	+	+	+
<i>S. anginosus</i> TU-C20	-	+	+	+	+
<i>S. anginosus</i> TU-C21	-	+	+	+	+
<i>S. anginosus</i> TU-C25	-	-	+	+	+
<i>S. intermedius</i> ATCC 27335	-	+	+/-	+	+
<i>S. constellatus</i> ATCC 27823	-	-	-	+	+

*バシトラシン濃度 (U/ml)

表 4. ST-sab 培地の各菌株の検出率

	TS	TS-sab	DR*
<i>S. anginosus</i> ATCC 33397	2.20	2.02	91.6
<i>S. anginosus</i> TU-C20	$\times 10^8$	$\times 10^8$	
<i>S. anginosus</i> TU-C21	2.48	2.33	94.0
<i>S. anginosus</i> TU-C25	$\times 10^7$	$\times 10^7$	
<i>S. anginosus</i> ATCC 27335	1.83	1.02	55.7
<i>S. anginosus</i> ATCC 27335	$\times 10^7$	$\times 10^7$	
<i>S. anginosus</i> ATCC 33478	2.27	6.50	0.3
<i>S. anginosus</i> ATCC 33478	$\times 10^7$	$\times 10^4$	
<i>S. intermedius</i> ATCC 27335	2.24	2.80	0.1
<i>S. intermedius</i> ATCC 27335	$\times 10^7$	$\times 10^4$	
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	3.74	1.22	0.03
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	$\times 10^6$	$\times 10^3$	
<i>S. sobrinus</i> 6715	4.39	4.07	0.01
<i>S. sobrinus</i> 6715	$\times 10^6$	$\times 10^2$	
その他菌株		ND	0

DR: detection rate (%) ND : not detect

2 種の抗菌剤スルファメタジンとアズトレオナムを用いた *S. anginosus* 用の半選択培地が報告されているが、その選択性は高くはない。本研究でもこれらの 2 種の抗菌剤を含む TS-sa 培地の *S. anginosus* の選択性は低かった。抗菌スペクトルの異なる抗菌剤を組み合わせる方法は対象細菌の選択性を高めるために有用である。バシトラシンは医学の分野で強い抗菌剤として知られており、口腔微生物学領域ではう蝕原細菌の半選択培地に用いられている。本研究では上記スルファメタジン、アズトレオナムに加えてバシトラシン(2.0U/ml)を添加した新しい ST-sab 培地を作製し、TS 培地と *S. anginosus* の検出率を比較した結果、3 種抗菌剤含有の新しい TS-sab 培地は *S. anginosus* に対する選択

性が大幅に改善された有用な選択培地であることが示唆された。

以上より、今回作製した *S. anginosus* 用の新しい TS-sab 培地は、3 種類の抗菌剤スルファメタジン、アズトレオナム、バシトラシンを応用することにより、選択性を大幅に改善することができた。

S. anginosus は口腔レンサ球菌の一員でありながら、一方で口腔の化膿性感染部位だけでなく、肝、肺、脾臓などの遠隔臓器の膿瘍の原因菌として良く知られている。さらに近年、肺がん、胃がん、咽頭がんや口腔がんの病巣から頻繁に分離されることから、がんとの関連に注目が集まっている。しかし、従来、分離培養に使用されていた培地では本菌と他のレンサ球菌の鑑別が難しく、臨床材料から見落とされがちであった。そこで、この問題を解決するために当該研究では本菌に適した選択培地の開発に取り組んだ。

特定の細菌を臨床材料から分離するために使用される選択培地は他の細菌の増殖を抑えるための添加剤（塩、色素、阻害剤、抗菌剤）により選択性を高める工夫がされている。本研究では Tryptic Soy Broth(TS)培地と Mitis-Salivarius(MS)培地を基礎培地として 3 種の抗菌剤（バシトラシン、スルファメタジン、アズトレオナム）を添加し新しい選択培地を作製した。スルファメタジンとアズトレオナムは、*S. anginosus* の半選択培地としてすでに使用されているが、その選択性は高くない。そこで、レンサ球菌の選択培地に添加剤として使用されるバシトラシンを最適な濃度に加えることにより、本菌の選択的に優れた培地の開発をめざした。供試菌株として *S. anginosus* 臨床分離株 3 株を含む 24 菌種のレンサ球菌を用い、TS 培地と MS 培地にスルファメタジン (1mg/ml) とアズトレオナム (0.2mg/ml) を添加した培地 (TS-sa, MS-sa) さらにはバシトラシンを加えた培地 (TS-sab, MS-sab) を作製し、TS 培地を対照として、バシトラシンの最適濃度を検討し、各供試菌株の相対的検出率を調べた。その結果、バシトラシンを 2.0U/ml に添加した TS-sab 培地 (バシトラシン; 2.0U/ml) の作製に成功し、今後の本菌の病原性の解明に極めて有用であることが示唆された。

< 引用文献 >

Narikiyo M, et al.: Frequent and preferential infection of *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus anginosus* in esophageal cancers. *Cancer Sci.* 2004;95(7):569-74.

Shinzato T, et al.: The *Streptococcus milleri* group as a cause of pulmonary infections. *Clin Infect Dis.* 1995;21 Suppl 3:S238-43.

Sasaki M, et al.: *Streptococcus anginosus* infection in oral cancer and its infection route.

Oral Dis. 2005; 11(3):151-6.

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 1 件)

Yu Fukuda, Susumu Imai, Yoshiki Hamada, Nobuhiro Hanada: Tryptic Soy agar supplemented with bacitracin represents a remarkable advancement as a selective culture medium for *Streptococcus anginosus*. *Asian Pac J Dent.* 査読有、12 巻、2012 : 37-44 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 俊克 (HORIUCHI, Toshikatsu)
鶴見大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号: 90454165

(2) 研究分担者

花田 信弘 (HANADA, Nobuhiro)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号: 70180916

濱田 良樹 (HAMADA, Yoshiki)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号: 70247336

今井 奨 (IMAI, Susumu)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号: 80072958

山田 浩之 (YAMADA, Hiroyuki)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号: 90267542

野村 義明 (NOMURA, Yoshiaki)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号: 90350587