マウス口底膿瘍モデルを用いた歯性感染症起炎菌の病原性の検討

—— *Streptococcus constellatus* と *Fusobacterium nucleatum* の

相互作用の機序について ——

栗山 智有・中川 清昌・川尻 秀一

山本 悦秀・斎木 康正*・室木 俊美**

Experimental study of pathogens of odontogenic infection,
using an oral floor abscess model in mice—— Mechanism of microbial interactions between *Streptococcus*
constellatus and *Fusobacterium nucleatum* ——

Tomoari KURIYAMA・Kiyomasa NAKAGAWA・Shuichi KAWASHIRI

Etsuhide YAMAMOTO・Yasumasa SAIKI*・Toshimi MUROI**

Abstract: In the present study, microbial interactions between *Streptococcus constellatus* and *Fusobacterium nucleatum*, which are isolated frequently in odontogenic infections, were examined using an oral floor abscess model in mice. Microbial interactions between the two tested strains were observed. The culture filtrate of *S. constellatus* did not enhance *F. nucleatum* virulence. However, it appeared that the culture filtrate of *F. nucleatum* enhanced *S. constellatus* virulence. Moreover, this enhancement was observed when a heat-treated culture filtrate of *F. nucleatum* was injected. These findings suggest that a heat-stable substance in *F. nucleatum* culture filtrate may play an important role in microbial synergy between *S. constellatus* and *F. nucleatum*.

Key words: odontogenic infection (歯性感染症), microbial interaction (相互作用), oral floor abscess model (口底膿瘍モデル)

緒 言

歯性感染症による閉塞膿瘍からの分離菌は、ほとんどの場合口腔内常在菌である。また、歯性感染症は複数の菌が関与する複数菌感染形態をとることが多い^{1)~3)}。われわれは口腔内の常在菌が健康なヒトに歯性感染症を発症、進展させる機序の一要因として複数菌感染形態であることに注目した。すなわち、菌の病原性の相互作用が炎症の発症、増悪に影響しているものと考えた。

われわれは、前報⁴⁾において複数起炎菌の相互作用

を明らかにする目的で歯性感染症においてきわめて高頻度に分離される *Streptococcus constellatus* と *Fusobacterium nucleatum* に注目し、当教室で考案したマウス口底膿瘍モデルを用いてその混合感染時の菌の病原性の相互作用およびその機序について検討した。その結果、この2菌の混合感染時において菌の病原性の相乗作用が存在することを明らかにした。しかしながら、この相乗作用がいかなる機序に基づくものかについては不明である。

そこで、われわれは、この相乗作用の機序を明らかにする目的で、マウス口底膿瘍モデルを用いて検討した。

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座

(主任：山本悦秀教授)

*木島病院歯科口腔外科

(主任：斎木康正医長)

**室木歯科口腔外科医院

(主任：室木俊美医長)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

School of Medicine, Kanazawa University (Chief:
Prof. Etsuhide Yamamoto)

*Department of Oral and Maxillofacial surgery,
Kijima Hospital (Chief: Yasumasa Saiki)

**Muroki Dento-Oral Surgical Clinic (Chief:
Toshimi Muroki)

受付日：平成10年5月20日

写真1 病変の形成様式

左：限局型病変。矢印部に膿瘍が観察され、菌接種部位（*印部）に限局している。
 右：拡散型病変。矢印部に蜂窩織炎様の病変が形成されている。病変は菌接種部位（*印部）から周囲組織に拡散されている。

方 法

1. 使用動物

使用した動物は、ICR Crj CD-1 マウス（日本チャールズリバー、横浜）、雌6週齢（体重25g～28g）である。

2. 使用菌株

使用した菌株は、American Type Culture Collection (ATCC) 由来の *S.constellatus* ATCC27823, *F.nucleatum* ATCC25586 である。

3. 菌の培養および接種液の作製

1) 菌培養液および菌培養濾液の作製

菌培養液および菌培養濾液の作製には Peptone-Yeast extract-Glucose (PYG) broth を用いた。この PYG broth の組成は 0.1% Vitamin K (和光純薬、大阪)、1% Bacto-Peptone (Defico, Detroit, USA)、1% Yeast extract (Defico)、1% glucose である。*S.constellatus* はこの PYG broth にて 37℃、5% CO₂ 下 48 時間培養した。これを菌培養液とし、さらにこの菌培養液を 2000rpm、20 分間遠心分離した後、0.22μm フィルター (Millex-GS®, Millipore, Bedford, USA) にて濾過滅菌した。こうして得られたものを菌培養濾液とした。

F.nucleatum についてはこの PYG broth にて 37℃、72 時間嫌気培養し、これを菌培養液とした。菌培養濾液については *S.constellatus* の菌培養濾液と同様の方法で作製した。

なお、菌培養液中の菌数は *S.constellatus* では 4.0×10^9 CFU/ml, *F.nucleatum* では 7.0×10^9 CFU

/ml であった。

2) 菌懸濁液の作製

菌懸濁液については次のような方法で作製した。

S.constellatus は 5% 羊血液加 Brucella HK 寒天培地にて 37℃、5% CO₂ 下にて 48 時間培養し、寒天培地上の *S.constellatus* の colony を集め PYG broth に 4.0×10^9 CFU/ml の濃度に懸濁した。

F.nucleatum は 5% 羊血液加 Brucella HK 寒天培地（極東製薬、東京）にて 37℃、72 時間嫌気培養し、寒天培地上の *F.nucleatum* の colony を集め PYG broth に 4.0×10^9 CFU/ml の濃度に懸濁した。

3) 接種液の作製

以上のように準備された *S.constellatus* および *F.nucleatum* の菌懸濁液、菌培養液、菌培養濾液を 0.05 ml ずつ次のような組み合わせで混合した。

- (1) 菌懸濁液 + 他方の菌の菌培養液
- (2) 菌懸濁液 + 他方の菌の菌培養濾液
- (3) 菌懸濁液 + 他方の菌の加熱処理した菌培養濾液
- (4) 菌懸濁液 + 未培養の PYG broth (コントロールとして)
- (5) 菌培養液 + 未培養の PYG broth
- (6) 菌培養濾液 + 未培養の PYG broth
- (7) 加熱処理菌培養濾液 + 未培養の PYG broth

菌培養濾液の加熱処理は、菌培養濾液をオートクレーブにて 121℃、20 分間加熱することにより行った。

こうして混合されたものを接種液とした。接種液の pH はすべて 7.00 ± 0.2 であった。

表1 *S. constellatus*, *F. nucleatum* の菌懸濁液, 菌培養液, 菌培養濾液の病原性

接種液 (接種菌数)		膿瘍形成マウス数 ／生存マウス数 (死亡マウス数)	病変形成様式	病変からの回収菌数
<i>S. constellatus</i>	菌懸濁液 (2.0×10 ⁸ CFU/mouse)	8／10 (0)	限局型
	菌培養液 (2.0×10 ⁸ CFU/mouse)	0／10 (0)	(NA)	(NA)
	菌培養濾液	0／10 (0)	(NA)	(NA)
	加熱処理菌培養濾液	0／10 (0)	(NA)	(NA)
<i>F. nucleatum</i>	菌懸濁液 (2.0×10 ⁸ CFU/mouse)	9／10 (0)	限局型
	菌培養液 (3.5×10 ⁸ CFU/mouse)	0／10 (0)	(NA)	(NA)
	菌培養濾液	0／10 (0)	(NA)	(NA)
	加熱処理菌培養濾液	0／10 (0)	(NA)	(NA)

菌懸濁液：寒天培地上の菌を懸濁した PYG broth

菌培養液：菌を培養した PYG broth

(NA)：病変を形成しないため観察不能

4. マウスへの菌の接種および膿瘍の回収

エタノールにて消毒したマウスのオトガイ下部皮膚側から26G 注射針を用い、口底の筋層部、粘膜下に接種液を0.1ml 接種した。それぞれの群は10匹とし、接種から7日間のマウスの致死率を検討した。また接種から7日後にジエチルエーテル下にて屠殺し、膿瘍の形成率および膿瘍からの回収生菌数を求めた。膿瘍の判定については、グラム染色で多核白血球と接種菌体の確認ができる膿汁を多量に含む内腔のある腫瘍で、内容液(膿汁)から接種菌を回収できるものを膿瘍と判定した。膿瘍からの生菌数の測定は次のように行った。すなわち無菌的に採取した膿瘍をホモジナイザーにて1ml の GAM broth (日水製薬, 東京) に粉砕溶解後、5 % 羊血液加 Brucella 寒天培地および PV (Paromomycin, Vancomycin) 加5 % 羊血液加 Brucella 寒天培地を用いて寒天平板希釈法にて菌数を定量した。

5. 病原性の評価法

今回われわれは菌の病原性を以下の4 点から評価した。

1) 致死率

2) 膿瘍形成率

3) 病変からの回収菌数

4) 病変の形成様式

病変の形成様式については接種部位に限局した病変(限局型)と周囲の組織に病変が及ぶ蜂窩織炎様の病変(拡散型)とに分類した(写真1)。

6. 統計学的検討

統計学的処理については、致死率、膿瘍形成率に対しては χ^2 検定を、回収菌数に対しては Student-T を用いてそれぞれの群をコントロール群と比較検討し、

危険率が5 % 未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. 培養条件による菌の病原性の違いについて

今回の条件で *S. constellatus* の菌培養液のみおよび菌培養濾液(加熱処理したものも含む)のみをマウス口底に接種しても、マウスは致死したり、病変の形成を認められなかった(表1)。また、*F. nucleatum* においてもその菌培養液のみおよび菌培養濾液(加熱処理したものも含む)のみでは、マウスを致死させたり、病変を形成させたりしなかった(表1)。しかし、その一方で *S. constellatus* および *F. nucleatum* の菌懸濁液はそれ単独でもマウスの口底部に膿瘍を形成した(表1)。

2. *S. constellatus* 菌培養液および培養濾液(加熱処理したものも含む)の *F. nucleatum* の病原性に及ぼす影響

F. nucleatum の菌懸濁液単独をマウスに接種した場合10匹中9 匹に限局型の病変(膿瘍)が形成され、病変から平均7.39 (Log₁₀CFU/mouse) の菌が回収された(表2)。 *F. nucleatum* の菌懸濁液に *S. constellatus* の菌培養濾液を加えたものを接種した場合、10匹中9 匹に限局型の病変が形成され、平均7.37 (Log₁₀CFU/mouse) の菌が回収された(表2)。また、 *S. constellatus* の加熱処理した菌培養濾液を加えたものを接種した場合、10匹中7 匹に限局型の病変が形成され、平均7.15 (Log₁₀CFU/mouse) の菌が回収された(表2)。 *F. nucleatum* の菌懸濁液に *S. constellatus* の菌培養液を加えた場合は10匹中5 匹が死亡し、残り

表2 *S. constellatus* の培養濾液の *F. nucleatum* の病原性に対する影響

被検菌種		膿瘍形成マウス数 ／生存マウス数 (死亡マウス数)	病変形成様式	病変からの回収菌数 (<i>F. nucleatum</i>)
<i>S. constellatus</i>	<i>F. nucleatum</i>			
なし	菌懸濁液 (2.0×10^8 CFU/mouse)	9／10 (0)	限局型	(Log ₁₀ CFU/mouse)
菌培養濾液	同上	9／10 (0)	限局型	
加熱処理 菌培養濾液	同上	7／10 (0)	限局型	
菌培養液 (2.0×10^8 CFU/mouse)	同上	5／5 (5)*	拡散型	
*: p<0.05 (致死率) †: p<0.05				

表3 *F. nucleatum* の培養濾液の *S. constellatus* の病原性に対する影響

被検菌種		膿瘍形成マウス数 ／生存マウス数 (死亡マウス数)	病変形成様式	病変からの回収菌数 (<i>S. constellatus</i>)
<i>S. constellatus</i>	<i>F. nucleatum</i>			
菌懸濁液 (2.0×10^8 CFU/mouse)	なし	8／10 (0)	限局型	(Log ₁₀ CFU/mouse)
同上	菌培養濾液	2／2 (8)*	拡散型	
同上	加熱処理 菌培養濾液	4／4 (6)*	拡散型	
同上	菌培養液 (3.5×10^8 CFU/mouse)	0／0 (10)*	(NA)	
*: p<0.05 (致死率) † : p<0.05 (NA) : 病変を形成しないため観察不能				

の5匹に拡散型の病変が形成され、平均8.24 (Log₁₀ CFU/mouse) の菌が回収された。致死率および回収菌数については、*F. nucleatum* の菌懸濁液を単独で接種した場合と比較して有意差が認められた (表2)。

しかしながら、菌懸濁液に *S. constellatus* の菌培養濾液 (加熱処理したものも含む) を加え接種した場合、膿瘍形成率、回収菌数において、*F. nucleatum* の菌懸濁液を単独で接種した場合と比較しても有意差は認められなかった。

3. *F. nucleatum* 菌培養液および培養濾液 (加熱処理したものも含む) の *S. constellatus* の病原性に及ぼす影響

S. constellatus の菌懸濁液単独をマウスに接種した場合10匹中8匹に限局型の病変 (膿瘍) が形成され、

病変から平均5.45 (Log₁₀CFU/mouse) の菌が回収された (表3)。*S. constellatus* の菌懸濁液に *F. nucleatum* の菌培養濾液を加えたものを接種した場合、10匹中8匹が死亡し、残りの2匹に拡散型の病変が形成され、平均7.35 (Log₁₀CFU/mouse) の菌が回収された (表3)。*F. nucleatum* の加熱処理した菌培養濾液を加えたものを接種した場合、10匹中6匹が死亡し、残りの4匹に拡散型の病変が形成され、平均6.82 (Log₁₀CFU/mouse) の菌が回収された。さらに、*F. nucleatum* の菌培養液を加えた場合は10匹中全匹が死亡した。*S. constellatus* の菌懸濁液を単独で接種した場合と比較したところ、*F. nucleatum* の菌培養濾液、加熱処理した菌培養濾液、菌培養液を加え接種した場合のいずれも致死率、回収菌数の有意な増加を

認めた(表3)。その一方で、加熱処理した場合と、していない場合とを比較しても、膿瘍形成率、致死率、回収菌数いずれにおいても有意差は認められなかった。

考 察

菌性感染症の起炎菌は、近年の検体の保存方法、菌の培養、分離、同定方法の飛躍的な進歩から *S. milleri* group を中心とした Viridans streptococci, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* 等が主に菌性感染症から分離され、これらの菌が炎症の発症、進展に大きく関与していると考えられている^{5, 6)}。これらの菌の病原性については以前から報告されており⁷⁻¹²⁾、菌性感染症の起炎菌として考えられている。特に今回の実験で用いた *S. constellatus* と *F. nucleatum* は重症菌性感染症からの分離頻度が高いことが指摘されている¹³⁾。しかしながらその一方で菌性感染症はほとんどが複数菌感染である。一般に複数菌感染症においてはそれぞれの起炎菌の相互作用が注目されており¹⁴⁾、菌性感染症においてもこうした起炎菌の相互作用が炎症の発症、増悪に強い影響を与えていると推察される。*S. constellatus* と *F. nucleatum* の病原性の相互作用については、マウス皮下膿瘍モデルやマウス腹腔内膿瘍モデルにおいて相乗効果が認められたと報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながらこれらはいずれも口腔組織を用いていないこと、またこの相乗作用の機構については全く解明されていないことが問題であった。そこでわれわれは口腔組織を用いた菌性感染症モデルにおける検討が必要と考え、実験を行った。われわれの実験において *S. constellatus* ATCC27823, *F. nucleatum* ATCC25586 とともに単独感染において膿瘍を形成することが認められた。興味深いことに同じ菌数を接種しても寒天培地で培養し、PYG broth に懸濁して接種した方が、PYG broth にて培養して接種したものよりも明らかに菌の病原性が強かった。この現象は、*S. constellatus*, *F. nucleatum* の双方に認められた。この機序については不明であるが、培地に含まれる栄養の組成が菌の病原性に影響を与えたものと推察される。

さて、今回 *S. constellatus* ATCC27823 と *F. nucleatum* ATCC25586 との混合感染の検討で菌の病原性の相乗作用が認められた。われわれは、*S. constellatus* と *F. nucleatum* について、臨床分離菌株についても検討したが、同様に混合感染時に菌の相乗作用が存在することを見だしている⁴⁾。そこでわれわれは、どのような因子がこの相乗作用発現に関与しているかについて検討した。

S. constellatus の培養濾液は *F. nucleatum* の病原性になら影響を与えなかった。この結果から、わ

れわれは *S. constellatus* の *F. nucleatum* に対する影響は、生菌間の相互作用によるものであり、菌の産生する物質によるものではないものと考えた。中川ら¹⁸⁾ は *in vitro* において *S. constellatus* と *F. nucleatum* と同時に培養した場合、*S. constellatus* が培養液中の酸化還元電位を低下させ、*F. nucleatum* の増殖を促進したと報告している。この報告はわれわれの研究結果を考える上で重要なものと考えられる。

一方、*F. nucleatum* の培養濾液の *S. constellatus* に対する影響については興味深い結果が得られた。すなわち、*F. nucleatum* の培養濾液の *S. constellatus* の生菌を混合して接種した場合、*S. constellatus* 単独で接種した場合よりも病原性の増強効果が認められた。また、*F. nucleatum* の培養濾液を 121℃、20 分間で加熱処理し、同様に *S. constellatus* と混合して接種した場合においても同様に病原性の増強効果が認められた。このことから、*F. nucleatum* の産生する耐熱性物質が *S. constellatus* との相乗効果発現の起因となることが推察される。

こうした菌の相互効果の機構について、1) 宿主の防御機構に対する作用—とくに貪食作用の抑制、2) 他菌への栄養の供給、3) 局所環境の変化、4) 他菌の病原性の増強、以上が考えられている¹⁹⁾。宿主の免疫に対する作用について、Inghan ら²⁰⁾ は *Bacteroides melaninogenicus* (現: *Prevotella melaninogenica*) が *Proteus* に対する貪食作用を抑制させたと報告している。また、Touyama ら²¹⁾ は *P. intermedia* の培養濾液が宿主防御機構を抑制したと報告している。菌への栄養の供給について、*B. melaninogenicus* の発育促進因子である Vitamin K の供給を口腔内常在菌が行っているとの報告がある²²⁾。局所環境の変化については、特に嫌気度を示す酸化還元電位について注目されている。すなわち、好気性菌の酸素の消費により、酸化還元電位が低下することにより嫌気性菌の発育が促進され、また種々の病原性の発揮が可能になると考えられている²³⁾。しかしながら *F. nucleatum* と他の菌との相互作用についての報告は少ない。Feuille ら²⁴⁾ は *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の病原性の相互作用について研究しており、その中でこの作用は *F. nucleatum* が免疫系を低下させることに起因していると報告している。しかしながら *S. constellatus* と *F. nucleatum* との相互作用の機序の解明には、さらなる研究が求められる。

結 語

われわれの研究から菌性感染症から高頻度に分離される *S. constellatus* と *F. nucleatum* にはその混合感染時において病原性の相乗作用がみられ、その原因の 1 つとして *F. nucleatum* の産生する耐熱性物質の

関与が示唆された。

謝辞

本研究遂行にあたり御助言いただいた金沢大学医学部微生物学講座 中村信一教授および唐沢忠宏助教授に感謝します。

引用文献

- 1) Lewis, M.A.O., Macfarlane, T.W., et al.: A microbiological and clinical review of the acute dentoalveolar abscess. *Br J Maxillofac Surg* 28: 359-366 1990.
- 2) Williams, B.L., Mccann, G.F., et al.: Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J Clin Microbiol* 18: 770-774 1983.
- 3) 栗山智有, 中川清昌, 他: 顎口腔領域感染症起炎菌の検討-第3報: 臨床症状と分離菌の関係について. *日口外誌* 44: 126-132 1998.
- 4) 栗山智有, 中川清昌, 他: マウス口底膿瘍モデルを用いた菌性感染症起炎菌の病原性の検討-*Streptococcus constellatus*, *Fusobacterium nucleatum* の膿瘍形成能について-. *日口外誌* 44: 382-387 1998.
- 5) Lewis, M.A.O., MacFarlane, T.W., et al.: Quantitative bacteriology of acute dentoalveolar abscesses. *J Med Microbiol* 21: 101-104 1986.
- 6) Brook, I., Frazier, E.H., et al.: Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. *Oral Microbiol Immunol* 6: 123-125 1991.
- 7) Gossling, J.: Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. *Rev Infect Dis* 10: 257-285 1988.
- 8) Lewis, M.A.O., MacFarlane, T.W., et al.: Assessment of the pathogenicity of bacterial species isolated from acute dentoalveolar abscesses. *J Med Microbiol* 27: 109-116 1988.
- 9) van Steenberg, T.J.M., Kastelein, P., et al.: Virulence of black-pigmented *Bacteroides* strains from periodontal pockets and other sites in experimentally induced skin lesions in mice. *J Periodont Res* 17: 41-49 1982.
- 10) Bolstad, A.I., Jensen, H. B., et al.: Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 9: 55-71 1996.
- 11) Finegold, S.M., Strong, C.A., et al.: The importance of black-pigmented gram-negative anaerobes in human infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 6: 77-82 1993.
- 12) Rams, T.E., Feik, D., et al.: *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 7: 1-6 1992.
- 13) Heimdahl, A., von Konow, L., et al.: Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *J Clin Microbiol* 22: 299-302 1985.
- 14) Rotstein, O.D., Pruett, T.L., et al.: Mechanisms of microbial synergy in polymicrobial surgical infections. *Rev Infect Dis* 7: 151-170 1985.
- 15) Brook, I., Hunter, V., et al.: Synergistic effect of *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, anaerobic cocci, and aerobic bacteria on mortality and induction of subcutaneous abscesses in mice. *J Infect Dis* 149: 924-928 1984.
- 16) Baumgartner, J.C., Falkler, W.A., et al.: Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 7: 253-256 1992.
- 17) 斎木康正, 中川清昌, 他: 口腔外科領域閉塞膿瘍からの分離菌による実験的膿瘍形成能の検討. *嫌気性菌研究会誌* 24: 10-16 1995.
- 18) 中川清昌, 斎木康正, 他: 口腔領域混合感染症の発生機序に関する検討-*in vitro* における酸化還元電位と生菌数の関連性について-. *日口外誌* 39: 1035-1042 1993.
- 19) Mackowiak, P.A.: Microbial synergism in human infections. *N Engl J Med* 298: 83-87 1978.
- 20) Ingham, H.R., Sisson, P., et al.: Inhibition of phagocytosis in vitro by obligate anaerobes. *Lancet* 2: 1252-1254 1977.
- 21) Touyama, M., Kusano, N., et al.: Effects of the *Prevotella intermedia* culture filtrate and short-chain fatty acids on human polymorphonuclear neutrophil functions. *感染症誌* 69: 1348-1355 1995.
- 22) Gibbons, R.J., MacDonald, J.B.: Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *J Bacteriol* 80: 164-170 1960.
- 23) Finegold, S.M.: Host factors predisposing to anaerobic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 6: 159-163 1993.
- 24) Feuille, F., Ebersole, J.L., et al.: Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. *Infect Immun* 64: 2095-2100 1996.