呼吸器感染症における 口腔内レンサ球菌と嫌気性菌の役割

迎 寛

Key words 細菌叢解析, 肺炎, 肺化膿症, 嫌気性菌, 口腔内レンサ球菌

はじめに

培養法を中心とした従来の感染症における原因菌検索法は、特に培養が困難な菌の場合などでは原因菌が明らかとならないことが多く、十分な検査手段とはいえない。また、嫌気性菌が関与する呼吸器感染症としては肺化膿症や誤嚥性肺炎がよく知られているが、実際は培養が困難なために、呼吸器感染症全体における嫌気性菌の原因菌としての正確な頻度やその重要性の詳細についてはいまだ不明である。また、口腔内レンサ球菌も口腔内常在菌として扱われるため、呼吸器感染症の原因菌としての判断は難しい。近年、分子生物学的手法、特に16SリボソームRNA (ribosomal RNA : rRNA) 遺伝子を用いた細菌の検出法の有用性が明らかとなっている。16S rRNA遺伝子はヒトには存在せずに細菌（および古細菌）のみが保有しているという特徴があり、これを直接解析することで培養に依存せ

ずに原因菌を検索することが可能となる。我々は産業医科大学微生物学教室と共同でこの16S rRNA遺伝子を用いた網羅的細菌叢解析法という手法を開発し、胸膜炎や肺炎などの呼吸器感染症においてこの方法を用いることで原因菌の検討を行ってきた^{1~4)}。本法による解析によって、主に培養法を用いて報告されてきた頻度以上に呼吸器感染症の原因菌として口腔内レンサ球菌や嫌気性菌が重要である可能性が明らかとなってきた^{1~4)}。

今回は、市中肺炎や医療・介護関連肺炎(nursing and healthcare-associated pneumonia : NHCAP)、誤嚥性肺炎、肺化膿症などの呼吸器感染症に関して、我々が行ってきた網羅的細菌叢解析法のデータをもとに、呼吸器領域における嫌気性菌や口腔内レンサ球菌の重要性について概説する。

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科展開医療科学講座呼吸器内科学分野

113th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine : Educational Lecture : 7. Significance of oral Streptococci and anaerobes in respiratory infections.

Hiroshi Mukae : Department of Respiratory Medicine, Unit of Translational Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Japan.

本講演は、平成28年4月15日（金）東京都・東京国際フォーラムにて行われた。

図1 細菌叢解析法（クローン・ライブラリー法）の概要

検体（気管支洗浄液や胸水など）中に存在する細菌の菌体を破壊し、DNAを抽出・精製し、ユニバーサルプライマーを用いて16S rRNA遺伝子の部分断片を網羅的にPCRで増幅し、クローン・ライブラリーを作成する。このクローン・ライブラリーから無作為に選択した96クローンの塩基配列を各々決定し、細菌基準株の16S rRNA遺伝子データベースとの相同性検索を行い、各々最も相同性の高い基準株の菌種とクローン数（割合）を決定する。
EtBr：ethidium bromide, SDS：sodium dodecyl sulfate, PCR：ポリメラーゼ連鎖反応、rRNA：リボソームRNA

1. 網羅的細菌叢解析の方法¹⁾

網羅的細菌叢解析法とは、細菌（および古細菌）のみが共通して保有する16S rRNA遺伝子をPCRで網羅的に増幅し、PCR産物のクローン・ライブラリーを作成した後に各クローンの塩基配列を評価することで、その検体中の菌種とその割合を把握する手法である（図1）。具体的にはサンプルをDNA抽出液に懸濁し、十分に均一化した後に30%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）溶液およびガラスビーズを用いて物理的、化学的に溶菌して、DNAを抽出した。抽出・精製後にDNA溶液を鋳型にuniversal primerを用いて、PCR法で網羅的に16S ribosomal RNA遺伝子の部分断片（約600 bp）を網羅的に増幅した。その後、大腸菌を用いてクローニングを行い、PCR産物のクローン・ライブラリーを作成し、無作為に選択した96クローンの塩基配列をそれぞれ

決定後、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) アルゴリズムを用いて外部データベースに登録されている基準株との相同性検索を行い、最も相同性の高い菌種の基準株を推定し、症例毎に菌種およびそのクローン数のリストを作成した。

2. 市中肺炎での細菌叢解析による原因菌

肺炎は呼吸器感染症で最も重要な疾患であり、死亡率の増加がみられており、現在、日本における死因別にみた死亡原因の第3位となっている。肺炎による死亡者の95%以上が65歳以上の高齢者という背景を考えると、日本社会の高齢化が肺炎による死亡の増加の一番の要因と考えられている。2060年には65歳以上の人口割合（高齢化率）が40%に達すると推計されているが、今後、ますます肺炎の死亡率は増加

図2 市中肺炎64例における喀痰培養および気管支洗浄液の培養結果と細菌叢解析結果 (文献1より改変)
気管支鏡検査を行った市中肺炎64例について、喀痰培養法では75%の症例で有意病原体の検出が困難であった。また、気管支洗浄液の培養法と細菌叢解析法では主な原因菌は肺炎球菌、インフルエンザ菌が検出された。加えて、細菌叢解析法ではマイコプラズマ、嫌気性菌(19%)が検出された。

するものと予想される。肺炎の診療においては原因菌の同定は重要なことであるが、実際に市中肺炎における原因菌調査では約30~40%が原因菌不明であるとされる⁵⁾。実際、2011年の日本からの報告では、呼吸器専門医が所属する全国約200施設から症例を集積した市中肺炎1,875例で原因菌の検討を行ったが、原因菌が判明したのは885例(47.2%)に過ぎず、半数以上の症例で原因菌を把握することができなかった⁶⁾。以上より、これまで日常臨床で行われている既存の原因菌検索法では明らかに限界が存在する。そこで、我々はより詳細な肺炎の原因菌検索のために、まず肺炎の病巣から気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)を直接採取し、その検体の培養に加え、前述した細菌叢解析法を用いた遺伝子学的検討を行った。まず、解析した64例の市中肺炎患者の喀痰とBALFの培養結果と細菌叢解析(各症例における第一優占菌種の割合)の結果を図1に示す³⁾。喀痰培養による原因菌検索では、全体の75%(48/64例)で有意な原因菌は同定な

れなかった。一方で、BALFによる解析では、培養法で39例(61%)、培養とマイコプラズマ抗体陽性例を含めると52例(81%)で原因菌が推定されたが、細菌叢解析法では64例全例(100%)で原因菌の推定が可能であった。この結果からは原因菌検索におけるBALFの検体としての有用性の再確認に加え、細菌叢解析法の有用性が示された。また、細菌叢解析法における第一優占菌種としては、これまでの培養を中心とした報告と同様に肺炎球菌やインフルエンザ桿菌が多く認められ、これはBALFの培養の結果と大差はなかった。しかし、BALFの培養と比較して細菌叢解析ではマイコプラズマの遺伝子に加え、*Fusobacterium*属や*Prevotella*属などの偏性嫌気性菌群や肺炎球菌以外の*Streptococcus*属などの口腔内常在菌も高い割合で検出された³⁾(図2)。これらの結果からは、培養を中心とした従来法による過去の市中肺炎の原因菌検索の報告における原因菌不明例の多くに、通常の培養法では評価が困難な嫌気性菌や口腔内レンサ球菌が関与している可能性が示唆される。ま

た、仮に1検体の中で1菌種の遺伝子が80%以上の占有率を示す場合を単独感染と定義すると、市中肺炎64症例中33例(51.6%)が単独感染に該当し、肺炎球菌やインフルエンザ菌などの従来からいわれている原因菌が多く検出された。一方で、残り31例(48.4%)が混合感染症例に該当し、特に嫌気性菌や口腔内レンサ球菌の関与が多く認められた。嫌気性菌は β ラクタマーゼを産生する菌種が多く存在することから、本来の原因微生物としての直接的な病原性に加えて、嫌気性菌が β ラクタマーゼの供給源として間接的に病原性を呈している可能性が示唆されている。また、嫌気性菌の培養上清が肺炎球菌肺炎を増悪させる可能性も報告されており、このような菌種間の関わりについても今後検討が必要な領域である。

3. NHCAPや誤嚥リスクをもつ症例における肺炎での細菌叢解析による原因菌

2011年に日本呼吸器学会から「医療・介護関連肺炎(NHCAP)診療ガイドライン」が発表された⁷⁾。このNHCAPは、市中での発症にもかかわらず、濃厚な医療や長期滞在型療養施設との関連から、いわゆる市中肺炎より原因菌の耐性度や死亡率が高く、院内肺炎と市中肺炎の中間的な病態を示すと考えられている。また、NHCAPの多くは高齢者に発症し、基礎疾患として脳血管疾患を有する症例が多いことから、誤嚥性肺炎が主要な発症機序の1つと考えられている。今後、高齢化が加速する日本においては、誤嚥性肺炎などを中心にNHCAPが重要になっていくものと思われる。誤嚥性肺炎においては従来から嫌気性菌の重要性が指摘されてきた。しかし、前述の通り、従来法での嫌気性菌の評価は難しいことから、我々はこのNHCAPにおいても、市中肺炎と同様にBALFを用いた気道局所からの検体の培養と細菌叢解析を行った⁴⁾。培養結果では、MRSA (methicillin-resistant Staph-

yllococcus aureus)を含む黄色ブドウ球菌や緑膿菌が原因菌と推定される症例が多かったが、細菌叢解析ではこれらの菌種の遺伝子が全く検出されない症例も多く、特にMRSAでは培養で検出されていても、実際に原因菌になっている症例は1/3～1/4程度しかない可能性が示唆された。実際に、培養にてMRSAが検出された症例のうち、約75%で抗MRSA活性のない抗菌薬が有効であった。また、嫌気性菌が原因菌と考えられる症例も1割程度存在しており、NHCAPにおいても嫌気性菌の重要性が確認されたが、NHCAPで原因菌として最も重要と考えられたのは口腔内レンサ球菌であった⁴⁾(図3)。また、市中肺炎と同様に、肺炎球菌やインフルエンザ桿菌はNHCAPにおいても重要な原因菌であった。

次に、原因菌検索のために気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage: BAL)を行った細菌性肺炎177例(市中肺炎83例、NHCAP94例)を対象に誤嚥リスク(脳血管障害の既往、中枢性変性疾患、認知症、頭頸部疾患、胃食道疾患)の有無による細菌叢の違いを検討した。内訳は誤嚥リスク保有群83例と非保有群94例であったが、第一優占菌種の比較では、嫌気性菌の検出率はリスク保有群に比べて非保有群が有意に高かった(5.7%と17.9%)。一方で、誤嚥リスクの有無と症例ごとの細菌叢の占有率を比較したところ、嫌気性菌では両群に有意差はみられなかったが、口腔レンサ球菌では誤嚥リスク保有群に有意な高い占有率を認めた。この結果からは、誤嚥性肺炎に関与する菌としては嫌気性菌より口腔内レンサ球菌が重要である可能性が考えられる。特にレンサ球菌の中で*Streptococcus anginosus*群は肺炎に加え、肺内や胸腔に膿を形成しやすく、高齢者では特に注意が必要である⁸⁾。

図3 医療介護関連肺炎82例における喀痰培養および気管支洗浄液の培養結果と細菌叢解析結果

(文献4より)

気管支鏡検査を行った医療介護関連肺炎82例。気管支洗浄液の培養法では、黄色ブドウ球菌 (19.5%)、緑膿菌 (17.1%) が多く培養されたが、細菌叢解析法では、それぞれ、7.3%、9.8%であり、それらの検出は半数以下であった。一方で、細菌叢解析法では、口腔内レンサ球菌 (23.2%) が多く検出された

4. 肺化膿症や細菌感染関連胸水での嫌気性菌や口腔内レンサ球菌の関与

我々は肺炎と同様の方法で肺化膿症45例での原因菌の同定を行った。BALFの培養では31.1%の症例で菌は検出されなかったが、細菌叢解析では全例で第一優占菌種が確認可能であった。培養法では、肺炎球菌や黄色ブドウ球菌、*S. anginosus*群が多く検出され、また20%以上の症例で3菌種以上が培養された。細菌叢解析では48.9%の症例で第一優占菌種が嫌気性菌 (主に*Fusobacterium*属) であった。また、残りの半数以上が*S. anginosus*群を含む、口腔内レンサ球菌であった。このように肺化膿症では嫌気性菌と口腔内レンサ球菌が重要であったが、嫌気性菌の占有率が高い症例群は低い群と比較して年齢が低い傾向にあった。また、逆に口腔内レンサ球菌が多い症例群では年齢が高い傾向にあった。

細菌感染関連胸水の26例の検討 (表) では、培養法では11例 (42%)、細菌叢解析では16例 (62%) で原因菌が推定され、細菌叢解析が検出に優れていた⁹⁾。一方で、10例は両者の方法ともに原因菌の検出は困難であった。培養法では黄色ブドウ球菌や口腔レンサ球菌等が検出された。培養と細菌叢解析の結果が一致しなかった10症例中7例で嫌気性菌が優占していた。このことから、黄色ブドウ球菌や口腔レンサ球菌は培養でも検出されるが、嫌気性菌の検出は細菌叢解析が優れていると考えられる。

おわりに

これまでは、呼吸器感染症の中で誤嚥性肺炎や肺化膿症では嫌気性菌の関与が高いと推定されてきた。また、口腔内レンサ球菌については喀痰の培養結果が原因菌であるのか、常在菌であるのかの判断自体が困難であった。今回、網

表 細菌感染関連胸水の培養結果と細菌叢解析結果 (文献1より一部改変)

No.	年齢/ 性別	Gram 染色	培養	細菌叢解析 (clones/clones, %)	
				第1 優占 phylotype	第2 優占 phylotype
1	72/M	GNR 1+	<i>P. aeruginosa</i> 3+	<i>P. aeruginosa</i> (100%)	—
2	61/F	GPC 1+	MSSA 3+	<i>S. aureus</i> (100%)	—
3	74/M	GPC 1+	MSSA 3+	<i>S. aureus</i> (100%)	—
4	73/M	GPC 2+	MRSA 3+	<i>S. aureus</i> (97.7%)	—
5	76/M	GPC 1+	<i>Streptococcus</i> sp.<+	<i>S. mitis</i> (100%)	—
6	60/M	GPC 2+	<i>S. agalactiae</i> 2+	<i>S. agalactiae</i> (100%)	—
7	84/F	GPC 2+	<i>S. anginosus</i> 2+	<i>S. intermedius</i> (100%)	—
8	52/F	GPC 2+	<i>S. intermedius</i>	<i>F. nucleatum</i> (48.8%)	<i>S. intermedius</i> (17/41, 41.5%)
9	74/M	GNR 3+	<i>Escherichia coli</i> 3+	<i>F. nucleatum</i> (25/74, 33.8%)	<i>Prevotella oris</i> (18/74, 24.3%)
		GPC 2+	<i>Strept. anginosus</i> 2+		
10	54/M	GNR 3+	<i>P. melaninogenica</i> group<+ <i>Wolinella spp</i> <+ <i>F. nucleatum</i> <+ <i>S. mitis</i> <+ <i>H. parainfluenzae</i> <+	<i>P. loescheii</i> (77/94, 81.9%)	<i>F. nucleatum</i> (17/94, 18.1%)
11	60/M	(—)	<i>Streptococcus</i> sp.<+	<i>Poryphyromonas. gingivalis</i> (55/75, 73.3%)	<i>F. simiae</i> (14/75, 18.6%)
12	69/M	(—)	no growth	<i>S. pneumoniae</i> (90/90, 100%)	—
13	66/M	(—)	no growth	<i>S. mitis</i> (27/77, 35.1%)	<i>Neisseria elongata</i> (8/77, 10.4%)
14	69/M	(—)	no growth	<i>F. simiae</i> (38/53, 71.7%)	<i>Filifactor alocis</i> (4/53, 7.6%)
15	55/M	(—)	no growth	<i>F. nucleatum</i> (11/34, 32.4%)	<i>Porphyromonas. endocarditis</i> (8/34, 23.5%)
16	58/M	(—)	no growth	<i>F. nucleatum</i> (47/86, 54.7%)	<i>Parvimonas micra</i> (12/86, 14.0%)

6例が培養結果と完全に一致(37.5%)した。

16例のうち7例(43.8%)に偏性嫌気性菌が優占し、培養で検出できなかった。原因菌は主に偏性嫌気性菌であった。

発熱を伴う片側性の好中球優位滲出性胸水で、他疾患を除外した26例。26検体のうち、培養陽性11検体(42%)、細菌叢解析法で原因菌が検出されたのは16検体(62%)であった。16例のうち7例(43.8%)で偏性嫌気性菌が優占し、培養で検出されず細菌叢解析法で同定された原因菌は主に偏性嫌気性菌であった。培養陽性例でも、細菌叢解析法でその菌が最優占菌種(第1優占)とならない症例も多かった。

羅的細菌叢解析という新しい分子生物学的手法を用いた呼吸器感染症の病巣から直接採取した検体を用いた検討では、肺炎ではある一定の割合で嫌気性菌や口腔レンサ球菌が原因菌である肺炎の存在が考えられる。また、これまで嫌気性菌の関与が知られている肺化膿症や細菌感染関連胸水においてはその半数程度に嫌気性菌が検出され、今まで考えられてきた以上に重要な役割を果たしていると考えられた。一方で、誤

嚥性肺炎においては嫌気性菌の関与は従来考えられていたよりも少ない可能性がある。特に、高齢者の呼吸器感染症では嫌気性菌より口腔レンサ球菌などの口腔内常在菌が重要である可能性がある。特に混合感染ではかなりの症例でこれらの菌の関与があり、特に嫌気性菌については肺炎の原因菌としてだけではなく、 β ラクタマーゼや病原因子の供給源として他の病原体による肺炎の重症化に関与している可能性も考え

られ、今後これらの菌の相互作用などの検討も重要である。

謝辞 今回の研究にご協力いただきました産業医科大学呼吸器内科 矢寺和博，川波敏則，山崎 啓，野口真吾の諸先生，および産業医科大学微生物学教室の諸先生に深謝いたします。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) 迎 寛：網羅的細菌叢解析法による呼吸器感染症診断．日内会誌 102：2875-2881, 2013.
- 2) Kawanami T, et al : A higher significance of anaerobes : the clone library analysis of bacterial pleurisy. Chest 139 : 600-608, 2011.
- 3) Yamasaki K, et al : Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. PLoS One 8 : e63103, 2013.
- 4) Noguchi S, et al : Bacteriological assessment of healthcare-associated pneumonia using a clone library analysis. PLoS One 10 : e0124697, 2015.
- 5) 日本呼吸器学会市中肺炎診療ガイドライン作成委員会編：成人市中肺炎診療ガイドライン．日本呼吸器学会，東京，2007.
- 6) Kohno S, et al : Evaluation of an assessment system for the JRS 2005 : A-DROP for the management of CAP in adults. Intern Med 50 : 1183-1191, 2011.
- 7) 日本呼吸器学会医療・介護関連肺炎（NHCAP）診療ガイドライン作成委員会編：医療・介護関連肺炎（NHCAP）診療ガイドライン．日本呼吸器学会，東京，2011.
- 8) Noguchi S, et al : The clinical features of respiratory infections caused by the *Streptococcus anginosus* group. BMC Pulm Med 15 : 133, 2015.
- 9) Kawanami T, et al : A higher significance of anaerobes : the clone library analysis of bacterial pleurisy. Chest 139 : 600-608, 2011.