
Review

口腔 Biofilm 感染症における病原因子と全身に及ぼす影響

湯本 浩通

キーワード：口腔 Biofilm, 病原因子, 菌体外 DNA, DNA 結合蛋白, 全身疾患

Pathogenic Factors in Oral Biofilm Infection and Their Effects on Systemic Diseases

Hirromichi YUMOTO

Abstract : Oral infectious diseases, such as dental caries and periodontitis, are caused by oral biofilm, so-called dental plaque. The foundation of the biofilm structure is the extracellular polymeric substances consisting of polysaccharides, toxins, proteins and nucleic acids as well as vesicles, which secrete these components outside of bacterial cells. Among them, extracellular DNA (eDNA) has become increasingly recognized as a key component for biofilm formation and its structural stability. Bacterial histone-like DNA binding protein (HLP), an accessory architectural protein in a variety of bacterial cellular processes due to DNA and mRNA binding capacity, also contributes to the activation of host innate immunity during bacterial infection. Moreover, it has been suggested that vesicles harboring DNA are associated with horizontal gene transfer. In recent two decades, numerous studies regarding the association between oral biofilm infectious diseases and various systemic diseases, such as cardiovascular diseases, atherosclerosis, diabetes mellitus, aspiration pneumonia and autoimmune diseases, have been reported. Besides bacteria, *Candida* spp., which are frequently implicated in mixed bacterial-fungal infections in humans, can readily form biofilms on the surfaces of denture and cause a variety of infectious diseases ranging from denture stomatitis in denture wearers to life-threatening invasive infections, such as aspiration pneumonia, particularly in immunocompromised and elderly populations. From the viewpoint of biofilm infection, which cause systemic diseases as well as oral infectious diseases, the development of new preventive and therapeutic procedures targeting bacterial-derived pathogenic factors such as eDNA, HLP and vesicle, is expected in future studies.

I. 緒 言

口腔内や咽頭局所には多数の常在微生物が棲息して微生物叢を成し、特に粘膜・歯肉・歯面や歯肉溝に定着・増殖して Biofilm を形成している。口腔内の 2 大疾患である齲蝕や歯周病もこの Biofilm が起因となる感染症である。近年の歯科医療の発展は目覚ましく、多くの患者の Quality of Life (QOL), 特に摂食嚥下機能の維持・向上に大きく貢献している。しかしながら、超高齢社会を

迎えた現在、高齢者を取り巻く環境も多様化し、要介護施設等において感染症が発症・蔓延化しており、その治療や予防が困難となっている。その原因の一つとして、免疫機能が低下し、易感染状態の高齢者が多く存在していることが挙げられると共に、抗菌薬の乱用により感染症の原因菌が抗菌薬耐性を獲得してきていることも大きな要因である。Biofilm の最大の特徴として抗菌薬が効きにくいということも耐性菌の出現に大きく関与し

ていると考えられている。さらに近年、齲蝕や歯周病に代表される口腔 Biofilm 感染症と様々な全身疾患（心疾患・動脈硬化症・誤嚥性肺炎・糖尿病など）との関連が注目され、口腔は微生物感染症の供給源あるいはリザーバーとして認識されている。このような現状において、口腔感染症を予防し、早期に対処する方法の確立は、歯科においても重要かつ喫緊の課題の一つである。すなわち、口腔 Biofilm 感染症の観点から、口腔微生物とそれらの病原因子の役割を理解し、これらと関連が示唆される様々な全身疾患とその発症メカニズムを解明することが、口腔から全身疾患発症への予防や対応策の開発に繋がるものと考えられる。

II. Biofilm

1. Biofilm とは

微生物、特に細菌は自然界では、実験室などにおいて試験管内で培養したような浮遊状態で存在することは少なく、何らかの対象物質表面に付着し、多くは Biofilm と呼ばれる菌体外（細胞外）マトリックスに被覆された独自の 3 次元構造を有した微小環境を形成している¹⁻³⁾。Biofilm 内の微生物は、代謝産物を共有し、自己の数や異種の数、すなわち細胞密度を感知する Quorum Sensing (QS) と呼ばれる細胞間コミュニケーション（細胞間相互反応）機構を有しており、これにより、特定の遺伝子発現を同調的に調節し、集団活性として酵素や毒素産生などを制御している。Biofilm は、医療現場では、カテーテル・人工心臓弁や人工関節等の埋入型医療機器・材料上に形成され、また慢性気道感染症や尿路感染症などの病巣部にも形成されることから、難治性の慢性感染症に関与することが問題視されており、日常のあらゆる場面において遭遇する⁴⁾。Biofilm の特徴である抗菌薬や宿主免疫に対する抵抗性が高いことが、慢性化や難治化へ導くと考えられ、アメリカ疾病予防管理センター（Center for Disease Control & Preventive : CDC）は、予防困難なヒト細菌感染の 65% 以上で Biofilm が関与しており、多剤耐性菌の出現や Biofilm 対策の遅れは医療全体の分野で重大な問題であると警鐘を鳴らしている。数百種類以上から成る口腔内の微生物集団形態の特徴である歯垢形成も Biofilm であり、歯垢や唾液中の細菌間においても遺伝子伝播が生じていることが報告されている⁵⁻⁷⁾。すなわち、Biofilm 内での頻繁な遺伝子の水平伝達による形質転換が、新たな耐性遺伝子の獲得や高い抗菌薬抵抗性に導いているものと考えられる。この観点からも、口腔 Biofilm 感染症の予防や制御を含めた治療法の開発は、QOL の向上や他の Biofilm 感染症に寄与すると考えられ、免疫や生体材料などにも関連した独創的な研究を推進する必要がある。

2. Biofilm のライフサイクル

Biofilm は、いくつかの段階を経て形成・成熟する（図

1）。まず浮遊状態の微生物・細菌が何らかの物体表面に付着することから始まり、この付着過程には、細菌の有する鞭毛・線毛や表面タンパク質が関与している。近年、可逆性の付着から不可逆性への付着への移行に bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (cyclic-di-GMP) と呼ばれる細胞内セカンドメッセンジャーが重要な役割を担い、転写調節因子を介して様々な遺伝子の発現を調節していることが示されている⁸⁾。付着した細菌は、増殖して菌数を増してマイクロコロニーを形成する。その後、多糖・DNA やタンパク質などから成る菌体外マトリックス成分を産生して菌体間を結ぶと共に、物体表面との付着も強固にし、Biofilm の構造を維持し、Biofilm は成熟する。成熟した Biofilm は菌体外マトリックスにより、抗菌薬や宿主細胞による貪食、酸化などのストレスから守られると共に、Biofilm 内部では、QS に関与するシグナル物質や代謝産物が蓄積し、微生物間でのコミュニケーションがより活性化する。成熟した Biofilm 表層の一部の細菌は脱離して浮遊状態へと移行し、新たな物体表面に付着する事により感染が拡大する。この浮遊状態から Biofilm 状態への移行やその逆である Biofilm 状態から浮遊状態への移行に関して、菌体内のセカンドメッセンジャーである cyclic-di-GMP の濃度の変化により、細菌の運動性や菌体外マトリックスの合成が調節されていることも報告されている^{9,10)}。我々は、Biofilm 中の菌体外 DNA 濃度が、Biofilm の成熟とその構造の強度・硬直性に関与すること、すなわち、DNA が高濃度になると Biofilm の成熟が抑制され、表層の細菌が脱離しやすい傾向となることを示した¹¹⁾。Biofilm の特性とライフサイクルの観点から、抗菌薬の投与により浮遊菌細菌は検出されなくなるが、Biofilm 内の細菌は生き残り、抗菌薬が作用なくなると、細菌は再び増殖して炎症の憎悪が生じ、感染がさらに拡大する原因となる。

III. Biofilm 感染症の病原因子

Biofilm の菌体外マトリックス成分の中には、多糖やタンパク質などに加えて、細菌のみならず宿主由来の DNA が含まれており、これら菌体外 DNA (Extracellular DNA ; eDNA) の Biofilm 形成における役割が明らかになってきた。Whitchurch らは、DNase I の添加により Biofilm 形成が抑制されること、さらに成熟した Biofilm が分解されることを報告した¹²⁾。すなわち、Biofilm の形成・成熟ならびにその構造維持に eDNA が必須であることが示唆された。また、口腔細菌 Biofilm に関しても、eDNA が口腔内の軟組織および硬組織上への Biofilm 形成・成熟とその構造的完全性において重要な役割を演じていることが示された¹³⁾。そこで Okshevsky らは、Biofilm 内の病原因子の観点から eDNA に着目し、Biofilm 内で eDNA と他の菌体外マトリックス成分との相互作用について考察している（表 1）¹⁴⁾。これらの中

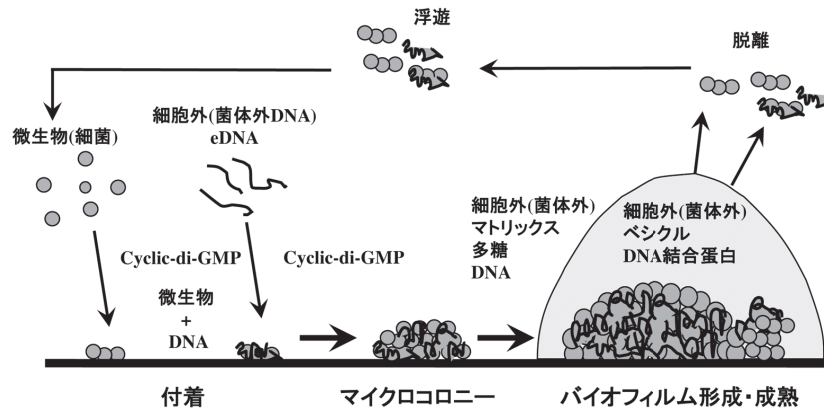


図1 Biofilm のライフサイクル

表1 eDNA と Biofilm 内の菌体外マトリックスとの相互作用

病原因子	役割
1. DNA 結合タンパク質 (DNA-binding proteins)	eDNA 鎖と結合 マトリックス中および菌体表層にも局在 形質転換能への関与
2. 毒素 (Toxin)	分泌病原因子 eDNA と架橋・結合 不溶性の核-タンパク複合体を形成 構造的に安定
3. 線毛 (Pili)	eDNA と結合 運動性に関与 Biofilm の構造に関与
4. 多糖 (Polysaccharide)	eDNA と共局在
5. 膜ベシクル (Membrane Vesicle)	eDNA と相互作用 DNA, 毒素や菌体膜成分 (リポタンパク質など) の菌体外への分泌・運搬に関与

から、菌種に関係なく、細菌に共通して存在している DNA, DNA 結合タンパク質と膜ベシクルについて記載する。

1. 菌体外 DNA (Extracellular DNA ; eDNA)

我々も Biofilm における eDNA の役割について、口腔内常在細菌叢の中で最も優勢な細菌群の 1 つである *Streptococci* に着目し、その中でも病原性が高く、40% の健常人の唾液や歯肉縁上および縁下プラークから分離され、口腔のみならず脳や肝臓などの深部膿瘍に関与するとされる *Streptococcus intermedius*¹⁵⁾ の Biofilm 系にて解析した。その結果、*S. intermedius* の Biofilm 培養系に DNase I を添加すると、Biofilm 形成は顕著に抑制され、さらに成熟した *S. intermedius* Biofilm を DNase I で処理しても Biofilm 量は有意に減少した。さらに、1 μg/ml までの DNA の添加により、Biofilm 形成量は濃度依存的に増加したが、10 μg/ml の DNA の添加は、Biofilm 形

成量を減少させた。この原因として、10 μg/ml の DNA 添加により形成・成熟した Biofilm の構造はもろくなり、付着した細菌が洗浄により脱離しやすくなること明らかになった。すなわち、Biofilm 内の eDNA 濃度が高まり、ある一定濃度に達すると Biofilm 内の一部の細菌が脱離し、新たな部位へ付着して Biofilm を形成して感染の拡大を招くという Biofilm のライフサイクルに eDNA は重要な役割を担っている。興味深いことに、この eDNA の特性は、大腸菌 *Escherichia coli*、ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* や緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* などの異種の細菌やヒト由来細胞の DNA でも同様な結果が認められた。すなわち、由来に関係なく Biofilm 中に存在する全ての eDNA が Biofilm の形成・成熟や構造に関与することが示され、Biofilm をコントロールするために、eDNA を標的とした Biofilm 感染症の新規治療法が開発できる可能性がある¹¹⁾。

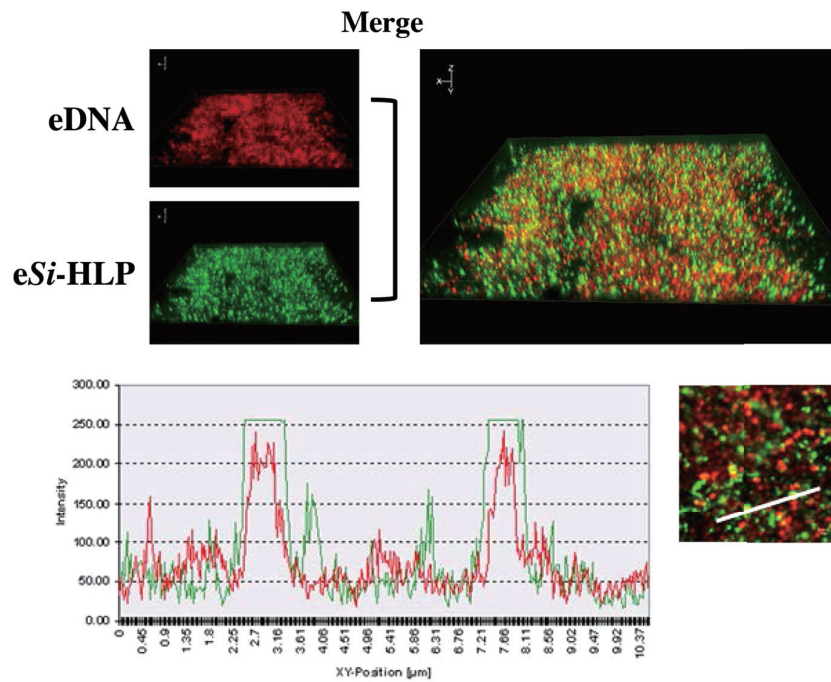


図2 *S. intermedius* Biofilm での eDNA と eSi-HLP の共局在と分布
 形成した *S. intermedius* の Biofilm 内の eDNA を 7-hydroxyl-9H-(1, 3-dichloro-9, 9-dimethylacridin-2-one) (DDAO) で、eSi-HLP を抗 Si-HLP 抗体と Alexa fluor488 で染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。
 Line Profile より、eDNA と HLP は、共局在し Biofilm 内に一様に分布している。

2. DNA 結合タンパク質 (DNA-binding protein)

真核生物には、核内に染色体 DNA をコンパクトに収納する役割も有する Histone と呼ばれるタンパク質が存在する。一方、細菌などの原核生物の染色体 DNA も小さな菌体内にコンパクトにまとめられ、Histone に似た DNA 結合タンパク質 (Histone-like DNA-binding protein; HLP) を有している。Histone に相当する細菌の HLP は、Histone-like と呼ばれる DNA-タンパク質複合体の形成という Nucleoid 関連タンパク質という概念を超えて、DNA や mRNA への結合能、遺伝子の転写や翻訳調節、複製・転位や組換えなど、菌体内の様々な過程に関与することが示されている。DNA と結合して DNA-タンパク質複合体を形成する HLP の Biofilm における病原性とその役割を明らかにするため、我々は、*S. intermedius* の HLP 遺伝子 (*Si-hlp*) をクローニングして DNA 配列を決定した。それから予測したアミノ酸配列をデータベースに照合した結果、HLP は、Streptococci において、アミノ酸配列で 89-94% の高い相同性を示し、構造的にも高度に保存されていることが明らかとなった^{16,17)}。さらに、この Si-HLP の機能を解析すると、菌体外ではホモ 2 量体を形成し、Si-HLP での単独刺激に加えて、細菌が有する病原関連分子パターン (Pattern-Associated Molecular Patterns) との共刺激により、相乗的あるいは相加的にヒト単球からの炎症性サイトカイン産生を誘導

することも明らかにした¹⁶⁾。このことは、細菌感染局所において HLP 自体が炎症を惹起する可能性があることを示す。さらに、antisense RNA 発現システムにて HLP の発現を Knockdown させることにより、*S. intermedius* の増殖抑制と Biofilm の形成抑制が認められ、HLP が *S. intermedius* の生存能力や増殖に必要な不可欠のタンパク質であることと共に、Biofilm 形成にも必要な因子であることも明らかとなった¹⁷⁾。この HLP の knockdown 株では、菌体表層の疎水性が低下し、*S. intermedius* の主要な病原因子である細胞溶解毒素 Intermedilysin の発現も抑制されていることから、HLP は細菌の付着や凝集に加えて、病原因子の発現調節にも影響していることが示された¹⁷⁾。すなわち、HLP は細菌の病原因子として、細菌の生存・増殖や Biofilm の形成・成熟に関与するのみならず、宿主細胞に対しても直接的に炎症性反応を誘導する特性を有していることから、細菌感染の観点から、その役割は極めて大きい。

Biofilm 中での eDNA と HLP との局在性と分布について、蛍光染色後、蛍光顕微鏡観察にて線上に沿って蛍光シグナル強度の測定 (Line Profile) を行った結果、eDNA と HLP は共存し、Biofilm 内に一様に分布していた (図 2)。これらの結果から、eDNA に加えて、HLP も Biofilm 感染症の新規治療として、Biofilm をコントロールするための標的となる可能性がある。

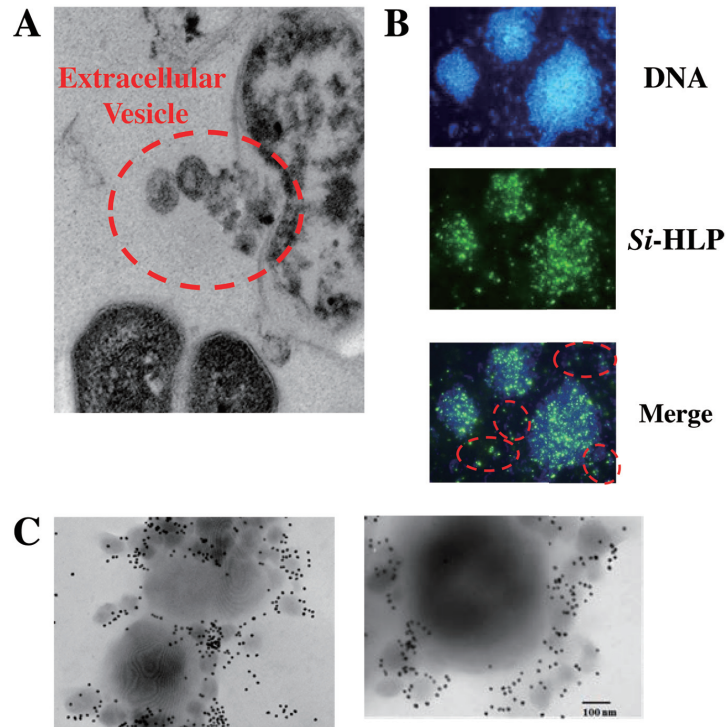


図3 培養 *S. intermedius* の膜ベシクル, eDNA と eSi-HLP の局在
 A: 培養 *S. intermedius* 菌体の透過型電子顕微鏡写真像。細菌菌体から菌体外マトリックス中へ放出された膜ベシクル (赤点線内)
 B: 培養 *S. intermedius* の DNA を Hoechst 33342 で, Si-HLP を抗 Si-HLP 抗体と Alexa fluor488 で染色後, 蛍光顕微鏡にて観察した。細菌菌体から菌体外マトリックス中へ放出された DNA と Si-HLP (赤点線内)
 C: 培養 *S. intermedius* の抗 Si-HLP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡写真像。培養した *S. intermedius* 菌体を金コロイド標識した抗 Si-HLP 抗体と反応させ, 薄切後, 透過型電子顕微鏡観察を行った。金コロイドで標識された Si-HLP が, 膜ベシクル様構造物表層に局在している。

3. 膜ベシクル (Membrane Vesicle)

多くの細菌は, 細胞外に膜ベシクル (Membrane Vesicle) と呼ばれる小胞を放出し, その膜構造内部に, DNA や RNA などの核酸や毒素などのタンパク質を取り囲んでいる。小胞表層の細胞膜成分には, 病原体関連分子パターン (Pattern-Associated Molecular Patterns; PAMPs) の一つであるリポタンパクも含まれており, Vesicle 放出後, 宿主細胞のパターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptors; PRRs) などを通して接触・附着することにより, 宿主細胞に炎症性サイトカインの産生を誘導し, 炎症や疾患の増悪へ関与することが示されている¹⁸⁾。これまで膜ベシクルの研究は, グラム陰性菌を用いて研究されてきたが, 約10年前より, グラム陽性菌の膜ベシクルに関する研究成果も多く示されるようになった¹⁹⁾。その生物学的機能として, Biofilm の細胞外マトリックスにも膜ベシクルが含まれていることから, 細胞間コミュニケーション, 小胞内の毒素の運搬や

遺伝子の水平伝播が挙げられ, さらに膜ベシクルの構造特性がリポソームに類似していることから, 医療の分野では, ナノバイオテクノロジーを応用して, ドラッグデリバリーシステムやワクチンへの応用が試みられている²⁰⁾。

培養細菌中の Vesicle の局在について, 透過型電子顕微鏡観察を行うと共に, eDNA および eHLP との関連を確認するため, 蛍光染色後, 蛍光顕微鏡観察と抗 HLP 抗体を用いた免疫電顕観察を行った結果, eDNA と HLP は, 菌体内から膜ベシクルにより菌体外マトリックスへ遊離・運搬されていることが明らかとなった (図3)。

IV. 口腔 Biofilm 感染症と全身疾患

口腔の2大疾患である齲蝕や歯周病も口腔 Biofilm 感染症であり, レンサ球菌 (*Streptococcus mutans* など) やグラム陰性嫌気性細菌 (*Porphyromonas gingivalis* など) が, それぞれ主要な齲蝕や歯周病関連細菌と考えられてい

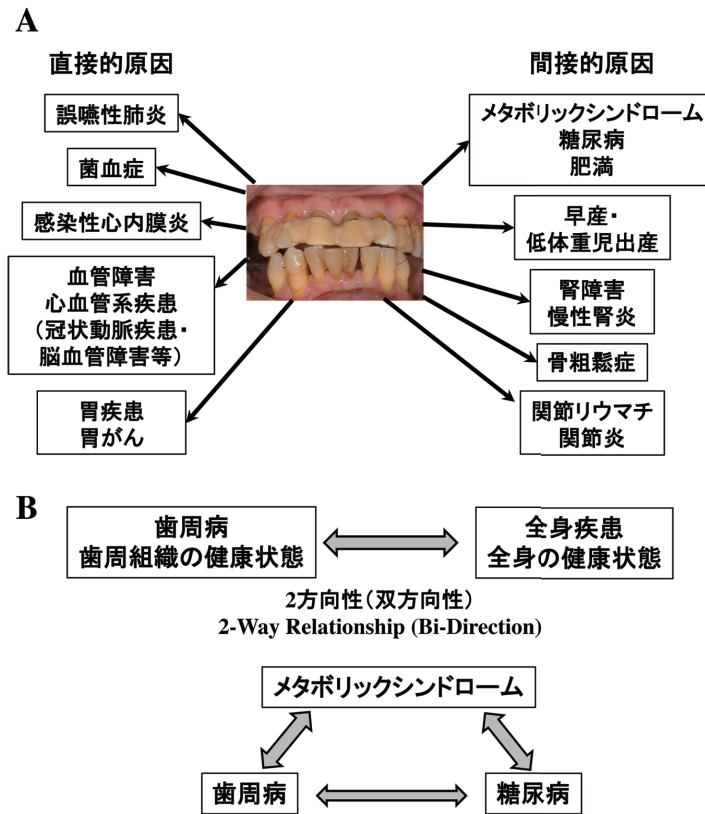


図4 口腔 Biofilm 感染症と全身疾患との関係

る。以前より、感染性心内膜炎など全身疾患と口腔細菌との関連は指摘されていたが、1996年に Offenbacher により「Periodontal Medicine」という用語が取り上げられて以降、疫学的ならびに細菌や免疫学を主体とした細胞および動物レベルでの研究が盛んに行われるようになった²¹⁾。これまでに、口腔内、特に歯周ポケットや歯髄腔から歯周および歯髄の血管内に侵入した口腔細菌が心臓のみならず大血管や各種臓器に到達すること、また口腔から咽頭を介して気道・呼吸器へ到達する経路にて全身疾患に関与するという直接的原因と、細菌が有する内毒素 (Lipopolysaccharide : LPS) や熱ショックタンパク質 (Heat-Shock Protein : HSP) などの抗原が、宿主細胞の免疫反応を惹起して疾患を誘発するという間接的原因により、様々な全身疾患に関与することが報告されている (図4 A)。歯周病と全身疾患との相互関係、すなわち歯周組織と全身の健康状態に関して、従来は、全身疾患が歯周組織の健康や歯周病に及ぼすという一方向性の関与の概念であったが、現在は、メタボリックシンドロームや糖尿病に代表されるように、歯周病も全身の健康状態に強い影響を与えているという2方向性 (双方向性) の概念が定着している (図4 B)。これらの中から、歯周病原性細菌 *P. gingivalis* と心臓血管疾患・動脈硬化症ならびに口腔レンサ球菌 *Streptococci* が全身疾患に及ぼす影響について記載する。

1. 歯周病原性細菌と心臓血管疾患・動脈硬化症との関連

口腔 Biofilm 感染症の代表格でもある歯周病と心臓血管疾患との関連については、20年以上にわたる疫学的研究により、歯周病が心臓血管疾患、特に血管におけるアテローム性変化やそれに引き続く血管イベントに対するリスク因子として関与することが示されている²²⁻²⁴⁾。動脈硬化症は、喫煙、高血圧、高脂血症、遺伝子変化・改変、食事や運動などが関与する多因子性疾患であるが、その病態の概念が、以前の Hypercholesterolemia (高コレステロール血症) から Inflammatory Cardiovascular Disease (炎症性心血管疾患) へシフトし、アテローム性動脈硬化症に炎症性反応が関与すると考えられるようになり、心血管疾患における炎症反応と感染による宿主免疫炎症反応の類似点から、感染や炎症の心血管疾患への関与が示唆されるようになった²⁵⁾。そこで、歯周病と心臓血管疾患との関連に関して、歯周病原性細菌感染、特に組織への侵入とそれに引き続く炎症が動脈硬化症の発症や進行・促進に及ぼす影響を調べるために動物実験を行った。Biofilm 感染症の第一段階は、病原微生物の組織への付着であり (図1)、歯周病原性細菌 *P. gingivalis* に発現する線毛は、歯周組織への付着や侵入、さらには Toll-like receptor (TLR) などの PRRs を介した免疫反応の活性化に重要な役割を演じているため、*P. gingivalis* 線毛遺伝子 (*fimA*) 欠損株 (DPG3株) を用いて、

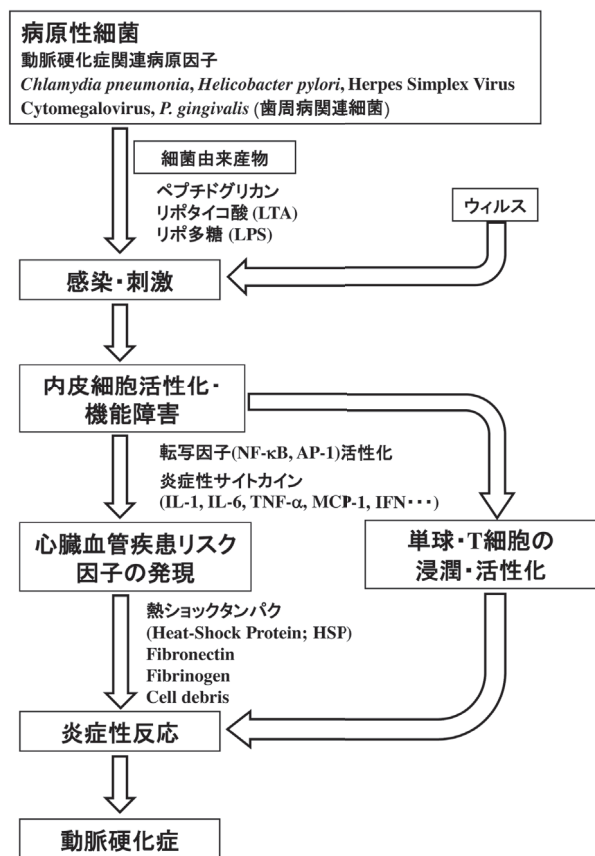


図5 微生物感染 (Pathogen Burden / Infectious Burden) による動脈硬化症発症機序

P. gingivalis の侵入能が動脈硬化症の進行に及ぼす影響を調べた。また、モデルマウスとして、Apolipoprotein E knockout mouse (ApoE^{-/-}) を用いた。ApoE は、細胞表面の Low-density Lipoprotein (LDL) レセプターファミリーのリガンドとして機能し、LDL などのリポタンパク質の細胞への取り込みや血中からの LDL の除去に重要な役割を担っており、多くのモデルでは高コレステロール食にて初めてアテローム病変が形成されるが、ApoE^{-/-}マウスは、ApoE の欠損により、血中にコレステロールの蓄積が生じ、通常のコレステロール量が少ない正常食においてもヒトに類似したアテローム性動脈硬化症の発症と進行を認める。感染方法として、5週齢の雄の ApoE^{-/-}マウスに抗菌薬を含む水を2週間与えた後、*P. gingivalis* 親株 (Wild-type) と *fimA* 欠損株 (DPG3) を5回/週で3週間 (計15回) 経口感染させた。最終感染から6週間後に大動脈弓を分離し、血管内面を Sudan IV にて染色を行い、アテローム病変 Plaque の評価を行うと同時に、歯周病に関しては歯槽骨吸収レベルを測定した。その結果、ApoE^{-/-}マウスへの *P. gingivalis* 経口感染により引き起こされた歯槽骨吸収 (歯周病) は、*P. gingivalis* 親株 (Wild-type) 感染で有意に大きく、また大動脈弓での動脈硬化病変の増大も認められた。組織へ

表2 口腔レンサ球菌が影響を及ぼす主な全身疾患

1. 菌血症・敗血症
2. 感染性心内膜炎
3. 心臓弁膜症
4. 大動脈瘤
5. 深部 (化膿性) 膿瘍 (脳・扁桃・腹腔や肝膿瘍など)
6. 髄膜炎
7. 脳血管疾患 (脳出血など)
8. 消化器疾患 (腸炎増悪・慢性化)
9. 腎疾患 (IgA 腎症)

の付着・侵入能を有さない *fimA* 欠損株 (DPG3) による感染では、歯槽骨吸収および動脈硬化病変共に非感染対照群との有意差は認めなかった。以上より、歯周病原性細菌感染、特に組織への侵入と炎症が、動脈硬化症の発症や進行・促進に関与することが示された²⁶⁾。近年、感染と動脈硬化症との関連に関しては、個々の特異的細菌感染によるというよりもむしろ Pathogen Burden (病原体の量) / Infectious Burden という概念で捉えられ、動脈硬化症のリスク因子を考える上で、血管内皮細胞の機能障害と全身的な感染・炎症との関連が重要視されている (図5)²⁷⁾。

さらに近年、歯周病など口腔内の持続的な炎症で喪失した歯数と動脈硬化症との関連が日本人でのコホート研究でも示され、口腔感染症の予防や治療が、口腔内状態の改善のみならず、動脈硬化症の予防にも効果的である可能性が示唆されている²⁸⁾。

2. 口腔レンサ球菌 Streptococci が全身疾患に及ぼす影響

Viridans Group Streptococci は、口腔内常在菌・細菌叢の中で最も優勢な細菌群の1つであり、古くより、感染性心内膜炎や敗血症、髄膜炎などの重症感染症の起原菌として考えられてきた (表2)²⁹⁾。さらに近年、齶蝕原性細菌 *S. mutans* が有する病原因子の中でも、コラーゲン結合タンパク質 (Collagen-binding protein; コド遺伝子 *cnm*) が、様々な全身疾患と関連することで注目されている。血管へ侵入したコラーゲン結合タンパク質を有する *S. mutans* は、血管内皮細胞へ障害を与えると共に、血管内皮のコラーゲンと結合して血小板の凝集能を抑制し、さらに Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現を亢進することで脳出血を増悪させる³⁰⁾。このことは、疫学的研究においても、脳の微小出血の発症と *cnm* 遺伝子陽性の *S. mutans* 株の高い検出率との相関関係が示され、*cnm* 遺伝子陽性の *S. mutans* が、脳血管疾患の発症や進展に対する独立したリスクであることが示唆されている³¹⁾。また、血管内へ侵入したコラーゲン結合タンパク質を有する *S. mutans* が、肝臓に到達した後、実質細胞内に取り込まれて、肝臓で IFN-γ などのサイトカインの産生を誘導して、免疫系への反応や免疫機構の不

均衡を生じさせることで、消化器においても腸炎・潰瘍性大腸炎の増悪や悪化につながることも報告されている³²⁾。さらに、*cnm* 遺伝子陽性の *S. mutans* を有し、かつ DMFT 指数が高い患者と高い尿蛋白値との関連が示され、IgA 腎症などの腎疾患等との関連も示唆されている³³⁾。

3. 口腔内細菌と自己免疫疾患との関係

自己免疫疾患は、自己抗原に対する免疫寛容が破綻し、自己抗原に対する抗体産生と自己抗原反応性細胞免疫反応が生じた結果、標的臓器に慢性炎症を来す疾患である。近年、何らかの感染が契機となり、その原因微生物に対する反応に加えて、自己抗原とも交差反応を示す“分子相同性：Molecular Mimic”が、自己免疫疾患の発症・進行機構の一つとして考えられるようになった。この観点により、口腔は多様な細菌が棲息していることから、常に細菌由来の抗原に暴露されており、この常在菌抗原感作と自己免疫疾患発症との関連が示唆されている。

口腔細菌、特にグラム陽性菌、と自己免疫疾患の関連に関して、原発性胆汁性肝硬変 (Primary Biliary Cirrhosis ; PBC) という自己免疫疾患に着目した研究報告がある。PBC は、閉経後の更年期以降の中年女性に好発する原因不明の自己免疫疾患であり、肝内小胆管周囲の非化膿性炎症 (慢性非化膿性破壊性胆管炎) を主体とする病変である。病態が進行すると、肝硬変から肝不全へ移行し、肝移植しか治療法がない難病である。検査所見としては、胆肝道系酵素の上昇や IgM の高値を認め、高率 (>90%) での抗ミトコンドリア抗体陽性や抗 gp210 (核膜蛋白) 抗体など多種類の自己抗体が陽性となる。以前より、PBC 患者の血清や小葉間胆管周囲の慢性非化膿性炎症部位の浸潤リンパ球や形質細胞の細胞質内、さらにその周囲の間質にグラム陽性菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸 (Lipoteichoic Acid ; LTA) が検出され、さらに PBC 患者では、健常者や慢性 C 型肝炎患者血清と比較して、IgM や IgA class の抗 LTA 抗体が高値を示すことが報告され、このことから PBC の発症や進行に何らかのグラム陽性菌が関与している可能性が示唆された^{34, 35)}。また、数種のグラム陽性 Streptococci の全菌体を用いた ELISA の結果から、健常者や慢性 C 型肝炎患者と比較して、PBC 患者の血清は、これらレンサ球菌との反応性が高く、特に *S. intermedius* に対する抗体価が高いことが示され、さらに Si-HLP に対する抗体価も高く、免疫組織化学的染色においても、PBC 病変部位で HLP が検出された³⁶⁾。以上より、Streptococci や HLP が、PBC の発症や進行に大きな役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、口腔 Biofilm 感染症モデルとして、BALB/c マウスの歯肉に *S. intermedius* などの数種の Streptococci を週 2 回、8 週間投与すると、Streptococci の生菌でも加熱死菌でも PBC に酷似した門

脈・肝臓小胆管周囲に慢性非化膿性炎症が生じ、投与終了 20 か月後でも PBC 様の病態が認められ、免疫組織化学的染色にて、肝臓の小胆管周囲の非化膿性炎症部位に一致して HLP も検出され、さらに腎尿細管にも炎症が認められた³⁷⁾。興味深いことに、病巣部から細菌は全く検出されなかったが、PBC 患者組織と同様に小胆管周囲に LTA や HLP の沈着が認められ、このマウスの碑細胞 (T 細胞) を RAG2^{-/-}免疫不全マウスに移植すると、小胆管周囲に同様の慢性非化膿性炎症が再現できた³⁸⁾。これらのことから、口腔 Biofilm 感染症と自己免疫疾患との関連性が示唆される。PBC 患者では、抗 gp210 (核膜蛋白) 自己抗体が陽性となるが、この抗体陽性患者は、陰性患者と比較して、肝硬変への進展割合が高く、PBC の予後予測因子として注目され、PBC の進行に深く関与していると考えられている。非常に興味深いことに、gp210 のエピトープが、HLP 配列内にも認められ、エピトープの共有が確認できると共に、抗 HLP 抗体が、マウスの gp210 と交差反応することが示された³⁷⁾。以上より、PBC の発症や進行には、LTA の由来となるグラム陽性菌として、レンサ球菌、特に口腔内で優勢な常在菌である Streptococci が強く関連していることが示唆されている。

4. 口腔 Biofilm 感染症と超高齢社会における誤嚥性肺炎との関連

超高齢社会を迎えた現在、高齢者の肺炎の約 70% 以上が誤嚥性肺炎であると報告されている³⁹⁾。口腔内細菌叢の細菌が咽頭でトラップされて咽頭細菌叢が形成され、喉頭蓋の閉鎖タイミング異常により、気管や肺に咽頭細菌叢内の細菌が侵入して誤嚥性肺炎が生じる。誤嚥性肺炎の発症メカニズムは、咽頭に定着・棲息・形成された咽頭細菌叢の誤嚥に始まり、グラム陽性レンサ球菌やグラム陰性桿菌 (まれに嫌気性菌) やその細菌産物に対して、肺に急性の炎症反応が生じることである。この発症に関与する主な素因として、年齢 (高齢者) に加えて、嚥下障害や胃運動障害を有する人たちが挙げられる⁴⁰⁾。咽頭細菌叢も口腔内細菌叢・口腔 Biofilm と同様に、Extracellular Vesicle が多数観察され、病原性と強く関係していることが示唆されている (図 6)。そこで我々は、特に摂食嚥下障害のある脳血管障害患者は、誤嚥性肺炎にかかり易いため、リスク回避には緑膿菌対策を考慮した口腔ケアが必要であること、すなわち、気道感染・誤嚥性肺炎予防の要は、口腔ケアであることを示した⁴¹⁾。

V. 口腔 Biofilm における *Candida* と日和見感染

口腔は細菌の温床であり、口腔内には様々な細菌が定着して口腔 Biofilm を形成している。前述した誤嚥性肺炎に加えて、超高齢社会を迎えた現在、加齢による免疫能の低下に伴い、さらに年齢的に義歯装着層とも一致し

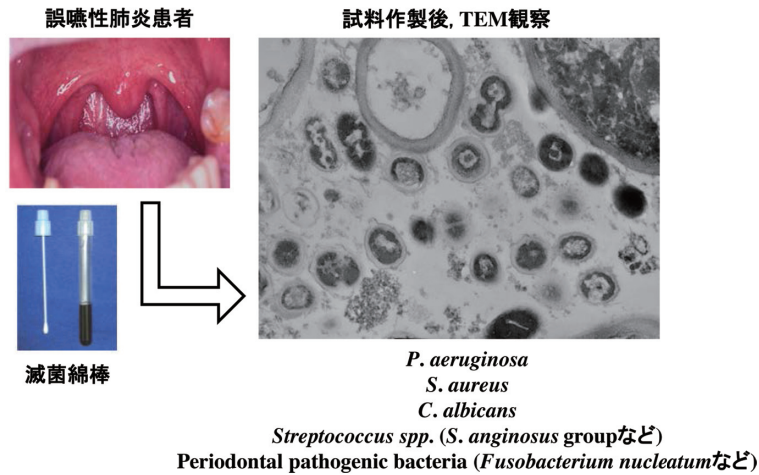


図6 誤嚥性肺炎患者の咽頭細菌叢
Extracellular Vesicle が Biofilm matrix 中に多数観察され、病原性とも関係していることが示唆されている。

て、口腔内の日和見細菌数が増加する。口腔内で見られる日和見感染菌を表3に示すが、それらの中でも、高齢者や寝たきりの方、義歯装着者によくみられる義歯性口内炎や口腔カンジダ症などの口腔粘膜感染症原因菌の代表格が *Candida* である。義歯に付着した *Candida* が、義歯床下粘膜に発赤を伴う炎症を惹起し、義歯性口内炎の発症に関与することはよく知られている。また、デンチャープラーク中の *Candida* spp. などの真菌は、感染性心内膜炎を惹起しやすいレンサ球菌と共凝集しやすく、高齢の易感染宿主 (Compromised Host) に重篤な感染症を惹起することが示唆され、義歯が *Candida* のリザーバーとなっている可能性が指摘されている。気道への *Candida* の colonization に関しては、2日以上的人工呼吸器装着患者では一般的に認められ、ICU や入院期間の延長とも関連していることが示され、人工呼吸器関連肺炎 (Ventilator Associated Pneumonia ; VAP) のリスクを増大させる可能性が指摘されている⁴²⁾。すなわち、高齢者・義歯・口腔 Biofilm と日和見感染をキーワードとして考えると、細菌のみならず真菌である *Candida* Biofilm の形成過程やその特徴を理解することは重要である。そこで我々は、細菌と同様に DNA が *Candida* Biofilm の形成と *Candida* の表現型や病原性に及ぼす影響について調べた。細菌と同様に、DNase I 処理により、3種の *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) の Biofilm の形成量は、有意に抑制され、また eDNA の添加は、*Candida* Biofilm の形成とその安定性に影響を及ぼした⁴³⁾。さらに、同種の DNA のみならず異種由来の DNA や small sized eDNA も同様に *Candida* Biofilm 形成量に影響を及ぼすことが明らかとなった⁴³⁾。興味深いことに、高濃度の eDNA は、Biofilm 中の *Candida* を酵母型 (Yeast form) から、より病原性が強い菌糸状 (Hyphal form) への表現変化を誘導することが示された⁴³⁾。

表3 口腔内に見られる主な日和見感染菌

1. <i>Candida albicans</i>
2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (肺炎桿菌)
3. <i>Pseudomonas</i> spp. (緑膿菌も含む)
4. <i>Staphylococcus aureus</i> (黄色ブドウ球菌) MRSA (メチシリン耐性) MSSA (メチシリン感受性)
5. <i>Serratia marcescens</i>
6. <i>Branhamella catarrhalis</i> (カタル球菌)
7. <i>Haemophilus influenzae</i> (インフルエンザ菌)

VI. まとめ

口腔は、細菌感染の供給源 (リザーバー) であり、この細菌叢によって形成された口腔および咽頭 Biofilm は、心血管疾患・動脈硬化や糖尿病などの様々な全身疾患と関連することが明らかになっている。超高齢社会を迎えた現在、免疫機能の低下や易感染状態の高齢者の割合も高く、要介護施設などでの高齢者の感染症の発症や蔓延化が大きな社会問題となっており、より効果的な予防や治療法の確立が望まれている。特に高齢者では、肺炎が死亡原因に占める割合が高く、中でも誤嚥性肺炎がその発症に深く関与している。このことには、高齢者では唾液分泌が低下し、口腔乾燥症を有していることや多くの高齢者は義歯を装着していることも一因であると考えられ、今後、唾液分泌低下への対策や義歯ケアによる呼吸器感染症重症化の予防対策が急務である。しかしながら、現在もなお、Biofilm 感染症に対して抗菌薬が乱用され、感染症原因菌の抗菌薬耐性の獲得 (多剤耐性菌の出現) や病原菌の更なる強毒化が指摘・報告されている。これらの問題を解決するために、これまでの抗菌薬

感受性や抗菌薬作用機序に基づいた選択的な微生物に対する方法ではなく、選択圧がかからずに細菌の付着・定着や Biofilm 形成を簡単かつ効果的に抑制する新たな方法を見出さなければならない。そこで、改めて細菌感染症の原因である Biofilm に関して、そのライフサイクルとその病原因子について考えると、微生物が共通して保有している核酸・DNA や広く保存されて構造が類似している DNA 結合タンパク質を新たな標的とすることにより、Biofilm 感染症を予防・治療できる可能性があると考えられる。核酸やその受容体は、感染や炎症のみならず、自己免疫疾患や癌にも関与している観点からも、感染症のみならず他の全身疾患の治療法の開発の標的として着目されており⁴⁴⁾、今後の研究成果が期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、四国歯学会会長・河野文昭教授ならびに Journal of Oral Health and Biosciences 編集委員会委員長・松香芳三教授に心より感謝申し上げます。また、本稿の口腔 Biofilm 感染症に関する一部は、以下に挙げる先生方との共同研究によって得られたものである。徳島文理大学保健福祉学部口腔保健学科・三宅洋一郎教授、高知学園短期大学医療衛生学科歯科衛生専攻・弘田克彦教授、徳島大学医歯薬学研究部口腔顎顔面補綴学分野・市川哲雄教授、徳島大学生物資源産業学部・長宗秀明教授、徳島大学医歯薬学研究部口腔微生物学分野・村上圭史准教授、徳島大学医歯薬学研究部歯科保存学分野・松尾敬志教授、平尾功治助教に、この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Flemming HC and Wingender J: The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623-633 (2010)
- 2) O'Toole G, Kaplan HB and Kolter: Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54, 49-79 (2000)
- 3) Stoodley P, Sauer K, Davies DG and Costerton JW: Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56, 187-209 (2002)
- 4) Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322 (1999)
- 5) Mercer DK, Scott KP, Melville CM, Glover LA and Flint HJ: Transformation of an oral bacterium via chromosomal integration of free DNA in the presence of human saliva. *FEMS Microbiol Lett* 200, 163-167 (2001)
- 6) Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP and Cvitkovitch DG: Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol* 183, 897-908 (2001)
- 7) Wang BY, Chi B and Kuramitsu HK: Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 17, 108-112 (2002)
- 8) Jakobsen TH, Tolker-Nielsen T and Givskov M: Bacterial Biofilm Control by Perturbation of Bacterial Signaling Processes. *Int J Mol Sci* 18 (2017)
- 9) McDougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD and Kjelleberg S: Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10, 39-50 (2011)
- 10) Romling U, Galperin MY and Gomelsky M: Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77, 1-52 (2013)
- 11) Nur A, Hirota K, Yumoto H, Hirao K, Liu D, Takahashi K, Murakami K, Matsuo T, Shu R and Miyake Y: Effects of extracellular DNA and DNA-binding protein on the development of a *Streptococcus intermedius* biofilm. *J Appl Microbiol* 115, 260-270 (2013)
- 12) Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC and Mattick JS: Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295, 1487 (2002)
- 13) Jakubovics NS and Burgess JG: Extracellular DNA in oral microbial biofilms. *Microbes Infect* 17, 531-537 (2015)
- 14) Okshevsky M, Regina VR and Meyer RL. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr Opin Biotechnol* 33, 73-80 (2015)
- 15) Wagner KW, Schon R, Schumacher M, Schmelzeisen R and Schulze D: Case report: brain and liver abscesses caused by oral infection with *Streptococcus intermedius*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102, e21-23 (2006)
- 16) Liu D, Yumoto H, Hirota K, Murakami K, Takahashi K, Hirao K, Matsuo T, Ohkura K, Nagamune H and Miyake Y: Histone-like DNA binding protein of *Streptococcus intermedius* induces the expression of pro-inflammatory cytokines in human monocytes via activation of ERK1/2 and JNK pathways. *Cell Microbiol* 10, 262-276 (2008)
- 17) Liu D, Yumoto H, Murakami K, Hirota K, Ono T, Nagamune H, Kayama S, Matsuo T and Miyake Y: The essentiality and involvement of *Streptococcus intermedius* histone-like DNA-binding protein in bacterial viability and normal growth. *Mol Microbiol* 68, 1268-1282 (2008)
- 18) Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R and Casadevall A: Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13, 620-630 (2015)
- 19) Kim JH, Lee J, Park J and Gho YS: Gram-negative and Gram-positive bacterial extracellular vesicles. *Semin Cell Dev Biol* 40, 97-104 (2015)
- 20) Toyofuku M, Tashiro Y, Hasegawa Y, Kurosawa M and

- Nomura N: Bacterial membrane vesicles, an overlooked environmental colloid: Biology, environmental perspectives and applications. *Adv Colloid Interface Sci* 226, 65-77 (2015)
- 21) Offenbacher S: Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1, 821-878 (1996)
- 22) Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS and Offenbacher S: Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 67, 1123-1137 (1996)
- 23) Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P and Garcia R: Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Ann Periodontol* 3, 127-141 (1998)
- 24) Nery EB, Meister F, Jr., Ellinger RF, Eslami A and McNamara TJ: Prevalence of medical problems in periodontal patients obtained from three different populations. *J Periodontol* 58, 564-568 (1987)
- 25) Rader DJ and Daugherty A: Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 451, 904-913 (2008)
- 26) Gibson FC, 3rd, Hong C, Chou HH, Yumoto H, Chen J, Lien E, Wong, J and Genco CA: Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109, 2801-2806 (2004)
- 27) Stassen FR, Vainas T and Bruggeman CA: Infection and atherosclerosis. An alternative view on an outdated hypothesis. *Pharmacol Rep* 60, 85-92 (2008)
- 28) Asai K, Yamori M, Yamazaki T, Yamaguchi A, Takahashi K, Sekine A, Kosugi S, Matsuda F, Nakayama T, Bssho K and Nagama Study Group: Tooth loss and atherosclerosis: the Nagahama Study. *J Dent Res* 94, 52S-58S (2015)
- 29) Mitchell TJ: The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* 1, 219-230 (2003)
- 30) Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K, Kudo C, Nomura R, Kojima A, Naka S, Muranaka Y, Thura M, Nakajima A, Masuda K, Nakagawa I, Speziale P, Shimada N, Amano A, Kamisaki Y, Tanaka T, Umemura K and Ooshima T: The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. *Nat Commun* 2, 485 (2011)
- 31) Miyatani F, Kuriyama N, Watanabe I, Nomura R, Nakano K, Matsui D, Ozaki E, Koyama T, Nishigaki M, Yamamoto T, Mizuno T, Tamura A, Akazawa K, Takada A, Takeda K, Yamada K, Nakagawa M, Ihara M, Kanamura N, Friedland RP and Watanabe Y: Relationship between Cnm-positive *Streptococcus mutans* and cerebral microbleeds in humans. *Oral Dis* 21:886-893 (2015)
- 32) Kojima A, Nakano K, Wada K, Takahashi H, Katayama K, Yoneda M, Higurashi T, Nomura R, Hokamura K, Muranaka Y, Matsuhashi N, Umemura K, Kamisaki Y, Nakajima A and Ooshima T: Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci Rep* 2, 332 (2012)
- 33) Misaki T, Naka S, Hatakeyama R, Fukunaga A, Nomura R, Isozaki T and Nakano K: Presence of *Streptococcus mutans* strains harbouring the cnm gene correlates with dental caries status and IgA nephropathy conditions. *Sci Rep* 6, 36455 (2016)
- 34) Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Hiramatsu K, Zen Y, Sudo Y, Gershwin ME, Ikemoto M, Araki H and Nakamura Y: Scavenger cells with gram-positive bacterial lipoteichoic acid infiltrate around the damaged interlobular bile ducts of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 35, 156-163 (2001)
- 35) Haruta I, Hashimoto E, Kato Y, Kikuchi K, Kato H, Yagi J, Uchiyama T, Kobayash M and Shiratori K: Lipoteichoic acid may affect the pathogenesis of bile duct damage in primary biliary cirrhosis. *Autoimmunity* 39, 129-135 (2006)
- 36) Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Kato H, Hirota K, Kobayashi M, Miyake Y, Uchiyama T, Yagi J and Shiratori K: A possible role of histone-like DNA-binding protein of *Streptococcus intermedius* in the pathogenesis of bile duct damage in primary biliary cirrhosis. *Clin Immunol* 127, 245-251 (2008)
- 37) Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, Nakamura M, Miyakawa H, Hirota K, Shibata N, Kato H, Arimura Y, Kato Y, Uchiyama T, Nagamune H, Kobayashi M, Miyake Y, Sjoratori K and Yagi J: Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. *Lab Invest* 90, 577-588 (2010)
- 38) Haruta I, Kikuchi K, Nakamura M, Hirota K, Kato H, Miyakawa H, Shibata N, Miyake Y, Hashimoto E, Shiratori E and Yagi J: Involvement of commensal bacteria may lead to dysregulated inflammatory and autoimmune responses in a mouse model for chronic nonsuppurative destructive cholangitis. *J Clin Immunol* 32, 1026-1037 (2012)
- 39) Teramoto S, Fukuchi Y, Sasaki H, Sato K, Sekizawa K, Matsuse T and Japanese Study Group on Aspiration Pulmonary Disease: High incidence of aspiration pneumonia in community- and hospital-acquired pneumonia in hospitalized patients: a multicenter, prospective study in Japan. *J Am Geriatr Soc* 56, 577-579 (2008)
- 40) Marik PE: Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *N Engl J Med* 344, 665-671 (2001)

- 41) Hirota K, Yoneyama T, Sakamoto M, Miyamoto H, Kurihara M, Kayama S, Murakami K, Yumoto H, Matsuo T and Miyake Y: High prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* from oropharyngeal biofilm in patients with cerebrovascular infarction and dysphagia. *Chest* 138, 237-238 (2010)
- 42) Azoulay E, Timsit JF, Tafflet M, de Lassence A, Darmon M, Zahar JR, Adrie C, Garrouste-Orgeas M, Cohen Y, Mourvillier B, Schlemmer B and Outcomerea Study Group. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent pseudomonas ventilator-associated pneumonia. *Chest* 129, 110-117 (2006)
- 43) Sapaar B, Nur A, Hirota K, Yumoto H, Murakami K, Amoh T, Matsuo T, Ichikawa T and Miyake Y: Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. *J Appl Microbiol* 116, 1531-1542 (2014)
- 44) Crump KE and Sahingur SE. Microbial Nucleic Acid Sensing in Oral and Systemic Diseases. *J Dent Res* 95, 17-25 (2016)