

顎口腔領域菌性感染症起炎菌の相互作用に関する研究：特にStreptococcus constellatusとFusobacterium nucleatumとの相乗効果について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9376">http://hdl.handle.net/2297/9376</a>

## 顎口腔領域菌性感染症起炎菌の相互作用に関する研究

—特に *Streptococcus constellatus* と *Fusobacterium nucleatum* との相乗効果について—

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 山本悦秀教授)

栗山智有

顎口腔領域菌性感染症の発症, 進展と関わりがあると考えられる起炎菌の相互作用の解明を目的として本感染症から高頻度に分離される *Streptococcus constellatus* (*S. constellatus*) と *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) に注目し, 両菌間の病原性の相互作用についてマウス口底膿瘍モデルを用い検討を行った. 本研究ではモデルとして雌のICR Crjマウスを用い, *S. constellatus* ATCC 27823, *F. nucleatum* ATCC 25586株を実験に用いた. 病原性は膿瘍の形成の有無, 致死率, 膿瘍からの回収菌数にて測定した. この2菌の生菌を混合し, マウス口底に接種した場合, 病原性の相乗作用が認められた. *F. nucleatum* の生菌と *S. constellatus* の菌培養濾液との混合液をマウスに接種した場合, *F. nucleatum* の病原性は増強しなかった. 一方, *S. constellatus* の生菌と *F. nucleatum* の菌培養濾液を混合しマウス口底に接種した場合, *S. constellatus* の病原性は増強した. さらに加熱処理した *F. nucleatum* の菌培養濾液を接種した場合も, *S. constellatus* の病原性は増強した. このことから *S. constellatus* についてはその産生物質ではなく生菌間による作用が, *F. nucleatum* については産生する耐熱性の物質がこの2菌間の相乗作用発現に関与しているものと推察される. また興味深いことに, 加熱処理した場合を含む *F. nucleatum* の菌培養濾液をマウスの背部に接種し, *S. constellatus* の生菌をマウス口底に接種した場合においても *S. constellatus* の病原性が増強された. この *F. nucleatum* による増強作用の強さはその菌培養濾液の濃度に依存しなかった. このことから, *F. nucleatum* はその耐熱性産生物質が宿主の免疫に影響し, それによって *S. constellatus* との相乗作用が発現するものと推察される. 以上の結果から, これらの相乗作用が顎口腔領域菌性感染症の発症に寄与していることが示唆された.

**Key words** orofacial odontogenic infection, microbial interaction, oral floor abscess model, *Streptococcus constellatus*, *Fusobacterium nucleatum*

顎口腔領域に発症する化膿性炎症の多くは歯牙および歯周組織の炎症に起因している. 国民の口腔衛生に対する認識の向上, 高度化する歯科治療技術, さらに抗生薬の発達などにも関わらず, 現在, 歯科口腔外科の臨床において顎口腔領域菌性感染症は最も高頻度に遭遇する疾患であり, かつ免疫能になら問題のない健康なヒトにも発症し, 進展する特異な感染症でもある. その一方で, 我が国の高齢化や糖尿病をはじめとした慢性疾患患者の増加, 各種抗生薬への耐性化等から治療に難渋する症例は増加傾向にある. 本感染症の発症, 進展機序の解明は, より確実かつ効果的な治療法の理論的根拠となり得ることから臨床的に非常に重要であるが, 未だ不明な点が多い. 本感染症は細菌感染症であるが, 分離菌のほとんどが口腔内常在菌である<sup>1)</sup>. 以前の研究では *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* 等の通性嫌気性もしくは好気性菌が多く分離されていた<sup>2)3)</sup>. しかしながら, 近年の検体採取, 保存法の改善, 嫌気性菌に対する培養技術の発達から, 口腔内の雑菌混入頻度が減少し, 従来検出困難とされた嫌気性菌の分離が飛躍的

に増加した. この結果, 近年では本感染症から主に通性嫌気性菌である *Streptococcus*, 偏性嫌気性菌である *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium* 等が分離され, 以前多く分離されていた好気性菌の分離頻度は相対的に少なくなった<sup>4)~6)</sup>. しかしながらこれらの菌はいずれも口腔内常在菌であり, それ単独で化膿性炎症の起炎菌になる理由については不明である.

興味深いことに, 本感染症ではこれらの菌が単独に分離されることは稀であり, 多くの場合, 1症例から同時に複数の菌が分離される<sup>7)8)</sup>. 一般に複数菌による感染症においては菌の相互作用が存在し, これが炎症の発症, 進展に大きな役割を果たしているものと考えられている<sup>9)10)</sup>. 例えば, 腹膜炎においてその代表的な起炎菌である *Escherichia coli* (*E. coli*) と *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) はいずれも下部消化管の常在菌であるが<sup>11)</sup>, その発症においてこの2菌間に相互作用が存在することが知られており, その機序として, 炎症初期においては好気性菌である *E. coli* が増殖し, 局所の酸素を消費し, これにより発育環境が整った後, 偏性嫌気性菌である *B. fragilis* が増

平成10年11月4日受付, 平成10年11月18日受理

Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; *B. gingivalis*, *Bacteroides gingivalis*; *B. fragilis*, *Bacteroides fragilis*; cfu, colony forming unit; *E. coli*, *Escherichia coli*; *F. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum*; IL, interleukin; *P. intermedia*, *Prevotella intermedia*; PYG ブロス, peptone-yeast extract-glucose broth; *S. constellatus*, *Streptococcus constellatus*

殖することがラットを用いた実験的研究にて明らかとなっている<sup>12)13)</sup>。従って複数菌感染形態をとる顎口腔領域菌感染症においても、こうした起炎菌の相互作用が存在し、これが炎症の発症、進展に深く関与している可能性が考えられる。

さて、顎口腔領域菌感染症の研究において動物を用いた実験モデルは必要である。単に菌の病原性を検討するだけであるならば、動物の背部もしくは鼠径部の皮下組織を用いることが多い<sup>14)~19)</sup>。しかしながら、本感染症の臨床的特異性を考慮すると、顎口腔領域の組織を用い、ヒトにおける臨床像を可及的に反映したモデルでの研究が望まれる。

そこで本研究では、顎口腔領域菌感染症モデルとして独自にマウス口底膿瘍モデルを製作し、このモデルを用いて顎口腔領域菌感染症の発症、進展と大きな関わりを持つと推察される起炎菌の相互作用について研究することとした。特に本感染症の代表的な起炎菌である *Streptococcus constellatus* (*S. constellatus*) と *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) に注目し、その混合感染時の菌の相互作用の存在およびその発現機序について検討した。

## 材料と方法

### I. 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5週齢 (体重25g~28g)。マウスは7日間の予備飼育の後に使用した。飼料は実験動物用固形飼料MF (オリエンタル酵母、東京) を与え、飲料水は水道水を使用し、それぞれ自由摂取させた。本実験においてマウスは1群10匹と設定した。

### II. 使用菌株

使用した菌株は、アメリカ菌株保存機関 (American Type Culture Collection, ATCC) 由来の *S. constellatus* ATCC 27823, *F. nucleatum* ATCC 25586 である。

### III. 菌の培養および接種液の準備

#### 1. 菌懸濁液の作製

*S. constellatus* は5%ヒツジ血液加ブセラHK寒天培地 (極東製薬、東京) 上で10% CO<sub>2</sub>, 20% H<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>の環境下にて37℃, 48時間培養した。*F. nucleatum* は5%ヒツジ血液加ブセラHK寒天培地上で5% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>の環境下にて37℃, 72時間培養した。発育した寒天培地上の集落を集め、ペプトン・イースト・グルコース培地 (peptone-yeast extract-glucose broth, PYG プロス) に  $1.0 \times 10^9$  コロニー形成単位 (colony forming unit, cfu) / ml および  $4.0 \times 10^9$  cfu/ml の濃度になるよう懸濁した。なお今回用いたPYGプロスは0.1% ビタミンK (和光純薬、大阪), 10% ペプトン (Bacto-Peptone) (Difco, Detroit, USA), 10% イースト (Yeast-extract) (Difco), 10% グルコースの組成である。

#### 2. 菌培養液および菌培養濾液の作製

*S. constellatus* はPYGプロスにて10% CO<sub>2</sub>, 20% H<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub>の環境下で37℃, 48時間培養した。これを *S. constellatus* 菌培養液とした。この菌培養液中の生菌濃度は  $4.0 \times 10^9$  cfu/ml であった。一方、*F. nucleatum* はPYGプロスにて5% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>環境下にて37℃, 72時間培養した。これを *F. nucleatum* 菌培養液とした。この菌培養液中の生菌濃度は  $7.0 \times 10^9$  cfu/ml であった。

*S. constellatus* および *F. nucleatum* の菌培養液を3000回転/

分、10分間遠心分離した後、直径0.22μmの濾過フィルター (Millex-GS, Millipore, Bedford, USA) にて濾過滅菌した。こうして得られた濾過滅菌液をそれぞれの菌の菌培養液とした。

さらにこれらの菌培養液の一部を取り出し、オートクレーブ (三洋電機、大阪) にて121℃, 20分加熱した。

### IV. マウスへの接種液の接種

#### 1. 2菌を同一部位に接種する場合についての検討

マウスをジエチルエーテル (和光純薬) にて麻酔させ、70% エタノール (和光純薬) にてマウスのオトガイ部から顎下部かけての皮膚を消毒し、26ゲージディスプレイ注射針 (テルモ、東京) を用いて皮膚側から針を進め、口底の粘膜下の筋層部に接種液を0.1ml接種した。接種液は *S. constellatus* もしくは *F. nucleatum* の菌懸濁液と他方の菌の菌培養液、未加熱処理の菌培養濾液、加熱処理した菌培養濾液のうちのどれかと等量混合することにより作製した。またコントロールには *S. constellatus* もしくは *F. nucleatum* の菌懸濁液と未培養のPYGプロスを等量混合したものを接種した。

#### 2. 2菌を異なる部位に接種した場合についての検討

一方、次のようなマウスへの接種も行った。すなわち、*S. constellatus* もしくは *F. nucleatum* の菌懸濁液に未培養のPYGプロスを加え0.1mlとし、これをマウスの口底に接種した。同時に他方の菌の未加熱処理もしくは加熱処理した菌培養濾液を未培養のPYGプロスを混合し0.1mlとし、これを同じマウスの背部皮下に接種した。コントロールとして菌懸濁液を口底に接種し、未培養のPYGプロスをマウスの背部皮下に接種したものを設定した。

#### 3. 相互作用における菌培養濾液の濃度の影響についての検討

さらに、*F. nucleatum* の菌培養濾液をPYGプロスにて10段階希釈し、これを *S. constellatus* の菌懸濁液と等量に混合し、0.1mlをマウス口底に接種した。また、希釈した *F. nucleatum* 菌培養濾液を未培養のPYGプロスと混合し0.1mlをマウス背部皮下に接種し、同時に未培養のPYGプロスと等量混合した *S. constellatus* 菌懸濁液0.1mlをマウス口底に接種した。

なお、この一連の実験に用いた全ての接種液のpHは6.8~7.0であった。

### V. 病原性の測定

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マウスを屠殺し、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、Shapiroら<sup>20)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、肉眼で検索される大きさで、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瘤で、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ガラス製ホモジナイザー (池本理化学工業、東京) にて1mlのPYGプロスに粉碎溶解後、5%羊血液加ブセラ寒天培地および0.75%パロモマイシン (協和発酵、東京), 0.025%バンコマイシン (塩野義製薬、東京), 5%羊血液加ブセラHK寒天培地を用いて寒天平板希釈法にて菌数を定量した。

### VI. 統計学的検討

統計学的処理については、致死率、膿瘍形成率については $\chi^2$ 検定を、回収菌量についてはStudent-t検定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。

## 成 績

### I. *S. constellatus* 生菌および *F. nucleatum* 生菌間における相乗作用について

*S. constellatus* 菌懸濁液もしくは *F. nucleatum* 菌懸濁液を未培養のPYGブロスと混合し、マウス口底部に接種した場合、マウスは死亡しなかったが、膿瘍を形成した(表1)。膿瘍は口底部から顎下部に存在し、炎症性の腫脹と発赤を伴っており、口腔内には口底部にびまん性の腫脹症が認められ、舌が挙上していた(図1)。この口底部膿瘍組織をホルマリン固定後にHE染色を施行して、病理組織学的に検索すると、主に死滅した細胞成分、細菌塊、そして血球から構成される膿汁を含む病変が周囲組織と結合組織を介して存在する所見が認められた(図1)。

一方、*S. constellatus* 菌培養液もしくは *F. nucleatum* 菌培養液を未培養のPYGブロスと混合し、マウス口底部に接種した場合、マウスは死亡せず、また膿瘍も形成しなかった。

しかしながら、*S. constellatus* もしくは *F. nucleatum* の菌懸濁液を他方の菌培養液と混合し接種した場合、全てのマウスが死亡し、菌の病原性の相乗作用が認められた。

### II. 菌懸濁液と他方の菌培養濾液を同一部位(口底部)に接種した際の相互作用について

*F. nucleatum* の菌懸濁液に  $5.0 \times 10^7$  もしくは  $2.0 \times 10^8$  cfu の *S. constellatus* の菌培養濾液を混合してマウスの口底部に接種した場合、コントロールと比較していずれも致死率、膿瘍形成率、膿瘍からの回収菌数に著しい差は認められなかった(表2)。一方、*S. constellatus* の菌懸濁液に *F. nucleatum* の菌培養濾液を混合してマウスの口底部に接種した場合、コントロールと比較して致死率、膿瘍形成率、膿瘍からの回収菌数が増加した(表3)。 $2.0 \times 10^8$  cfu の接種菌数の場合、8匹のマウスが死亡し、残りの2匹に有意に高い菌数を含む膿瘍が認められた。またこの培養濾液を加熱処理した場合においては、6匹のマウスが死亡し、残り4匹全てに膿瘍が形成され、コントロールよりも多い回収菌数が得られた。培養濾液を加熱処理した場合としていない場合とで比較すると致死率、回収菌数がわずかに減少

したが有意な差は認められなかった。接種菌数を  $5.0 \times 10^7$  cfu にした場合、死亡したマウスは認められなかったが、膿瘍形成率が増加し、膿瘍から有意に高い菌数が回収された。

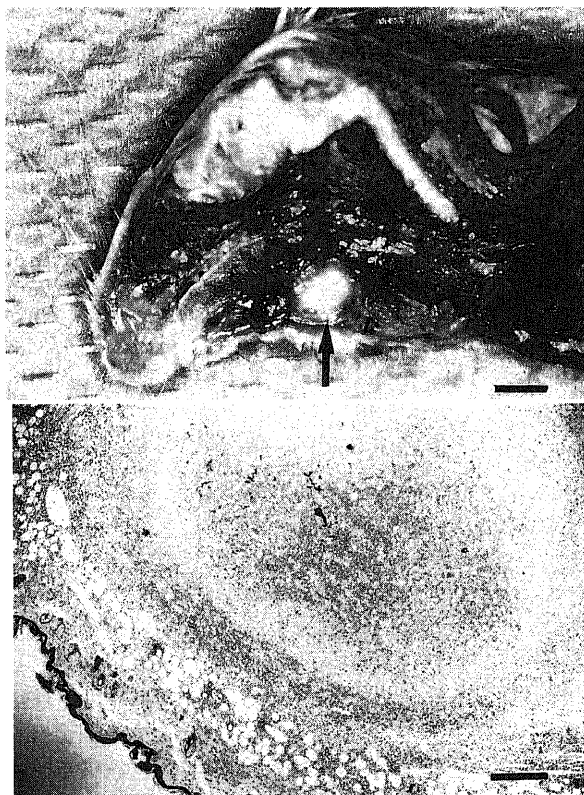


Fig.1. Oral floor abscess in mouse. The black arrow in left photograph showed the macroscopic findings of the abscess (bar, 3mm). The abscess showed as a yellowish soft mass under smooth muscle layer of oral floor. The right photograph showed the histological findings of the abscess (HE stain,  $\times 15$ ). The necrotic debris and the connective tissue surrounding the debris are observed (bar,  $20\mu\text{m}$ ).

Table 1. Synergistic effects of *S. constellatus* and *F. nucleatum* with living cells

Injection combination		No. of mice used	No. of dead mice	No. of abscess-forming mice	Bacterial cell count of <i>S. constellatus</i> per lesion ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ , $\text{Long}_{10}$ cfu/mouse)
<i>S. constellatus</i>	<i>F. nucleatum</i>				
Cell suspension	None	10	0	8	$5.45 \pm 0.93$
Culture	None	10	0	0	0.00
None	Cell suspension	10	0	10	$7.39 \pm 0.29$
None	Culture	10	0	8	0.00
Cell suspension	Culture	10	$10^*$	NA	NA
Culture	Cell suspension	10	$10^\dagger$	NA	NA

The bacterial mixture with each injection combination was injected into murine oral floor.

Number of bacterial cells injected into mice were  $2.0 \times 10^8$  cfu in *S. constellatus* cell suspension,  $2.0 \times 10^8$  cfu in *S. constellatus* culture,  $2.0 \times 10^8$  cfu in *F. nucleatum* cell suspension and  $3.5 \times 10^8$  cfu in *F. nucleatum* culture: cell suspension was prepared from colonies on agar plates and culture was PYG broth culture.

\* $p < 0.001$  vs. cell suspension or culture of *S. constellatus* alone.  $\dagger p < 0.001$  vs. cell suspension or culture of *F. nucleatum* alone. NA, not applicable because all mice were died with sepsis before abscess forming.

### Ⅲ. 菌懸濁液と他方の菌培養濾液を異なる部位 (口底部と背部皮下) に接種した際の相互作用について

同一部位に接種した場合, *F. nucleatum* 菌培養濾液が *S. constellatus* の病原性を増強させる結果が得られたため, 次にこれらの接種部位を隔離してみた. すなわち *S. constellatus* の菌

懸濁液をマウス口底に, 同時に *F. nucleatum* の菌培養濾液を背部皮下に接種した. *S. constellatus* を  $2.0 \times 10^8$  cfu 接種した場合, 4匹死亡し, 残りの6匹全てに膿瘍が形成された (表4). その結果, 膿瘍からの回収菌数はコントロールと比較して有意に高かった. また, *F. nucleatum* 菌培養濾液を加熱処理したものを接

Table 2. Effects of *S. constellatus* culture filtrate on the virulence of *F. nucleatum*

Injection combination		No. of mice used	No. of dead mice	No. of abscess-forming mice	Bacterial cell count of <i>F. nucleatum</i> per lesion ( $\bar{x} \pm SD$ , $\text{Log}_{10}$ cfu/mouse)
<i>F. nucleatum</i> (cfu/mouse)	<i>S. constellatus</i>				
$5.0 \times 10^7$	None	10	0	9	$7.25 \pm 0.69$
$5.0 \times 10^7$	Culture filtrate	10	0	10	$7.20 \pm 0.38$
$5.0 \times 10^7$	Heat-treated culture filtrate	10	0	8	$7.01 \pm 0.46$
$2.0 \times 10^8$	None	10	0	10	$7.39 \pm 0.29$
$2.0 \times 10^8$	Culture filtrate	10	0	10	$7.37 \pm 0.62$
$2.0 \times 10^8$	Heat-treated culture filtrate	10	0	9	$7.15 \pm 0.33$

The mixture of bacterial cell suspension of *F. nucleatum* and *S. constellatus* culture filtrate was challenged at a same site (oral floor).

Table 3. Effects of *F. nucleatum* culture filtrate on the virulence of *S. constellatus* in the injection at same site

Injection combination		No. of mice used	No. of dead mice	No. of abscess-forming mice	Bacterial cell count of <i>S. constellatus</i> per lesion ( $\bar{x} \pm SD$ , $\text{Log}_{10}$ cfu/mouse)
<i>S. constellatus</i> (cfu/mouse)	<i>F. nucleatum</i>				
$5.0 \times 10^7$	None	10	0	6	$4.40 \pm 0.20$
$5.0 \times 10^7$	Culture filtrate	10	0	10	$6.34 \pm 0.14 \dagger$
$5.0 \times 10^7$	Heat-treated culture filtrate	10	0	9	$5.23 \pm 0.26 \dagger$
$2.0 \times 10^8$	None	10	0	8	$5.45 \pm 0.93$
$2.0 \times 10^8$	Culture filtrate	10	8*	2	$7.35 \pm 0.04 \dagger$
$2.0 \times 10^8$	Heat-treated culture filtrate	10	6*	4	$6.82 \pm 0.42 \dagger$

The mixture of bacterial cell suspension of *S. constellatus* and *F. nucleatum* culture filtrate was challenged at a same site (oral floor).

\*,  $\dagger$   $p < 0.02$  vs. bacterial cell suspension of *S. constellatus* alone.

Table 4. Effects of *F. nucleatum* culture filtrate on the virulence of *S. constellatus* in the injection at separate sites

Injection combination		No. of mice used	No. of dead mice	No. of abscess-forming mice	Bacterial cell count of <i>S. constellatus</i> per lesion ( $\bar{x} \pm SD$ , $\text{Log}_{10}$ cfu/mouse)
<i>S. constellatus</i> (cfu/mouse)	<i>F. nucleatum</i>				
$5.0 \times 10^7$	None	10	0	6	$4.71 \pm 0.17$
$5.0 \times 10^7$	Culture filtrate	10	0	10	$6.34 \pm 0.14^*$
$5.0 \times 10^7$	Heat-treated culture filtrate	10	0	9	$5.23 \pm 0.26^*$
$2.0 \times 10^8$	None	10	0	8	$5.54 \pm 0.90$
$2.0 \times 10^8$	Culture filtrate	10	4	6	$6.77 \pm 0.31^*$
$2.0 \times 10^8$	Heat-treated culture filtrate	10	1	9	$6.43 \pm 0.43^*$

The bacterial cell suspension of *S. constellatus* and *F. nucleatum* culture filtrate were injected into oral floor and subcutaneous tissue of back, respectively.

\* $p < 0.05$  vs. bacterial cell suspension of *S. constellatus* alone.

Table 5. Effects of various concentration of *F. nucleatum* culture filtrate on the virulence of *S. constellatus*

Injection combination		Injection at same site			Injection at separate sites		
<i>S. constellatus</i>	<i>F. nucleatum</i>	No. of mice used	No. of abscess-forming mice	Bacterial count of <i>S. constellatus</i> per lesion ( $\bar{x} \pm SD, \text{Log}_{10} \text{cfu/mouse}$ )	No. of mice used	No. of abscess-forming mice	Bacterial count of <i>S. constellatus</i> per lesion ( $\bar{x} \pm SD, \text{Log}_{10} \text{cfu/mouse}$ )
Living cells (cfu/mouse)	Culture filtrate dilution						
$5.0 \times 10^7$	None	10	6	$4.40 \pm 0.20$	10	6	$4.71 \pm 0.17$
$5.0 \times 10^7$	$10^0$	10	10	$6.34 \pm 0.84^*$	10	10	$6.49 \pm 0.48^\dagger$
$5.0 \times 10^7$	$10^1$	10	10	$5.58 \pm 0.45^*$	10	10	$5.44 \pm 0.64^\dagger$
$5.0 \times 10^7$	$10^2$	10	10	$5.90 \pm 0.68^*$	10	7	$5.50 \pm 0.10^\dagger$
$5.0 \times 10^7$	$10^3$	10	8	$5.36 \pm 0.12^*$	10	7	$5.53 \pm 0.07^\dagger$
$5.0 \times 10^7$	$10^4$	10	6	$5.26 \pm 0.90$	10	6	$4.94 \pm 0.60$

*F. nucleatum* culture filtrate was  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ , and  $10^4$ -fold diluted. The bacterial cell suspension of *S. constellatus* and *F. nucleatum* culture filtrate was challenged at the same site or the separate sites. In this experiment, no dead mice were observed.

\*,  $\dagger p < 0.05$  vs. cell suspension of *S. constellatus* alone.

種した場合においても死亡マウスが出現し、有意に高い回収菌数が得られた。接種菌数が $5.0 \times 10^7 \text{cfu}$ の場合においては、マウスは死亡しなかったがコントロールと比較して膿瘍形成率が上昇し、また回収菌数が有意に増加した。

#### IV. 相互作用の強さにおける菌培養濾液の濃度の影響について

*F. nucleatum* の菌培養濾液の濃度と *S. constellatus* の病原性の増強作用における影響について検討した。

*F. nucleatum* 菌培養濾液を *S. constellatus* の菌懸濁液と混合しマウスの口底に接種した場合、この菌培養濾液を 1/1000 まで希釈しても有意に高い膿瘍からの回収菌数が得られた。しかしながら、*S. constellatus* の病原性を増強させる濃度では、濃度が上昇してもそれに比例して膿瘍形成率、膿瘍からの回収菌数が増加しなかった (表 5)。一方、この菌培養濾液を希釈して背部皮下に接種した場合においても、1/1000 に濃度に希釈しても有意に高い回収菌数を認めた。この場合においても、1/1000 以上の濃度では、濃度の上昇に比例した膿瘍形成率や回収菌数の増加は認められなかった。

## 考 察

顎口腔領域菌性感染症から分離される菌は口腔内常在菌であり、本感染症からは  $\alpha$ -*Streptococci*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacterium* が高率に分離される<sup>14)~6)</sup>。このうち本研究で用いられた *S. constellatus* は通性嫌気性グラム陽性球菌である *Streptococcus milleri* グループの 1 つであり、口腔、消化管、女性器等ヒトの体内から広く分離される<sup>21)</sup>。口腔内において本菌は唾液よりもむしろ歯垢に多く存在している。一方、*F. nucleatum* は偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、菌血症、呼吸器感染症、腹部感染症、尿路感染症等からの分離が報告されている<sup>22)~25)</sup>。口腔内からは成人性辺縁性歯周炎 (いわゆる歯槽膿漏症) から検出される<sup>26)</sup>。顎口腔領域菌性感染症において、*S. constellatus* は最も高頻度で分離される  $\alpha$ -*Streptococci* であり<sup>21)</sup>、*F. nucleatum* はその高い分離頻度、とりわけ重症症例からの分離が注目されており、重要な起炎菌として注目されている<sup>27)</sup>。

さて、菌性感染症の起炎菌の病原性や発症機構の解明のため、

数多くの動物モデルが考案されている。その多くは動物の皮下組織に菌を接種し、膿瘍を形成させて病原性を評価する皮下膿瘍モデルである。Sundqvist<sup>14)</sup>、Brook<sup>15)16)</sup>、Lewis<sup>17)</sup> はモルモットもしくはマウスの鼠径部皮下膿瘍モデルにて、また van Steenberg<sup>18)</sup>、Ebersole<sup>19)</sup> はマウスの背部皮下膿瘍モデルを用いて致死率、膿瘍形成率、膿瘍の大きさからその病原性を評価している。これらに対して、齋木<sup>28)</sup> はマウス腹腔内膿瘍モデルを用いて、致死率、膿瘍形成率、膿瘍からの回収菌数からの評価を試みている。これらの研究から菌性感染症の起炎菌の病原性はおおよそ推察できる。しかし、顎口腔領域には組織隙が数多く存在し、それらが互いに交通しており、この隙に歯牙の炎症が進展し拡大するという機転をとる<sup>29)</sup>。従って、顎口腔領域菌性感染症の研究にはヒトの臨床像を反映したモデルでの研究が望ましい。Teles<sup>30)</sup> はマウスの歯牙に直接菌を接種し、根尖性歯周組織炎から蜂窩織炎を発症させるモデルを作製している。このモデルは実際に歯牙に起炎菌を接種すること、それにより炎症が進展し、顎口腔の蜂窩織炎が観察できることからヒトの顎口腔領域菌性感染症の発症、進展機構に極めて類似しており注目される。しかしながら、このモデルでは雑菌の混入が避けられないこと、免疫不全マウスを用いており、正常な免疫保有マウスではこの炎症が全く再現されないことが欠点として挙げられる。本研究で用いたマウス口底膿瘍モデルは実際の歯牙を介した炎症ではないが、直接舌下隙に菌を接種して、組織隙の炎症を起こさせており、顔面および口底部の腫脹、重症化により頸部への炎症の進展、食欲不振と体重減少が観察され、実際のヒトでのルートヴィヒアンギーナの臨床像に類似している。また、研究に際して、雑菌の混入がないこと、正常な免疫保有マウスでも観察できること、菌の接種が容易であることが利点として挙げられる。これらのことから、本モデルはヒトの顎口腔領域菌性感染症の研究に有用であると考えられた。

*S. constellatus*, *F. nucleatum* についてはその単独接種によっても膿瘍を形成することが他家<sup>15)16)18)19)28)</sup>の研究で明らかになっている。本研究においてもこれらの菌の単独接種にて膿瘍が形成された。

本研究において膿瘍を形成するのに必要な菌数は *S.*

*constellatus*では $10^7$ cfu/マウスであった。菌懸濁液を接種した研究では、Brookら<sup>15)16)</sup>のマウス鼠径部皮下膿瘍モデルでは $10^8$ から $10^{10}$ cfu/マウス、斎木ら<sup>28)</sup>のマウス腹腔内膿瘍モデルでは $10^7$ から $10^{10}$ cfu/マウスの菌数が膿瘍形成に必要であったと報告しており、本研究と概ね同様の値であった。しかしながら、*F. nucleatum*については興味深い結果が得られた。本研究では膿瘍形成に必要な菌数は $10^7$ cfu/マウスであったが、Brookら<sup>16)</sup>のマウス鼠径部皮下膿瘍モデル、Ebersoleら<sup>18)</sup>はマウスの背部皮下膿瘍モデルであり $10^9$ cfu/マウス、斎木ら<sup>28)</sup>のマウス腹腔内膿瘍モデルでは $10^8$ cfu/マウスであり、本研究での値の10から100倍の値であった。このことは、*F. nucleatum*の病原性の発現が顎口腔領域においては他部位に比べ強いことを示唆している。

さらに本研究では興味深いことに、同じ菌数を接種しても寒天培地で培養し、PYGブロスに懸濁して接種した方が、PYGブロスで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。これは接種菌数が同じであっても、培養条件によって菌の保有する病原性が変化する可能性を示唆しているが、その理由は不明であり、基礎的研究が必要と考えられる。

*S. constellatus*と*F. nucleatum*の病原因子はいくつか報告されている。*S. constellatus*はフィブリノリジン、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ヒアルロニダーゼ、コンドロイチン硫酸等を産生することが知られており、これらが病原因子として考えられている<sup>21)</sup>。特に、ヒアルロニダーゼについては、この酵素を産生する株が非産生株と比較して膿瘍病変から高頻度に分離されており、化膿性炎症の形成との強い関連が指摘されている<sup>31)</sup>。一方、*F. nucleatum*については内毒素が病原性の主体をなしており、この内毒素を担う細胞外膜のリピドAの組成は属を超えて*Pseudomonas*、*Salmonella*のそれに類似している<sup>32)</sup>。これらの病原因子が膿瘍の形成、さらにはヒトの化膿性炎症の発症、進展に強く関与しているものと推察される。

一方、顎口腔領域菌性感染症は、複数菌感染形態をとっている<sup>4)7)8)</sup>。当講座において1993年から1996年にかけて本感染症による閉塞膿瘍を有する患者150症例に対する細菌学的研究においても、1症例あたり4ないし5菌種分離され、重症度が増すにつれ分離菌数が増える傾向があった<sup>33)</sup>。また、*Streptococcus*と*Fusobacterium*を含む偏性嫌気性グラム陰性桿菌との混合感染形態をとる症例は軽症症例の73.2%、中等度症例の78%、重症症例の93.3%という結果であり、この感染形態と重症化との関連が示唆される結果であった<sup>33)</sup>。これに関連して、Lewisら<sup>8)</sup>は偏性嫌気性グラム陰性桿菌が42%で通性嫌気性グラム陽性球菌と同時に検出されたと報告している。複数菌感染における菌の相互作用については以前より注目され、実験的研究で菌の相乗作用が認められることが報告されてきた<sup>16)28)34)35)</sup>。そこで、本研究では、組み合わせの多い感染形態の1つである*S. constellatus*と*F. nucleatum*の混合感染時の菌の相互作用について、その存在を確認し、その作用の発現機構の解明を目的に研究を進めた。

*S. constellatus*と*F. nucleatum*の生菌をマウス口底に接種した場合、それぞれを単独で接種した場合と比較して、死亡マウスが認められ、膿瘍の形成率が有意に上昇した。このことからこの2菌間の病原性の相乗作用が存在することが確認された。本実験においてはATCC株を用いたが、以前の研究において、臨

床分離菌株においてもこの相乗作用が認められた<sup>36)</sup>。

そこでどのような因子がこの相互作用発現に関与しているかについて検討した。*S. constellatus*の菌培養濾液は*F. nucleatum*の病原性になんら影響を与えなかった。この結果から、*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推察される。Nakagawaら<sup>37)</sup>は液体培地において*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。この報告はこの結果を考察する上で重要なものと考えられる。一方、*F. nucleatum*の菌培養濾液の*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*の菌培養濾液と*S. constellatus*の菌懸濁液(生菌)を混合して接種した場合、*S. constellatus*菌懸濁液単独を接種した場合と比較して死亡するマウスが出現し、膿瘍形成するマウスが有意に増加した。このことは*F. nucleatum*の菌培養濾液が*S. constellatus*の病原性を増強させたものと考えられる。また、*F. nucleatum*の菌培養濾液を121℃、20分間で加熱処理し、同様に*S. constellatus*菌懸濁液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。すなわち、*F. nucleatum*については菌の産生する耐熱性物質が*S. constellatus*との相乗作用発現の起因となることが推察される。

こうした菌の相乗作用の機構について、宿主の防御機構に対する作用、他菌への栄養の供給、局所環境の変化、他菌の病原性の増強等が考えられている<sup>10)</sup>。本研究では*F. nucleatum*菌培養濾液の*S. constellatus*の病原性の増強作用の機序を解明すべく、その接種部位を変えて検討を行った。その結果、*F. nucleatum*菌培養濾液をマウスの背部皮下に接種しても*S. constellatus*の菌懸濁液と同一部位(マウス口底)に接種した場合と同様に*S. constellatus*の病原性を増強した。このことは、*F. nucleatum*の菌培養濾液が宿主の免疫に対して作用し、それにより*S. constellatus*の病原性が増強させたと推察される。細菌の産生物質が免疫担当細胞の機能を抑制する現象についてはいくつか報告されている。Inghamら<sup>38)</sup>は*Bacteroides melaninogenicus*(現*Prevotella melaninogenica*)と*B. fragilis*の培養上清液が、またNamavarら<sup>39)</sup>は*Bacteroides gingivalis*(*B. gingivalis*)の培養上清液がそれぞれ*Proteus mirabilis*に対するヒトの多核白血球の貪食能を低下させたと報告している。Yonedaら<sup>40)</sup>は*B. gingivalis*の培養上清液がヒトの好中球のスーパーオキシダーゼ産生能を抑制したと報告している。Rotsteinら<sup>41)42)</sup>は*B. fragilis*の終末代謝産物であるコハク酸が*E. coli*に対するヒトの好中球の貪食能を低下させることを見出している。Shinzatoら<sup>43)</sup>は*Prevotella intermedia*(*P. intermedia*)の培養濾液がヒトの多核白血球の貪食能を低下させることを見出しており、さらにこれに関連してTouyamaら<sup>44)</sup>は*P. intermedia*の終末代謝産物であるコハク酸、イソ吉草酸がヒトの白血球の貪食能、遊走能、殺菌能を低下させたと報告している。*F. nucleatum*についてもその産生物質の活性について研究がなされている。特に、*F. nucleatum*の免疫に対する作用については、産生物質中の蛋白がヒトのTリンパ球の活性を低下させることを見い出されている<sup>45)46)</sup>。また、*F. nucleatum*の産生する蛋白成分が好中球と相互作用し、これによって血清のオプソニン活性を低下させることについても報告がある<sup>47)49)</sup>。しかしながらこれらの蛋白物質は易熱性であり、

本研究での知見とは異なる。こうした中で、Eftimiadiら<sup>50)</sup>は偏性嫌気性菌の終末代謝産物である短鎖脂肪酸のうち酪酸、コハク酸、プロピオン酸の単球、好中球の*Streptococcus aureus*に対する食能への影響を検討しており、これらの脂肪酸がこの食能を強く抑制したと報告している。酪酸、プロピオン酸は耐熱性であり、*F. nucleatum*も産生するため注目される。また、Kurita-Ochiai<sup>51)</sup>はこの酪酸がヒトのTリンパ球のインターロイキン (interleukin, IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10を減弱させたと報告している。酪酸は耐熱性であることから、これが本研究で認められた免疫能に影響を与え、*S. constellatus*の病原性を増強させる物質の1つとして考えられる。しかしながら、これだけでは不十分であり、さらなる研究が望まれる。

さて、本研究では*F. nucleatum*菌培養濾液を希釈してその濃度と*S. constellatus*の病原性の増強活性の強さについて検討したが、活性を呈する濃度において、濃度と活性の強さは比例しなかった。このことからこの活性は濃度依存性ではないものと考えられる。しかしながら、この菌培養濾液を1/1000に希釈してもその活性が認められ、非常に強いものであった。すなわち、少数の*F. nucleatum*が存在しても*S. constellatus*と相乗作用が発現し、これが炎症の発症、進展に寄与する可能性が推察される。

本研究において、顎口腔領域菌性感染症の起炎菌間に相乗作用が存在することが判明した。本感染症は、常在菌による内因感染であることから、1つの菌の病原性のみで炎症の発症、進展の機序を説明することは困難である。本研究の結果は菌の相乗作用がこの機序の1つであることを示唆している。しかしながら、本感染症の発症、進展にはさらにいくつもの因子が複雑に関与しているものと考えられ、今後さらなる研究が求められる。

## 結 論

顎口腔領域菌性感染症の代表的な起炎菌である*S. constellatus*と*F. nucleatum*についてその混合感染時の相互作用について、マウス口底膿瘍モデルを用いて検討したところ、以下のような結論を得た。

1. *S. constellatus*と*F. nucleatum*の混合感染においては病原性の相乗作用が存在した。
2. この相乗作用の発現において*S. constellatus*の産生物質は*F. nucleatum*の病原性に影響を与えなかった。
3. *F. nucleatum*の産生する耐熱性産生物質は*S. constellatus*の病原性を増強し、この増強はこの耐熱性物質が宿主の免疫能に影響を与えることが原因であると考えられた。また、この物質の活性は少量でも発現するが、濃度依存的には作用しなかった。

以上の結果から、本感染症の発症、進展に菌の相乗作用が重要な役割を果たし、この相乗作用は各々の菌が異なる作用機序にて他菌の病原性を増強させることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師である金沢大学医学部歯科口腔外科学講座主任である山本悦秀教授に深謝します。また、終始研究を御指導頂いた同講座の中川清昌助教授、金沢大学医学部微生物学講座の唐澤忠宏助教授、動物モデルの製作にあたり有用な御助言を頂いた金沢大学医学部歯科口腔外科学講座の川尻秀一助手および齋木康正博士に深くお礼申し上げます。さらに、研究に御支援と御協力を頂き

ました金沢大学医学部歯科口腔外科学教室および同微生物学教室の皆様

に感謝します。  
本研究は平成8、9年度文部省科学研究補助金基盤研究C(課題07672164号)によるものであります。

## 文 献

- 1) Pantera EA Jr. Endodontic disease. In GS Schuster (eds), Oral Microbiology and Infectious Disease, 3rd ed, p549-569, BC Decker Inc, Philadelphia, 1990
- 2) Goldberg MH. Corynebacterium: an oral-systemic pathogen: report of cases. J Oral Surg 29: 349-351, 1971
- 3) Dormer BJ, Babbett AJ. Orofacial infection due to bacteroides a neglected pathogen. J Oral Surg 30: 658-660, 1972
- 4) Lewis MAO, MacFarlane TW, MacGowan DA. A microbiological and clinical review of the acute dentoalveolar abscess. Br J Maxillofac Surg 28: 359-366, 1990
- 5) Brook I, Frazier EH, Gher ME. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscess. Oral Microbiol Immunol 6: 123-125, 1991
- 6) Williams BL, McCann GF, Schoenknecht FD. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. J Clin Microbiol 18: 770-774, 1983
- 7) Oguntebi B, Slee AM, Tanzer JM, Langeland K. Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. J Clin Microbiol 15: 964-966, 1982
- 8) Lewis MAO, MacFarlane TW, MacGowan DA. Quantitative bacteriology of acute dento-alveolar abscesses. J Med Microbiol 21: 101-104, 1986
- 9) Rotstein OD, Pruett TL, Simmons RL. Mechanisms of microbial synergy in polymicrobial surgical infection. Rev Infect Dis 7: 151-170, 1985
- 10) Mackowiak PA. Microbial synergism in human infections. N Engl J Med 298: 83-87, 1978
- 11) Smith JW, Nichols RL. Prophylaxis in the surgical patient. In SM Finegold, WL George (eds), Anaerobic Infections in Humans, 1st ed, p771-792, Academic Press Inc, San Diego, 1989
- 12) Onderdonk AB, Weinstein WM, Sullivan NM, Bartlett JG, Gorbach SL. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: quantitative bacteriology of infected animals. Infect Immun 10: 1256-1259, 1974
- 13) Onderdonk AB, Bartlett JG, Louie T, Sullivan-Seigler N, Gorbach SL. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. Infect Immun 13: 22-26, 1976
- 14) Sundqvist GK, Eckerbom MI, Larsson ÅP, Sjögren UT. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. Infect Immun 25: 685-693, 1979
- 15) Brook I, Walker RI. Pathogenicity of anaerobic gram-positive cocci. Infect Immun 45: 320-324, 1984
- 16) Brook I, Hunter V, Walker RI. Synergistic effect of *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, anaerobic cocci, and aerobic bacteria on mortality and induction of subcutaneous abscesses in mice. J Infect Dis 149: 924-927, 1984
- 17) Lewis MAO, MacFarlane TW, McGowan DA, MacDonald DG. Assessment of the pathogenicity of bacterial species isolated from acute dentoalveolar abscesses. J Med Microbiol



- 27: 109-116, 1988
- 18) van Steenberg TMJ, Kastelein P, Touw JJA, de Graaff J. Virulence of black-pigmented *Bacteroides* strains from periodontal pockets and other sites in experimentally induced skin lesions in mice. *J Periodontal Res* 17: 41-49, 1982
- 19) Ebersole JL, Feuille F, Kesavalu L, Holt SC. Host modulation of tissue destruction caused by periodontopathogens: effects on a mixed microbial infection composed of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Microb Pathog* 23: 23-32, 1997
- 20) Shapiro ME, Onderdonk AB, Kasper DL, Finberg RW. Cellular immunity to *Bacteriodes fragilis* capsular polysaccharide. *J Exp Med* 155: 1188-1197, 1982
- 21) Gossling J. Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. *Rev Infect Dis* 10: 257-285, 1988
- 22) Edson RS, Rosenblatt JE, Washington JA II, Stewart JB. Gas-liquid chromatography of positive blood cultures for rapid presumptive diagnosis of anaerobic bacteremia. *J Clin Microbiol* 15: 1059-1061, 1982
- 23) Robit S, Gal K, Goldblat MV, Eslami HH. The role of anaerobic bacteria in the pathogenesis of urinary tract infections. *J Urol* 126: 852-853, 1981
- 24) Marina M, Strong CA, Civen R, Molitoris E, Finegold SM. Bacteriology of anaerobic pleuropulmonary infection: preliminary report. *Clin Infect Dis* 16 (Suppl 4): S256-S262, 1993
- 25) Brook I, Frazier EH. Aerobic and anaerobic microbiology of superficial suppurative thrombophlebitis. *Arch Surg* 131: 95-97, 1996
- 26) Bolstand AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 9: 55-71, 1996
- 27) Heimdahl A, von Konow L, Satoh T, Nord CE. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *J Clin Microbiol* 22: 299-302, 1985
- 28) 齋木康正, 中川清昌, 川尻秀一, 熊谷茂宏, 山本悦秀. 口腔領域感染症分離菌によるマウス腹腔内膿瘍形成能の検討 - *Fusobacterium nucleatum* と *Streptococcus constellatus* -. *日口外誌* 40: 577-584, 1994
- 29) Thoma KH. *Oral Surgery*, 4th ed, p722-775, The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1963
- 30) Teles R, Wang CY, Stashenko P. Increased susceptibility of RAG-2 SCID mice to dissemination of endodontic infections. *Infect Immun* 65: 3781-3787, 1997
- 31) Unsworth PF. Hyaluronidase production in *Streptococcus milleri* in relation to infection. *J Clin Pathol* 42: 506-510, 1989
- 32) Holdeman LV, Kelley RW, Moore WEC. Anaerobic Gram-Negative Straight, curved and helical rods. *In* NR Krieg NR, JG Holt (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 1. 1st ed, p602-637, Williams and Wilkins, Baltimore, 1984
- 33) 栗山智有, 中川清昌, 山本悦秀, 齋木康正, 室木俊美, 松本成雄. 顎口腔領域感染症起炎菌の検討 - 第3報: 臨床症状と分離菌との関連について -. *日口外誌* 44: 126-132, 1998
- 34) Baumgartner JC, Falkler WA, Beckerman T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol* 7: 253-256, 1992
- 35) Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Stepfen MJ, Holt SC. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. *Infect Immun* 64: 2094-2100, 1996
- 36) 栗山智有, 中川清昌, 川尻秀一, 山本悦秀, 齋木康正. 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
- 37) Nakagawa K, Saiki Y, Kuriyama T, Okabe K, Yamamoto E. An experimental investigation of Eh in pyogenic orofacial odontogenic infection. *In* N. Ravindranathan (eds), 3rd Asian Congress on OMFS, p551-555, Monduzzi Editore, Italy, 1997
- 38) Ingham HR, Sisson PR, Tharaggonnet D, Selkon JB, Codd AA. Inhibition of phagocytosis in vitro by obligate anaerobes. *Lancet* 17: 1252-1254, 1977
- 39) Namavar F, Verweij AMJJ, Bal M, van Steenberg TJM, de Graaff J, MacLaren DM. Effect of anaerobic bacteria on killing of *Proteus mirabilis* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 40: 930-935, 1983
- 40) Yoneda M, Maeda K, Aono M. Suppression of Bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes by *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun* 58: 406-411, 1990
- 41) Rotstein OD, Vittorini T, Kao J, McBurney MI, Nasmith PE, Grinstein S. A soluble *Bacteroides* by-product impairs phagocytic killing of *Escherichia coli* by neutrophils. *Infect Immun* 57: 745-753, 1989
- 42) Rotstein OD, Pruett TL, Fiegel VD, Nelson RD, Simmons RL. Succinic acid, a metabolic by-product of *Bacteroides* species, inhibits polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun* 48: 402-408, 1985
- 43) Shinzato T, Saito A. A mechanism of pathogenicity of "Streptococcus milleri group" in pulmonary infection: synergy with an anaerobe. *J Med Microbiol* 40: 118-123, 1994
- 44) Touyama M, Kusano N, Saito A. 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
- 45) Shenker BJ, Datar S. *Fusobacterium nucleatum* inhibits human T-cell activation by arresting cells in the mid-G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *Infect Immun* 63: 4830-4836, 1995
- 46) Shenker BJ, DiRienzo JM. Suppression of human peripheral blood lymphocytes by *Fusobacterium nucleatum*. *J Immunol* 132: 2357-2362, 1984
- 47) Hsu SD, Cole MF. Structural integrity of host defense factors in dental plaque. *Infect Immun* 50: 398-402, 1985
- 48) Schenkein HA, Genco RJ. Gingival fluid and serum in periodontal diseases. I. Quantitative study of immunoglobulins, complement components, and other plasma proteins. *J Periodontol* 48: 772-777, 1977
- 49) Mangan DF, Novak MJ, Vora SA, Mourad J, Kriger PS. Lectinlike interactions of *Fusobacterium nucleatum* with human

neutrophils. *Infect Immun* 57: 3601-3611, 1989

50) Eftimiadi C, Tonetti M, Cavallero TA, Sacco O, Rossi GA. Short-chain fatty acids produced by anaerobic bacteria inhibit phagocytosis by human lung phagocytes. *J Infect Dis* 161: 138-142, 1990

51) Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K. Volatile fatty acids, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. *J Dent Res* 74: 1367-1373, 1995

**Microbial Interaction of Pathogens in Orofacial Odontogenic Infections – The Synergistic Effect Between *Streptococcus constellatus* and *Fusobacterium nucleatum*** – Tomoari Kuriyama, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Medicine, Kanazawa University Kanazawa 920-8640 – *J. Juzen Med Soc.*, **107**, 409 – 417 (1998)

**Key words** Orofacial odontogenic infection, Microbial interaction, Oral floor abscess model, *Streptococcus constellatus*, *Fusobacterium nucleatum*

#### Abstract

In the present study, the microbial interaction between *Streptococcus constellatus* and *Fusobacterium nucleatum*, which are frequently isolated from orofacial odontogenic infections, was examined using an oral floor abscess model in mice. Female ICR Crj mice were employed as subjects, and *S. constellatus* ATCC 27823 and *F. nucleatum* ATCC 25586 were used in this study. Bacterial virulence was assessed by the presence or absence of abscesses, lethality, and bacterial count per abscess. When both *S. constellatus* and *F. nucleatum* were injected into the murine oral floor, these two tested strains exhibited positive microbial synergy. When *F. nucleatum* cells were injected into mice together with a *S. constellatus* culture filtrate, *F. nucleatum* virulence was not enhanced. However, when a mixture of *S. constellatus* cells and a *F. nucleatum* culture filtrate was injected, *S. constellatus* virulence was enhanced. This enhancement was observed even when the *F. nucleatum* culture filtrate was heat-treated. These findings suggest that the interaction of the *S. constellatus* cells and a heat-stable substance produced by *F. nucleatum* contribute to the microbial synergy. Interestingly, when *S. constellatus* was injected into the murine oral floor and the *F. nucleatum* culture filtrate (including heat-treated) was injected into the back of the mice, enhanced *S. constellatus* virulence was still observed, and this effect did not depend on the concentration of the *F. nucleatum* culture filtrate. This indicates a heat-stable substance produced by *F. nucleatum* might affect the host defenses, and this mechanism may play an important role in the microbial interaction of *S. constellatus* and *F. nucleatum*. From the above, it seems that, the microbial synergism between these two organisms may be a major contributor to the occurrence of orofacial odontogenic infections.