

●原 著

肺膿瘍・膿胸 7 例における歯周病細菌 PCR 検査の臨床的意義の検討

門屋講太郎^a 吉岡 泰子^a 難波由喜子^a 桂 蓉子^a 高 遼^a
 小池 建吾^a 吉岡 正剛^a 佐々木信一^a 富永 滋^a 高橋 和久^b

要旨：肺膿瘍，膿胸の発症には歯周病が関与し，起炎菌は *Streptococcus anginosus* group や偏性嫌気性菌などが知られている．今回我々は，肺膿瘍，膿胸の病巣からの検体で歯周病細菌 PCR 検査を施行した 7 例（肺膿瘍 3 例，膿胸 4 例）を経験した．1 例のみで気管支洗浄液から嫌気性菌が分離されたが，経気管支生検や胸水からの検体の培養検査では嫌気性菌は培養されず，PCR 検査では 6 例に歯周病細菌が検出された（*Porphyromonas gingivalis* 3 例，*Tannerella forsythensis* 1 例，*Treponema denticola* 1 例，*Prevotella intermedia* 1 例）．うち 1 例ではまだ病原性が明らかでない *T. denticola* が検出された．歯周病細菌 PCR 検査は，培養診断が困難な嫌気性菌性呼吸器感染症の起炎菌の同定に有用な検査と考えられた．

キーワード：肺膿瘍，膿胸，歯周病細菌，PCR 法，*Treponema denticola*

Lung abscess, Empyema, Periodontal bacteria, PCR assay, *Treponema denticola*

緒 言

近年，歯周病などの口腔内感染症と全身性疾患の関連が目ざされているが，そのなかで誤嚥性肺炎，肺膿瘍，膿胸といった呼吸器感染症については比較的以前から関連性が指摘されており，特に嫌気性菌の関与が重要視されてきた．山下らは呼吸器感染症 67 例における嫌気性菌検出率は膿胸で 80%，肺膿瘍で 43%，誤嚥性肺炎で 42% であったと報告している¹⁾．

一方，実際の臨床現場では，気道系検体における嫌気培養の困難さから起炎菌培養同定までに至らない症例が多く，口腔内嫌気性菌の関与は過小評価されている可能性が高いと考えられる．

最近，歯科領域において歯周病細菌の検出に real-time PCR による定量法が応用され，実地臨床でも用いられるようになってきた²⁾³⁾．real-time PCR 法は従来の PCR 法と比し定量性に優れるため，コンタミネーションなどの問題も克服できると考えられる．

今回我々は，肺膿瘍と膿胸の病巣から採取した検体を用い歯周病細菌 PCR 法による感染症診断を試み，その有用性を確認できたので報告する．

対象と方法

対象は 2009 年 6 月から 2011 年 11 月までに順天堂大学医学部附属浦安病院呼吸器内科に入院した肺膿瘍または膿胸の 7 例であり，肺膿瘍の症例では気管支鏡検査を行い，経気管支生検（transbronchial biopsy：TBB），気管支洗浄を施行し，膿胸の症例では経皮的に胸水を穿刺した．採取された検体において培養検査と歯周病細菌遺伝子検査を施行した．培養検査については，胸水は血液培養用の嫌気用レズンボトル（BBL）と滅菌スピッツに採取し，肺組織は嫌気ポーター（テルモ・クリニカルサプライ株式会社），気管支洗浄液は滅菌スピッツに入れて，速やかに細菌検査室に搬送した．提出検体は BTB 乳糖寒天培地，血液寒天培地，チョコレート寒天培地（BBT），プルセラ HK 寒天培地（極東製薬）を使用し分離した．BTB 乳糖寒天培地と血液寒天培地は 35℃・18 時間好気培養，チョコレート寒天培地は 35℃・18 時間炭酸ガス培養，プルセラ HK 寒天培地は嫌気バッグ法（三菱化学メディエンス）にて 35℃・48 時間（発育不良時 96 時間まで延長）培養した．嫌気性菌の同定は，微生物学検査マニュアルの臨床嫌気性菌⁴⁾に準じてレベル 1a・2a の方法で同定を行い必要に応じて Rapid ANA II System（アムコ）を使用した．歯周病細菌遺伝子検査は生検した肺組織と胸水を用いて，株式会社ミロクメディカルラボラトリー（長野県佐久市）に依頼し，歯周病細菌遺伝子検査は TaqMan プローブ法を使用した real-time PCR 法で定量的に目的菌遺伝子（*Aggregati-*

連絡先：門屋 講太郎

〒279-0021 千葉県浦安市富岡 2-1-1

^a 順天堂大学医学部附属浦安病院呼吸器内科

^b 順天堂大学医学部呼吸器内科

(Received 30 Sep 2011/Accepted 17 Jul 2012)

Table 1 Characteristics of the 7 cases

Case	Age/ gender	Diagnosis	History of periodontal disease	Culture of sputum	Culture of TBB, BLF, or effusion (source)	PCR analysis (source)	Copy number of the targeted pathogen (proportion of total bacterial load)	Treatment
1	69/F	lung abscess	+	normal flora	no growth (TBB and BLF)	<i>Treponema denticola</i> (TBB)	11,040 copies/8 mm ³ (10.3%)	CAM + CLDM (6 weeks)
2	55/M	Empyema	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus constellatus</i> (effusion)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (effusion)	40,800 copies/ml (20.52%)	CTR + CLDM (4 weeks)
3	60/M	lung abscess	+	normal flora	no growth (TBB and BLF)	<i>Tannerella forsythensis</i> (TBB)	1,280 copies/8 mm ³ (42.1%)	ABPC (7 weeks)
4	54/M	Empyema	-	normal flora	no growth (effusion)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (effusion)	6,000 copies/ml (0.01%)	ABPC/SBT (4 weeks)
5	83/M	Empyema	-	methicillin sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>	no growth (effusion)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (effusion)	5,600 copies/ml (0.09%)	ABPC + CLDM (4 weeks)
6	55/F	Empyema	+	normal flora	<i>Streptococcus intermedius</i> (effusion)	negative (effusion)	not detected (0.0%)	TAZ/PIPC (3 weeks)
7	68/M	lung abscess	-	normal flora	<i>Prevotella oralis</i> (BLF)	<i>Prevotella inter- media</i> (TBB)	1,000 copies/8 mm ³ (0.1%)	TAZ/PIPC (2 weeks) → ABPC/SBT (2 weeks)

BLF, bronchial lavage fluid; GNR, gram negative rod; CAM, clarithromycin; CTRX, ceftriaxone sodium hydrate; CLDM, clindamycin hydrochloride; ABPC, ampicillin; ABPC/SBT, ampicillin/sulbactam; TAZ/PIPC, tazobactam/piperacillin.

bacter actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*) の検出を行った。方法は目的菌の菌種に特異的な 16S rRNA をターゲットにしたプライマーで増幅を行い、TaqMan プローブにて検出し、既知量のコピー数の DNA 溶液をスタンダードとして定量的に測定した。総菌数は 16S rRNA 領域の共通配列で PCR 法による増幅を行い、同様に既知のコピー数の検量線から定量的に測定した。また検出菌の総菌数に対する相対的比率を補正はせず算出した。対象 7 例について、歯科疾患の既往、喀痰培養、肺組織と気管支洗浄液または胸水の培養、PCR 検査、治療内容を検討した。

成 績

症例一覧を Table 1 に示した。4 例に歯科疾患の既往を認めた。喀痰検査では陽性 2 例、陰性 5 例であり、嫌気性菌はいずれの症例でも分離されなかった。病巣部の培養では、症例 2 の胸水から *Streptococcus constellatus*、症例 6 の胸水から *S. intermedius*、症例 7 では気管支洗浄液のみから *Prevotella oralis* が検出されたが、他 4 例(症例 1, 3 の気管支洗浄液および肺組織、症例 4, 5 の胸水)は陰性であった。一方、病巣部の検体を用いた PCR 検

査では 7 例中 6 例と、嫌気性菌周病細菌の検出において培養と比べ高率に陽性であり、明らかな歯科疾患の既往がない症例でも陽性となった。肺膿瘍 3 例の肺組織からはそれぞれ *T. denticola* (症例 1), *T. forsythensis* (症例 3), *P. intermedia* (症例 7) が検出され、膿胸の 3 例からは全例 *P. gingivalis* が検出されたが、いずれの症例も 1 菌種のみが陽性であった。また症例 3 では病理組織中にグラム陰性桿菌のコロニーが鏡検されたが、培養では同定できず、PCR 検査で *T. forsythensis* が 1,280 コピー(総菌数の 42.1%)と高い優占率で認められた。症例 1, 2, 3 の菌周病菌数あるいは総菌数に対する割合は高かったが、症例 4, 5, 7 では総菌数に比して菌周病菌の割合が低かった。症例 7 では気管支洗浄液の培養では *P. oralis* が分離され、肺組織の PCR 検査でも少数ながら *Prevotella* 属の *P. intermedia* が検出された。以下に症例 2 例を提示する。

【症例 1】

患者：69 歳、女性。

主訴：発熱、血痰。

既往歴：高血圧症、子宮筋腫。

生活歴：喫煙歴なし、機会飲酒。

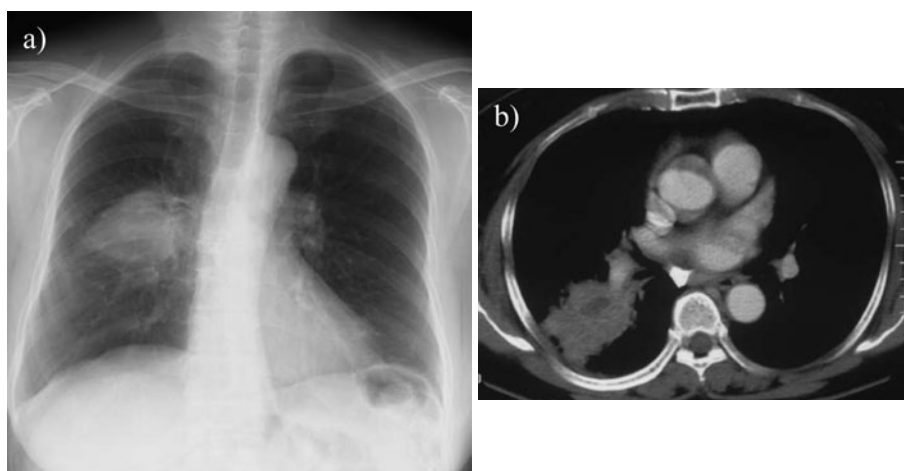


Fig. 1 (a) Chest radiograph on admission, showing a nodular shadow in the right-middle lung field. (b) Chest CT scan on admission, revealing an irregularly shaped mass lesion of the right lower lobe (Case 1).

現病歴：2009年4月11日から感冒症状があり、1週間後発熱、血痰が出現し近医を受診した。胸部CT上右S6に浸潤影を認め肺膿瘍が疑われたが、痰や気管支洗浄液の培養は陰性であった。メシル酸ガレノキサシン (garenoxacin mesilate hydrate: GRNX) 400 mg/日が3週間投与されたが、発熱と血痰を繰り返し、腫瘤影も残存していたため、6月11日当科紹介初診となった。

初診時現症：身長142.0 cm, 体重49.2 kg, 血圧130/70 mmHg, 脈拍73/min (整), 体温36.7°C, SpO₂ 98% (room air), 胸部聴診所見は異常なし。口腔内所見として齲歯と動揺歯を認めたが未治療であった。

入院時検査所見：白血球数11,000/μl (好中球77.7%), 赤沈76 mm/h, CRP 5.2 mg/dl と炎症反応を認めた。血清学的検査では腫瘍マーカーは正常内、カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカスの抗原、β-D-グルカンはいずれも陰性。喀痰の細菌培養、抗酸菌検査も陰性であった。

画像所見：胸部X線では右中肺野に均一な濃度の楕円形の腫瘤影を認め (Fig. 1a), 胸部CTでは右S6に約6 cm大の内部が一部低吸収の腫瘤影を認めた (Fig. 1b)。

臨床経過：気管支鏡検査を施行しTBBと気管支洗浄を行った。病理所見では炎症細胞浸潤と肺胞壁の破壊を認め肺膿瘍と診断した。しかしTBBの組織培養、気管支洗浄液の塗抹・培養検査はいずれも陰性であった。難治性の肺膿瘍と診断、嫌気性菌のほか *Rhodococcus* や *Legionella* の可能性も考え、クリンダマイシン (clindamycin hydrochloride: CLDM) 1,200 mg/日を4週間、クラリスロマイシン (clarithromycin: CAM) 400 mg/日を6週間投与し、第27病日で炎症反応は陰性化した。臨床症状も消失し、胸部X線で膿瘍は著明な縮小を認

めた。その後齲歯治療も行ったところ再発しなかった。

歯周病細菌 PCR 検査：本症例は齲歯と動揺歯を認めたことから、歯周病の感染巣の菌が起炎菌である可能性を疑った。TBB検体を用いて歯周病細菌 PCR 検査を施行し、*T. denticola* が検出された。

【症例 2】

患者：55歳、男性。

主訴：呼吸困難、背部痛。

既往歴：高血圧症。

生活歴：喫煙歴 20本/日×35年間、飲酒歴 日本酒2合・ビール2本/日。

現病歴：2009年8月3日より38°Cの発熱、8月5日から背部痛と呼吸困難が出現したため、救急車で来院し緊急入院となった。

初診時現症：身長158.4 cm, 体重66.7 kg, 血圧110/60 mmHg, 脈拍85/min (整), 体温37.0°C, SpO₂ 96% (room air), 胸部では右呼吸音減弱、吸気時と体動時に背部痛を認めた。

入院時検査所見：白血球数20,700/μl (好中球87.2%), CRP 19.0 mg/dl と炎症反応を認めた。胸水は好中球優位の滲出性で、胸水培養から *S. constellatus* が分離された。

画像所見：胸部X線で右胸水を認め (Fig. 2), 胸部CTで右S5の浸潤影と右胸水を認めた。

臨床経過：入院時に喀痰と胸水を採取した。喀痰培養で *Klebsiella pneumoniae* が検出され、セフトリアキソン (ceftriaxone sodium hydrate: CTRX) 2 g/日 と CLDM 1,200 mg/日を開始した。第7病日に胸水培養から *S. constellatus* が分離され膿胸の併発と診断し、胸水



Fig. 2 Chest radiograph on admission showing right pleural effusion (Case 2).

ドレナージと胸腔内洗浄を施行した。改善を認め第16病日にドレーンを抜去。CTR_XとCLDMを19日間投与した後、アンピシリン/スルバクタム（ampicillin/sulbactam：ABPC/SBT）1,175 mg/日の内服に変更し外来で治療を継続した。退院1週間後にCRPは陰性化し、1ヶ月後の胸部X線では胸水は消失した。

歯周病細菌PCR検査：喀痰から *K. pneumoniae*、胸水から *S. constellatus* を認めたことから誤嚥の関与を疑った。2週間前に歯周治療を受けていたため、胸水検体で歯周病細菌PCR検査を施行したところ、*P. gingivalis* が検出された。

考 察

歯牙、歯周疾患と呼吸器感染症の関連については、Finegold⁵⁾が、嫌気性菌性胸膜・肺感染症143例で基礎疾患・発症誘因を検討し、歯牙・歯周疾患と誤嚥の重要性を指摘している。我が国では古西と三笠⁶⁾が、嫌気性菌性呼吸器感染症の基礎疾患として歯牙・歯周疾患が41%と最多であると報告している。

嫌気性菌性呼吸器感染症における起炎菌同定率の向上のため、以前よりさまざまな検査法が試みられてきた。Bartlettら⁷⁾は、経皮経気管吸引による病巣からの無菌的な検体採取の有用性を報告しており、近年ではCTガイド下病巣穿刺の有用性も示されている⁸⁾⁹⁾。しかしこれらをもってしても、起炎菌同定に至らない症例も存在する。

そこで、抗菌薬投与後の培養陰性例や嫌気性菌、遅発菌、あるいはトレポネーマなどの人工培地での発育困難な菌など、培養診断ができない感染症に対し、大楠と江崎は補助診断としてPCR法による菌の同定を試みて

おり、臨床的に有効性が示されている¹⁰⁾。またKawamiらは細菌感染関連胸水において16S rRNAを用いた網羅的解析を行い、培養法で診断困難な症例でも起炎菌診断が可能であり、またより高い頻度で嫌気性菌を認めたことを報告している¹¹⁾。

歯牙・歯周疾患に罹患した歯周組織の細菌の分布は、正常のグラム陽性通性嫌気性菌主体の分布とは異なり、*P. gingivalis*、*T. forsythensis*、*T. denticola*、*P. intermedia*、*Fusobacterium nucleatum*、*A. actinomycetem-comitans* といった偏性嫌気性グラム陰性桿菌を中心とした菌群が優勢になっている。これらの細菌は歯周炎の発症、進展に特に重要とされているが、誤嚥性肺炎や膿胸、肺膿瘍の病巣でも分離される頻度が高く、病原菌と認識されている。こうした背景から我々は、歯周病細菌PCR検査は嫌気性菌性呼吸器感染症の診断の一助となりうるのではないかと考えた。

当院での病巣の検体を用いた検索では、嫌気性菌培養陰性の6例中、5例でPCR検査が陽性であり、気管支洗浄液の培養で嫌気性菌を認めた1例はPCR検査でも陽性であった。歯周治療直後の抗酸菌症のTBB検体1例、肺癌のTBB検体1例と非感染性の胸水1例で歯周病細菌PCR検査を試みたがいずれも陰性であり、症例数は少ないが細菌感染疾患に特異的に陽性であった。また検体採取に伴う定着菌のコンタミネーションについては、4例の胸水は無菌的に採取しているため問題はないが、TBB検体については、real-time PCRによる定量法での検出菌の総菌数に対する比率が、症例1では10.3%、症例3では42.1%と高く、偽陽性の可能性は低いと思われた。症例7ではPCRでも気管支鏡でも *Prevotella* 属が検出され、口腔内嫌気性菌群が起炎菌であると推測されたが、*P. intermedia* はPCRでの菌数や比率から主要菌ではなく、混合感染あるいは疑陽性の可能性が考えられた。また症例3において病理組織で鏡検されたグラム陰性桿菌が、組織培養では同定できず、PCR検査で *T. forsythensis* を認め、網羅的解析でないため主要な起炎菌と断定はできないものの、検出の有効性は期待できるものと思われた。さらに結果報告までの平均日数が8.3日（7～10日）であり、迅速性の点では従来の嫌気培養と比較して劣らないものであった。培養法は薬剤感受性を確認できるなど細菌感染症には不可欠な検査であり、現時点ではPCR検査は特に嫌気性菌において有用な補助診断と考えられ、また凍結保存検体でも検査できる点からも培養困難な際には施行する価値があると思われる。

さらに、今回の検討で嫌気性菌性呼吸器感染症の発症や進展にかかわると考えられる興味深い所見を2点認めた。一つは、症例2において、培養とPCR法の併用に

より、誤嚥を発症機序とした *S. anginosus* group と *P. gingivalis* の混合感染であったことが示唆されたことである。*S. anginosus* group はしばしば他の嫌気性菌との混合感染における相乗作用が示されており、新里ら¹²⁾はマウス肺炎モデルの研究で、*S. constellatus* と *P. intermedia* の混合感染群では、それぞれの単独感染群に比し、肺病理像の炎症が非常に強く、膿瘍形成率および致死率が有意に上昇したと報告している。症例 2 の結果は、これまで *S. anginosus* group の単独感染と認識されていた症例の中に嫌気性菌との混合感染も含まれていたことを示す 1 例と考えられ、同様の結果は Kawanami らの手法で検索された報告例にもみられる¹¹⁾。

二つ目は、現時点ではヒトにおける病原性が定かではない *T. denticola* が、症例 1 の肺膿瘍の病巣から検出されたことである。*T. denticola* はスピロヘータ科に属する口腔内常在細菌で、発育には TYGVS 培地を用いた嫌気的条件下での培養といった特殊な培養環境を必要とする。細胞附着活性や宿主組織進入能を有し、侵襲性の歯周疾患の病巣で増加していると報告されている。ヒトにおいては *T. denticola* による肺感染症の報告例は文献上みられず病原性が明らかでないが、動物実験では病原性を示唆する報告がある。君塚¹³⁾は、マウスの気管内に *P. gingivalis* と *T. denticola* を混合感染させて、BALF 中の TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカイン産生量が単独感染に比し増加することや膿瘍形成率および致死率が有意に上昇することを報告している。今回、肺膿瘍の病巣から *T. denticola* が検出されたことから、*T. denticola* が肺膿瘍の起炎菌の一つとして働いていた可能性が推測される。かつては *S. anginosus* group や嫌気性菌も口腔内に常在する病原性を持たない菌とされ、後に肺感染症の起炎菌と認識された経緯があり、*T. denticola* のヒトにおける病原性に関しても、臨床的な症例蓄積と微生物学的見地からの検討を進めていく必要があると思われる。

今回、培養診断が困難な呼吸器感染症に対し、歯周病細菌 PCR 検査を用いた同定を行い、有用性を示す結果が得られた。今後さらに症例を蓄積し、嫌気性菌性感染症診断の一方法としての臨床的意義を検討する必要があると考えられる。

謝辞：細菌検査ならびにご助言をいただきました順天堂大学医学部附属浦安病院細菌検査室の中沢武司先生、検査技師の方々に深謝いたします。

引用文献

- 1) 山下裕子, 河野 茂, 田中研一, 他. 嫌気性菌による呼吸器感染症—その検体採取法の検討を含めて—. 感染症誌 1994; 68: 631-63.
- 2) 高松伸博. 歯周初期治療における *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の変動: DNA プローブ法と PCR 法による測定. 口腔病学会誌 1997; 64: 534-543.
- 3) 藤瀬 修. 歯周病細菌遺伝子検査の臨床へのアプローチ—歯周病関連細菌の PCR による定量法の臨床応用 (歯周病細菌遺伝子検査の臨床へのアプローチ). 日本歯周病学学会誌 2001; 43 (春季特別号): 43.
- 4) 上野一恵 (監修). 微生物検査マニュアル—臨床嫌気性菌検査法 '97. 日臨微生物誌 1997; 7 (Suppl 1), 1-115.
- 5) Finegold SM. Lung abscess. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, ed. Principles and Practice of Infectious Disease. 5th ed. New York: Churchill Livingstone. 2000; 751-755.
- 6) 古西 満, 三笠桂一. 偏性嫌気性菌感染症の基礎と臨床—臨床編—呼吸器感染症. 臨床と微生物 2008; 35: 371-5.
- 7) Bartlett JG, Rosenbaltt JE, Finegold SM, et al. Percutaneous transtracheal aspiration in the diagnosis of anaerobic pulmonary infection. Ann Intern Med 1973; 79: 535-40.
- 8) Ghaye B, Dondelinger RF. Imaging guided thoracic interventions. Eur Respir J 2001; 17: 507-28.
- 9) 宮本 篤, 坪井永保, 高谷久史, 他. 経皮的病巣穿刺にて *Haemophilus parainfluenzae* および *Streptococcus intermedius* が分離された肺膿瘍の 1 例. 日呼吸器会誌 2006; 44: 561-6.
- 10) 大楠清文, 江崎孝行. 感染症診断における遺伝子解析技術の適応. 日臨微生物誌 2008; 18: 163-76.
- 11) Kawanami T, Fukuda K, Yatera K, et al. A higher significance of anaerobes: The clone library analysis of bacterial pleurisy. Chest 2011; 193: 600-8.
- 12) 新里 敬, 重野芳輝, 斎藤 厚, 他. 嫌気性菌の "*Streptococcus milleri*" group 呼吸器感染症に及ぼす影響 (第 2 報). 嫌気性菌感染症研 1992; 22: 66-9.
- 13) 君塚隆太. マウス肺炎モデルにおける歯周病原性菌混合感染による病態解析. 歯科学報 2003; 103: 905-11.

Abstract

Clinical evaluation of PCR assays for detection of periodontal bacteria in patients with lung abscesses or empyemata

Kotaro Kadoya^a, Yasuko Yoshioka^a, Yukiko Namba^a, Yoko Katsura^a, Ryo Ko^a, Kengo Koike^a, Masakata Yoshioka^a, Shinichi Sasaki^a, Shigeru Tominaga^a and Kazuhisa Takahashi^b

^aDepartment of Respiratory Medicine, Juntendo University Urayasu Hospital

^bDepartment of Respiratory Medicine, Juntendo University School of Medicine

Current evidence suggests that periodontal disease may be associated with the development of a lung abscess or an empyema. Some microbes, including the *Streptococcus anginosus* group and obligate anaerobic bacteria, are recognized as important pathogens. We analyzed periodontal disease bacteria by polymerase chain reaction (PCR) assays of transbronchial biopsy (TBB) specimens, bronchial lavage fluid (BLF), or pleural effusion obtained from 7 cases (lung abscess, 3; and empyema, 4). In 1 case, anaerobes were isolated from BLF culture, but periodontal pathogens were detected in TBB specimens or pleural effusion by PCR assays in 6 cases (*Porphyromonas gingivalis*, 3; *Tannerella forsythensis*, 1; *Treponema denticola*, 1; and *Prevotella intermedia*, 1). In 1 case *T. denticola* of unknown pathogenicity was detected in the TBB specimens. PCR assays targeting periodontal disease bacteria are potentially useful for identifying the causes of respiratory infectious diseases, which are difficult to diagnose by anaerobic culture.