

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862088

研究課題名(和文) インフルエンザ感染と重症化に及ぼす口腔細菌の影響とその予防に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Study of the effect of oral bacteria on influenza infection

研究代表者

神尾 宜昌 (KAMIO, Noriaki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60546472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス表面のノイラミニダーゼ(NA)は、ウイルス放出時に重要な役割を果たしている。口腔からはNA産生細菌が検出されることから、本研究では、細菌由来のNAがウイルスのNAの働きを助長し、ウイルス放出を促進するか否か検討した。その結果、NA活性を認める細菌培養上清を添加しMDCK細胞にウイルス感染を行うと、ウイルスの放出量が著しく増加した。さらに、細菌由来のNAが抗インフルエンザ薬(NA阻害薬)処理時のウイルス感染に及ぼす影響を検討した。その結果、NA産生細菌培養上清の添加によりNA阻害薬の効果が減弱した。

研究成果の概要(英文)：Influenza virus neuraminidase (NA) cleaves terminal sialic acid residues and promotes the release of progeny virus from an infected cell by destroying host cell receptors and the virus itself. Previous studies have reported the presence of bacterial NA activity in dental plaque fluid and saliva. In this study, we examined the biological effects of oral bacteria on the releases of influenza. Streptococcus oralis and Streptococcus mitis were found to exhibit NA activity and their culture supernatants promoted the release of influenza virus and cell-to-cell spread of the infection. Furthermore, we demonstrated that NA inhibitor zanamivir suppressed the release of progeny viruses from the infected cells, and interestingly, the viral release was restored upon the addition of culture supernatants of NA-producing oral bacteria.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：インフルエンザウイルス 口腔内細菌 ノイラミニダーゼ

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えている我が国では、毎年流行する季節性インフルエンザにより、多くの命が失われている。インフルエンザ予防対策としてのワクチン接種は最も効果の高い手法であるものの、副反応の危険性があるとともに、新型インフルエンザによるパンデミックに対応することは極めて困難である。そのため、高齢者などにも応用でき、ウイルスの抗原変異による影響を受けない予防法の確立は喫緊の課題となっている。

口腔とインフルエンザの関連については『ウイルスの初感染部位が、口腔近傍の上気道粘膜上皮であること』『口腔内には多くのウイルスが排出され、飛沫により感染すること』『1918年に発生し、世界中で2,000~4,000万人が犠牲になったスペインかぜにおいて、何らかの口腔内疾患がある者の罹患率が、健康な口腔内の者に比べ2~3倍高かったこと』などが報告されており、口腔とインフルエンザが密接に関連していると考えられる。またインフルエンザの予防において口腔ケアが有効であるとの報告もある (*Arch Gerontol Geriatr.* 43: 157-164)。しかしながら、口腔領域におけるインフルエンザ研究はほとんど行われておらず、口腔内細菌がインフルエンザウイルス感染にどのように関与しているのか、分子レベルで明らかにされることが期待されていた。

2. 研究の目的

A型インフルエンザウイルスの粒子表面にはヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) がスパイク状に並んでおり、ウイルスの感染・放出に重要な役割を果たしている。ウイルスの感染・放出過程は、まずHAが宿主細胞表面にあるシアル酸残基に結合することから始まる。その後、細胞内に取り込まれ脱殻し、ウイルス核酸およびタンパクを合成、宿主細胞表面にウイルス粒子を出芽する。出芽ウイルス粒子のHAは宿主細胞表面のシアル酸と結合するため、放出時においてNAがシアル酸残基を分解することにより、出芽ウイルスが感染細胞から遊離し、感染が拡大する。

口腔からはNA産生細菌が検出されることから、細菌由来のNAがウイルスNAの働きを助け、ウイルスの放出を促進する可能性がある。そこで本研究ではNA産生口腔内細菌がウイルスの感染に及ぼす影響を分子レベルで解明し、インフルエンザ予防法としての口腔ケアの重要性を証明することを目的と

する。

3. 研究の方法

NA産生口腔内細菌培養上清のNA活性は2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic Acidを用いて測定した。ウイルス感染に対する影響を調べるため、インフルエンザウイルス A/Udorn/72 (H3N2) をイヌ腎臓由来細胞株 (MDCK細胞) に感染させ、NA活性の高い細菌培養上清存在下で培養を行った。培養液中に放出されたウイルス量をブランク法およびウエスタンブロット法により検討した。またウイルス感染細胞数については蛍光免疫染色法およびウエスタンブロット法により検討した。

抗インフルエンザ薬としてNA阻害薬であるザナミビルを用い、口腔内細菌由来NAがNA阻害薬の効果に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 口腔内細菌由来のNAがインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響

NAを産生することが報告されている口腔内細菌19菌株の培養上清中のNA活性を測定した。その結果、*Streptococcus oralis* ATCC 10557と*Streptococcus mitis* ATCC 6249において特に高い活性が認められた(図1)。

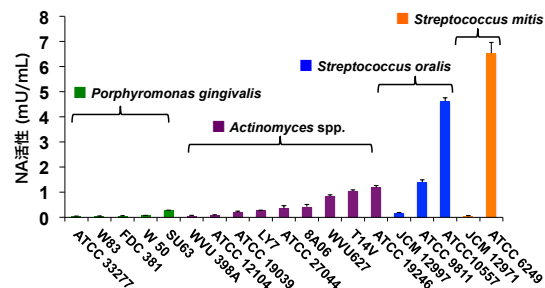


図1 口腔内細菌培養上清中のNA活性

そこで *S. oralis* ATCC 10557 と *S. mitis* ATCC 6249 の培養上清存在下でウイルス感染実験を行った。またネガティブコントロールとしてNA活性がない *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 の培養上清を用いた。

ブランク法の結果、放出ウイルス量は *S. mitis* で非存在下の約28倍、*S. oralis* で約21倍と著しく増加した(図2A)。さらに培養上清中のウイルスタンパクM1の発現をウエスタンブロット法により検討したところ、NA活性を認める細菌培養上清存在下でM1発現の増加が認められた(図2B)。つまり、口腔内細菌由来のNAによりウイルスの放出が促進されたことが示唆された。

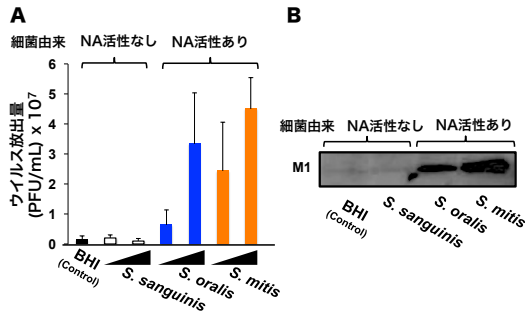


図2 口腔内細菌由来NAがウイルスの放出に及ぼす影響

蛍光顕微鏡による感染細胞数の測定と、ウェスタンブロット法による細胞溶解液中のM1の発現を解析したところ、NA活性を認める培養上清存在下で感染細胞数の増加およびM1の増加が認められた(図3)。以上の結果から、NA産生口腔内細菌によりウイルスの放出が促進され、感染が拡大することが明らかとなった。

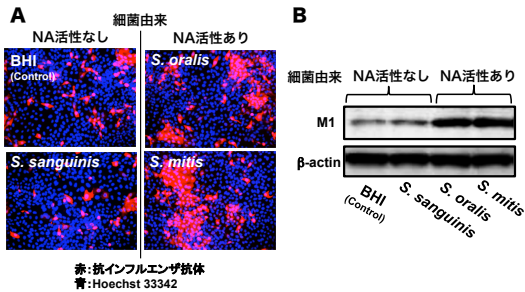


図3 口腔内細菌由来NAがウイルス感染に及ぼす影響

(2) 口腔内細菌由来のNAが抗インフルエンザ薬の効果に及ぼす影響

ザナミビルはウイルスのNA活性を阻害することにより、感染細胞から出芽ウイルスが遊離することを抑制する。そこでザナミビル処理時に細菌由来のNAがウイルス感染に及ぼす影響を検討した。

ザナミビルがウイルスおよび細菌のNA活性に及ぼす影響を検討した。その結果、ザナミビルはウイルスのNA活性を抑制するが、細菌のNA活性に影響を及ぼさなかった(図4)。

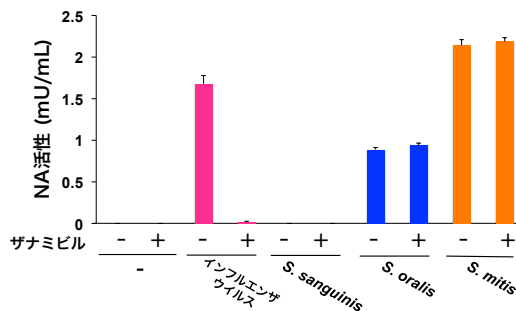


図4 ザナミビルがウイルスおよび細菌のNA活性に及ぼす影響

次にザナミビル存在下でNA活性を認める培養上清を添加し、ウイルス感染実験を行った。培養上清中のウイルス量をプラーク法により測定した結果、NA活性を認める培養上清存在下では、ザナミビルによるウイルス放出抑制効果が著しく減弱した(図5)。

以上の結果から、ザナミビルによりウイルスのNA活性が抑制された場合でも、口腔内細菌由来のNAが代わりに働くことによりウイルスが放出され、薬の効果が著しく減弱することが示唆された。

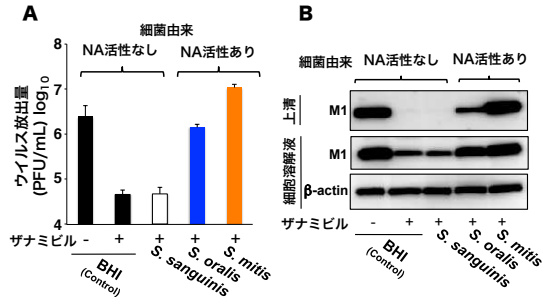


図5 口腔内細菌由来NAがザナミビルの効果に及ぼす影響

本研究において、NA産生口腔内細菌がインフルエンザウイルス感染を増強し、また抗インフルエンザ薬の効果を抑制することが明らかとなった。NA活性が特に高い*S. mitis*および*S. oralis*は口腔フローラ構成菌において優勢な菌種であることから、口腔内細菌を減らすことができる口腔ケアはインフルエンザの感染予防およびNA阻害薬を用いた治療において重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Kamio N, Imai K, Shimizu K, Cueno ME, Tamura M, Saito Y, Ochiai K. Neuraminidase-producing oral mitis group streptococci potentially contribute to influenza viral infection and reduction in antiviral efficacy of zanamivir. *Cell Mol Life Sci.* 72:357-366. 2015 査読有
doi: 10.1007/s00018-014-1669-1
- ② Cueno ME, Kamio N, Imai K, Ohya M, Tamura M, Ochiai K. Structural significance of the β 1K396 residue found in the *Porphyromonas gingivalis* sialidase β -propeller domain: A computational study with implications for novel therapeutics against periodontal disease. *OMICS.* 18:591-599. 2014 査読有
doi: 10.1089/omi.2013.0152.
- ③ Imai K, Kamio N, Cueno ME, Saito Y,

Inoue H, Saito I, Ochiai K. Role of the histone H3 lysine 9 methyltransferase Suv39h1 in maintaining Epstein-Barr virus latency in B95-8 cells. FEBS J. 281:2148-2158. 2014 査読有
doi: 10.1111/febs.12768.

- ④ Nakano Y, Takeshita T, Kamio N, Shiota S, Shibata Y, Suzuki, N, Yoneda M, Hirofuji T, Yamashita Y. Supervised machine learning-based prediction of oral malodor based on the microbiota in saliva samples. Artif Intell Med. 60:97-101. 2014 査読有
doi: 10.1016/j.artmed.2013.12.001.

〔学会発表〕(計16件)

- ① 神尾 宜昌, 今井 健一, 落合 邦康, インフルエンザウイルスは歯周病原菌 *P. gingivalis* により感染性を獲得する, 第88回日本細菌学会総会、平成27年3月26日、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)
- ② 神尾 宜昌, 今井 健一, 清水 一史, 落合 邦康, 口腔細菌 *Porphyromonas gingivalis* 産生プロテアーゼによるインフルエンザウイルス感染性の賦与, 第62回日本ウイルス学会学術集会、平成26年11月11日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)
- ③ 神尾 宜昌, 今井 健一, 落合 邦康, ノイラミニダーゼ産生口腔レンサ球菌は、インフルエンザウイルス感染を促進する, 第97回日本細菌学会関東支部総会、平成26年10月31日、東京ドームホテル(東京都・文京区)
- ④ 神尾 宜昌, 今井 健一, 齋藤 夕子, 落合 邦康, *Porphyromonas gingivalis* のインフルエンザウイルスの感染性獲得に関与する, 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、平成26年9月26日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
- ⑤ 神尾 宜昌, 今井 健一, Marni Cueno, 田村 宗明, 落合 邦康, ノイラミニダーゼ産生口腔細菌はインフルエンザウイルス感染を促進する, 第63回日本口腔衛生学会・総会、平成26年5月31日、熊本市国際交流会館(熊本県・熊本市)
- ⑥ 神尾 宜昌, 今井 健一, 田村 宗明, Marni Cueno, 齋藤 夕子, 落合 邦康, 口腔細菌はインフルエンザウイルス感染を促進する, 第87回日本細菌学会総会、平成26年3月27日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)
- ⑦ 神尾 宜昌, 今井 健一, 田村 宗明, Marni Cueno, 落合 邦康, 口腔細菌がインフルエンザウイルス感染および重症化へ及ぼす影響, 第47回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、平成26年1月31日、アルカディア市ヶ谷(東京都・千代田区)
- ⑧ 神尾 宜昌, 今井 健一, 田村 宗明, Marni Cueno, 清水 一史, 落合 邦康, 口腔細菌のインフルエンザウイルス感染

促進と重症化に及ぼす影響, 第61回日本ウイルス学会学術集会、平成25年11月11日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

- ⑨ 神尾 宜昌, 今井 健一, 田村 宗明, Marni Cueno, 落合 邦康, 口腔細菌のインフルエンザウイルス感染促進作用, 第55回歯科基礎医学会学術大会、平成25年9月22日、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/microbiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神尾 宜昌 (KAMIO, Noriaki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60546472