

# インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の 機序と呼吸器疾患重症化の病態の解明

山本樹生<sup>1)</sup>, 黒田和道<sup>1)</sup>

## Study on the mechanism of exaggeration by both influenza virus and oral/respiratory tract bacteria and the pathogenesis of exaggeration for respiratory disease

Tatsuo YAMAMOTO<sup>1)</sup>, Kazumichi KURODA<sup>1)</sup>

### 要旨

2010年より開始された本プロジェクトも4年目を迎えた。インフルエンザの脅威は、2009年のブタより由来した新型インフルエンザの流行以降も収まっていない。H1N1 (2009) ウイルスによるパンデミックでは、高齢者の感染例は少なかったものの、発症高齢者における死亡率は高かった。次期パンデミックでの高齢者への被害が危惧される。2003年に始まったH5N1強毒トリウイルスによるヒトへの感染は致死率が高いまま今も続いている。本年(2013年)の春には、これまでヒトへの感染が知られていなかったH7N9ウイルス感染による死亡例(37名)が中国で報告され、注目を集めた。これが新たなパンデミックに繋がらない保証はない。このような状況下での本プロジェクト研究の重要性は明確であり、着々と成果を上げつつある。ここにこれまで得られた成果の概要をまとめた。

### 1. 研究プロジェクトの概要

高齢罹患率において、インフルエンザの重症化率・致死率が著しく高まることが知られている。インフルエンザ以外の呼吸器疾患においても高齢化の影響は大きい。したがって、世界史上かつてない高齢化社会を迎えている日本では、インフルエンザなどの呼吸器疾患に対する有効な対策の確立は喫緊の課題と考えられる。本プロジェクトは、インフルエンザを中心に呼吸器疾患の病態悪化の機構を解明することで、それらに対する有効な対策を提案することを目的として平成22年より開始されたものである。これまで、インフルエンザウイルスが、常在細菌叢の存在する鼻腔・口腔から感染することから、ウイルス・常在細菌・宿主の3者が動的生態系を形成する点に着目し、以下に大別される研究を行ってきた。

I. インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌および体液中ウイルス感染阻害因子との相互作用の解

明

II. インフルエンザ重症化の病態解明

III. 口腔管理(口腔ケア)のインフルエンザ対策としての有効性の検証

以下に、これまでのプロジェクト進捗状況の概要を紹介する。

### 2. 研究プロジェクト遂行の概要・進捗状況

本プロジェクト前半期における最重要課題は口腔・気道の細菌や体液中阻害因子がインフルエンザウイルス感染にどのような影響を与えるかを明らかにすることである。この目的は下記のようにほぼ達成された。インフルエンザ重症化のメカニズムに関しても重要な知見が得られつつある。

I. インフルエンザウイルスと口腔・気道細菌との相互作用の解明

インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ(NA)はウイルスのHAが認識して吸着する細胞上

1) 日本大学医学部  
山本樹生: yamamoto.tatsuo@nihon-u.ac.jp

のレセプターを破壊する酵素活性を持つ。これにより子孫ウイルスは感染細胞から遊離し、感染を新しい細胞に広げることができる。また、体液中に含まれるレセプター様物質を破壊する役割も担っている。現在広く処方されている、タミフルやリレンザなどはインフルエンザNAの特異的な阻害薬であり、これらの働きを抑えることにより抗ウイルス効果を発揮する。注目すべき点として、一部の細菌がインフルエンザNAと酵素学的に同様なノイラミニダーゼ活性を持つタンパク質を分泌することが挙げられる。この細菌NAのインフルエンザウイルス感染での役割を解明する目的で、まず、細菌由来NAが、NA阻害薬存在下でウイルスの増殖を回復することができるかどうかを検討した。

ノイラミニダーゼ分泌口腔・気道細菌の同定：

ヒト口腔および上気道に存在する13菌種33菌株の培養上清のノイラミニダーゼ活性を測定し、7菌種8菌株で活性を検出した。図1表1

Sample	Neuraminidase activity		Calculated original activity	
	Dilution	Signals* ± SD <sup>b</sup>	μunit/ml <sup>c</sup> ± SD <sup>b</sup>	Ratio to A/Udorn
Arthro bacter ureofaciens neuraminidase (1 unit/ml)	×10,000	69,258 ± 1,262	1,000,000	2,300
Vibrio cholerae culture supernatant (RDE)	×100	25,592 ± 9,516	3,700 ± 1,400	8.5
Streptococcus pneumoniae culture supernatant	×1	89,954 ± 4,574	130 ± 6.6	0.30
Human saliva	×1	33,283 ± 1,994	48 ± 2.9	0.11
Bjohm-Hamburg/99 virus (1:10 HAU/ml)	×250	39,026 ± 1,230	14,000 ± 440	32
Kilidoni/72(H2N2) virus (3:20 HAU/ml)	×10	30,303 ± 926	440 ± 13	1.00

表1 Comparison of neuraminidase activities with those of A/Udorn/72 virus.

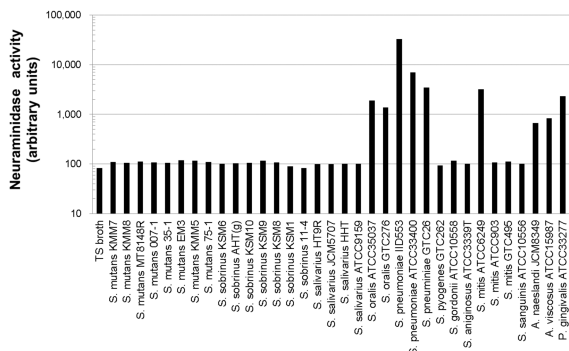


図1 Screening of neuraminidase -secreting oral and upper respiratory bacteria.

肺炎球菌では特に高く、インフルエンザウイルス感染細胞上清と同レベルのノイラミニダーゼ活性を示した。インフルエンザNA阻害薬ザナミビルはインフルエンザウイルスNAに非常に特異性が高く、IC50は、ウイルスNAに対しては1 nM前後、細菌由来ノイラミニダーゼに対してはその百万倍の1 mM前後であった。

細菌由来ノイラミニダーゼによるインフルエンザウイルスNAの代役：

ザナミビルは、感染細胞からの増殖ウイルスの放出に働くウイルスNA活性を阻害し、細胞から細胞へのウイルス感染の伝播を抑制する。その結果、ウイルス産生は抑制される。ここにザナミビルで阻害されない肺炎球菌由来ノイラミニダーゼを添加すると感染の伝播やウイルス産生が回復した。細菌ノイラミニダーゼがウイルスNAの代わりにウイルス放出に働くことが示された。

唾液中インフルエンザウイルス阻害物質：

ヒト唾液中にインフルエンザウイルスのHA活性および感染性を抑制する物質が存在すること、さらに、この抑制活性はノイラミニダーゼ処理感受性であり、ウイルスや細菌のノイラミニダーゼ活性により失活することを明らかにした。ウイルスNA活性が抑制されるザナミビル存在下では、唾液の感染性中和活性は薬剤非存在下に比べて著しく増強された。しかし、ザナミビルにより阻害されない細菌ノイラミニダーゼを加えると感染中和活性は著しく減少した。インフルエンザの治療に広く用いられているインフルエンザウイルスNA阻害薬の効果に、ウイルス放出阻害作用に加えて、唾液中中和活性の増強作用が寄与していることが示唆された。

インフルエンザウイルスNA阻害薬の効果に対する細菌由来ノイラミニダーゼの影響：

インフルエンザウイルスNA阻害薬存在下で細菌由来ノイラミニダーゼがウイルスNAの役割を果たし、ウイルスの増殖を助けることが明らかにされた。NA阻害薬の効果は細菌由来ノイラミニダーゼ存在下では著しく減弱することになり、薬剤投与時の口腔管理による細菌対策の重要性が示唆された。

鼻粘液の抗インフルエンザウイルス活性：

鼻粘液中にインフルエンザウイルスに対する赤血球凝集抑制活性および感染中和活性があることを明らかにした。これらは唾液中のものより約10倍活性が高く、ノイラミニダーゼ処理感受性で熱安定性であった。電気泳動により4種類のウイルス結合性タンパク質が検出された。

NAおよびHA遺伝子上の連動変異による機能的新型インフルエンザウイルスの出現：

一人のインフルエンザ感染患者の中で、通常HAに担われているレセプター結合活性がNAに担われている全く新しい型のウイルスが出現したことを明らかにした。NAはD151N変異によりレセプター結合能を獲得した。これに連動してHAにL221P変異が起こり、HAはレセプター結合能を喪失し、同時に粘液中のウイルス阻害物質に対する抵抗性を獲得した。このようなウイルス進化の原動力は細菌由来のノイラミニダーゼと粘液中のインフルエンザウイルス阻害物質であることが考えられた。

## II. インフルエンザ重症化の病態解明

NS1 遺伝子点突然変異による弱毒性インフルエンザウイルスの強毒化：

インフルエンザウイルスを感染させた重度免疫不全NOGマウスでは、ウイルス増殖が長期間持続し、最終的に肺での増殖性を増大した変異ウイルスが出現し、マウスは致死に至ることが明らかとなった。この時いずれのマウス個体でも、ウイルス変異はNS1 遺伝子上に見いだされた。これらの変異は、宿主mRNA前駆体ポリA部位切断反応の抑制に係わるNS1のCPSF30結合ドメインに生じていた。このことはウイルスの増殖性や病原性がNS1により制御されていることを強く示唆している。

強毒インフルエンザウイルスによるサイトカイン産生の亢進：

重度免疫不全NOGマウスのインフルエンザウイルス感染において、強毒変異ウイルスの出現に伴ってサイトカイン産生の亢進が見られた。特にLIFとIL-12では顕著であった。強毒変異は宿主細胞の遺伝子の発現を抑制するウイルスNS1の機能喪失変異であることが示唆された。

選択的スプライシングの誘導：

インフルエンザウイルスのNS1がポリA部位切断反応を阻害することで選択的スプライシングを引き起こし、下流の遺伝子の発現を誘導することを見出した。この現象によりプリオン遺伝子の約20 kbp下流に位置するドッペル遺伝子の発現がインフルエンザウイルス感染により異常に亢進することが示された。

合併症：

インフルエンザ脳症の病態として、髄液中のIL10やTNF  $\alpha$ の上昇を伴わないIL6の上昇が観察された。またインフルエンザ感染後に抗GQ1b抗体陽性を伴うミラー・フィッシャー症候群やオプソクロヌス・ミオクロヌス症候群の合併が新たに認められた。

タイトジャンクションの関与：

感染の重症化因子として、上皮細胞間のタイトジャンクションがTLR3/TRIF経路を介して障害を受けること、NDRG1の機能の変調がこの障害に関与することがわかった。逆にステロイドやTLR9リガンドがタイトジャンクション形成促進作用を持ち、治療に資する可能性が示唆された。

宿主応答：

感染応答遺伝子UBE2L6およびIFIT1の過剰発現によるインフルエンザウイルス増殖の抑制が示された。ウイルス感染でおこる小胞体ストレスに対する応答としてIntegrated stress responseがあるが、その活性分子候補としてZCCHC12を同定した。5FU, LPSなどによるバイオストレス存在下において骨髄と脾臓の肥満細胞造血が異なる反応を示し、ストローマ細胞による調節機構の違いが示唆された。絨毛系細胞において抗 $\beta$ 2-GPI抗体に対するTLRによる過剰な応答を認め、流産や胎児発育不全などとの関連が示唆された。この際に、STAT系、NF $\kappa$ Bなどの関与が示唆された。TLR4を介した子宮内膜症・PGE2による免疫抑制・骨盤腔感染症の悪循環経路が浮かび上がった。妊娠高血圧腎症においてsoluble endoglin高値とheme oxygenase 1活性低下、eNOS活性低下の関与が示唆された。

遺伝子発現変化：

マイクロアレイ解析から、喫煙において酸化ストレス応答・炎症・サーカディアンリズムに関連する遺伝子の変動が見られ、インフルエンザ重症化との関連が示唆された。VDRとI $\kappa$ B $\alpha$ 発現などの関連が見られ、炎症性反応への関与が示唆された。

Ⅲ. 口腔管理（口腔ケア）のインフルエンザ対策としての有効性の検証

インフルエンザ罹患者の口腔内細菌：

インフルエンザ罹患者の咽頭ぬぐい液中のインフルエンザウイルスと細菌の解析を行った。ウイルス分離と細菌の総数および菌種のあいだに特定の相関は見いだせなかった。

口腔ケアによるインフルエンザ罹患率の減少：

口腔ケアにより口腔内細菌数が顕著に減少し、細菌数の減少とインフルエンザ罹患率の減少の相関性が特別養護ホームにおける連携疫学調査（日本歯科医師会日本歯科総合研究機構）で示された。

Ⅳ. その他の関連研究

カリン中ポリフェノール画分による新型インフルエンザウイルスの感染抑制効果：

カリンに含まれるポリフェノールが2009年に出現したブタ由来新型インフルエンザウイルスの感染抑制活性を持つことを明らかにした。

インフルエンザウイルスの動物種特異性：

HAタンパク質のB-loopの88番目のアミノ酸残基が種トロピズムに関与することを明らかにした。

ウイルス宿主相互作用：

インフルエンザウイルスM1タンパク質が、そのN末端領域中のループ構造を介して核内構造物ND10 (PML body, PODs) へ集積することを明らかにした。C型肝炎ウイルス (HCV) 非構造タンパク質4B (NS4B) がN及びC両末端領域の両親媒性ヘリックスを介して脂肪滴膜へ結合し、ウイルス粒子産生に重要な役割を果たすことが明らかになった。HCVゲノムマイナス鎖がタンパク質発現制御に関連する可能性が示唆された。また細胞膜セリンプロテアーゼTMPRSS2がHCV感染の制御に関与していることを明らかにした。HCV感染肝におけるウイル

ス量や発癌母地候補としての胆管増生などに関連するタンパク質群が同定された。HCV感染における鉄・亜鉛などの微量元素の影響を臨床的に検討するとともに、*in vitro* 実験系においてメカニズムを検討した。

以上述べたように多くの成果が既に得られているが、特に、細菌由来ノイラミニダーゼがインフルエンザウイルスのNAの働きを代行し得ることを明らかにしたことは特筆すべきと考えられる。これはウイルスの病原性にも関わり、また現在広く処方されている抗インフルエンザNA阻害薬を効果的に使用するために決定的に重要な知見である。さらに、細菌の減少を伴う口腔ケアがインフルエンザ対策になり得るウイルス学的な根拠になり、実用的な意義も大きい成果と考える。

3. 今後の展望 - 次年度に向けて -

今後行う必要がある重要な研究として、インフルエンザウイルス感染に対する細菌由来ノイラミニダーゼの効果を動物モデルで実証することがある。この点に関しても、既に予備実験を行っており、技術的な点では問題はないと考えている。その他の研究に関しても、現在の方向性でさらに研究を進展させるとともに、得られた知見を統合し、新たなインフルエンザ対策を確立することを目指したい。

本プロジェクトにおける研究の中から、ウイルス、細菌、宿主細胞の3者がお互いの遺伝子の発現に影響を与えながら共生関係を築いている様が見えてきた。今後はこのような3者の共生関係の解明に重点を置き、関係性の中で出現する感染症重症化の原因解明とその制御を目指した研究がさらに発展することが期待される。

4. 今年度の研究発表

(学会発表)

西川智子, 山崎元美, 長谷川 央, 豊澤恵子, 山本樹生, 池田 稔, 濱田良樹, 清水一史: インフルエンザウイルス増殖に対する細菌ノイラミニダーゼの影響, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪国際会議場, 2012. 11

他 全126件

(論文)

Nishikawa T, Shimizu K, Tanaka T, Kuroda K,  
Takayama T, Yamamoto T, Hanada N, Hamada Y.  
Bacterial neuraminidase rescues influenza virus rep-

lication from inhibition by a neuraminidase inhibitor.  
PLoS One. 2012; 7 (9): e45371.

他 全57件