

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462806

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス 口腔細菌混合感染による致死的感染症発症とその機構

研究課題名(英文) Mechanism of invasive diseases by superinfection with influenza virus and oral Streptococcus

研究代表者

岡本 成史 (OKAMOTO, Shigefumi)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：50311759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザAウイルス(IAV)と肺炎レンサ球菌などのレンサ球菌との複合感染は、その感染症を重症化させることが知られている。一方、病原性が弱い細菌と考えられている口腔レンサ球菌も病原性の強い他のレンサ球菌とゲノム相同性が高いことが知られ、口腔レンサ球菌とIAVとの複合感染による病原性が重症化の可能性が考えられる。

本研究では、インフルエンザウイルスと口腔レンサ球菌のひとつであるStreptococcus sanguinisとの複合感染により肺炎による症状の重症化が認められることを明らかにし、その原因としてIAV感染細胞でのgp96発現上昇とそれによる細菌の細胞への付着能増強が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Superinfection with influenza A virus (IAV) and streptococci such as Streptococcus pneumoniae is known to cause severe infection. On the other hand, it is known that oral streptococci considered to be a low-pathogenic bacteria have high genomic homology with other pathogenic streptococci, thus, it is possible that superinfection with oral streptococci and IAV leads to invasive infections.

In this study, we showed that superinfection with IAV and one of the oral streptococci, Streptococcus sanguinis occurs severe pneumonia. It is suggested that the severe disease is caused that the enhanced gp96 expression in IAV-infected alveolar epithelial cells induces enhanced adhesion of S. sanguinis to the IAV-infected cells.

研究分野：細菌学

キーワード：並行感染 口腔レンサ球菌 インフルエンザウイルス 感染症重症化 付着

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザによる死因のひとつに細菌の二次感染による呼吸器疾患の重症化が挙げられる。その原因細菌として、レンサ球菌属、ブドウ球菌属、ヘモフィルス属の各細菌があるが、その中でもレンサ球菌属の肺炎レンサ球菌、A群レンサ球菌、B群レンサ球菌は、特に二次感染による重症化症例によく認められる細菌である。また、A群レンサ球菌については、インフルエンザ A ウイルス (IAV) との複合感染による劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症が報告されており、重篤な全身感染症に波及する可能性が示唆されている。

我々は、マウスへの IAV と A 群レンサ球菌との経鼻複合感染により、劇症型 A 群レンサ球菌感染症を発症することを明らかにし、その原因として、インフルエンザウイルス感染肺胞上皮細胞への A 群レンサ球菌の付着・侵入能の増強によることを明らかにした。A 群レンサ球菌は他のレンサ球菌とゲノム相同性が高いことが知られており、インフルエンザウイルスの感染経路である口腔領域に広く生息する口腔レンサ球菌においても A 群レンサ球菌同様に複合感染による感染症の重症化が考えられる。しかし、本来病原性の低い口腔レンサ球菌がインフルエンザウイルスとの重複感染により、重篤な感染症を惹起させるか否か不明であり、またそのような臨床報告も見当たらない。

2. 研究の目的

本研究では、マウスに非致死量の口腔レンサ球菌と IAV を経鼻並行感染させ、感染後のマウス感染症の重症化の有無を明らかにする。また、重症化が認められた場合、その原因について解析する。

3. 研究の方法

1) 実験動物、病原体

マウスは SPF 環境下で飼育した BALB/c マウス (6-8 週齢、雌) を使用し、感染動物実験区域 (ABSL2) にて供試された。動物実験ならびに飼育においては、金沢大学動物実験規程を遵守し行った。病原体として、IAV は A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1) を、細菌は、*Streptococcus pyogenes* (SSI-1 株; M3)、*S. pneumoniae* (D39 株)、*S. mutans* (MT8148 株)、*S. sanguinis* (SK36 株)、*S. salivarius* (ATCC10556 株) を用いた。

2) 動物感染実験

麻酔下においてマウス鼻腔より、IAV を 2×10^4 TCID₅₀ 感染させ、その 2 日後に各種細菌を 10^9 cfu 感染させた。その後のマウスの体重変化、行動状態、立毛の有無などの変化について観察した。

3) マウス肺における細菌数の測定

IAV 感染し、その 2 日後に細菌感染させたマウス肺を細菌感染 48 時間後に取り出した。その肺を PBS 存在下で摩砕、その摩砕液を寒天培地に播種し、24 時間培養後の細菌数のコロニー数を測定した。

4) インフルエンザウイルス感染による肺胞上皮細胞への細菌の付着能の変化

24 穴マルチプレートにて培養し、作製したヒト肺胞上皮細胞株 A549 単層シートに IAV を 2×10^5 TCID₅₀ 感染させ、36 時間培養する。培養後各種細菌を 1×10^9 cfu 播種し、播種 2 時間後に培地を取り除いて 2 回 PBS にて細胞洗浄を行った。その後、滅菌蒸留水を各穴に入れて細胞を破壊し、その溶液を寒天培地に播種し、コロニーカウントした。付着数評価は、A549 1 細胞あたりの付着細菌数を算定することによって行った。

5) gp96 インヒビターによるウイルス感染細胞表面層の gp96 発現抑制法

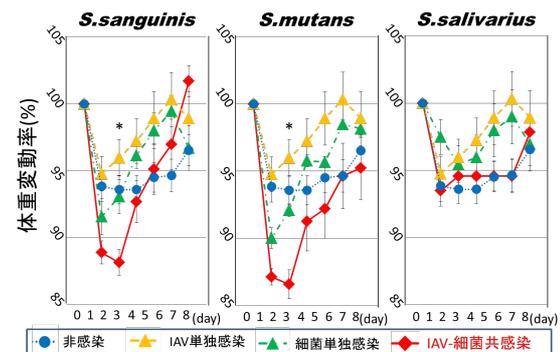
gp96 インヒビターである、PU-WS1350 μ M を A549 への IAV 感染と同時に添加し、36 時間培養した。その後、上記 4) の方法に従って細菌播種、再培養することにより、細胞に付着する細菌数の変化を観察した。

4. 研究成果

インフルエンザウイルスと口腔レンサ球菌の混合感染マウスモデルを作成し、その体重減少率を調べた。マウスにインフルエンザウイルスを感染後、口腔レンサ球菌である *Streptococcus sanguinis*, *S. mutans*, *S. Salivarius* を感染させたところ、*S. sanguinis* と *S. mutans* を感染させたマウスの体重が有意に減少した。(図 1)

図 1 混合感染マウスの体重減少率

インフルエンザウイルス感染後 3 日目のマウス肺内のウイルス感染価と生菌数を求めた。



その結果、有意差を認めなかったものの、インフルエンザウイルスと *S. sanguinis* 混合感染により肺内の生菌数の若干の上昇がみられた。(図 2)

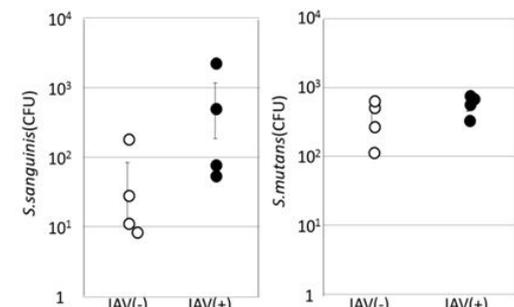


図 2 混合感染マウス肺中の細菌数、インフルエンザウイルス感染価

次に A549 細胞を用いて、インフルエンザウイルス感染細胞への細菌の付着・侵入率を求めた。その結果、インフルエンザ感染により *S.sanguinis* の細胞への付着・侵入率が上昇した。(図 3)

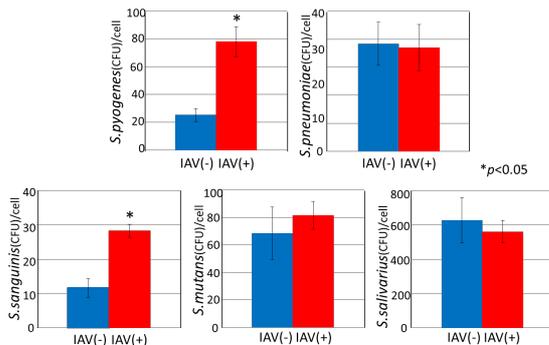


図 3 インフルエンザウイルス感染による肺胞上皮細胞への細菌の付着能の変化

インフルエンザウイルス感染時に gp96 インヒビターである PU-WS13 を添加し、*S.sanguinis* の付着・侵入率の変化を検討した。その結果、PU-WS13 を添加することにより、インフルエンザウイルス感染細胞への *S.sanguinis* の付着・侵入率がインフルエンザウイルス非感染細胞と同程度に低下した(図 4)

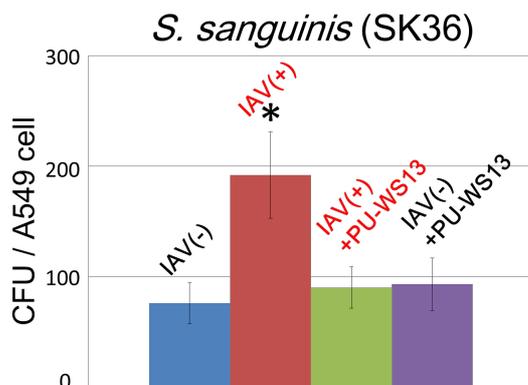


図 4 PU-WS13 による付着・侵入率の変化

以上の結果より、口腔レンサ球菌である *S.mutans* と *S.sanguinis* をインフルエンザウイルス感染マウスに感染させると体重が有意に減少し、肺炎の症状を呈した。また、インフルエンザウイルス感染肺胞上皮細胞に *S.sanguinis* を接種することにより、*S.sanguinis* の細胞への付着・侵入率が上昇した。さらに、インフルエンザウイルス感染により細胞表面に発現する gp96 が *S.sanguinis* の付着・侵入能の上昇に関連していることが示唆された。今後は gp96 に結合する *S.sanguinis* 側の付着因子を同定し、インフルエンザウイルスと *S.sanguinis* との混合感染による肺炎発症のメカニズムの詳細を明らかにする予定である。

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 3 件)

1. Yamada H, Nagase S, Takahashi K, Sakoda Y, Kida H, Okamoto S. Toll-like receptor 9 ligand D-type oligodeoxynucleotide D35 as a broad inhibitor for influenza A virus replication that is associated with suppression of neuraminidase activity. *Antiviral Research* 129:81-92, 2016. doi: 10.1016/j.antiviral (査読あり)
2. Yamada H, Nagao C, Haredy AM, Mori Y, Mizuguchi K, Yamanishi K, Okamoto S. Dextran sulfate-resistant A/Puerto Rico/8/34 influenza virus is associated with the emergence of specific mutations in the neuraminidase glycoprotein. *Antiviral Research* 111(2):69-77, 2014. doi: 10.1016/j.antiviral (査読あり)
3. Haredy AM, Yamada H, Sakoda Y, Okamoto M, Yamamoto N, Omasa T, Ohtake H, Mori Y, Kida H, Okamoto S, Okuno Y, Yamanishi K. Neuraminidase gene homology contributes to the protective activity of influenza vaccines prepared from the influenza library. *Journal of General Virology* 95(11): 2365-2371, 2014. doi: 10.1099/vir.0.067 488-0 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 岡本 成史. インフルエンザウイルスとレンサ球菌属との共感染による劇症型感染症発症に関する研究動向. 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 24 日, 大阪国際交流センター(大阪府大阪市).
2. 岡本 成史. パンデミックに即応しうるインフルエンザワクチンデザイン. 第 10 回霊長類医科学フォーラム, 2014 年 11 月 13 日, 文部科学省研究交流センター(茨城県つくば市).

〔図書〕(計 2 件)

1. 岡本成史. 感染症の基礎 感染症の制御 3. ワクチン. *メディカルサイエンス微生物検査学<第二版>* 太田敏子、岡崎充宏、金森政人、古畑勝則、松村充、山本容正編、近代出版、420 (pp.78-81), 2016.
2. 杉谷加代、千田靖子、岡本成史. 感染症の検体検査 消化器感染症. *メディカルサイエンス微生物検査学<第二版>* 太田敏子、岡崎充宏、金森政人、古畑勝則、松村充、山本容正編、近代出版、420 (pp. 334-342), 2016

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://sokamoto-lab.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6．研究組織

(1)研究代表者

岡本 成史 （OKAMOTO, Shigefumi）

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：50311759

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし