課題番号	総２１－０４０１

【様式５総合研究】

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和６年４月３０日

氏　　名：　　佐藤　佑介

所属・資格：　　商学部・准教授

実施研究所：

1　研究課題

アスリートのための次世代型バーチャルリアリティ・トレーニングシステムの開発

2　研究期間

令和３年度　～　令和４年度

※令和３年度　～　令和５年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏　　名	部科校・資格	役割分担
研究代表者	佐 藤 佑 介	商学部・准教授	研究の統括 生理・心理指標評価
研究分担者	水 島 宏 一	文理学部・教授	VR トレーニングの作成と応用 アスリートのパフォーマンス評価
	西 川 大 輔	スポーツ科学部・教授	アスリートのパフォーマンス評価 選手へのフィードバック
	遠 藤 幸 一	商学部・教授	VR 用映像撮影の統括 VR 環境の構築
	髙 寄 正 樹	生産工学部・准教授	脳活動，生理指標の解析と評価
	深 見 将 志	商学部・准教授	VR 環境の構築 VR を利用しての選手への介入
	越 澤 亮	経済学部・専任講師	脳活動評価と統計処理

※**ホームページ等での公開（☑可・□否）**いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。

課題番号	総２１－０４０１

4　現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として，以下の区分より自己評価を行ってください。
＜区分＞①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：②】・【達成度：９０%】

5　研究目的

本研究の目的は，アスリートが競技大会でより良いパフォーマンスを発揮するための心理的スキルの獲得を目指し，自由に移動可能な VR 空間を利用したトレーニング法(次世代型 VR トレーニングシステム: Innovative Virtual Reality Training System)(以下，iVRTS とする)を開発することであった。以下，本研究の具体的な目的である。

1. 実際の競技会場を自由に移動可能な VR 空間を構築する。
2. 構築された VR 環境が，アスリートの生体情報におよぼす影響を明らかにする。
3. iVRTS を利用してメンタルトレーニングを行った選手が実際の競技場面においてどのようなストレス反応を示すかを明らかにする。

これらの目的を達成することは，スポーツ現場における課題解決につながる。その 1 つが，メンタルトレーニング（以下，MT とする）が実践される場面と，緊張をともなう実際の競技場面の乖離である(笹塲ほか, 2016)。構築した VR 環境により実際の競技場面と同様のストレス反応を選手に喚起させ，競技場面で生じるストレスへの対処方略の獲得といった心理的スキルの向上をねらう。

iVRTS が持つ利点はその他にも挙げられる。例えば，通常では繰り返し経験できない環境を，その制限なしに体感できることにある。アスリートはこのシステムを通して，身体的疲労の回復を図りつつスキル向上を図れたり，負傷の危険性が皆無である VR 空間で，自身が望む環境を繰り返しトレーニングできたりする。単に心理的スキルの向上につながるだけでなく，トレーニングへの動機づけにも肯定的な影響を与えることが期待される。

6　研究概要

バーチャルリアリティ(Virtual Reality)(以下，VR とする)を利用したメンタルトレーニングは，アスリートのパフォーマンス向上につながる可能性をもつ。申請者らは，その科学的根拠を蓄積し始めている(深見, 2019)。しかしながら，既存の VR 空間を利用した MT には没入感を高めることが課題として挙げられている(Frank, 2020)。本研究では，この没入感が向上したシステムを構築し，それを MT に応用する。

本研究では，　実際の競技会場を基に視聴者が移動可能な VR 環境を構築し，それを利用したトレーニング法(iVRTS)を開発した。1 年目には環境の構築を達成し，2 年目にはそれを利用した MT を行うことで，その効果を検証した。 3 年目には，それまでの成果を整理するとともに発表を進めた。

開発された新たなトレーニング法がアスリートに対する MT として機能することが示された。今後はこの成果を，バイオフィードバック法を用いたトレーニング手法へ応用することを見据えている。

7　研究結果（4,000 字以上記入のこと）

３か年にわたり研究を展開することによって，３つの目的を達成するに至った。それぞれについての成果を報告する。

1．有明体操競技場を基にした移動可能な VR 空間の構築とこの環境が喚起する生体反応の取得

まずは，iVRTS の基盤となる VR 環境を構築した。2020 年東京オリンピック・パラリンピック競技大会（以下，「オリンピック」とする）における体操競技場であった有明体操競技場を VR 空間として再現できた。この VR 空間は，実際の体操競技場とほぼ同様の設備が再現され，参加者は指定された範囲において自由に動くことで競技場を観察できるよう設計された。本来，アクセスすることが困難であるオリンピックの会場を VR 空間として記録することができたのは，東京オリンピック・パラリンピック組織委員会の体操スポーツマネージャーであった遠藤幸一准教授が本研究グループの一員だったからである。

このようにして構築された VR 空間を，男子大学体操選手に視聴してもらった。没入感の高さに関わる評価も高かった。また，選手から得られた内省報告としても，「映像と分かっていても，自分の動きと連動するので，現実と区別しづらく感じた」などが挙げられた。本研究で用いられた VR 空間が，頭部の動きに合わせて追従する映像の視聴を可能としていたからであろう。これらのことから，このシステムが従前の VR 空間よりも高い没入感を有していると評価することができる。

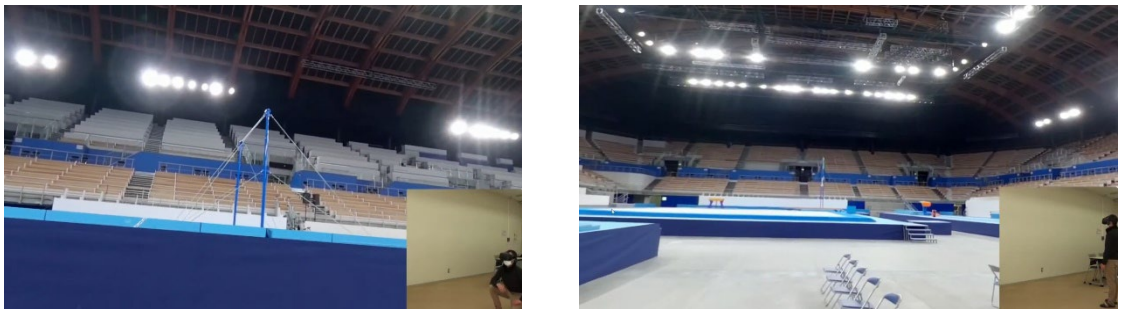


図 1　構築された有明体操競技場の VR 空間
視聴者は会場を自由に見まわすことができる。

この VR 空間が，視聴者にどのような心理的変化を生じさせるかを評価することも試みた。体操選手に協力してもらい，VR を利用している際の生体情報を取得した。利用された生体情報は，心拍変動，精神性発汗および脳波であった。それぞれを利用することにより，自律神経活動や中枢神経活動の変化を捉えることができる。視聴される VR 空間として有明体操競技場に加え，実験を行った大学の教室も利用された。

実験の結果，教室と有明体操競技場を再現した VR 映像を視聴した際の生体反応には顕著な違いが見られなかったため，VR の種類に関わらず同様の生体反応が得られることが示された。具体的には，心拍変動の解析から副交感神経の亢進が，精神性発汗の解析からは交感神経の亢進が確認された。視覚的な注意が必要となる VR 視聴では，心拍数が上昇しにくい（長

〔7　研究結果（つづき)〕

野，2017）という。このことが，前者の結果につながったのであろう。後者の結果から，構築された VR 空間が，視聴者の覚醒水準の上昇や注意や緊張の喚起（本多，2017）に影響したと考えられる。さらに，EEG データの解析からは，VR 視聴時に α 波の含有率が低下し，β 波の含有率が増加したことが確認された。これは，VR 環境下での視覚的な注意が高まり，認知処理活動が亢進していることを示している。特に，β 波は情報処理活動を反映し，視覚情報処理に関連する脳領域での活動の亢進を示している。過去の経験と VR 空間を照合や運動イメージといった認知処理が安静時よりも亢進していることを反映している可能性がある。すべての生体情報の結果をまとめると，本研究により構築された VR 空間により，視聴者は視覚的な注意を高め，それにともないさまざまな認知処理の亢進や覚醒水準の上昇が生じたと考えられる。これらの結果から，このシステムの利用が実際の競技場面に汎化されやすい心理的スキルの向上に資するといえる。実際の競技場面のように緊張を喚起した状態で MT を実施することができるからである。

オリンピック会場を VR 空間として構築することができたことは，副次的な成果を生んだ。大会レガシーへの貢献である。本研究を通して，オリンピック会場を視聴者がいつでも体験することが可能な状況を作りあげることができた。

この成果は，遠藤ほか（2023）に詳細に記載されている。

２．構築されたシステムを利用した MT プログラムの立案と効果検証

次いで達成した課題は，VR 空間を利用した MT プログラムの立案と効果検証であった。MT は理論を基に構築されているものの，アスリートのパフォーマンス向上にとってエビデンスが乏しい方法も存在している。VR を利用した MT に関する研究もほとんど見られない。そこで我々は，構築した VR 環境を利用して MT 実施時と実際の競技場面の乖離がない場面を準備した。

この VR 環境において，呼吸法を組み込んだ MT を実施した。呼吸法はリラクゼーション技法としての有用性が示されているばかりでなく，本システムを利用した MT に容易に組み込むことが可能である。この MT は，3 週間にわたり合計 4 回実施された（深見，2019)。1 回の MT は，次の 2 つの段階にわけられた。まず，ヘッドマウントディスプレイを装着し，その環境に慣れるための安静状態が維持された。その後，VR 空間を視聴しながら呼吸法を同時に行う MT が実施された。この間，参加者は周囲を自由に眺め見ることができた。

実験参加者は男子大学体操選手であった。10 名が VR 空間を視聴しながら呼吸法を実施する MT を行った群（以下，iVRTS 群とする）であり，10 名が呼吸法のみの従来の MT を実施する群（コントロール群）であった。

MT の効果を検証するために，心理指標と生理指標が測定された。心理指標には TDMS が利用され，生理指標には唾液αアミラーゼ活性が利用された。これらの指標を 1 回目の MT と 4 回目の最終 MT にて比較した。

実験の結果，iVRTS 群はコントロール群に比べ，快適度が有意に高く，活性度も両時点で高い値を示した。これは iVRTS が選手をイキイキとした活力ある状態にする効果があることを示

〔7　研究結果（つづき)〕

している。その一方で，安定度はコントロール群が iVRTS 群よりも高かった。iVRTS を利用した MT はゆったりと落ち着いた状態が抑制される傾向にあるといえる。これらの結果は，iVRTS を用いた MT が通常の呼吸法を用いた MT に比べて心理的な覚醒水準を高め，より競技場面に近い環境下での心理的スキルトレーニングを可能にする MT であることを示唆する。

さらに，生理的反応として唾液αアミラーゼ活性を分析した結果，iVRTS 群では 1 回目は 4 回目のものに比べ有意に高い値を示した。唾液αアミラーゼ活性は不快な刺激では上昇し，快適な刺激では低下する。したがって，競技場面を利用した VR 空間が体操選手にとって交感神経系の亢進を促す不快な刺激となり，競技場面特有の感情反応を喚起させていることが示唆された。他方，1 回目に対する 4 回目での唾液αアミラーゼ活性の低下には，VR 映像に対する慣れも関わっている可能性がある。本システムを用いた MT を多角的に評価する際には，映像の多様化を行うことで，参加者の興味や反応を維持する工夫も必要かもしれない。

この結果のように，構築された VR 空間を利用した MT は通常の呼吸法を利用した MT と比較して，心理的な覚醒水準を高める効果があることが明らかとなった。VR 映像により競技場面に近似した環境を具体的にイメージすることが容易となったことから，交感神経の亢進につながりストレス状態をもたらした可能性がある。本システムがこれまで指摘されてきた MT を行ううえでの実験室場面と競技場面における乖離という問題解決に寄与すると考えられる。

詳細は，Fukami et al. (in submission)に示されている。

３．iVRTS を利用した体操選手における競技会場におけるストレス反応

本研究は，iVRTS を使用して MT を実施した体操選手が，競技大会の会場で示したストレス反応を評価したものであった。iVRTS は，実際の競技場を基に構築された VR 空間であり，選手がその空間内を自由に移動できる機能を持っている。すなわち，上述の「２.」での MT を実施した選手において，その直後に開催された競技大会での生体情報を取得した。

データが測定された参加者は，「２.」において iVRTS を用いた MT を行った選手のうち，競技大会に出場した 6 名であった。出場した大会は，MT 期間の直後に開催された第 76 回全日本学生体操競技選手権大会（以下，「インカレ」とする）であった。「2.」で視聴した VR 空間は，このインカレの実施が予定されている競技会場を利用して大会前に映像撮影が行われた。すなわち，選手はまだ経験したことのないインカレ会場を，VR を通して大会前に会場にいるような体験を積んでいたといえる。

体操選手は iVRTS を用いた MT を経て，実際の競技大会でのストレス反応が評価された。その評価には，唾液 α アミラーゼ活性が用いられた。唾液 α アミラーゼ活性は交感神経系の活性を反映するマーカーであり，ストレス状態を評価するのに適している。

測定の結果として，会場初日には団体戦に出場した 4 名の選手が安静時よりも高い唾液 α アミラーゼ活性を示し，競技場への来場が彼らにストレスを与えたことが示された。これに対して，個人戦に出場した 2 名は安静時よりも低い唾液 α アミラーゼ活性を示した。さらに，会場初日よりも会場 2 日目の方が高い値を記録した。団体戦に出場する選手は，競技結果がチームの成績に直結するため，会場への来場により高いストレスを感じることが考えられる。

〔7　研究結果（つづき)〕

一方で，個人登録の選手にはそのようなプレッシャーが少なく，異なるストレス反応が生じたのかもしれない。

これらの結果は，iVRTS を用いた MT が選手の競技前のストレス反応に影響を与えるか否かを評価するに至るものではない。iVRTS による MT が競技場でのストレス反応に与えた影響を正確に評価するには，より多くのデータを収集したり，コントロール条件と比較したりすることが必要である。

しかしながら，これらのデータからも実用的な提言をすることができる。競技会場初日に唾液αアミラーゼ活性の高値が見られたことから，VR にて事前の環境体験に関わらず，選手は競技場の新しい環境に初めて触れることで高いストレスを感じている可能性がある。この状態での競技はパフォーマンスの低下につながるばかりでなく，傷害発生リスクも高めるため，競技当日に初めて会場に来場することは避け，あらかじめ環境に慣れる機会を設けることが推奨される。指導者は，選手たちが日常と異なるストレス状態にある可能性を考慮して，適切なサポートとコーチングを提供する必要がある。

会場 2 日目に唾液 α アミラーゼ活性が安静時と同等になったことは，選手が環境に順応し始めたことを示唆している。これを iVRTS の MT 効果と断定するには慎重な検討が必要であるが，このデータは，今後のこの MT の効果検証の起点となるだろう。

これらの結果についての詳細は，佐藤ほか(投稿準備中)に示されている。

これらのように本研究課題の目的を達成するに至った。すなわち，実際の映像を基とした移動可能な VR 空間を構築し，選手の心理的スキルを高めることに資する MT を開発するに至った。この MT を現場で応用しつつ，同時にエビデンスを蓄積することによって，iVRTS のさらなる効果検証につながるだろう。

このシステムが単なる研究対象にとどまらず，実際のスポーツ現場で活用されることを願う。それが日本大学にて競技スポーツに関わる選手の心理的競技能力やメンタルヘルスの向上に寄与することを期待し，本報告書を締めくくる。

課題番号	総 21-1302

【様式 5 総合研究】

学術研究助成金〔総合研究〕実績報告書

令和 6 年 4 月 11 日

氏　　名：　今井 健一

所属・資格：　歯学部・　教授

実施研究所：　歯学部・総合歯学研究所

1　研究課題

歯周病原菌誤嚥による呼吸器疾患発症と増悪の分子基盤確立と新規予防・治療法の提示

2　研究期間

令和　3　年度　～　令和　4　年度

※令和　3　年度　～　令和　5　年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏　　名	部科校・資格	役割分担
研究代表者	今井 健一	歯学部/教授	研究の立案と統括 微生物相互作用研究
研究分担者	權　寧博	医学部/教授	呼吸器疾患の臨床及び口腔との関連解析
	丸岡 秀一郎	医学部/准教授	臨床及び動物研究による呼吸器疾患増悪機序の解明
	飯沼 利光	歯学部/教授	細菌叢解析と臨床研究データの統計学的解析
	神尾 宜昌	歯学部/准教授	細菌とウイルスの分子生物学・免疫組織学的解析
	高井 英樹	松戸歯学部/准教授	唾液や喀痰等を用いた生化学的実験及び細菌叢解析

※**ホームページ等での公開（☑可・□否）**いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。

課題番号	総 21-1302

4　現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として，以下の区分より自己評価を行ってください。
＜区分＞①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：②　　】・【達成度： 80 %】

5　研究目的

「感染症との闘い」と評される人類の歴史の中で、ウイルスのパンデミックが幾度となく人類の存在を脅かし続けている。今世紀だけでも SARS、新型インフルエンザ、さらには MERS が人々を恐怖に陥れた。そして現在、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)によって、すでに約 700 万人もの人の命が奪われている。SARS-CoV-2 感染者においては、高齢者に加え昨年世界死因の第 3 位となった慢性閉塞性肺疾患：COPD や肺炎などの呼吸器疾患、糖尿病、および心疾患などの基礎疾患を有する人の重症化・死亡率が高いことが知られている。いずれもが、 “歯周病”との関連が深い疾患である。さらに、COVID-19 患者の肺や喀痰から歯周病原菌が検出されること、歯周病患者は 10 倍以上 COVID-19 の重症化と死亡率が高いことが報告された (3, 4)。また、COPD や肺炎においても、歯周病患者ではその増悪リスクが 4 倍以上高いことが臨床研究から明らかとなっている (5) 。さらに、高齢や基礎疾患を有する COVID-19 患者では，発熱により口腔清掃がおろそかになったり、摂食嚥下機能が低下した結果，誤嚥性肺炎を発症し、亡くなるケースが多発しており社会問題となっている。パンデミック下や大規模震災時等においては、口腔ケアが後回しとなるため、歯周病原菌の誤嚥により下気道の炎症が悪化する可能性がある。実際、大震災が起こる度に、誤嚥性肺炎による被災者の災害関連死が大きな問題となる。

一方、口腔ケアを始めとする口腔衛生管理が、肺炎やインフルエンザの発症と COPD 増悪の予防に有効であることが知られている(6)。COVID-19 も肺を“炎症”の場とするため、その重症化予防にも、他の呼吸器疾患同様、口腔衛生管理が有効である可能性が高い。加えて、世界に類を見ない早さで高齢化が進むわが国において、今後ますます増加する呼吸器疾患に対して、薬やワクチンに頼らない予防・治療法の開発は急務である。しかし、口腔細菌が上・下気道に及ぼす影響、及び口腔健康管理が呼吸器疾患の予防になぜ有効なのかは、良く解っていない。

本プロジェクトは、未だ収束に至らない COVID-19 と COPD、高齢者の死因第 1 位である肺炎、時にパンデミックを引き起こすインフルエンザ、及び喘息等の呼吸器疾患と口腔との関連に焦点を絞り、各疾患の発症と進行に及ぼす歯周病原菌の影響と口腔衛生管理をはじめとする新規予防・治療法開発のための分子基盤を確立することを目指す。

対象疾患は全て主に肺を場とする“炎症”で密接にリンクしているため、得られたデータを有機的に結び付け解析することにより、疾病の新たな解釈に繋がることが期待される。また、研究を通して、さらなる医科歯科連携の推進と国民の健康増進、大学院生を含む若手研究者の育成にもつながることも期待される。

1. Soffritti et al. *Front Microbiol.* 2021
2. Bao L et al, *BMC Microbiol.* 2021
3. Anand et al. *J Periodontol*. 2022
4. Marouf *et al*. *J Clin Periodontol*. 2021
5. Takeuchi et al. *J Dent. Res*. 2019
6. Imai et al. *Jap. Dent. Sci. Rev*. 2021

課題番号	総 21-1302

6　研究概要

上記目的を達成するべく、微生物・感染症学、歯周病学、呼吸器内科学、及び創薬学の専門家がグループを形成、「微生物ー宿主相互作用」に加え、「細菌ーウイルスの微生物間相互作用」にも焦点を当て、口腔ー呼吸器を軸とした下気道炎症研究を進めている。昨年度までは、誤嚥性肺炎、COPD、COVID-19 及び喘息に関連する研究に注力したが、今年度は、インフルエンザ研究にも力を入れた。具体的には、1）歯周病原菌による呼吸器疾患（特にインフルエンザ）の発症と増悪メカニズムの解明と、2) 口腔と SARS-CoV2 関連に関する研究、特に唾液中の SARS-CoV2 量の定量と伝播と肺炎惹起に関する研究、さらに 3）口腔衛生管理有効性の証明ための基礎研究に関して研究を進めた。課題 1）に関しては、*P. gingivalis* が産生するプロテアーゼ Rgp がウイルス表面のヘマグルチニン HA を開裂し、インフルエンザウイルスは感染性を獲得することを初めて明らかとした（論文リバイス中)。この作用は、PC を用いたシュミレーション解析でも確認できた（論文投稿中)。本結果から、口腔ケアにより口腔内細菌数をコントロールすることは、インフルエンザ感染予防に効果があることが示唆され、現在臨床研究の準備を進めている。また、基礎実験としては、口腔細菌と喘息発症に関する研究を進めたとともに、バリア機能破壊に関するメカニズム解析を進め、論文として報告することができた(Karahashi Y et al, Biochem Biophys Res Commun, 2024)。さらに、唾液中の SARS-CoV 量の定量を試みた結果、デルタ株では、1 ml 中に約 1860 万個と従来株に比べて 15 倍ものウイルスが存在すること、オミクロン株では、セルフリーウイルスは 1 ml 中に約 321 万個で、デルタ株の 2.7 倍、従来株の 17.8 倍と大幅に増加していることを見出した（Imai K et al, JAMA Network Open, 2023)。本解析から、唾液内のウイルス量の増加と感染者数の増加とがリンクしていることが明らかとなった。このような研究は、更なる医科と歯科との連携ために、また現在の COVID-19 パンデミックだけでなく、まだ遭遇していない将来のパンデミックに迅速に対応するためにも重要と考えられる。臨床研究においては、歯科医による専門的口腔ケア前後の唾液に次世代シーケンサーを用いた細菌叢解析を実施、現在詳細な解析を進めているが、特徴的な細菌の変化を見出しているため、論文化を進めている。

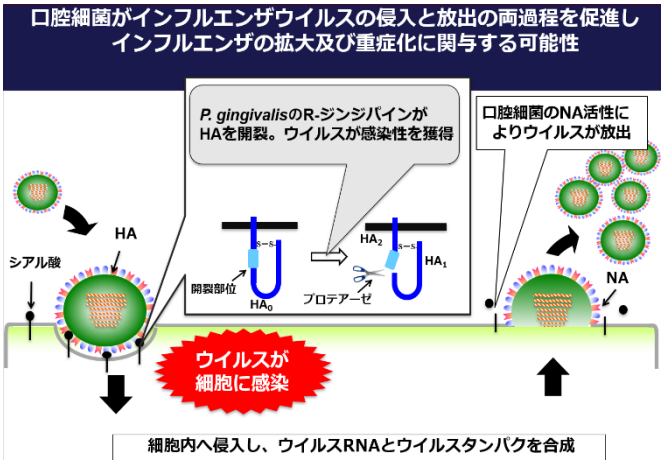
本研究の推進により、口腔-呼吸器軸から全身の健康を考えるための分子基盤、及び医科歯科連携推進ための新たな知見が得られたと考える。

7　研究結果（4,000 字以上記入のこと）

① 口腔細菌がインフルエンザウイルス感染に及ぼす影響

1) *Porphyromonas gingivalis* がインフルエンザウイルスのヘマグルチニン開裂と感染性に及ぼす影響

以前我々は、口腔細菌（*Streptococcus mitis* と *Streptococcus oralis*）由来のノイラミニダーゼ（NA）がインフルエンザウイルスの NA の働きを助け，ウイルスの増殖を 20 倍以上に促進することを報告した。また、NA 阻害薬であるザナミビルによるウイルス放出阻害作用が、NA 産生口腔細菌の存在下では減弱してしまうことも見出した。つまり、インフルエンザの治療に NA 阻害薬を用いてウイルス活性を抑制しても、口腔環境が悪い状態では、口腔細菌由来の NA がウイルス NA の代わりに働くことでインフルエンザウイルスの放出が促進、インフルエンザの拡大がおこる可能性ある。一方、A 型インフルエンザウイルスが宿主細胞に感染するには、ウイルス表面のヘマグルチニン(HA0)がプロテアーゼにより HA1 と HA2 に開裂して膜融合能を獲得することが

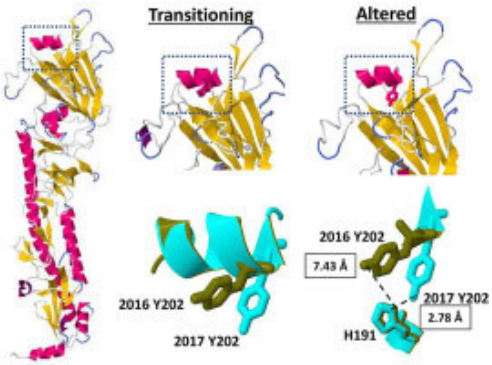


必須である。このプロテアーゼは主に宿主由来だが、黄色ブドウ球菌由来のプロテアーゼでも開裂することが知られている。口腔ケアがインフルエンザ発症のリスクを低下させる事実から、口腔細菌由来プロテアーゼが HA を開裂し、インフルエンザウイルス感染に関与する可能性がある。歯周病原菌の *Porphyromonas gingivalis* は、アルギニンを切断するジンジパイン(Rgp)とリシンを切断するジンジパイン(Kgp)を産生することから、本研究ではジンジパインがインフルエンザウイルスの感染成立に関与するか検討を行った。*P. gingivalis* が HA の開裂に及ぼす影響を検討した結果、wild-type と KDP129（Kgp 欠損株)において HA の開裂を認めたが、KDP133（Rgp 欠損株)と KDP136（Rgp/Kgp 欠損株）では影響を認めなかった。*P. gingivalis* によりインフルエンザウイルスが感染性を獲得したか否かを細胞感染実験により検討した結果、wild-type と KDP129 では多くの感染細胞を認めたが、KDP133 と KDP136 ではほとんど感染が成立しなかった。

P. gingivalis が産生する Rgp が HA を開裂し、インフルエンザウイルスは感染性を獲得することが明らかとなった（右図)。この結果から、口腔ケアにより口腔内細菌数をコントロールすることは、インフルエンザウイルス感染予防に効果があることが示唆された。

2) インフルエンザウイルスの HA 配列と口腔細菌由来ノイラミニダ―ゼがウイルス感染性に与える影響　-計算構造解析-

インフルエンザウイルス HA は、ホモ型糖タンパク質の三量体で、ウイルスの表層の大部分を占め糸球状の脚部（HA2）が差し込まれる形でエンベロープから突出しその先端の球状頭部（HA1）を支えている。われわれは、コンピューターとソフトフェアを用いて計算構造解析を駆使、H1N1 ウイルスのウイルス種内形質伝達および感染に伴い変化した可能性が高いと思われる HA2 構成アミノ酸残基の同定を試み、以下のような新知見を得た。隣接する 2 個のアスパラギン残基（$N145_2$-$N146_2$）が HA2 鎖の根本部分に保存されていることを見出し、この残基がウイルス HA 構造の安定性に寄与していることが推察された(論文投稿中)。また、HA2 の B ループに存在する 88_2 部位のアミノ酸残基の方向が、HA1 の受容体結合部位の構造に影響を及ぼす可能性を見出した。さらに、この 88_2 部位のアミノ酸残基はウイルスの変異にも寄与していることが推察された（右図)。



一方、以前報告した口腔細菌以外にも、ノイラミニダーゼを産生する事も見出し、予備実験の結果、これら細菌由来のノイラミニダーゼがインフルエンザウイルスの感染性を促進する結果を得た。口腔細菌感染症がウイルス感染に影響を及ぼしている事が考えられ、研究を進めている。

インフルエンザ流行の予測は困難を極めると共に、薬剤耐性ウイルスの問題も深刻化しており、ワクチンや薬剤によらない新たな感染予防および重症化対策が求められている。これまでのわれわれの研究結果は、専門的口腔ケアがインフルエンザ対策に極めて有効な方法となる可能性を強く示唆している。現在、動物実験等によるさらなる科学的根拠の蓄積と臨床調査を進めて

いる。

② 口腔細菌や唾液が呼吸器ウイルス感染に及ぼす影響の解明

口腔細菌や唾液が呼吸器ウイルス感染に及ぼす影響を解明することにより、良好な口腔環境が、呼吸器ウイルス感染症予防対策として有効であることを示す分子基盤の構築を目的として以下の実験を行った。ヒストン脱アセチル化酵素 6（HDAC6）は、インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼ（PA）を分解し、α-チューブリンを脱アセチル化することで、ウイルスの複製を阻害する。*F. nucleatum* により前処理した A549 細胞にウイルス感染させると、HDAC6 の発現が低下した。そこで、PA の発現状態ならびに α-チューブリンのアセチル化状態をウエスタンブロットにより解析した。その結果、*F. nucleatum* により前処理した後にウイルス感染させた細胞では、PA の発現は上昇しており、また α-チューブリンのアセチル化状態は上昇していた。現在、HDAC6 強発現株による解析を行っている。

歯周病原菌 *F. nucelatum* や *P. gingivalis* は、酪酸を産生する。そこで、酪酸で前処理した A549 細胞にインフルエンザウイルス感染をおこなった。その結果、ウイルス放出量は、酪酸処理した細胞では増加傾向示したものの、統計学的に有意差は認めなかった。一方、炎症性サイトカインである IL-6 と IL-8 遺伝子は、酪酸処理した細胞へのウイルス感染で発現が亢進していた。そのため、歯周病原菌が産生する酪酸により宿主細胞が刺激されていると、インフルエンザウイルス感染時に炎症性サイトカインの発現が亢進すると考えられる。歯周病患者は、インフルエンザウイルスに感染するとサイトカインストームを引き起こし重症化する可能性が示唆された。

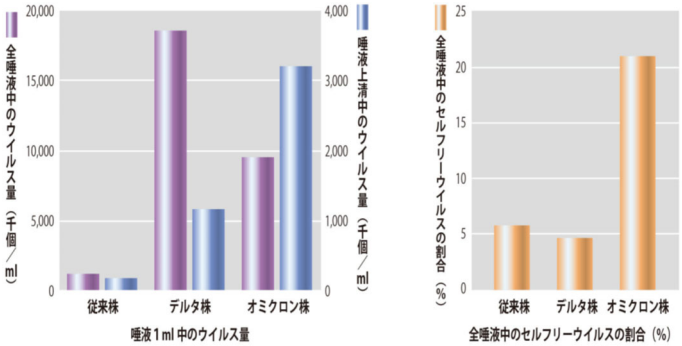
以上の結果から、歯周病などによる口腔の不健康は、呼吸器ウイルスの発症・重症化に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

③ 唾液内の SARS-CoV-2 の性状解析 -感染・下気道炎症に及ぼす影響と口腔細菌叢との関連-

以前我々は、歯周病原菌が SARS-CoV-2 の受容体 ACE2 の発現を遺伝子及びタンパク質レベルで発現誘導することを報告した。唾液中の SARS-CoV-2 を誤嚥することで、COVID-19 が発症することが知られている。すなわち、口腔内の SARS-CoV-2 量を減らすことが出来れば、新規の感染を防ぐことにつながる。また、次なるパンデミックに備えるためにも、感染者の唾液中にはどれくらいウイルスがいるのか？、どう危険なのか？等の重要かつ、国民にも理解しやすいシンプルな問いに答えを出すべく、これまで実施されていない唾液研究に挑戦した。

SARS-CoV-2 のコピー数は PCR のサイクル数（Ct 値）で示されているが、in-house RT-nested PCR とポアソン確立分布法とを駆使することにより、失活させたウイルスを 1 桁単位まで定量出来る解析系を確立した。本手法を駆使しつつ、唾液中の SARS-CoV-2 の性状を解明するために、COVID-19 患者（野生株やデルタ・オミクロン株、及び無症状と有症状者）の唾液において、唾液中（全唾液及び遠心後の上澄み）のウイルスの量を一桁レベルまで定量した。はじめに、私たちが算定したウイルス量と検査会社が行った PCR の Ct 値とが相関すること、遠心後の上澄み液にはヒト DNA が 0.5%未満しか含まれておらず細胞がしっかり除去されていることなどを確認した。解析の結果、従来株では全唾液 1 ml 中に約 123 万個のウイルスが存在していることが判明した。デルタ株では、 1 ml 中に約 1860 万個と従来株に比べて 15 倍ものウイルスが存在した。その内、細胞内外に付随していないセルフリーウイルスは約 117 万個で、全唾液中に占める割合は約 4.8 %で従来株と同程度であることもわかった。オミクロン株では、セルフリーウイルスは 1 ml 中に約 321 万個で、デルタ株の 2.7 倍、従来株の 17.8 倍と大幅に増

加していた。さらに、全唾液に占める割合は約 21.3 %で、両株の約 4 倍もセルフリーウイルスの割合が増加していることを見出した(右図)。



唾液中の口腔細胞の中にはウイルス感染細胞（細胞内や細胞周囲に多くのウイルスが付随）が多く存在している。これらの細胞は直径 10 マイクロメートル以上、平均で通常 15 マイクロメートル程度と大きく重いので、飛沫内容物として飛沫と共に吐き出されたとしても 1〜2 m ほどで落下すると考えられている。一方で、唾液中に排出されたセルフリーウイルスはとても小さく（約 0.1 マイクロメートル)、小さな飛沫や飛沫核（直径 5 マイクロメートル以下）として空気中に長時間漂うため、エアロゾル感染を引き起こすことになる。今回の研究によりオミクロン株ではこのセルフリーの状態のウイルスの割合が、それ以前に発生した 2 株よりも圧倒的に高かったことが判明した。これは、オミクロン株では他の 2 株よりも唾液腺や口腔上皮細胞内での増殖が速く、唾液中により多く排出されているためと考えられる。そもそも唾液中のフリーウイルスの量が多ければ、新たな宿主に到達した際に新型コロナウイルスの受容体である ACE2 への結合がしやすく、感染効率も自然と高まることになる。さらに、セルフリーウイルスは細胞付随ウイルスよりも 3 倍近い速さで新たな未感染の細胞に感染するので、セルフリーウイルスが唾液中に多く含まれることは感染爆発の主要な原因となり得る。

本研究は、未知のウイルス感染症が発生した際、そしてウイルスに変異が生じる度にそのウイルスの性状を知り感染対策を企てるための基本概念として適用されるものと考える。現在、唾液ウイルスと臨床症状との関連、及びウイルスが口腔細菌叢への影響を解析している。

④　歯周病原菌と喘息との関連研究

前回の報告で、マウス喘息モデルを用いて歯周病原菌の死菌（*F. nucleatum*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* が肺洗浄液中の細胞分画で好酸球数を増強することを示した。そこで、喘息患者に用いられている抗 IL-5Rα 抗体（ベンラリズマブ）の効果を検討した。ヒト化マウスに第 1, 2, 3 日の 3 日連続で IL-33, TSLP およびデキサメタゾンを投与し、第 0, 2, 4 日にベンラリズマブを投与した。 第 7 日に、肺胞洗浄液、末梢血および肺組織中の好酸球数の評価を行った結果、ベンラリズマブの投与によって、肺胞洗浄液、肺および末梢血中の好酸球数は有意に減少した（論文投稿中)。現在、歯周病原菌による詳細な喘息惹起機序、及びベンラリズマブによる抑制メカニズムを検討中である。

⑤ 口腔衛生管理有効性の科学的根拠の立証のための基礎研究

昨年の報告に続き、歯科医による専門的口腔ケア前後の唾液と喀痰を採取し、唾液中のプロテアーゼ活性や炎症物資量を定量するとともに、次世代シーケンサーにより唾液中の細菌叢解析を進めている。現在、新たな協力病院も加わり、昨年までの 40 例に加え、30 例の追加サンプルが取得できた。次世代シークエンサーによるビッグデータが得られており、その詳細な解析と論文化を進めている。今後さらに症例数を増やして炎症物質量と病態・予後との関連解析を進めて行く予定である。さらに、肺炎や COVID-19 患者のみならず、インフルエンザ罹患者における口腔ケアの効果について、基礎研究で口腔細菌との関連性が見出された TMPRSS2 や炎症物質等の発現を調べることが出来るか否かの検討を進めている。