

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16183

研究課題名（和文）ヒトインフルエンザウイルスによる腸管感染の証明とメカニズムの解明

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism of seasonal influenza-related enteritis

研究代表者

廣瀬 亮平（Hirose, Ryohei）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：50795383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒト上気道由来粘液中に存在するインフルエンザウイルスが胃酸や消化液（胆汁・膵液など）への暴露によっても不活化されずに保護されるメカニズムを解明した。さらに、3次元培養した腸管上皮細胞および剖検体から摘出した腸管組織を用いたインフルエンザウイルス感染実験を行い、インフルエンザウイルスが腸管上皮で感染を起こしうることを明らかにした。このようにインフルエンザウイルスによる腸管感染成立のメカニズム解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではヒト上気道由来粘液中のインフルエンザウイルスが外部環境から保護されるメカニズムの解明を行った。さらに、これらのウイルスが腸管上皮で感染を起こしうることを明らかにした。高齢者や妊婦・基礎疾患のある患者においてインフルエンザ感染は致死的になりうる。また若年者においてもインフルエンザのアウトブレイクによる社会的損失は極めて深刻な問題となっている。そのためインフルエンザウイルスにおける腸管感染の可否の評価は臨床上非常に重要で、インフルエンザの診断・予防・治療に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the mechanism by which influenza viruses in mucus from the human upper respiratory tract are not inactivated by exposure to gastric acid or digestive juices (bile and pancreatic juice). In addition, we conducted influenza virus infection experiments using three-dimensional cultured intestinal epithelial cells and intestinal tissues from autopsies, and demonstrated that influenza viruses can infect intestinal epithelium. Thus, we clarified the mechanism of influenza virus infection of the intestinal tract.

研究分野：感染症

キーワード：インフルエンザ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一般に季節性ヒトインフルエンザ A 型 B 型ウイルス (IAV/IBV) は上気道感染を起こし、上気道症状を主症状とし発熱や倦怠感などの症状を引き起こす。一方で IAV/IBV の症例の中には、腹痛・嘔吐・下痢といった腹部症状を認める症例が散見される (Chan et al. J Clin Viro 2010)。その病態を考えるにあたって、感染部位は上気道に限定されるものではなく、消化管などの他臓器にも広がっているのではないかと考えられる。しかしながら、腸管感染に肯定的・否定的両方の報告があり、IAV/IBV 腸管感染の可否については未だ結論が出ていない (Minodier et al. Virol J 2015)。

### 2. 研究の目的

我々は IAV/IBV が腸管感染を起こすメカニズム解明の一端として、IAV/IBV が腸管内の過酷な環境に耐え、不活化されずに感染性を維持するメカニズムの解明に着手した。上気道で感染・増殖した高力価の IAV/IBV を含んだ痰や鼻汁を嚥下する in vitro モデルを考案し解析を行った。その結果、本来腸管内環境に非常に脆弱な IAV/IBV が粘度の高い粘液に閉じ込められることによって、人工胃酸・胆汁膵液に対して耐性を獲得し不活化されず感染力を保ち続けることが判明した (Hirose et al. J Infect Dis 2017)。さらに粘液内の病原体が外部環境 (消毒液等) に耐性を獲得することを別のアプローチから明らかにしており (Hirose et al. Sci Rep 2017) これらの知見に基づき、IAV/IBV が腸管内の環境で不活化されずに感染力を有したまま小腸・大腸に到達し腸管上皮に感染を起こすメカニズムの解明、IAV/IBV の腸管感染の評価、を本研究では目指した。

### 3. 研究の方法

当初の予定に従い下記 5 項目の研究を進めた。また (3)(4) に関しては腸管上皮初代細胞だけでなく腸管組織も評価対象に加えた。詳細は研究成果の項でまとめて記載する。

- (1) ヒトの喀痰に類似した性質をもつ人工粘液の作製
- (2) 人工粘液存在下での消化液耐性試験、耐性獲得と粘度との相関解析
- (3) ヒト結腸癌由来細胞 (Caco2)・腸管上皮初代細胞を用いた IAV/IBV 感染実験
- (4) 腸管上皮初代細胞における糖鎖構造解析
- (5) マウスを用いた粘液条件下の IAV/IBV 経口感染実験 (ウイルス嚥下モデル)

### 4. 研究成果

#### (1) 最もヒトの喀痰に近い性質をもつ人工粘液の作製

レオメーターを用いてヒト喀痰検体および様々な高分子化合物から作成した人工粘液の粘弾性を解析した。またそのデータに基づきヒトの喀痰に最も近い粘弾性および消化管内環境からの保護機能をもつ人工粘液の同定を行った。

その結果、キサンタンガム水溶液が喀痰に一番類似した粘弾性特性を示した。またキサンタンガムの至適濃度は喀痰の粘弾性から 0.3~0.7%程度と算出された。また、この人工粘液がヒト粘液と同様の保護機能をもつことを確認した。

#### (2) 粘液存在下での消化液耐性試験、耐性と粘度との相関解析

まず、胃酸暴露後の粘液粒子中心部の pH の値をリアルタイムで計測出来るモデルを構築した。この構築したモデルを用いて各粘液サンプルにおける粘液粒子中心部の pH の経時変化を評価した。生理食塩水は人工胃酸暴露後速やかに pH が低下していき 1 分程度で pH3 以下に減少した。一方で粘液サンプルは pH の低下が緩徐であり、低粘度のものでも pH が 3 以下まで減少するのに 30 分程度要した。また粘度の高いサンプルほど pH の低下は緩徐になり、高粘度の喀痰サンプルにおいては 100 分程度要した。解析をさらにすすめて、生理食塩水に比して粘液サンプルは粘液中のウイルスが完全に不活化される時間が数十倍高いこと、粘液中のウイルスが完全に不活化される時間と粘液粘度の間には強い正の相関が示された。このことは粘液粘度が高ければ高いほど、粘液内に存在するウイルスは胃酸で不活化されにくくなることを示唆している。さらに、上述のヒト粘液サンプルとウイルスの混合物と人工胃液を 5~180 分反応後、残存するウイルスの力価を計測しウイルスの生存率を解析した結果、大半の粘液サンプル中のウイルスは 60 分以上生存した。また生存率と粘液粘度の間には強い正の相関を認め、粘液粘度が高ければ高いほど粘液内に存在するウイルスは胃酸で不活化されにくくなることが示唆された。

#### (3) ヒト結腸癌由来細胞(Caco2)・腸管上皮初代細胞を用いた IAV/IBV 感染実験

ヒト結腸癌由来細胞株 (CaCo2)、ヒト小腸および大腸粘膜上皮初代細胞を用いて IAV/IBV 感染実験を行った結果、すべての細胞において感染が確認された。さらにサイトケラチンカクテル抗体を用いた多重染色を行った結果、感染している細胞が粘膜上皮細胞であることが確認された。次に、ヒト結腸腺癌細胞(HCT-116)を用いて 3 次元培養を行い、スフェロイド形成後に IAV 感染実験を行った結果、高率に IAV の感染が確認された。さらにマウスの腸管組織から腸オルガノイドの樹立を行い、IAV 感染実験を施行した。その結果、腸オルガノイドに感染細胞が確認され、現在どの細胞が感染を起こしているのか解析を進めている。

最後に、剖検体から採取した腸管を用いた ex vivo での感染実験を行った。腸管を採取し洗浄後、腸管粘膜上に一定量の IAV を塗布しインキュベートさせた後にホルマリン固定を行い病理標本を作製した。免疫組織化学染色を施行した結果、腸管上皮組織に IAV 抗原陽性細胞を複数認められた。

#### (4) 腸管上皮初代細胞における糖鎖構造解析

腸管上皮細胞におけるシアロ糖鎖解析を行った。まず小腸粘膜上皮初代細胞に対してレクチン染色を行う事により糖鎖解析を行った。その結果、小腸粘膜上皮初代細胞においては SA<sub>2,3</sub>Gal・SA<sub>2,6</sub>Gal の両方が存在している可能性が示された。

次に MDCK 細胞 (イヌ腎臓尿管上皮細胞由来細胞株) を比較対象とし、分化させた CaCo2 細胞を用いたフローサイトメトリーでの評価を行った。MDCK・CaCo2 細胞ともに SA<sub>2,3</sub>Gal・

SA 2,6Gal の両方が存在しており、ヒトインフルエンザウイルスと鳥インフルエンザウイルス両方の感染が成立する可能性があることが示された。

(5) マウスを用いた粘液条件下の IAV/IBV 経口感染実験（ウイルス嚥下モデル）

マウス（BALB/c，5 週齢，雌）に、粘液とウイルスを混合したものをゾンデで経口投与後 1～5 日にマウスを安楽死させて、肺・小腸・大腸を摘出し組織をホモジネートした後にウイルス力価と RNA の定量を行い感染の有無を評価した。しかしウイルスの感染性粒子およびウイルス RNA はほとんど検出されなかった。

追加解析として、マウス大腸癌由来細胞株（Colon26）を用いて in vitro での感染実験を施行した結果、Colon26 は Caco2 に比して明らかに感染効率は低かった。以上よりマウス腸管は IAV/IBV がほとんど感染しない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirose R, Nakaya T, Naito Y, Daidoji T, Bandou R, Inoue K, Dohi O, Yoshida N, Konishi H, Itoh Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 Situations leading to reduced effectiveness of current hand hygiene against infectious mucus from influenza-infected patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00474-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00474-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirose R, Nakaya T	4. 巻 4
2. 論文標題 Reply to Peters and Pittet, "Influenza and Alcohol-Based Handrub: the Danger of Ignoring Clinical Relevance," and Boyce, "Alcohol-Based Handrubs and Influenza A".	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00745-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00745-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣瀬亮平
2. 発表標題 季節性インフルエンザによる腸管感染に対する基礎・臨床研究両面からのアプローチ
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣瀬亮平
2. 発表標題 Viscosity is an important factor in acquisition of resistance to alcohol-based disinfectants by pathogens present in mucus
3. 学会等名 第92回 日本感染症学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬亮平
2. 発表標題 季節性インフルエンザ関連腸炎に関する研究の最前線
3. 学会等名 第109回 日本消化器病学会近畿支部例会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 廣瀬亮平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社メディカ出版	5. 総ページ数 100
3. 書名 INFECTION CONTROL	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------