203　インフルエンザ腸炎の証明とメカニズムの解明	廣瀬　亮平

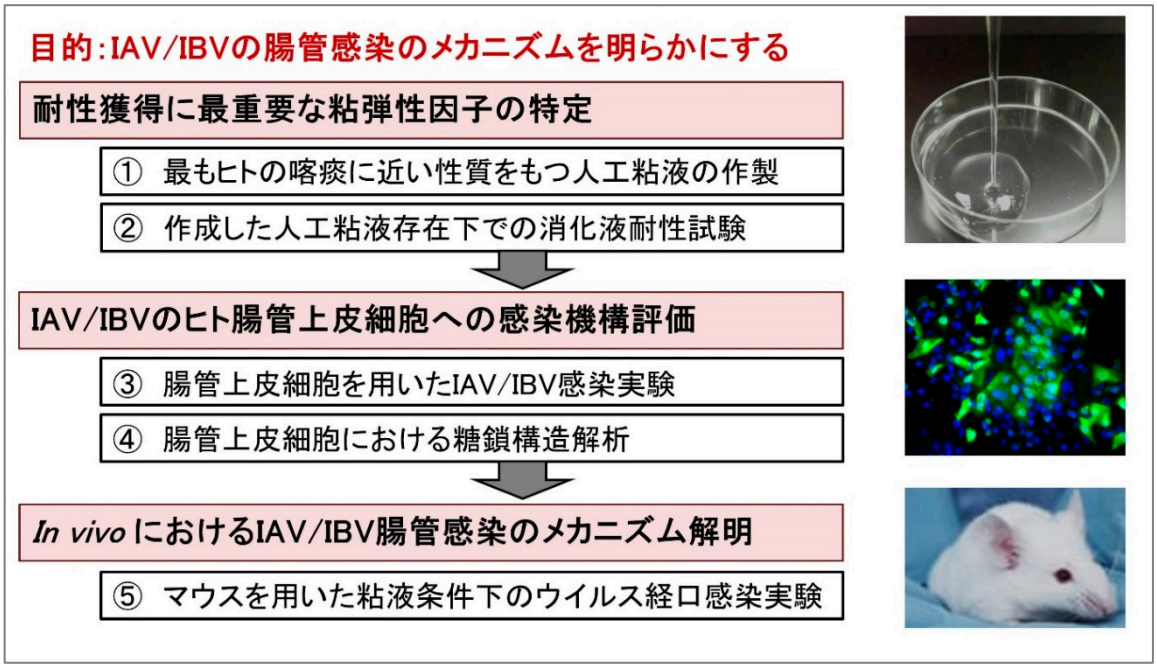
【目的】一般に季節性ヒトインフルエンザA型・B型ウイルス（IAV／IBV）は上気道感染を起こし、上気道症状、発熱、倦怠感などの症状を引き起こす。一方で IAV／IBV の症例の中には、腹痛・嘔吐・下痢といった腹部症状を認める症例が散見される。その病態を考えるにあたって、感染部位は上気道に限定されるものではなく、消化管などの他臓器にも拡がっているのではないかと考えられる。本研究では、『IAV／IBV の腸管感染を証明すること』、『IAV／IBV が腸管内の環境で不活化されずに感染力を有したまま小腸・大腸に到達し、腸管上皮に感染を起こすメカニズムを解明すること』を目的とした。

【方法】IAV／IBV と診断された全 22 症例に対して糞便、喀痰を採取し RNA の検出・定量を行い、前向き観察研究を行った．また上気道で感染、増殖したウイルスを含んだ痰や鼻汁を嚥下し腸管感染を起こすモデルを考案した。粘液と IAV／IBV を混和した上で、人工消化液によってウイルスや RNA が不活化・分解されないか評価を行い、さらにヒト結腸癌由来細胞とヒト小腸、大腸初代培養細胞を用いて IAV／IBV 感染実験を行った。またマウスを用いて IAV／IBV を経口投与し腸管感染が起こるか評価を行っている。

【結果】IAV／IBV 感染者 22 例の糞便よりウイルス RNA が検出されたのは 8 例（36.4%）であった。糞便 IAV 陽性群は 5 例（71.4%）に下痢を認め、陰性群に比して有意に下痢が出現した。また長期解析例では痰検体のウイルス RNA が消失後も長期にわたり、便検体からは 1.0×10^5copies/g 程度の RNA を検出し続けた。また腸炎発症例はS状結腸粘膜に線状発赤と軽度びらんを認め、PCR・免疫組織化学染色にて同部位よりウイルス RNA ・抗原が検出された。

基礎研究では、胃酸暴露環境下において粘液中の pH 低下速度は極端に遅くなる事が明らかになった。また粘液中の IAV／IBV は胃酸や胆汁膵液と暴露後も感染力を維持して生存し、粘液粘度と生存率には正の相関が認められた。ヒト結腸癌由来細胞とヒト小腸・大腸初代細胞での感染実験では IAV／IBV 感染細胞を多数認め、同細胞の糖鎖解析ではSAα2,6、SAα2,3 両方のシアル酸レセプター発現が認められた。

本研究課題の目的と概要



203. インフルエンザ腸炎の証明とメカニズムの解明

廣瀬　亮平

京都府立医科大学 大学院医学研究科 消化器内科学／感染病態学

Key words：インフルエンザウイルス，粘液，腸管感染

緒　言

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・発熱・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［1］。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拡がっているのではないかと考えられる。

過去の後ろ向き研究では、感染性腸炎の疑いで採取された糞便より IAV／IBV の RNA が検出されている［2］。また 2009 年パンデミック株の IAV（H1N1pdm）においては糞便からの RNA 検出だけでなく分離培養にも成功している［3］。このように IAV／IBV が腸管感染を起こしていることを示唆する報告も散見される。一方、IAV／IBV 感染後に発症した出血性腸炎に対して大腸内視鏡検査を施行した症例は以前にもいくつか報告があるが、腸管での感染が証明された報告は未だ存在しない［4］。また IAV／IBV 感染後に腸炎を起こすのは腸管感染によるものではなく、Th17 細胞等が関与する免疫反応の一環であるとの報告も存在する［5］。以上のように腸管感染に肯定的・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［6］。

以前に我々は、IAV／IBV 感染者において便から長期間ウイルス RNA が検出されること、IAV 感染後腸炎症例の大腸粘膜組織内に IAV 抗原陽性細胞が認められることを発見し報告した［7，8］。この報告は IAV／IBV の腸管感染を強く示唆する臨床データであったが、腸管感染を証明するにはさらなる臨床データの蓄積（臨床研究）と感染を起こすメカニズムの解明（基礎研究）が必須であった。感染機序の解明が進めばより質の高い臨床研究を行うことが可能となり、IAV／IBV の腸管感染の証明および臨床病理学的特徴の解明が期待される。そこで我々は 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ている［9］。

本研究では、『IAV／IBV の腸管感染を証明すること』、『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を解明すること』を目的とした。

方法および結果

1. 最もヒトの喀痰に近い性質をもつ人工粘液の作製

様々な高分子化合物から作製した人工粘液の粘弾性を解析し、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目指した。粘弾性の詳細な測定、評価にはレオメーターを用いた（図 1）。

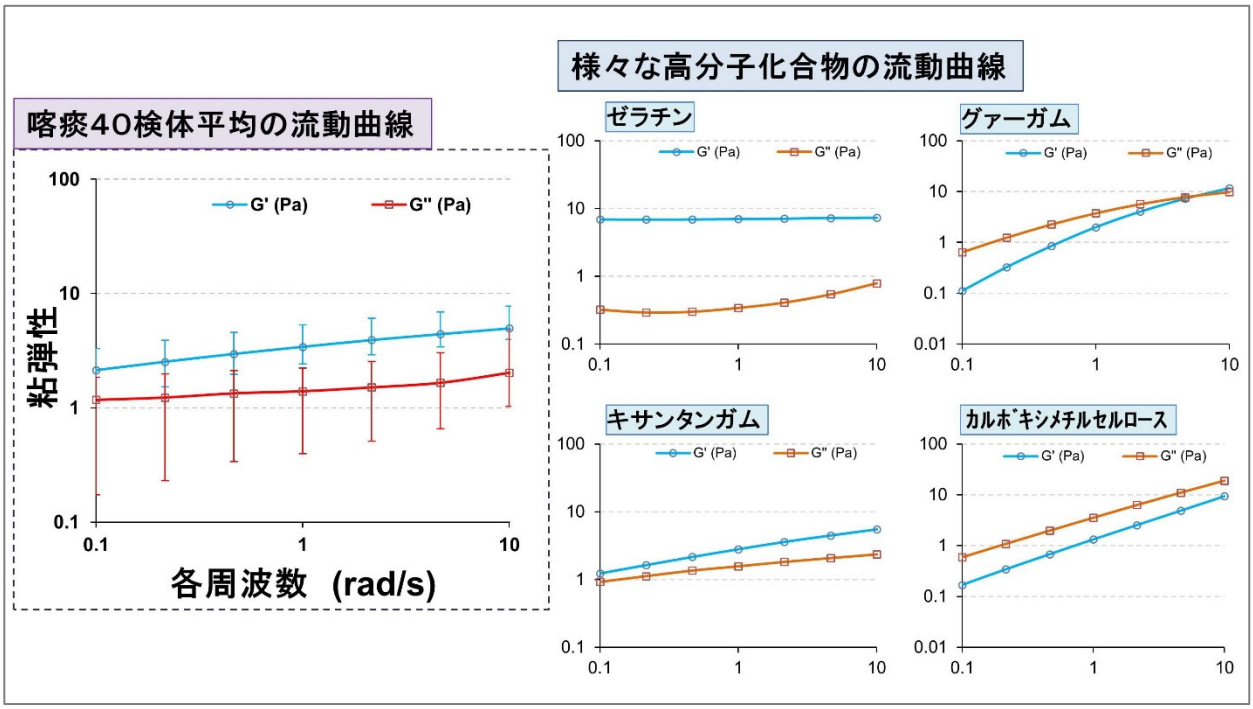


図 1. 喀痰に類似した粘弾性をもつ人工粘液の同定

様々な高分子化合物の人工粘液の粘弾性を解析した。またヒト喀痰検体の粘弾性解析も同時に行った。
その結果、キサンタンガム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。
G’：弾性係数、G”：損失係数。

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

粘液に含まれる IAV／IBV が耐性を獲得する機序解明を行った。上記で作製したキサンタンガム由来の人工粘液を使用することによって、実際にヒトが IAV／IBV を含む喀痰を嚥下して腸管に到達したケースに最も近い条件で、耐性獲得の評価が可能である。また人工消化液以外の腸管環境（半消化体等）からも IAV／IBV が保護されるのか評価を行った。

粘液非存在下でウイルス、RNA は人工消化液で速やかに不活化・分解された。一方粘液存在下では、粘液粘度が上がるにつれ不活化、分解されないウイルス、RNA の割合が増加し、最終的に高粘度条件下では消化液と 4 時間反応後もウイルス、RNA は不活化、分解されなかった。また、粘液存在下、非存在下いずれにおいても半消化体によってウイルスは不活化しなかった。

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

感染力を有した IAV／IBV が腸管に到達した際、腸管上皮細胞で感染を起こすことが可能かどうか評価するために、腸管上皮細胞を用いた IAV／IBV 感染実験を行った。分化させたヒト結腸癌由来細胞（Caco2）と小腸・大腸上皮初代細胞を用いて感染実験を行った（図 2）。

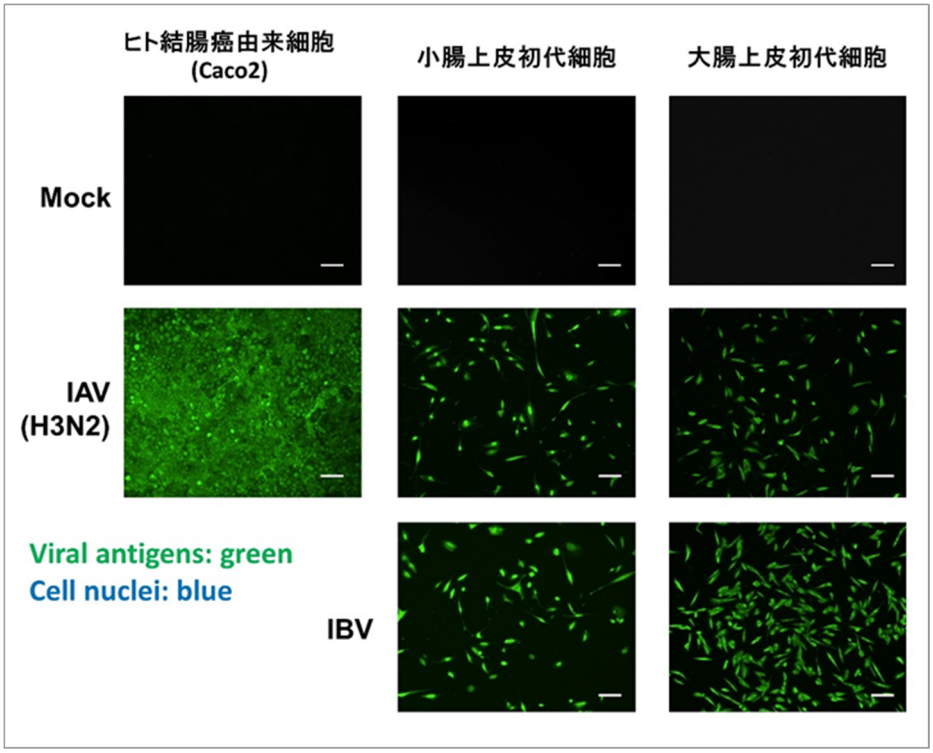


図 2. IAV／IBV 感染実験

感染 16 時間後に免疫組織化学染色を施行した。ヒト結腸癌由来細胞とヒト小腸、大腸初代細胞において感染細胞が多数認められた。スケールバー：100μm。

4. 腸管上皮初代細胞における糖鎖構造解析

上記の Caco2 と小腸、大腸初代細胞において、MAA、SNA レクチン染色によるシアル酸レセプター（SAα2,6、SAα2,3）の発現状況の評価とウイルスの細胞侵入効率を現在解析している（図 3）。

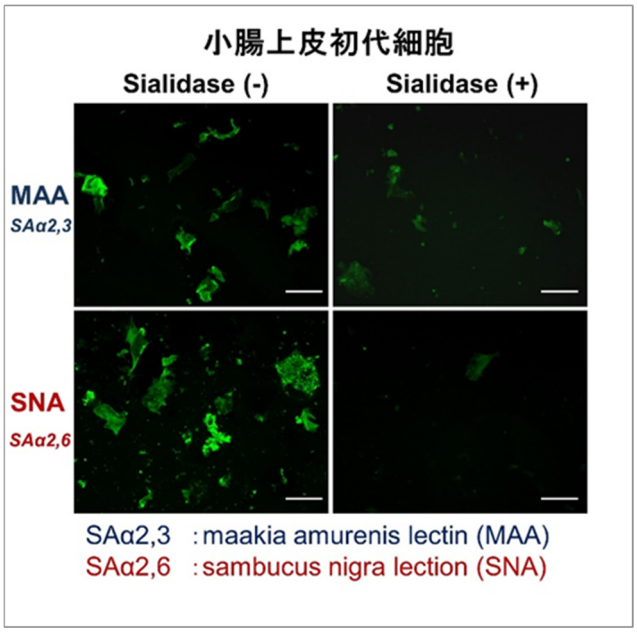


図 3. ヒト小腸初代細胞における糖鎖構造解析

レクチン染色を施行した。小腸粘膜上皮初代細胞にはヒト型（SAα2,6Gal）、鳥型（SAα2,3Gal）、両方のレセプター発現が認められた。スケールバー：400μm。

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）

in vivo での評価を行うためマウスでのウイルス嚥下モデルを構築する。マウス（BALB/c、5 週齢、雌）に、1. で作製した粘液とウイルスを混合したものをゾンデで経口投与した。投与後 3 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する。また糞便を採取しウイルス力価と RNA の定量を行った。

現在研究は進行中である。現段階で、粘液とウイルスを混合した条件において腸管で感染が示唆されるデータを所得している。今後も研究を継続し、データを蓄積していく予定である。

考　察

本研究において、上気道で感染、増殖したIAV／IBVは、粘性の高い痰や鼻汁に閉じ込められることにより消化管内環境に耐性を獲得し、腸管上皮細胞で感染が成立する可能性が本研究より示唆された。

高齢者は感染を繰り返すことにより急激に体力が低下する為、感染予防は高齢者にとっては非常に重要である。高齢者の入院の多い医療施設においては、インフルエンザのアウトブレイクなどの院内集団感染は極めて深刻な問題となっている。そのためIAV／IBVの腸管感染を証明することは臨床上非常に有用で、インフルエンザの診断、予防、治療に大きく貢献できるものと思われる（図4）。

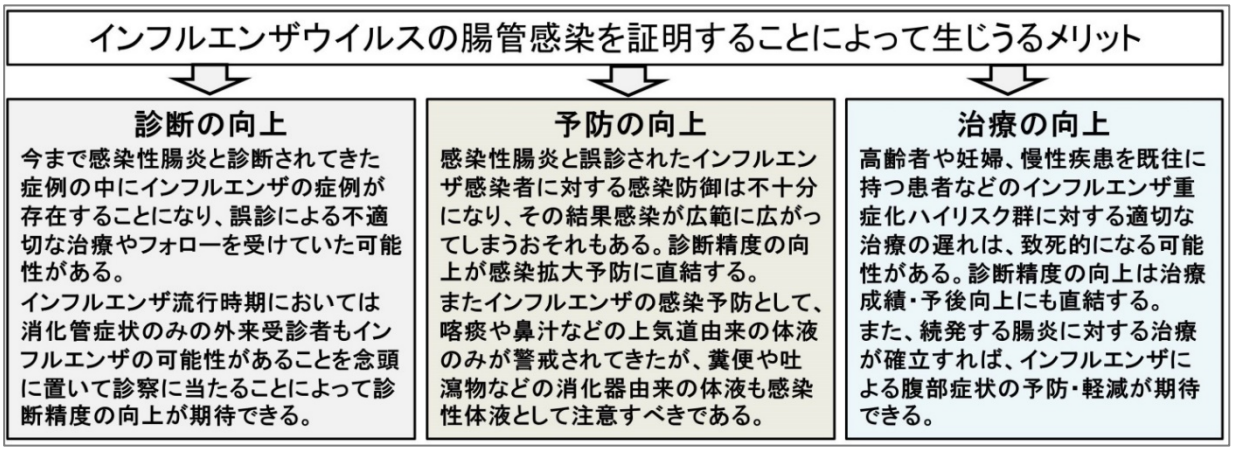


図 4. 本研究から期待される成果

文　献

1） Chan MC, Lee N, Wong RY, Ho WS, Sung JJ. A 75-year-old woman with seasonal influenza A (H3N2) virus infection and diarrhea. J Clin Virol. 2010;48(4):231-3. Epub 2010/03/18. doi: 10.1016/j.jcv.2010.02.017. PubMed PMID: 20233671.

2） Arena C, Amoros JP, Vaillant V, Balay K, Chikhi-Brachet R, Varesi L, et al. Simultaneous investigation of influenza and enteric viruses in the stools of adult patients consulting in general practice for acute diarrhea. Virol J. 2012;9:116. Epub 2012/06/20. doi: 10.1186/1743-422x-9-116. PubMed PMID: 22709374; PubMed Central PMCID: PMCPMC3466123.

3） To KK, Chan KH, Li IW, Tsang TY, Tse H, Chan JF, et al. Viral load in patients infected with pandemic H1N1 2009 influenza A virus. J Med Virol. 2010;82(1):1-7. Epub 2009/12/02. doi: 10.1002/jmv.21664. PubMed PMID: 19950247.

4) Okayama S, Arakawa S, Ogawa K, Makino T. A case of hemorrhagic colitis after influenza A infection. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44(6):480-3. Epub 2011/07/05. doi: 10.1016/j.jmii.2011.04.003. PubMed PMID: 21724476.

5) Wang J, Li F, Wei H, Lian ZX, Sun R, Tian Z. Respiratory influenza virus infection induces intestinal immune injury via microbiota-mediated Th17 cell-dependent inflammation. J Exp Med. 2014;211(12):2397-410. Epub 2014/11/05. doi: 10.1084/jem.20140625. PubMed PMID: 25366965; PubMed Central PMCID: PMCPMC4235643.

6) Minodier L, Charrel RN, Ceccaldi PE, van der Werf S, Blanchon T, Hanslik T, et al. Prevalence of gastrointestinal symptoms in patients with influenza, clinical significance, and pathophysiology of human influenza viruses in faecal samples: what do we know? Virol J. 2015;12:215. Epub 2015/12/15. doi: 10.1186/s12985-015-0448-4. PubMed PMID: 26651485; PubMed Central PMCID: PMCPMC4676820.

7) Hirose R, Daidoji T, Naito Y, Watanabe Y, Arai Y, Oda T, et al. Long-term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2016. Epub 2016/07/19. doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.015. PubMed PMID: 27424942.

8) Hirose R, Nakaya T, Daidoji T. Additional comments: long-term detection of seasonal influenza RNA in faeces and intestine. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2016. Epub 2016/10/04. doi: 10.1016/j.cmi.2016.09.020. PubMed PMID: 27693655.

9) Hirose R, Nakaya T, Naito Y, Daidoji T, Watanabe Y, Yasuda H, et al. Mechanism of human influenza virus RNA persistence and virion survival in feces: mucus protects virions from acid and digestive juices. J Infect Dis. 2017. Epub 2017/05/13. doi: 10.1093/infdis/jix224. PubMed PMID: 28498998.