

<令和3年度助成>

腸内環境の改変と腸管ウイルス感染制御

金井 祐太

(大阪大学 微生物病研究所 ウイルス免疫分野)

下部消化管に感染する腸管ウイルス（ロタウイルス、レオウイルス、コロナウイルス、カリシウイルス等）は、胃や腸管腔内でのpHの変化や多量に存在する消化酵素に耐性を持ち、ロタウイルスのように宿主の消化酵素によりウイルスタンパク質が切断されることで感染性を得るウイルスも存在するなど、腸管環境に適応して進化してきたと考えられる。またウイルス種ごとに好適な感染組織（小腸上部、小腸下部、盲腸、大腸など）の特異性や、感染感受性を示す年齢層が異なることから、腸管ウイルス種ごとの好適な腸管環境が異なることが考えられる。腸管腔内には1,000種超の腸内細菌が生息しており、特定の腸内細菌がウイルスの感染性の促進もしくは抑制に関与していることが近年明らかになっている。腸内細菌の代謝物（胆汁酸、短鎖脂肪酸、トリプトファン代謝物等）は腸管上皮細胞により吸収され、生体の恒常性維持に重要な機能を果たしている。また腸管における細胞分化速度は他の組織に比べ極めて速く、幹細胞からは常に腸管上皮細胞が分化し数日で全ての腸管上皮細胞が置き換わり、腸内環境が変化することで腸管上皮細胞の遺伝子発現が変動することが知られている。このような、別組織とは全く異なる環境を「正常環境」として適応した腸管ウイルスの感染性は腸管環境の変化に応じて変動することが知られている。

そこで本研究課題では、腸内環境の変動とウイルス感染の関連を調べるために、作用機序の異なる抗生物質 [Penicillin (ペーテラクタム)、Kanamycin (アミノグリコシド)、Doxycycline (テトラサイクリン)、Erythromycin (マクロライド)、Sulfamethoxazole (サルファ剤)、Lomefloxacin (ニューキノロン)] を

近交系マウス (Balb/c、3週齢、オス) に2週間経口投与し、ロタウイルスを経口感染したところ、Penicillin投与マウスにおいて顕著なロタウイルス感染抑制が認められた (図1A)。そこでペーテラクタム系抗生物質 (Penicillin、Ampicillin、Cefmetazole、Meropenem) を経口投与したマウスにロタウイルス感染を試みたところ、いずれの抗生物質投与マウスにおいても顕著なロタウイルス感染抑制が認められた (図1B)。上述の実験 (図1A) において一部のKanamycin投与マウスにおいてウイルス感染抑制が見られたため、次にアミノグリコシド系抗生物質 (Kanamycin、Neomycin、Gentamicin、Streptomycin) を試験に供した。これらの抗生物質を2週間経口投与したマウスにロタウイルス感染を行ったところ、GentamicinおよびStreptomycin投与マウスで顕著なロタウイルス感染抑制が認められた (図1C)。これらの抗生物質を用いた実験から特定の腸内細菌がロタウイルスの感染感受性に関与していることが示唆された。確認のために無菌マウス (Balb/c、3週齢、オス) にロタウイルス感染を試みたところ、通常飼育マウスと比較しロタウイルス感染量が顕著に低下した (図1D)。さらに無菌マウスに通常飼育マウスの糞便懸濁液を経口投与し、2週間飼育することで腸内細菌叢を再構築したマウスにおいてはロタウイルス感染量が通常飼育マウスと同程度に回復したことから、腸内細菌叢がロタウイルス感染に重要であることが確認された。

次に抗生物質を用いない腸内環境の改変法として特殊配合飼料を用いたマウス感染実験を行った。通常飼料としてCE-2 (日本クレア株式会社)、AIN-76A (TestDiet、米国)、高脂肪飼料としてQuick fat

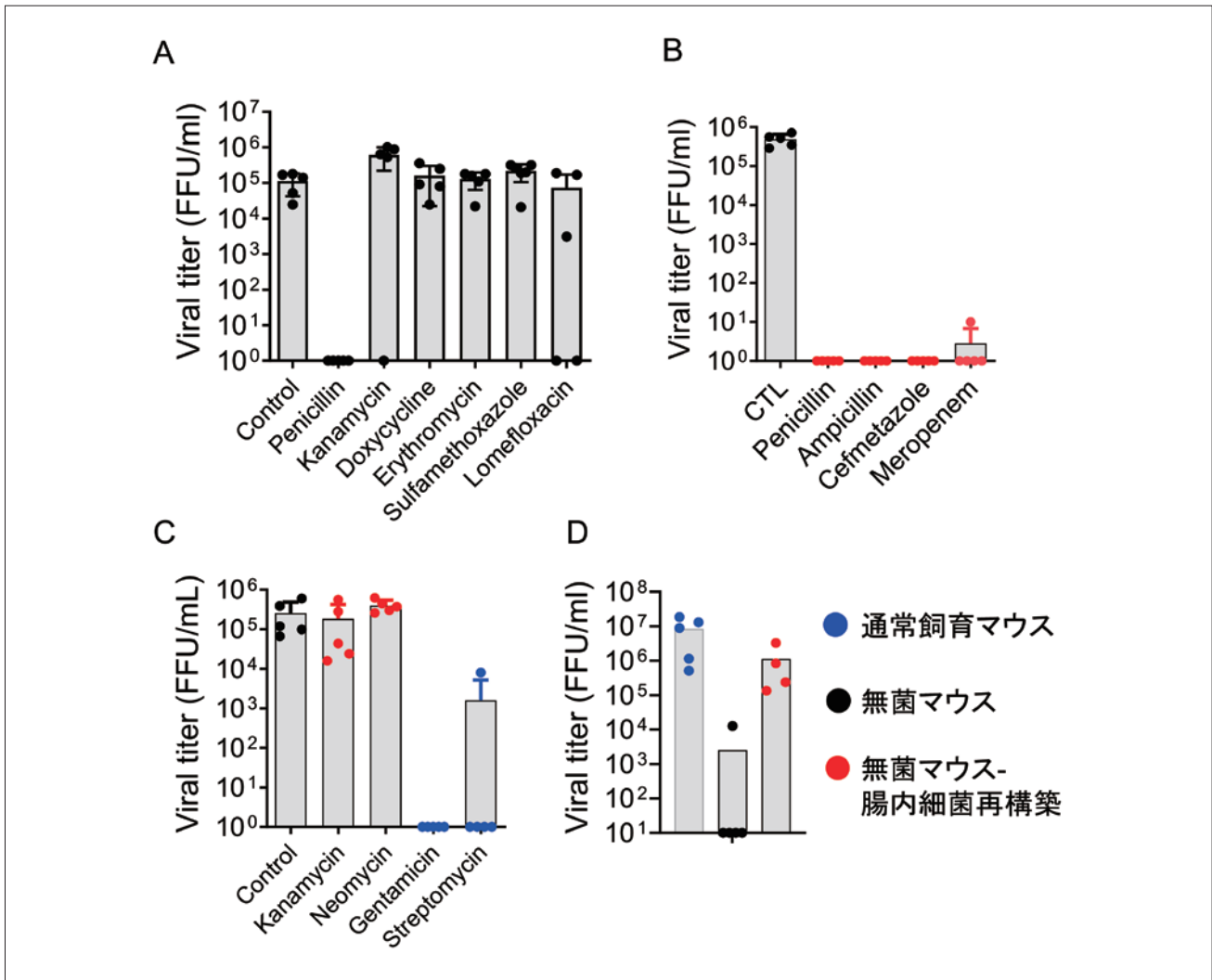


図1 腸内細菌叢改変マウスにおけるロタウイルス感染性の変化

A-C. 各種抗生物質を2週間飲水投与したマウス (Balb/c, 3週齢) にロタウイルスを経口感染し、72時間後の腸管内におけるロタウイルス量を測定した。D. 通常飼育マウス (Balb/c, 3週齢)、無菌マウス (Balb/c, 3週齢) および無菌マウスに通常飼育マウスの糞便懸濁液を経口投与し腸内細菌叢を再構築したマウスにロタウイルス経口感染を試みた。感染72時間後の腸管内におけるロタウイルス量を測定した。

(日本クレア株式会社)、58Y1 (TestDiet)、高コレステロール飼料として58R6 (TestDiet) を用意した (表1)。近交系マウス (Balb/c, 3週齢、オス) をそれぞれの飼料で2週間飼育した後、ロタウイルス

感染実験を試みたところ、AIN-76A、58R6、および58Y1で飼育したマウスにおいて顕著なロタウイルス感染抑制が認められた (図2)。これらの結果から腸内環境が変動することでロタウイルス感染性が変

表1 マウスの飼育に使用した飼料の栄養組成

	Protein (%)	Fat (%)	Cholesterol (ppm)	Fiber (%)	Carbohydrate (%)
CE-2 (CLEA)	25.1	4.51		5.05	
Quick fat (CLEA)	24.1	13		3.9	
AIN-76A (TestDiet)	18	5	0	5	66.4
58R6 (TestDiet)	20.2	20.1	12537	5.6	45.2
58Y1 (TestDiet)	23.1	34.9	301	6.5	25.9

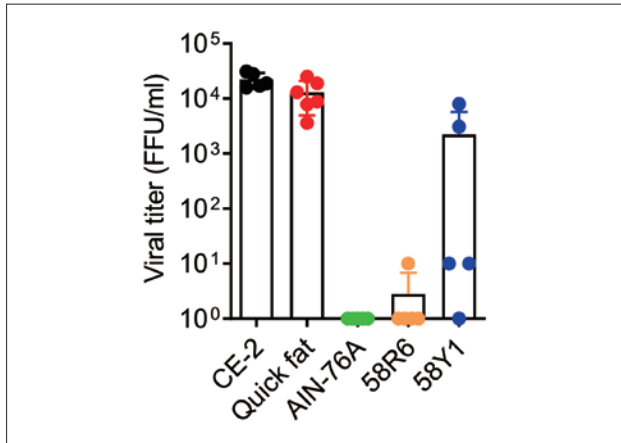


図2 特殊配合飼料で飼育したマウスにおけるロタウイルス感染能の変化
通常飼料 (CE-2、AIN-76A)、高脂肪飼料 (Quick fat、58Y1)、高コレステロール飼料 (58R6) で2週間飼育したマウスにロタウイルス感染を行い、感染72時間後の腸管内ウイルス量を測定した。

化したことが示唆された。また通常飼料として用意した AIN-76A で飼育したマウスでウイルス感染が激減したことから、試料中の単純な脂肪やコレステロール量のような直接の要因ではなく、腸内細菌やその代謝物を含む二次的な腸内環境の変化が関連し

ていることが考えられた。

次に抗生物質や特殊配合飼料で飼育したマウスにおけるウイルス感染抑制のメカニズムを探索するため、腸管内容物によるウイルス粒子の感染性への直接の影響を調べた。ロタウイルス粒子の表面にはスパイク状の VP4 タンパク質が並ぶ。細胞内で合成された新規ロタウイルス粒子は細胞外へ放出された後、宿主由来のトリプシンにより VP4 が VP8 と VP5 に切断され感染性を獲得する (図 3A)。そこで培養細胞で増幅したロタウイルス粒子とマウス腸管内容物を混合し、ウイルス感染性の増減を調べた。まず培養細胞でトリプシンを添加せずにウイルスを感染し、非感染性のウイルス粒子を用意した (図 3B)。そこに通常飼育マウス、Penicillin 投与マウスもしくは AIN-76A で飼育したマウスの腸管内容物を混合し、感染性ウイルス量を定量したところ、いずれのマウス由来の腸管内容物処理においても同程度にロタウイルス感染性の上昇が認められた (図 3C)。

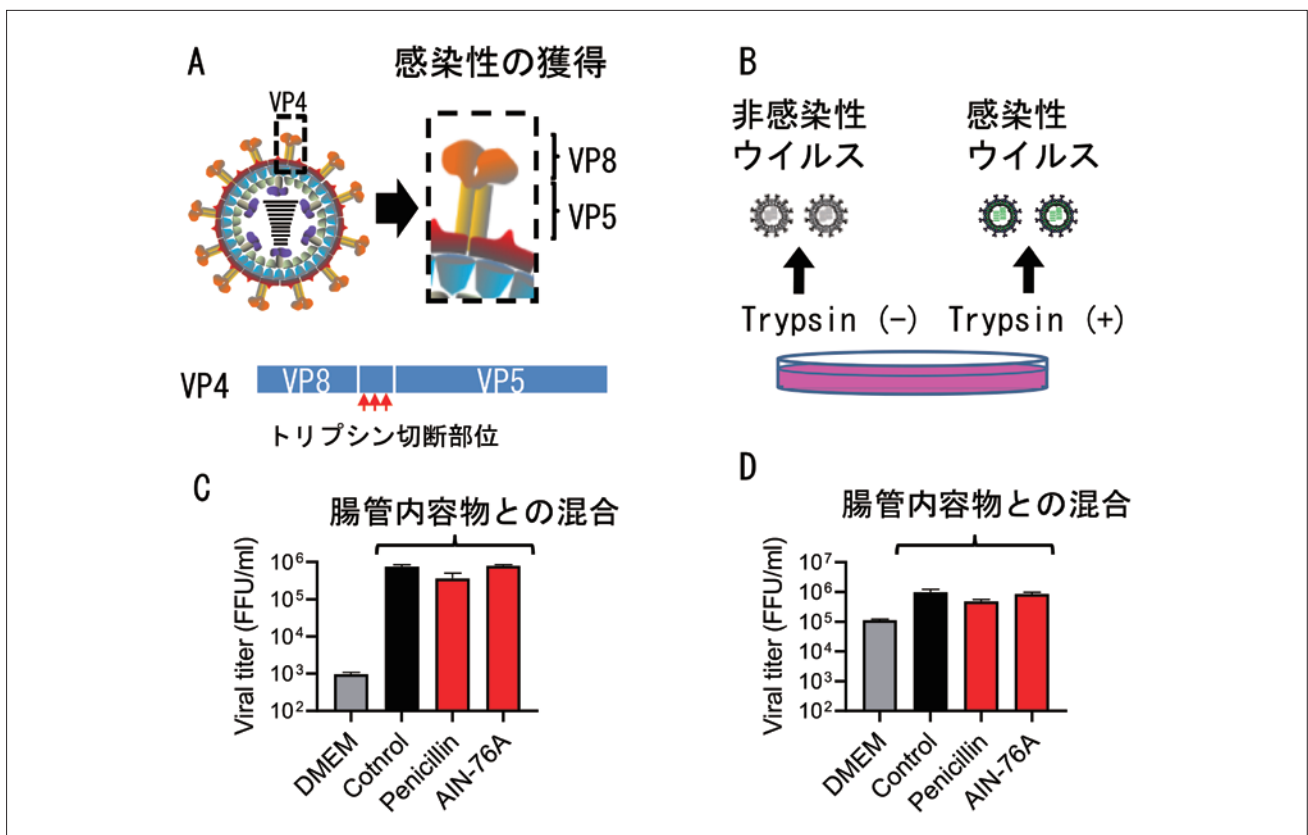


図3 腸管内容物によるロタウイルス感染性への影響

A. トリプシンによりロタウイルス粒子表面の VP4 が切断されることで感染能を獲得する。B. 培養液中にトリプシンを加えることで感染性のロタウイルスが得られる。C-D. マウス腸管内容物の (C) 非感染性ウイルス粒子および (D) 感染性ウイルス粒子への影響。Control: 通常飼育マウス、Penicillin: ペニシリン投与マウス、AIN-76A: AIN-76A 飼料で飼育したマウス。

このことは腸管内容物に含まれるトリプシンによりロタウイルスが感染性を獲得したことを意味するが、ロタウイルス感染抑制を示したトリプシンやAIN-76A 飼料で飼育したマウスでもウイルス活性化能には差がないことが明らかとなった。次にトリプシンを添加した培養細胞でウイルスを増幅し、感染性のロタウイルス粒子を用意した。そこにマウス腸管内容物を混合し、感染性ウイルス量を定量したところ、通常飼育マウス、Penicillin 投与マウスおよびAIN-76A 飼育マウス由来の腸管内容物との混合においていずれも感染性が同程度に上昇した (図 3D)。感染性ウイルス量の増加は、感染性ウイルス粒子として用意したサンプルに残余した非感染性ウイルス粒子が、腸管内容物に含まれる過剰のトリプシンにより活性化されたためと考えられた。これらの結果から、Penicillin 投与や AIN-76A 飼料により変化した腸管内容物の直接の作用によりロタウイルス粒子

の感染性が低下する訳ではないことが示唆された。

次に腸内細菌叢の変化とウイルス感染の関連を明らかにするために、様々な抗生物質を投与したマウスの糞便内腸内細菌叢をメタゲノム解析により測定した。図 1A で使用した 7 種の抗生物質をそれぞれ 2 週間飲水投与したマウスにおいてそれぞれの抗生物質に固有の細菌叢の変化が認められた (図 4)。特にロタウイルス感染抑制が認められた Penicillin 投与マウスにおいては *Allobaculum* 属細菌や *Desulfovibrionaceae* 科細菌など、通常飼育ではほぼ認められない細菌叢の増加が見られた。

腸管内で分解された食事由来成分は腸内細菌により二次代謝され、代謝物質の一部は腸管上皮細胞より吸収される。細菌種により代謝物質の質・量が異なるため、腸内細菌叢の変化により腸管内代謝物質の構成が異なり、宿主への生理的影響にも変化が生じることが予想される。そこで抗生物質投与マウス

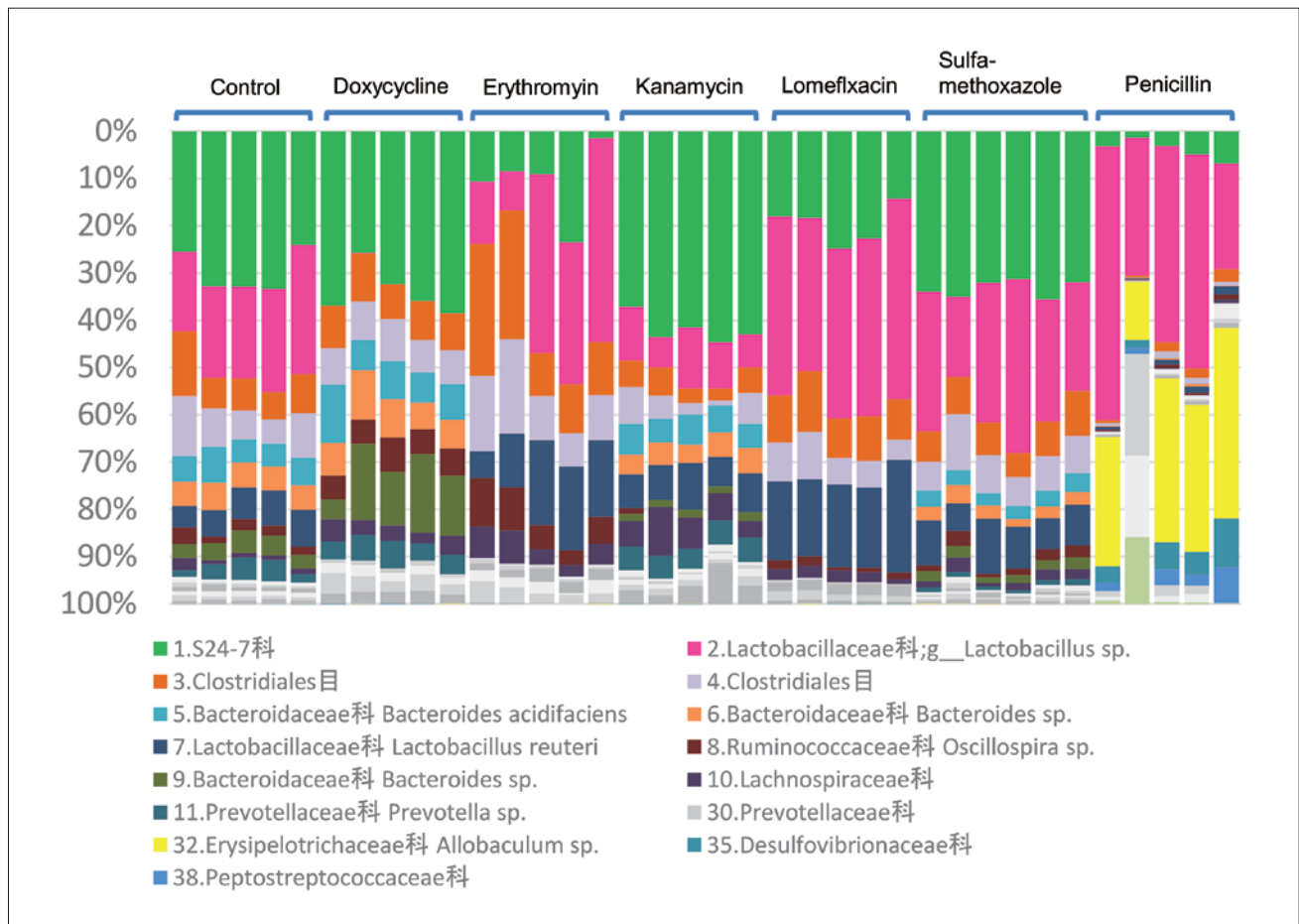


図 4 様々な抗生物質によるマウス糞便内腸内細菌叢への影響

各種抗生物質を 2 週間飲水投与したマウスの糞便内細菌叢のメタゲノム解析を行った。各マウス個体における割合が 5% を超える候補細菌種を表示した。

における腸管内容物の代謝物質を調べ、ウイルス感染に関連する候補物質の推定を行った。ロタウイルス抑制効果を示した Penicillin (1 g/L) を 2 週間飲水投与したマウス (Balb/c、3 週齢、オス) と通常飼育したマウスの盲腸内容物の代謝物質を CE-TOFMS および LC-TOFMS 法により測定した (ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社による受託解析)。合計 426 の候補化合物が検出され、多くの化合物が Penicillin 投与マウスで顕著な増加もしくは減少が認められた (図 5)。

これらの結果から、Penicillin 投与マウスにおいて腸内細菌叢と代謝物質の構成が通常飼育マウスと比較し大きく変化していることが明らかとなった。一方、ウイルス粒子と腸管内容物との混合実験 (図 3) から、腸内細菌叢と代謝物質が変化した腸管内容物中でもウイルス感染能の減少が認められなかったため、次にウイルス感染の標的である腸管上皮細胞の変化について調べた。ロタウイルス感染抑制が認められた Penicillin 投与マウスおよび高コレステロール飼育マウスの腸管上皮細胞の RNA トランスクリプトーム解析を行ったところ、770 の遺伝子において通常飼育マウスと比較し、Penicillin・高コレステロール飼料の一方もしくは両方において顕著な遺伝子発現の増加もしくは減少が認められた (図 6)。この遺伝子群の中には免疫関連遺伝子や、ロタウイルスの感染受容体である糖鎖の転移酵素など、ウイルス感染との関連が容易に想像されるものも含まれていたが、多くの遺伝子に関してはロタウイルス感染抑制との関連は未知であった。今後、個々の遺伝子について培養細胞を用いて候補遺伝子の過剰発現、ノックダウン・ノックアウトの手法によりウイルス感染との関連を調べる予定である。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

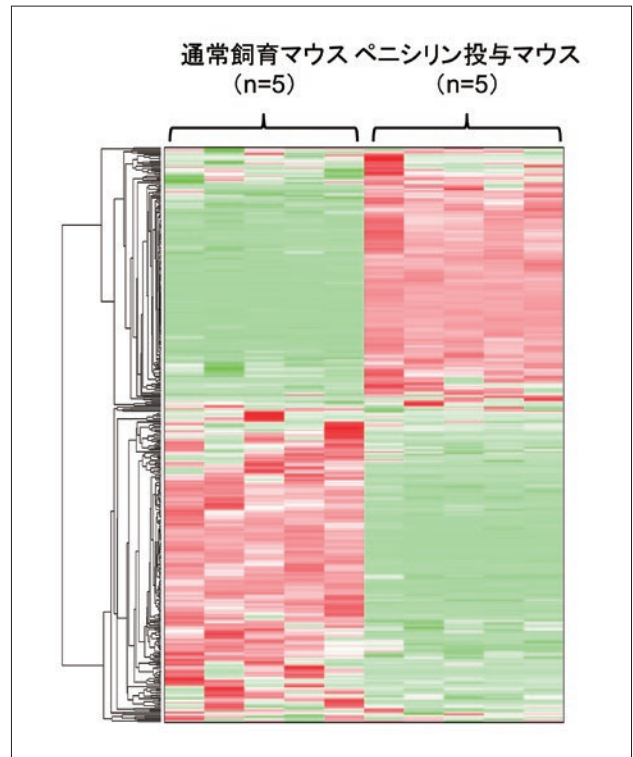


図 5 マウス腸管内代謝物・候補化合物の階層的クラスタリング解析 (HCA) 結果
横軸はサンプル名、縦軸はピークを示す。ピークに対して HCA を実施し、ピーク間の距離は図中の樹形図で表している。緑が濃いほど平均よりも小さいことを示し、赤が濃いほど平均よりも大きいことを示す。

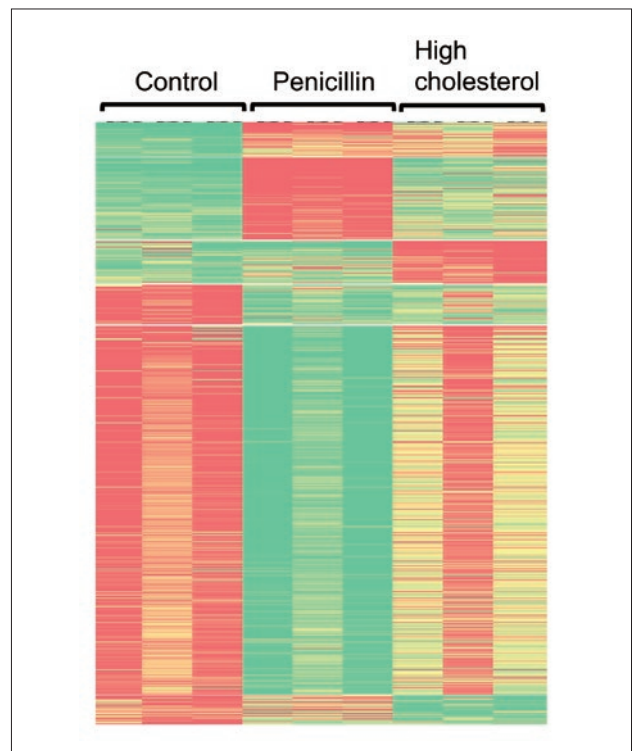


図 6 マウス腸管上皮細胞におけるトランスクリプトーム解析
通常飼育マウスと比較し、ペニシリン投与マウスもしくは高コレステロール飼料飼育マウスで差が見られた 770 遺伝子発現量のヒートマップを示した。

Control of enteric viral infections by modification of the intestinal environment

Yuta KANAI

Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Rotavirus is a leading cause of severe acute gastroenteritis in infants and children younger than 5 years. In this study, we altered the intestinal environment of inbred mice (Balb/c) via administration of antibiotics and custom diets, and investigated the resulting infectivity of rotavirus. Rotavirus infectivity was reduced in mice that were administered beta-lactam antibiotics (penicillin, ampicillin, cefmetazole, and meropenem) and aminoglycoside antibiotics (gentamicin, streptomycin). However, administration of kanamycin, neomycin (aminoglycoside), doxycycline (tetracycline), erythromycin (macrolide), sulfamethoxazole (sulfonamide), and lomefloxacin (new quinolone) did not affect rotavirus infections in mice. Further, rotavirus infections were reduced in mice raised not only on a high-cholesterol and high-fat diet, but also on AIN-76A, a conventional diet used mainly in the United States. A metagenomic analysis of fecal bacteria revealed a significant alteration of intestinal microbiota in penicillin-treated mice. In particular, bacteria of the genus *Allobaculum* and families *Desulfovibrionaceae* and *Peptostreptococcaceae*, which are hardly detectable in conventional mice, increased significantly. Further, the metabolite compositions in penicillin-treated mice were also changed. Finally, we investigated the RNA transcriptome in intestinal epithelial cells, and found that the expressions of 770 genes were increased or decreased in penicillin-treated mice and/or high-cholesterol diet fed mice. Based on these results, it was hypothesized that the administration of antibiotics or diet induced alterations in intestinal flora, followed by altered metabolite composition. Changes in metabolite composition might induce altered gene expressions in intestinal epithelial cells, resulting in an increased resistance to rotavirus infection.