

COVID-19 後遺症の病態診断と治療を目指した
腸内細菌由来の細胞外小胞の活用

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所
エイズ研究センター 主任研究官

みずたに たけとし
水谷 壮利

COVID-19 後遺症の病態診断と治療を目指した 腸内細菌由来の細胞外小胞の活用

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 エイズ研究センター

調査・研究 実施者氏名 水谷 壮利

【要旨】

1、調査・研究目的

COVID-19 後遺症は公衆衛生上の複雑な問題を引き起こしているが、有効な治療法がない。その病態は腸内細菌叢のバランス異常 (dysbiosis) と相関することが知られている (1)。一部の患者では治癒後も dysbiosis が持続し、腸管恒常性の低下が指摘されている。これらの病態緩和において糞便移植などの腸内微生物叢の調節は治療効果が報告されているが、この観察を説明する作用原理は不明である。一方、腸内細菌由来の細胞外小胞 (BEV) は、核酸やタンパク質を含むナノサイズ (20-400 nm) の膜小胞である (2)。実施者らは、腸内細菌が分泌する BEV には炎症制御効果の潜在性があることを見出しており、その乱れが COVID-19 の病態に関与していると考えている。つまり BEV の生理機能の理解に加え、その制御が可能となれば後遺症の治癒に資する成果となる。

本研究は、COVID-19 の病態における BEV の生理機能の解明を目的とした実証実験かつパイロットスタディである。病態に関与する責任 BEV の同定とその分子基盤の理解は、便検体を用いた後遺症診断や、BEV 製剤としての免疫制御法の開発など、整腸を軸とした疾患リスク管理も含めたセルフメディケーション推進に貢献する。

2、調査・研究方法

2.1 被験者の募集とサンプル採取

2020 年に東京大学医学部附属病院に入院中の COVID-19 患者 17 名 (軽症・中等症・重症) から便サンプルを採取した。対照群として、パンデミック前の 2018 年に募集された健康成人 50 名のうち無作為に選ばれた 20 名を用いた。なお、採取前 2 週間以内に抗生物質を使用した被験者は除外されている。

2.2 便からの細菌画分抽出プロトコル

凍結便サンプルを解凍後、Tris 緩衝液と混合・攪拌した。遠心分離後に上清を除去し、残っ

た固形物を再度バッファーに懸濁させた後、100 μm のセルストレーナーで濾過することで、腸内細菌を含む細菌画分を回収した (3)。

2.3 細菌由来細胞外小胞 (BEVs) の単離

便サンプルや培養液から遠心分離と 0.22 μm フィルターによる濾過を行い、細菌体などの不純物を除去した。その後、超遠心分離 (100,000 \times g、3 時間) によって BEVs を沈殿させ、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製を行った。得られた画分は濃縮され、後の解析に使用した。

2.4 ナノ粒子トラッキング解析

Nanosight(NS300)顕微鏡を用いて、単離した BEVs の粒径分布と濃度を測定した。また、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて、小胞の形態的な観察を行った。

2.5 DNA 抽出、増幅、次世代シーケンス解析

フェノール・クロロホルム法を用いて細菌画分と BEV 画分から DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を増幅し、Illumina MiSeq プラットフォームを用いて次世代シーケンス解析を行った。

2.6 16S rRNA データ解析パイプライン

QIIME 2 プラットフォームを用いて、シーケンスデータの品質管理、デノイズ処理を行った。得られたアンプリコン配列 (ASV) は SILVA データベースに基づき分類し、分類学的解析を実施した (4)。

2.7 真菌ゲノム PCR および SARS-CoV-2 RNA の検出

BEV 画分に含まれる真菌の混入をチェックするため ITS 領域の増幅を行い、SARS-CoV-2 の混入については N タンパク質(N1 および N2) をターゲットとした定量的 PCR によって確認した。

2.8 細胞培養と BEVs の共培養実験

U937 単球細胞を RPMI 1640 培地で維持し、BEVs (2,000 粒子 / 細胞) を添加して 24 時間共培養した。培養後の上清をサイトカイン解析 (Bio-Plex、Bio-Rad 社) に供した。

2.9 BEVs のフローサイトメトリー解析

ヒト由来 EV (ポジティブコントロール) と BEVs を比較するため、蛍光ラベル化した CD9、CD63、CD81 などの表面マーカー抗体や、核酸染色 (SYTO 9) および膜染色を行い、フローサイトメーターで粒子を分析した。また、酵素処理 (ベンゾナーゼ、DNase、RNase)

による核酸含有量の変化も検証した。

2.10 統計解析

QIIME2 ソフトウェア を用いたベータ多様性の可視化や、GraphPad Prism を用いた統計処理を行った。Mann-Whitney U 検定および Benjamini-Hochberg 法による偽発見率 (FDR) の検定を行い、調整済み p 値が 0.05 未満のものを統計的に有意とみなした。

3、調査・研究成果

3-1 便中からの BEV (細菌由来細胞外小胞) の精製

本研究では、COVID-19 患者 (17 名) と健常者 (20 名) の便から BEV を抽出し、その特性を比較した。濾過、超遠心分離、サイズ排除クロマトグラフィーを組み合わせる手法により (図 1A)、サイズが 80 ~ 400nm の多様な BEV を回収した (図 1B)。ヒト由来の EV (細胞外小胞) やウイルス粒子などの混入は非常に少ないことが確認され、純度の高い BEV 試料であると評価された。また、BEV 画分をヒト EV マーカーである CD9 / CD63 / CD81 で染色したところ、ヒト由来の EV の混入は 1% 未満であり、BEV 純度の高さが示された (図 1C 左)。さらに核酸染色を用いた分析から、核酸が封入されている BEV は約 5% であった (図 1C 右)。

3-2 COVID-19 における細菌 DNA 含有 BEV (dcBEV) の分泌レベルの変化

腸内細菌叢の構成と、そこから分泌される dcBEV のプロファイルを解析した。解析の結果、健常者・患者のいずれにおいても、腸内細菌叢の組成と dcBEV の多様性、および組成には違いが観察された (図 2A と B)。これは、各細菌の BEV 分泌能力が異なることを意味する。特に、主要な菌種と dcBEV の分泌量には比例関係が見られないケースがあり、dcBEV の分泌は単なる細菌の存在量ではなく、他の何らかのメカニズムによって独立的に制御されている可能性が示唆された (図 2C)。

3-3 COVID-19 患者由来 BEV による単球系細胞でのサイトカイン分泌誘導

COVID-19 患者由来の BEV が免疫系に与える影響を調べるため、U937 単球細胞を用いて BEV 添加後のサイトカイン分泌の変化を定量した。健常者由来の BEV を添加した場合はサイトカイン応答に大きな変化は認められなかったが、患者由来の BEV を添加するとサイトカインレベルに有意な変動が観察された (図 3A)。特に Ruminococcaceae 由来の dcBEV の減少と、特定のサイトカイン (APRIL / TNFSF13 や IL-11) の変動に関連が見られ、BEV が免疫細胞に対して生理的な影響を及ぼしている可能性が考えられた (図 3B)。

3.4 COVID-19 回復期における腸内細菌叢と BEV の動態およびサイトカインへの影響

COVID-19 発症から回復期に至るまでの BEV が免疫細胞に与える影響について縦断的な解析を行った。各患者の腸内細菌は類似しており、発症から治癒にかけて一貫しているのに対し、BEV の種類は個人差があり、発症から治癒にかけて変動も観察された (図 4 A)。発症から 25 日以上経過した患者において、BEV が U937 細胞にサイトカイン分泌を誘導し続ける検体が存在する一方で、BEV の与えるサイトカイン応答の影響が健常者と同等のレベルにまで正常化する症例が確認された (図 4 B)。つまり、細菌叢の組成自体には大きな差がない患者間でも、dcBEV のプロファイルが異なることで免疫反応に違いが生じることが考えられた。このことは、BEV の「質」が回復段階や個体差によって変化し、免疫系への影響力も変動することが想起される。

4、考察

本研究では、COVID-19 感染が引き起こす腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) が、細菌由来細胞外小胞 (BEVs) の組成や分泌パターンにどのような変化をもたらし、それが宿主の免疫系にどのような影響を与えるかを中心に調査した。

解析の結果、COVID-19 患者の便から単離された BEVs は、健常者由来のものとは異なり、U937 単球細胞に対して強力なサイトカイン分泌誘導能を有していることが明らかとなった。特筆すべきは、腸内細菌叢の構成比率と BEVs の分泌量に必ずしも相関がない点であり、これは BEVs の分泌が単なる細菌の存在量だけでなく、ウイルス感染や代謝ストレスといった腸内の微小環境の変化によって動的に制御されていることを示唆している。

また、回復期の患者を追跡した longitudinal (縦断的) な解析では、感染から数週間経過しても BEVs による免疫刺激能が持続するケースが確認された。これは、腸内環境の異常が感染後も長期にわたって解消されず、BEVs を介して持続的な炎症や免疫活性化を引き起こしている可能性を示している。特定の菌種 (例えば Ruminococcaceae や Prevotellaceae など) 由来の BEVs が免疫反応と相関しているという知見は、これらの小胞が腸内の恒常性維持や炎症制御における重要なメディエーターであることを示唆しており、いわゆる「ロング COVID」の病態解明における新たな切り口となる可能性がある。

研究の限界として、本研究は症例数が限定的であること、また DNA を含むサブpopulation (dcBEVs) に焦点を当てた探索的解析である点が挙げられる。しかし、BEVs の「質的な変化」が免疫細胞のシグナル伝達を歪め、結果として全身の健康状態に波及するというメカニズムは非常に重要である。今後は、単一菌株による培養実験やマウスモデルを用いた詳細な解析を進めることで、BEVs の構成成分 (タンパク質、脂質、核酸など) がどのように免疫を制御しているのか、その因果関係を解明する必要がある。

5、まとめ

本研究には、サンプルサイズの制約や DNA 含有 BEVs (全体の 5%) に焦点を当てたことによる限定性は存在する。しかし、BEVs の特性解析が細菌の存在量のみには依らない臨床的視点を提供し、次世代の診断バイオマーカーや所謂「善玉 BEV」を用いた治療介入の標的となる可能性を提示した意義は極めて大きい。

結論として、COVID-19 による腸内細菌叢の攪乱は、BEV 分泌の質的変容を介して宿主の免疫応答を異常に修飾し、病態の深刻化および回復の遷延に直接的に寄与していることが示唆された。今後の課題としては、これらを制御する BEV の分泌元細菌の同定と BEV 粒子内の責任因子の特定である。このモードオブアクションの特定が進めば、未来の治療薬として整腸をベースとしたセルフメディケーションの推進につながる事が期待される。

6、調査・研究発表 (口頭又は誌上発表)

6-1 学会発表

第 12 回日本細胞外小胞学会学術集会 2025 年 10 月 大阪府

シンポジウム②<非哺乳類 EV と疾患>

「腸内細菌由来 EV が担う新型コロナウイルス感染症における免疫制御機構の解明」

水谷 壮利、石坂 彩、古賀 道子、四柳 宏

6-2 英文学術論文

現在、英文誌に投稿を進めている (2026 年 5 月 1 日現在)。

7、引用文献

1. Mizutani T, Ishizaka A, Koga M, Ikeuchi K, Saito M, Adachi E, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Yasuhara A, Kiyono H, Matano T, Suzuki Y, Tsutsumi T, Kawaoka Y, Yotsuyanagi H. 2022. Correlation Analysis between Gut Microbiota Alterations and the Cytokine Response in Patients with Coronavirus Disease during Hospitalization. *Microbiol Spectr* 10:e0168921.
2. Nie X, Li Q, Chen X, Onyango S, Xie J, Nie S. 2024. Bacterial extracellular vesicles: Vital contributors to physiology from bacteria to host. *Microbiol Res* 284:127733.
3. Northrop-Albrecht EJ, Taylor WR, Huang BQ, Kisiel JB, Lucien F. 2022. Assessment of extracellular vesicle isolation methods from human stool supernatant. *J Extracell*

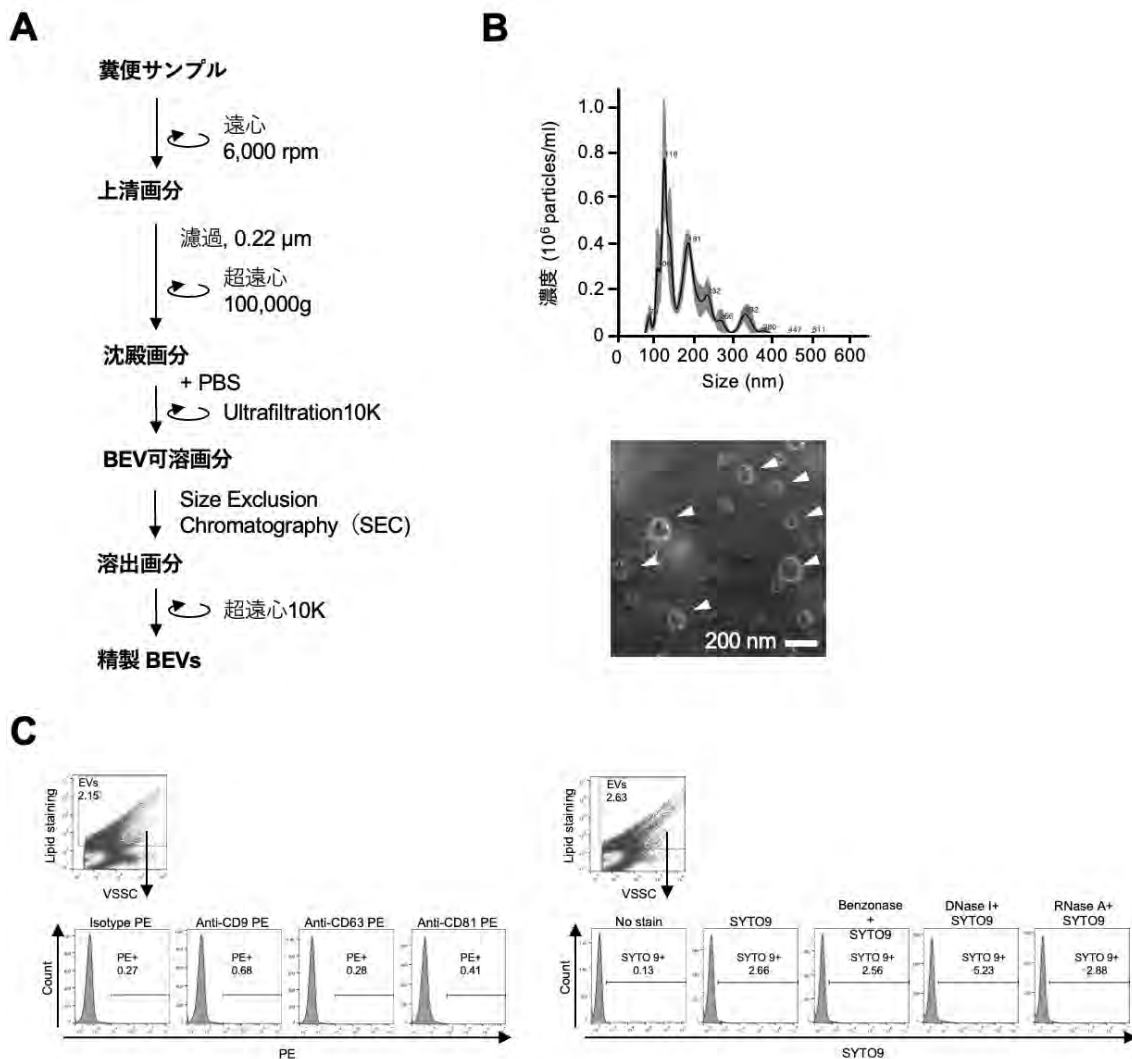
Vesicles 11:e12208.

4. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 41:D590-6.

8、謝辞

本研究は「公益財団法人一般医用医学品セルフメディケーション振興財団・令和7年度 調査・研究助成」のご支援を賜りましたことを改めまして感謝申し上げます。

表、図及び写真



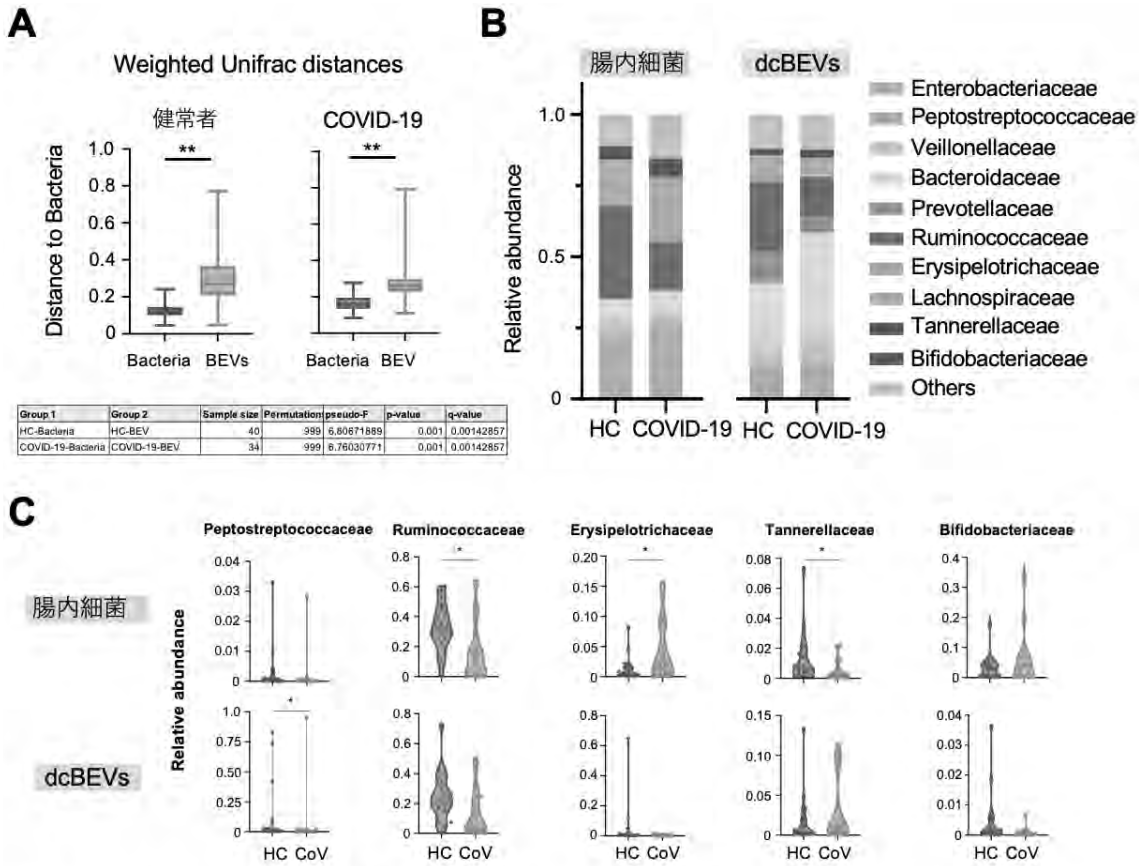


図2. COVID-19が腸内細菌叢の組成とdcBEV（細菌DNA含有細胞外小胞）の動態に与える影響
 (A) 便検体における親細菌（腸内細菌叢）と、そこから分泌されたdcBEVsのベータ多様性。加重UniFrac距離を用いて示されている。健康対照群（左）とCOVID-19群（右）の結果。(B) 上位10種のdcBEVsと、それに対応する親細菌の相対存在比（科レベル）。(C) 健康対照群とCOVID-19患者間における、dcBEV産生腸内細菌（上段：科レベル）およびそれらが分泌するdcBEVs（下段）の相対存在比の比較。バイオリンプロットは、相対存在比の分布における中央値（中央の横棒）と四分位範囲（IQR）を示している。

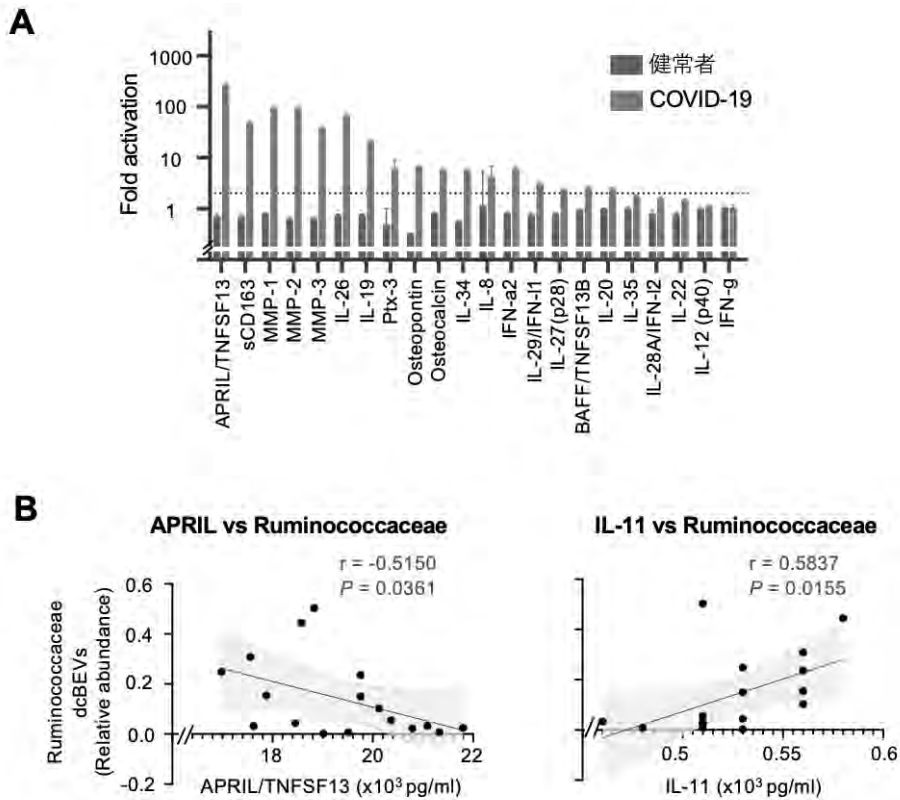


図3. COVID-19患者由来BEVsによるU937細胞のサイトカイン応答の変化

(A) 健常者およびCOVID-19患者由来のBEVs (2000粒子/細胞)で24時間刺激した後の、U937細胞培養上清におけるサイトカインレベルの倍率変化(未処置の対照細胞と比較。中央値と95%信頼区間を表示)。破線は2倍の閾値を示す。(B) COVID-19患者由来BEVsによる刺激下でU937細胞から放出されたサイトカイン(APRIL/TNFSF13およびIL-11)のレベルと、Ruminococcaceae由来dcBEVsの存在量との相関関係。

Title: Harnessing Gut Microbiota-Derived Extracellular Vesicles for Pathophysiological Diagnosis and Therapeutic Intervention in Post-COVID-19 Syndrome

Taketoshi Mizutani (Ph.D)

Senior Researcher

AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

Japan Institute for Health Security (JIHS)

1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

E-mail: mizutani.t@jihs.go.jp

Tel: +81-3-5285-1111

Abstract

Although gut dysbiosis is known to be associated with the pathology of post-COVID-19 syndrome, the underlying mechanisms remain unclear. In this study, we focused on gut microbiota-derived extracellular vesicles (BEVs) and performed a comparative analysis of BEVs purified from stool samples of COVID-19 patients and healthy individuals. Next-generation sequencing and co-culture experiments using U937 monocytes revealed that patient-derived BEVs exhibited distinct profiles and induced aberrant cytokine secretion in monocytes compared to those from healthy controls. Notably, we observed cases where the immune-stimulating capacity of BEVs persisted even after the composition of the gut microbiota had normalized. These findings suggest that the qualitative transformation of BEVs may continuously modulate the host immune response post-infection, thereby contributing to the prolongation of symptoms in Long COVID. Our study highlights the potential of BEVs as novel diagnostic biomarkers and targets for next-generation therapeutic interventions aimed at gut homeostasis, providing critical insights for managing post-COVID-19 syndrome through microbiota-based self-medication strategies.