

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670479

研究課題名(和文) ロタウイルスとノロウイルスの混合ワクチンの基礎研究

研究課題名(英文) A basic study on combination vaccines of rotavirus and norovirus

## 研究代表者

牛島 廣治 (USHIJIMA, Hiroshi)

日本大学・医学部・客員教授

研究者番号：10091068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： ウイルス性胃腸炎で重要なロタウイルスとノロウイルスの混合ワクチンをめざして、基礎実験を行った。ロタウイルスはワクチン株(Rotarix)と人工的に作製したウイルス蛋白(VP6)を用いた。ノロウイルスはウイルス様粒子を用いた。マウスへの経口接種で相乗効果はなく、それぞれのウイルスとして抗体の上昇を認めた。子マウスにロタウイルスの感染実験(下痢)はできたが、ノロウイルスでは下痢が生じなかったため、ワクチンの予防効果の実験はできなかった。

ヒトでのロタウイルスワクチンの使用例と繰り返すノロウイルス胃腸炎の例を参考にし、混合ワクチンの開発を進めることが期待された。

研究成果の概要(英文)： Basic experiments was done for combination oral vaccines of rotavirus and norovirus. Rotavirus vaccine strain (Rotarix) and artificially produced rotavirus protein (VP6) were used for rotavirus vaccines. Virus like particles were used for norovirus vaccine. Elevation of viral antibodies was the same as the individual vaccine and a synergistic effect of combination vaccines were not recognized. Rotavirus gastroenteritis (diarrhea) was induced into newborn mice by oral vaccination. However norovirus gastroenteritis was not induced in newborn mice.

Combination vaccines are expected to develop in reference to the cases of rotavirus vaccination and the cases of recurrent norovirus infection.

研究分野：ワクチン学

キーワード：ワクチン ロタウイルス ノロウイルス 混合ワクチン マウスモデル 経口接種

### 1. 研究開始当初の背景

ロタウイルスおよびノロウイルス感染症は小児の感染症として重要な位置をしめる。開発途上国を含め世界では、それぞれ60万人、20万人の年間死亡が推定されている。我々はこれまでウイルス性下痢症の分子疫学を中心に30年研究を行ってきた。一方、ロタウイルスワクチンは外国で作られ、わが国でもその使用は始まった。もともとヒトロタウイルスの細胞培養は我々の関係者が世界に先駆けて成功し、申請者もワクチン開発に関与している。現在我々も、そのワクチンの小児における臨床的効果の評価をしている。

一方ヒトノロウイルスの細胞培養は未だ誰も成功していない(2015年可能になったとの情報があるが論文は見当たらない)。遺伝子工学的にウイルス様中空粒子(VLP)が作られており、我々はVLPのモノクローナル抗体を用いて世界に先駆けてイムノクロマト試薬を開発した。

ノロウイルスVLPを用いたワクチン開発は、一部は論文があるものの市販されていない。また米国でボランティアへVLPを経鼻接種した研究では、糞便由来ウイルスのチャレンジに対し、ワクチンが有効であったと報告された。我々は多数の遺伝子型のノロウイルスVLPを有しており、マウスでの実験でVLPは細胞性免疫および液性免疫を高めること、経口接種は局所IgA産生、皮下接種はIgG産生の増強が見られた。重症のウイルス性下痢症を減らすためにはロタウイルスとノロウイルスの両ワクチンが必要であり、小児の負担を考えると混合ワクチンの開発が急務である。過去のロタウイルスワクチン作製時でのわが国の微力さを再度経験してはならない。

### 2. 研究の目的

ロタウイルスとノロウイルスの混合ワクチン開発のための基礎研究を行う。具体的には既に進行中のVLP(ウイルス様中空粒子)を用いたノロウイルスワクチンの基礎研究の成果を踏まえて、これに市販ワクチンまたは細胞培養した生ロタウイルスを混合し、マウスに経口投与し、免疫系の活性化を調べる。平行してロタウイルス蛋白(VP6)を人工的に作製する。また混合ワクチンをマウスに接種後、培養ロタウイルスを経口的に投与し、ロタウイルス下痢症が軽減するか調べる。ノロウイルスに関しては無菌ミニ仔ブタあるいはマウスなどの小動物の利用の実験系を確立し、ノロウイルス感染症が軽減するか調べる。世界に先駆け、不活化ウイルス(ノロウイルスVLP)-生ウイルス(ロタウイルス)の混合ワクチン、あるいはノロウイルスVLPとロタウイルスVP6の混合不活化ワクチンを開発する。

さらに現行のロタウイルスワクチンの臨床における評価を行うことによって今後、ロ

タウイルスとノロウイルスワクチンの臨床試験での問題点を探る。さらにノロウイルスの再感染例から感染実験や臨床試験のモデルとする。

### 3. 研究の方法

ロタウイルスとノロウイルスの混合ワクチンの接種のため、株または人工抗原の選択を行う。動物は比較的实验がしやすいマウス(成熟もしくは新生マウス)や子ブタを用いる。感染実験では糞便中のリアルタイムPCRによるウイルスゲノム量、酵素抗体法(EIA)によるウイルス抗原量を調べる。ワクチン接種による特異抗体の測定にはEIA、即ち抗原(VLP)をマイクロプレートの底に添加し、測定する抗体を入れ、さらに標識抗マウス抗体を用いた。ワクチン経口接種するノロウイルスVLPは100ugを用いた。またRotarixは100μlを用いた。子マウスの感染実験では10%乳剤100μl量のノロウイルスおよび100μl量のRotarixまたはSA11を用いた。繰り返しノロウイルスに罹患する2例の継続的抗体の測定はマウスの抗体測定に類似し、2次抗体に標識抗ヒト抗体を用いた。ロタウイルス患者の検体は、わが国のウイルス性下痢症の分子疫学の目的・ワクチンの目的のための検体を用いた。動物実験は民間会社(イムノプローブ社)で、ヒトの抗体、抗原、遺伝子診断などは日本大学や東京大学で行った。

### 4. 研究成果

(1) ワクチン株(あるいは抗原)の選択と病原体の感染実験

ロタウイルス: 候補株として、市販されているRotarix(G1P[8])ワクチン株、我々が有するTMC1株(G1P[8])、オデリア株(G4P[8])、サルノ SA11株を用いた。オデリア株およびSA11株は細胞培養でウイルスが良く増殖するがRotarixワクチン株は増殖が悪かった。TMC1は細胞増殖を起こすことができなかった。この中で、SA11株は子マウスに軽度の下痢を生じた。親マウスでは全ての株で下痢を生じることはなかった。生ワクチン以外に不活化ワクチンも視野に入れてオデリア株のVP6をバキュロウイルス系で発現させた。このVP6をワクチンとして用いてもロタウイルス抗体の上昇を認めた。

ノロウイルス: ノロウイルスは細胞培養で増やすことが出来ないため、ワクチンの候補としてVLPが用いられる。既に有するNoV GII.4流行株2006bのVLPを用いた。生のノロウイルスがマウスに感染を来すかを知るため、マウスに糞便材料の経口投与を行なったが成熟マウス、子マウス共に下痢を来すことはなかった。また免疫不全マウス(TLR3欠損マウス)でも下痢を来すことはなかった。

(2) ワクチン候補株を用いたマウスでの実験

既にロタウイルス(生ウイルス)およびノロウイルス(VLP)各々のマウス皮下接種で

は特異的血清 IgG の上昇、経口接種では特異的血清 IgG および IgA および便中の特異的 IgA の上昇を認めている。Rotarix および NoV GII.4 を同時に混合接種し抗体の上昇を調べた。混合接種は単独接種の場合と抗体の上昇までの日数に差が見られたが、上昇の抗体量の OD 値は差がなかった。さらにインフルエンザと同様に経鼻ワクチンも考えられるため、マウスの鼻への Rotarix 株および GII.4 の VLP を投与した(現在、経日的な抗体の上昇を調べている)。

### (3) ヒトでのワクチンのモデル

ノロウイルス感染例：ヒトでのノロウイルスワクチンの投与実験はわが国では難しいため、たまたまノロウイルスに繰り返し下痢を示す成人 2 例を経験し、その血中および便中のウイルス量の変化や抗体の変化を調べた。過去にノロウイルスに感染し、免疫があるためか排泄されるウイルスは急激に減少した。この事はイムノクロマトの抗原検出キットでもリアルタイム PCR でも確認された。一方、抗体の上昇が見られるが血清と便の IgA 抗体は数か月で減少を示した。IgG は年を超えて減少した。感染を受けた型の VLP 以外に対しても抗体の上昇をみた(抗体においては同じ遺伝子群内では交差免疫が存在した)。

ロタウイルスワクチンと感染：ロタウイルスワクチンの臨床使用経験から、ロタウイルスの外来での患者数は概ね減少傾向にある。さらに重症のロタウイルス患者は少なくなった。2014 年時点で 50-60% の乳児が有料のロタウイルスワクチンを使用していた。一方、小中学生のロタウイルス感染の割合が乳幼児と比較すると多くなった。一方、ワクチンの経験者でもロタウイルスに罹患することがあった。ワクチンによるのかわからないが、ネコ、イヌ、ウシなどの動物のロタウイルスの VP7 遺伝子を有するリアソータントウイルスがヒトの糞便から認められるようになった。

今後の課題：ノロウイルスの細胞培養が可能となったという情報があり、追試する必要がある。このことにより中和抗体の存在が調べられるようになる。ワクチンの開発が加速されると思われる。ロタウイルスのマウス実験は可能であるがノロウイルスではまだない。今後、子ブタの利用も本格的に始める予定である。特に経鼻ワクチンに対して深めていきたい。さらにサイトカインの動きに対しても注目する。ロタウイルスのワクチンの効果や問題点についても今後検討する。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Ushijima H, Machida S, Nomura A, Khamrin

P, Dinh Nguyen Tran, Nomura A, Hayakawa S. Immune responses against norovirus GII.4 virus-like particles in mice. Acta Virologica 査読有、印刷中

高梨さやか、生島廣治：ノロウイルスワクチンの開発の現状 外来小児科 査読無 2015; 18:178-183

井上茉南、高梨さやか、生島廣治、沖津祥子、崎山弘、水口雅。定期接種ワクチンとロタウイルスワクチン累積接種率の比較 日本小児科学会雑誌 2015: 査読有 119(3)525-537

生島廣治、沖津祥子、早川智、Leera Kittigul、高梨さやか：ロタウイルスワクチンによるヒトと環境中のロタウイルスの動向 臨床とウイルス 2014: 査読無 42; 5: 231-236

高梨さやか、生島廣治。ロタウイルスワクチン、ノロウイルスワクチン 臨床と微生物 査読無 2014; 41(6):741-748

生島廣治 ロタウイルスワクチンと母乳保育 (話題提供) 日本母乳哺育学会雑誌 査読無 2013; 7(2);128-129.

[学会発表](計 13 件)

金子明依、高梨さやか、Thongprachum A、井上茉南、沖津祥子、早川智、水口雅、生島廣治 ロタウイルスワクチン様株に起因する急性胃腸炎の実態調査 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.5.13-15、ロイトン札幌(北海道札幌市)発表確定

高梨さやか、Thongprachum A、沖津祥子、早川智、水口雅、生島廣治 ロタウイルスワクチン導入移行期における同ウイルスの分子疫学的特徴の解明 第 119 回日本小児科学会学術集会 2016.5.13-15 ロイトン札幌(北海道札幌市)発表確定

井上茉南、高梨さやか、生島廣治、沖津祥子、崎山弘、水口雅 単価ロタウイルスワクチン接種後のワクチン株クリアランスと免疫応答 2016.2.20 第 21 回東京小児医学研究会 東京大学医学部附属病院(東京都文京区)

Shimizu Y, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H. Immunological responses to noroviruses (GII.4 and 17) in a patient of the infection. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22-24 日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

井上茉南、高梨さやか、生島廣治、沖津祥子、崎山弘、水口雅 単価ロタウイルスワクチン接種後のワクチン株クリアランスに伴う免疫応答。第 47 回日本小児感染症学会総会・学術集会) 2015 年 10 月 31 日-11 月 1 日 ザ・セレクトン福島(福島県福島市)

生島廣治、町田早苗、野村明子、野村 博、早川智 マウスを用いたヒトノロウイルスワクチンの基礎研究 第 46 回日本小児感染症学会総会・学術集会 2014. 10.18-19

京王プラザホテル(東京都新宿区)

牛島廣治、町田早苗、野村明子、野村博、Khamrin P. 乳幼児の感染回避を考慮したノロウイルス GII.4 VLP の経口投与方法におけるマウスでの免疫効果 第 88 回日本感染症学会学術講演会 2014 年 6 月 18-20 日 ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)

野村明子、町田早苗、牛島廣治 ノロウイルス GII.4 VLP とロタウイルスワクチンを用いたマウスでの免疫効果 第 55 回日本臨床ウイルス学会 2014 年 6 月 14-15 日 ロイトン札幌(北海道札幌市)

高梨さやか、Thongprachum A.、沖津祥子、水口雅、牛島廣治 ロタウイルスワクチン導入移行期における同ウイルスの遺伝子型の検討 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014 年 4 月 11-13 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

井上茉南、高梨さやか、牛島廣治、沖津祥子、崎山弘、水口雅 府中市におけるロタウイルスワクチン累積予防接種率の検討 定期接種ワクチンとの比較 第 117 回日本小児科学会学術集会 2014 年 4 月 11-13 日 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

高梨さやか、井上茉南、水口雅、崎山弘、沖津祥子、牛島廣治 府中市におけるロタウイルスワクチン累積接種率の検討 - 定期接種との比較 第 5 回予防接種に関する研究報告会 2014 年 3 月 8 日 新太宗ビル(東京都渋谷区)

牛島廣治、町田早苗、野村明子、野村博、Khamrin P. 感染回避を考慮したノロウイルス GII.4VLP の経口投与方法におけるマウスでの免疫効果 第 5 回予防接種に関する研究報告会 2014 年 3 月 8 日 新太宗ビル(東京都渋谷区)

町田早苗、野村明子、野村博、Khamrin P.、牛島廣治 経口投与を前提としたノロウイルス GII.4 VLP ワクチンのマウスでの免疫効果 第 61 回日本ウイルス学会 2013 年 11 月 10-12 日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

日本大学医学部 医局・教室紹介 病態病理学系微生物学分野 研究業績

<http://www.nihon-u.med-microbe.jp/publications.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

牛島 廣治 (USHIJIMA, Hiroshi)

日本大学・医学部・客員教授

研究者番号: 10091068

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

沖津 祥子 (OKITSU, Shoko)

東京大学・医学系研究科・客員研究員

研究者番号: 10082215

高梨 さやか (TAKANASHI, Sayaka)

東京大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 20645709

町田 早苗 (MACHIDA, Sanae)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00219362

### (4) 研究協力者

カムリン パターラ (KHAMRIN, Pattara)

日本大学・医学部・客員研究員、

チェンマイ大学・医学部・講師

トンプラチュム アクサラ

(THONPRACHUM, Aksara)

日本学術振興会・外国人特別研究員

(日本大学医学部)

野村 明子 (NOMURA, Akiko)

イムノプローブ株式会社・研究員

早川 智 (HAYAKAWA, Satoshi)

日本大学・医学部・教授