

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601
 研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
 研究期間：2017～2019
 課題番号：16KK0178
 研究課題名（和文）Gnotobiotic pigsを用いたウイルス性胃腸炎制御へのワクチン開発（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Vaccine development utilizing gnotobiotic pig model for controlling viral gastroenteritis(Fostering Joint International Research)

研究代表者
 高梨 さやか（Takanashi, Sayaka）
 東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：20645709

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円
 渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：オハイオ州立大学に研究代表者が1年間滞在し、ヒト乳児由来糞便細菌叢移植 gnotobiotic pigsを用いて、栄養充足群と栄養不足群におけるロタウイルス（RV）ワクチンの効果検証実験を行った。結果、食餌中のタンパク欠乏により、IL-22の低下で示される腸上皮細胞のバリア機能の破綻、及びLPS高値の示すBacteremiaがもたらされた可能性が示唆された。また、抗RV IgA抗体の産生不良や、RV抗原刺激時のT細胞IFN- γ 産生能が低下していることから、ワクチン接種に対する免疫応答が阻害され、結果的にRVワクチンの効果減弱を引き起こしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者が博士研究員として留学したネットワークを活かし、オハイオ州立大学で長年実績のある gnotobiotic pigを用いて、日本で近々定期接種化が計画されているHRVワクチンの国際共同研究を行った。ヒト乳児由来糞便細菌叢移植 gnotobiotic pigsの系は、腸内細菌叢、栄養と免疫との相互作用解明に有用な動物モデルであり、HRV感染症対策には、ワクチンの活用に加えて、衛生や栄養も考慮した包括的な取り組みが必要なことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：By using malnourished-human infant fecal microbiota transplanted neonatal pig models, we demonstrated that protein malnutrition hampered the efficacy of an oral attenuated human rotavirus vaccine by altering adaptive and innate immune responses. Our findings on lower level of IL-22 and higher amount of LPS in protein-deficient diet pigs would provide novel insights on intestinal membrane regeneration and possible interactions among nutrition, microbiota and host immunity.

研究分野：小児感染症

キーワード：胃腸炎 Gnotobiotic pig model ロタウイルス ワクチン 栄養 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

UNICEF の 2013 年の推計によると、全世界で 5 歳未満の乳幼児の死亡数は年間約 630 万人であり、そのうち、約 9 % が下痢原性疾患による死亡と報告されている (Liu et al., 2015)。ヒトロタウイルス (HRV) は重症胃腸炎の代表的な原因であり、同年の推計では、約 21 万人の死亡が報告されている (Tate et al., 2016)。こうした中、WHO は 2009 年よりロタウイルスワクチンを各国の定期接種に導入するよう Position paper で勧告している。一方で、全世界的なロタウイルスワクチンの有効性を比較した研究では、高所得国に比して中・低所得国で有効性が低い傾向にあると報告されている (Glass et al., 2013)。こうした現象の背景として、経口生ワクチン中の有効なウイルス量を減少させる要素と、ワクチンに対する児の免疫反応を減弱させる要素が考慮されている。前者として、母乳中の IgA 抗体や経胎盤の母体由来の IgG 抗体の影響が指摘され、後者として、ホストの遺伝的要因に加え、タンパク質や微量栄養素の欠乏、環境要因による腸炎の影響や腸内細菌叢の多様性低下によるバランス失調が指摘されている。

腸内細菌叢を既知の状態にコントロールする目的で、飼料や飼育材料等を滅菌したものをを用いてアイソレータ内で管理する、無菌動物実験がワクチン研究で取り入れられてきた。中でもブタは解剖学的、生理学的、免疫学的にヒトに近似することから、多くの研究がなされてきている (Saif et al., 1996, Ward et al., 1996, Gonzalez et al., 2010)。研究代表者が博士研究員として留学し、本研究課題の海外共同研究施設であるオハイオ州立大学は、この無菌状態に保った gnotobiotic pig (Gn pig) の研究で長年の実績がある。最近、同大学は、米国の健康乳児から採取したヒト乳児由来糞便細菌叢 (human infant fecal microbiota, HIFM) を定着させた HRV 感染モデルにおいて、栄養失調によるロタウイルス感染時およびワクチン接種時の獲得免疫機能低下を報告している (Vlasova et al., 2016)。本研究では当該モデルを活用し、中・低所得国における状況とさらに近似させる目的で、ケニアの栄養不良乳児由来の糞便細菌叢 (malnourished-HIFM, M-HIFM) を定着させた HRV 感染モデルにおいて、ロタウイルス感染時およびワクチン接種時の免疫機能評価を行った。研究開始当初は未定であった、HRV ワクチンの日本の定期接種導入を見据えて、将来の胃腸炎ワクチン戦略を考慮する上での介入策の道筋を探ることを目的とした。

2. 研究の目的

(1) M-HIFM を定着させた Gn pig HRV 感染モデルにおける、低たんぱく栄養の HRV 感染症に与える影響の評価

(2) M-HIFM を定着させた Gn pig HRV 感染モデルにおける、低たんぱく栄養の HRV ワクチン効果に与える影響の評価

3. 研究の方法

(1) 使用した HRV

サル胎児腎細胞である MA104 細胞で継代培養し弱毒化した HRV (AttHRV) Wa G1P[8] 株を、1 回 1×10^7 fluorescent foci-forming units (FFU) の量をワクチンとして用いた。また、Gn pig で 25 ~ 26 回継代した強毒 (VirHRV) Wa G1P[8] 株を攻撃用ウイルスとして 1 回 1×10^6 FFU 使用した。

(2) 使用した HIFM

オハイオ州立大学の Institutional Ethical committee の許可のもと、WHO 子ども成長基準で、年齢に対する身長が中央値から標準偏差 -2 以上であるケニアの 2 歳児のおむつより、継続的に便検体を採取した。検体はプールし、0.05% (vol/vol) cysteine と 30% glycerol 含有リン酸緩衝液で 1:20 (wt/vol) に希釈し、実験に用いるまで -80℃ に保管した。

(3) 動物実験

動物実験はすべて、オハイオ州立大学の Institutional Animal Care and Use Committee の許可のもと、3R の原則 (Replacement, reduction, refinement) に従って行われた。既報に乗っ取り、Landrace × Yorkshire × Duroc cross-bred の分娩直前の妊娠ブタより子宮を摘出し、無菌アイソレータ内で新生児ブタを蘇生した。1 頭の妊娠ブタから 12 頭前後の新生児ブタを作出し、無菌アイソレータ内にて飼育した。飼料として、100% ultrahigh-temperature-pasteurized bovine milk (Parmalat) を与えた栄養充足 (sufficient diet, SD) 群と、50% の Parmalat と 50% の無菌水を混合した飼料を与えた栄養不足 (deficient diet, DD) 群を、それぞれ独立した無菌アイソレータ内で維持した。2- の目的のために SD 群に 8 頭、DD 群に 7 頭、2- の目的のために SD 群に 10 頭、DD 群に 9 頭ランダムに割り当てた。直腸スワブ検体にて、好気性、嫌気性菌培養を行い、無菌ブタに細菌真菌の混入が無いことを確認後、日齢 4 に M-HIFM を移植した (post-HIFM transplantation day, PTD 0)。2- の目的のために、PTD 10 に Vir HRV にて攻撃した (PTD 10/post-challenge day, PCD 0)。攻撃後 14 日目に免疫応答の解析のため安楽殺した (PTD 24/PCD 14)。2- の目的のために、PTD 7 (PTD 7/post-1st vaccination day, PVD 0) と PTD 17 (PTD 17/post-2nd vaccination day 0, PVD 7 (0))

に AttHRV ワクチンを投与し、その 7 日後に Vir HRV にて攻撃した (PTD 24/PVD 17(7)/PCD 0)。攻撃予定当日に SD 群、DD 群ともに 4 頭ずつ、攻撃前の状態評価のために安楽殺した。残りの SD 群 6 頭、DD 群 5 頭は、攻撃後 7 日目に、安楽殺した (PTD 31/PVD 24 (14)/PCD 7)。

(4) 臨床症状とウイルス排泄評価

臨床的評価項目の一つとして、PTD 0 における体重を 100% とした増体率を 2-3 回/週 算出した。Vir HRV による攻撃後、連日直腸スワブ検体を採取した。Fecal consistency を、以下のようにスコアリングした: 0, normal; 1, pasty/semi-liquid; 2, liquid。既報に乗っ取り、スコア 2 以上を下痢ありと判定した。スワブは minimum essential medium に懸濁し、遠心の後、免疫蛍光抗体法によるウイルス定量を行うまで上清を -20 に保管した (Ward et al., 1996)。

(5) 単核球分離とフローサイトメトリー解析

全血、脾臓、回腸、十二指腸を回収し、既報に乗っ取り単核球分離を行った。分離された単核球はそれぞれ、T 細胞分画 (T helper (CD3+CD4+) および cytotoxic T cells (CD3+CD8+))、制御性 T 細胞 (natural regulatory T cells: CD4+CD25-Foxp3+, inducible regulatory T cells: CD4+CD25-Foxp3+, activated T cells: CD4+CD25+Foxp3-)、HRV 特異的 IFN- 産生性 CD4+ および CD8+ cells、plasmacytoid DCs (pDCs, SWC3a+CD4+CD11R1-)、の存在率を BD CSampler™ Plus を用いて解析した (Chatta et al., 2010, Miyazaki et al., 2018)。

(6) 血清、腸管内容物中サイトカイン測定

試験中、複数のタイミング (PTD 0, 7, 9, 17, 19, 24 (PCD 0), 26 (PCD 2) and 31 (PCD 7)) で採血を行い、血清を回収した。また、安楽殺時に腸管 (回腸、結腸) 内容物を回収した。既報に乗っ取り、proinflammatory (TNF- and IL-6)、innate (IFN-), Th1 (IL-12 and IFN-), Th2 (IL-4)、および 上皮細胞の保護に働く IL-22 の濃度を ELISA 法にて測定した (Chatta et al., 2010, Miyazaki et al., 2018)。

(7) 血清生化学およびロタウイルス抗体測定

VirHRV の攻撃当日と 7 日後に、グルコース、Lipopolysaccharide (LPS) 含む一般血液生化学項目および、抗ロタウイルス IgA 抗体の測定を行った。

4. 研究成果

DD 投与豚は SD 投与豚に比して有意に体重増加が障害された。DD 投与豚はワクチン投与後の強毒株の攻撃に対して下痢防御率が低く、胃腸炎スコアは攻撃後 4 日目において、SD 投与豚より有意に高かった。ウイルス排泄量は全般的に DD 群で高く、経過を通じた幾何平均として有意差が認められた。血清中のグルコース値は、強毒株攻撃前後ともに、SD 群で有意に高かった。また、LPS は強毒株攻撃当日の測定において、DD 群で有意に高かった。

血清中の抗ロタウイルス IgA 抗体は両群で強毒株攻撃後に上昇したが、攻撃後の値は SD 群のほうが有意に高かった。血清中サイトカインの動向は、多くの項目で SD 群、DD 群に顕著な相違が認められなかった中で、IL-22 が PTD2 において有意に SD 群で高く検出された。また、IFN-、IFN- が PCD2 において、やはり SD 群で有意に高く検出された。単核球フローサイトメトリー解析では、ワクチン投与試験において、安楽殺時の脾臓由来 HRV 特異的 IFN- 産生性 CD4+T 細胞の存在率は DD 群で、有意に少なかった。

これらの結果から、食餌中のタンパク欠乏により、IL-22 の低下で示される腸上皮細胞のバリア機能の破綻および、LPS 高値の示す Bacteremia がもたらされた可能性が示唆された。また、抗 RV IgA 抗体の産生不良や、RV 抗原で刺激した際の T 細胞の IFN- 産生能が低下していることから、ワクチン接種に対する免疫応答が阻害され、結果的に RV ワクチンの効果減弱を引き起こしていることが示唆された。

HIFM 移植 Gn pig の系は、腸内細菌叢、栄養と免疫との相互作用解明に有用な動物モデルであり、HRV 感染症対策には、ワクチンの活用に加えて、衛生や栄養も考慮した包括的な取り組みが必要なことが示唆された。

これらの成果は現在、論文原稿作成中であり、本課題の海外共同研究施設と共同で、腸内細菌叢がワクチン免疫原性に与える影響に関する英語総説論文は (5-6) の如く刊行された。また、臨床ウイルス学会のロタウイルスワクチン定期接種化特集学会誌で、腸内細菌叢とロタウイルス感染症に関する総説論文は (5-8) のごとく敢行された。さらに、HRV ワクチン導入後の諸外国において、人畜共通感染症として注目を集めてきている C 群ロタウイルス感染症について、古典的な株 (Cowden) と最近の流行株 (RV104, RV143) との病原性の相違に関するスタディに参画し、共同執筆した論文は (5-9) の如く刊行された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 10件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okitsu S, Hikita T, Thongprachum A, Khamrin P, Takanashi S, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H.	4. 巻 62
2. 論文標題 Detection and molecular characterization of two rare G8P[14] and G3P[3] rotavirus strains collected from children with acute gastroenteritis in Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infect Genet Evol	6. 最初と最後の頁 95-108.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.meegid.2018.04.011	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 該当する
1. 著者名 Hoque SA, Khandoker N, Thongprachum A, Khamrin P, Takanashi S, Okitsu S,	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Distribution of rotavirus genotypes in Japan from 2015 to 2018: Diversity in genotypes before and after introduction of rotavirus vaccines.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2020.03.061.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hoque SA, Iizuka I, Kobayashi M, Takanashi S, Anwar KS, Islam MT, Hoque SA, Khamrin P, Okitsu S, Hayakawa S, Ushijima H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Determining effectiveness of rotavirus vaccine by immunochromatography and reverse transcriptase polymerase chain reaction: A comparison.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 5886-5890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2019.07.091.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okitsu S, Khamrin P, Takanashi S, Thongprachum A, Hoque SA, Takeuchi H, Khan MA, Hasan SMT, Iwata T, Shimizu H, Jimba M, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H.	4. 巻 77
2. 論文標題 Molecular detection of enteric viruses in the stool samples of children without diarrhea in Bangladesh.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infect Genet Evol	6. 最初と最後の頁 104055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.meegid.2019.104055.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kaneko M, Takanashi S, Inoue M, Sakiyama H, Okitsu S, Mizuguchi M, Ushijima H	4. 巻 acmi.0.000033
2. 論文標題 Detection of mutations in the VP7 gene of vaccine-derived strains shed by monovalent rotavirus vaccine recipients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Access Microbiology	6. 最初と最後の頁 acmi.0.000033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/acmi.0.000033	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 Vlasova AN, Takanashi S, Miyazaki A, Rajashekara G, Saif LJ	4. 巻 37
2. 論文標題 How the gut microbiome regulates host immune responses to viral vaccines.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current opinion in virology	6. 最初と最後の頁 16-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.coviro.2019.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kawata K, Hikita T, Takanashi S, Hikita H, Ogita K, Okitsu S, Hoque SA, Phan T G, Ushijima H.	4. 巻 acmi.0.000085.
2. 論文標題 Diagnosis of Acute Gastroenteritis with Immunochromatography and Effectiveness of Rotavirus Vaccine in a Japanese Clinic.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Access Microbiol.	6. 最初と最後の頁 acmi.0.000085.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/acmi.0.000085.	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 高梨 さやか	4. 巻 48
2. 論文標題 ロタウイルス胃腸炎とMicrobiome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床とウイルス	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Juliet Chepngeno, Sayaka Takanashi, Annika Diaz, Husheem Michael, Francine C Paim, Michael C Rahe, Jeffrey R Hayes, Courtney Baker, Douglas Marthaler, Linda J Saif, Anastasia N Vlasova	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Comparative Sequence Analysis of Historic and Current Porcine Rotavirus C Strains and Their Pathogenesis in 3-Day-Old and 3-Week-Old Piglets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00780.	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 該当する

1. 著者名 Khandoker N, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Nishimura S, Kikuta H, Yamamoto A, Sugita K, Baba T, Kobayashi M, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H.	4. 巻 90
2. 論文標題 Molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis in Japan during 2014-2015: Characterization of re-emerging G2P[4] after rotavirus vaccine introduction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Med Virol.	6. 最初と最後の頁 1040-1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 牛島 廣治、疋田 敏之、Kim Pham、飯塚 愛恵、恩田 優子、川岸 崇裕、金井 裕太、河本聡志、高梨さやか、沖津 祥子、田島 剛、菊田英明、小林 正明、山本 あつ子、西村 修一、杉田 久美子、馬場 常嘉、小林 剛、谷口 孝喜、早川 智
2. 発表標題 イムノクロマト法によるロタウイルス抗原血症の検討
3. 学会等名 第51回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 疋田敏之、疋田博之、疋田房子、高梨 さやか、沖津祥子、Hoque Ariful、牛島廣治
2. 発表標題 イムノクロマト法による胃腸炎の 診断とロタウイルスワクチンの効果についての検討
3. 学会等名 第51回日本小児感染症学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牛島 廣治、塩田 愛恵、清水 優子、宮下 英将、小林 正明、カムリン パタラ、ホク アリフル、高梨さやか、沖津 祥子、川岸 崇裕、金井 裕太、河本聡、谷口 孝喜、小林 剛、田島 剛、マネカンニワット、早川 智
2. 発表標題 免疫クロマト法と酵素抗体法によるロタウイルス抗原血症と抗原尿症の検索
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高梨 さやか、宮崎 綾子、マイケル フシーム、ペイム フランシン、チャンベンチノ ジュリエット、スリバスタナ ヴィシャル、ラジャセカラ ギリシュ、サイフ リンダ、ブラソバ アナスタシア
2. 発表標題 低栄養児由来便細菌叢移植無菌ブタモデルを用いた蛋白質欠乏餌によるヒトロタウイルスワクチン効果減弱の解析
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高梨 さやか、沖津 祥子、柴村 美帆、牛島 廣治
2. 発表標題 単価ロタウイルスワクチン培養精製抗原を用いた妊婦血清中抗ロタウイルス抗体価の検討 ワクチン免疫原性に影響を与える母体由来因子の解明を目指して
3. 学会等名 第60回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Khamrin Pattara, 飯塚 愛恵、沖津 祥子、高梨 さやか、早川 智、牛島 廣治
2. 発表標題 Molecular Epidemiology of Gastroenteritis Viruses in Pediatric Patients in Japan
3. 学会等名 第60回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hoque Ariful, 飯塚(塩田) 愛恵, 小林 正明, 高梨 さやか, Khamrin Pattara, 沖津 祥子, 早川 智, 牛島 廣治
2. 発表標題 Determination of Effectiveness of Rotavirus Vaccine by Immunochromatography and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
3. 学会等名 第60回日本臨床ウイルス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高梨 さやか, 中村 佳恵, 水野 葉子, 名西 恵子, 星野 愛, 安戸 裕貴, 岡 明, 沖津 祥子, 牛島 廣治, 水口 雅
2. 発表標題 単価ロタウイルスワクチン培養精製抗原を用いた妊婦血清中抗ロタウイルス抗体価の検討
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院医学系研究科発達医科学 ホームページ http://www.development.m.u-tokyo.ac.jp/ リサーチマップ https://researchmap.jp/sayakatakanashi/?lang=japanese</p>

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	サイフ リンダ (Saif J. Linda)	オハイオ州立大学・FAHRP・Professor	