

2022 年度 博士（医療科学）学位論文

**ロタウイルス特異的 IgG および IgA の定量分析のための
In house ELISA の開発と評価**

藤田医科大学大学院保健学研究科
医療科学専攻 博士後期課程

（指導：井平 勝 教授）

塩谷 泰子

**Development and evaluation of in house ELISA for quantitative
analysis of rotavirus specific IgG and IgA**

Yasuko Enya

Fujita Health University Graduate School of Health Sciences
Doctoral Program in Medical Sciences

目次

第1章 はじめに

1.1	ロタウイルス	1
1.2	ロタウイルス構造と分類とその遺伝子型	2
1.3	ロタウイルス胃腸炎の疫学	6
1.4	ロタウイルス胃腸炎の病態	7
1.5	ロタウイルス感染に対する免疫とその防御	8
1.6	ロタウイルスワクチン	10

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

2.1	目的	12
2.2	方法	12
2.2.1	RV 大量培養	
2.2.2	RV の濃縮と精製	
2.3	In house ELISA 法の開発	15
2.3.1	In house ELISA 法手順	
2.3.2	OD カットオフ値の決定および抗体価算出法	
2.3.3	In house ELISA 法の再現性	
2.3.4	RV 中和抗体測定法	
2.3.5	RV 中和抗体価測定法と in house ELISA 法の比較	
2.3.6	臨床検体を用いた評価	
2.4	結果	19
2.4.1	In house ELISA 法の再現性	
2.4.2	RV 中和抗体価と in house ELISA 法の比較	
2.4.3	臨床検体の評価	
2.5	考察	23

第3章 Rotarix®接種後の宿主免疫応答と便中ウイルス増殖の関連性解析

3.1	はじめに	25
3.2	方法	27
3.2.1	対象	
3.2.2	検体採取	
3.2.3	RNA 抽出	
3.2.4	Real-time RT-PCR	

3.2.5	In house ELISA	
3.2.6	統計解析	
3.3	結果	30
3.3.1	観察期間における RV IgG、IgA 抗体価測定結果	
3.3.2	RV1 ワクチン接種後の便中への RV ワクチン株ゲノム排泄	
3.3.3	RV IgG、IgA と便中 RV1 ウイルス排出量	
3.3.4	RV IgG、IgA と便中ウイルス排泄量の相関	
3.4	考察	38
第4章 急性ロタウイルス胃腸炎患者におけるロタウイルス抗原血症と液性免疫応答との関連性解析		
4.1	はじめに	41
4.2	方法	41
4.2.1	研究デザイン	
4.2.2	血清 RV IgG および IgA 抗体価を測定するための in house ELISA	
4.2.3	血清検体中の RV 抗原の検出	
4.2.4	RV IgG および IgA 抗体価に関連する因子	
4.2.5	統計分析	
4.3	結果	43
4.3.1	患者背景	
4.3.2	RV IgG および IgA 抗体価	
4.3.3	RV 抗原血症	
4.3.4	RV 抗原血症と抗体価の相関性	
4.3.5	RV IgG および IgA 抗体価に関連する因子	
4.4	考察	50
第5章 総括		53
謝辞		55
引用文献		
第1章	引用文献	56
第2章	引用文献	60
第3章	引用文献	61
第4章	引用文献	65

第1章 はじめに

1.1 ロタウイルス

ロタウイルス（Rotavirus ; RV）はレオウイルス科（family *Reoviridae*）、ロタウイルス属（genus *Rotavirus*）に分類されるウイルスで、1950年代と1960年代にサルとマウスから発見された。1973年に Bishop らによって、急性胃腸炎幼児の十二指腸生検標本からも電子顕微鏡により特徴的なウイルス粒子が発見され、乳幼児の嘔吐・下痢症の起因ウイルスであることが明らかとなった^{1,2}。その後、下痢を伴った小児の便サンプルからも同様に電子顕微鏡でウイルス粒子が検出され、ウイルス粒子が車輪のように見えることから、ラテン語の「ロタ（Rota）＝車輪」由来のウイルス名が付けられた。（Figure 1-1, 1-2）

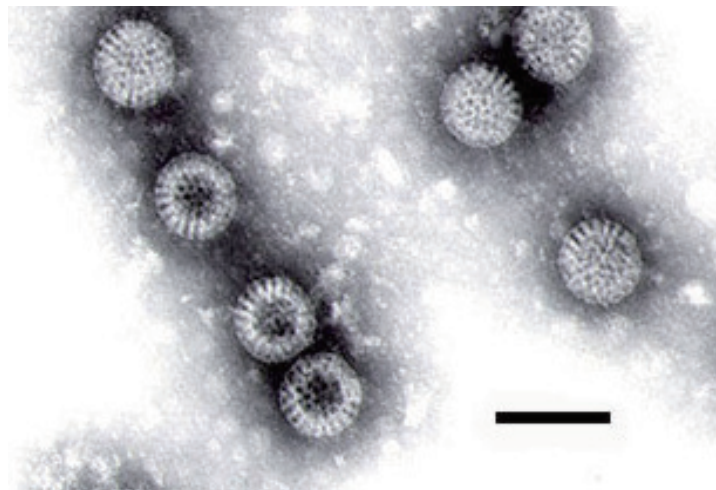


Figure 1-1 Transmission Electron Microscopy. Bar = 100 nanometers.

US Environmental Protection Agency.

Transfer from <http://www.epa.gov/microbes/rota.html>

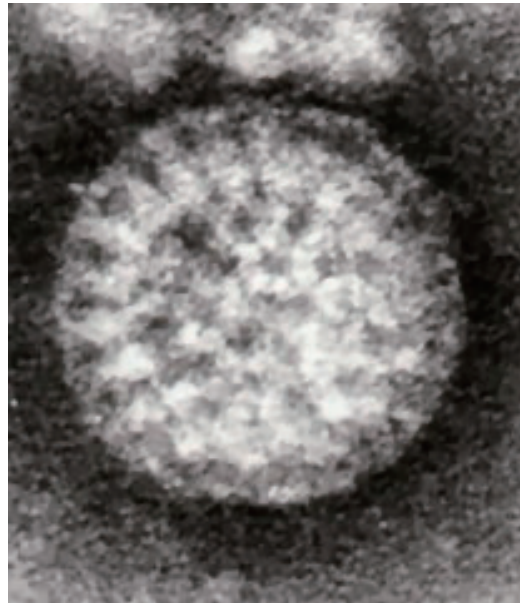


Figure 1-2 A rotavirus particle from a transmission electron micrograph made by Thomas Henry Flewett and left in the possession of Dr G.M. Beards.

Transfer from English Wikipedia

このように、RV は小児急性胃腸炎の原因ウイルスであることが明らかとなり、世界のほぼすべての小児が5歳までにRVに感染することが示唆されている。世界保健機関(WHO)の推計によると、ワクチン導入前はRVによる死亡者数は約45万人、入院者数は200万人以上、通院者数は2,500万人以上と推計されており³、この甚大な疾病負荷の90%以上がアジアやアフリカの発展途上国で発生していた^{4,5}。ワクチン開発後、接種プログラムが進んだ地域では全体のRV胃腸炎患児数は減少したものの、ワクチン未接種の年長児の割合が増している。一方、ワクチン接種が進んでいない地域での有病率は相変わらず高いままである。ワクチン導入が進んだ後の2013年の調査でも、発展途上国を中心に年間20万人以上のRV感染に伴う死亡例があると推計されている⁶。

1.2 ロタウイルス構造と分類とその遺伝子型

RV はエンベロープを持たない直径80~100 nm(スパイクを形成するVP4を含む)の正20面体の粒子で、外殻、内殻、コアの三重構造を持ち、内部には11分節からなる2本鎖RNAを有している。RVのゲノムは約18.5 Kbで、11分節の遺伝子にはRV粒子を構成する6種類のウイルス構造タンパク質(VP1~4、VP6、VP7)と、細胞に感染し粒子形成時にのみ産生される6種類の非構造タンパク質(NSP1~6)がコードされている。RV粒子

第1章 はじめに

は、内殻タンパク質 VP6、外殻タンパク質 VP7、VP4 が、コアを形成する VP1～3 を覆っている⁷⁾。(Figure 1-3) (Table 1-1)

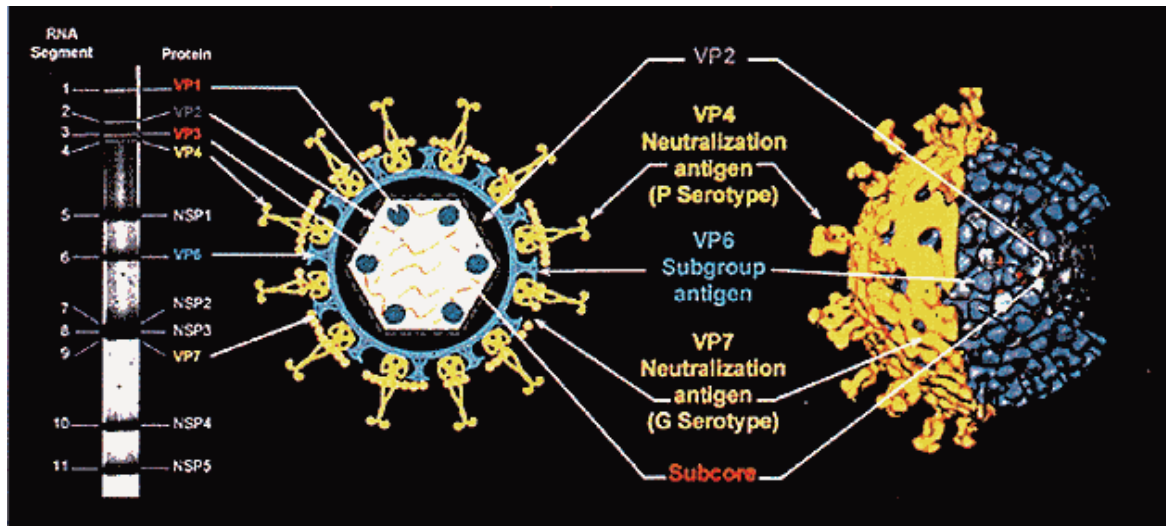


Figure 1-3 Rotavirus structure.

Emerging Infectious Diseases Volume 4, Number 4 –Oct–Dec 1998

Table 1-1 Genes and proteins of rotavirus SA11 strain.

Genome Segment	Encoded Proteins	Location, in Virion	Number of Genotype	Name/ Function
1	VP1	Core	21R type	RNA-dependent RNA polymerase
2	VP2	Core	19C type	Core protein
3	VP3	Core	19M type	Methyltransferase
4	VP4	Outer layer	50P type	Protease sensitive
5	VP6	Middle layer	26I type	Inner capsid
6	VP7	Outer layer	35G type	Glycosylated
7	NSP1	Nonstructural	30A type	Interferon Antagonist
8	NSP2	Nonstructural	20N type	NTPase
9	NSP3	Nonstructural	21T type	Translation enhancer
10	NSP4	Nonstructural	26E type	Enterotoxin
11	NSP5	Nonstructural	21H type	pHosphoprotein

2つの外殻タンパク質、VP7（G型）とVP4（P型）は中和エпитープを含み、感染防御免疫を誘導する。これらのタンパク質によってそれぞれGおよびP遺伝子型を定義する遺伝子型別調査が従来から実施され、疫学調査に使用されている。現在までに、世界中で35

第1章 はじめに

(G1~35) の G と 50 (P[1]~[50]) の P 遺伝子型が報告^{4,5}されており、G 型、P 型を基にして G 型[P 型]の様に表記される。一方、内殻タンパク質 VP6 の抗原性により A~H の 8 群に分類され、A~C 群はヒトに感染し、そのうち A 群 RV (RVA) の頻度や重症度が高いとされている。

ヒトに感染する RV の中で頻度の高い G 遺伝子型は、G1、G2、G3、G4、G9 および G12 であり、P 遺伝子型で頻度が高いものは P[4]・P[6]・P[8]である。ヒトから検出されるウイルスの 90%以上が G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]、および近年新たに発見された G12P[8]で占められ、特に世界のヒト RV 株の約 31%を G1P [8]が占める (Figure 1-4)⁸⁻¹⁰。

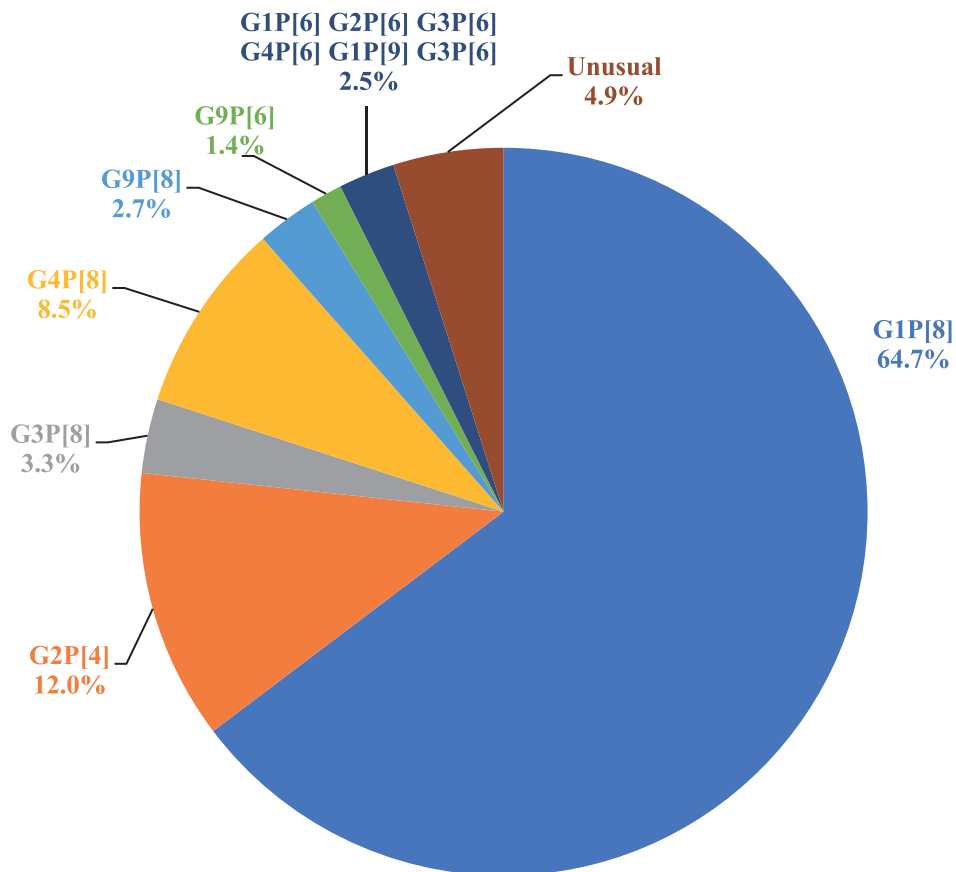


Figure 1-4 The global distribution of human group A rotavirus PG types (n=16474) reviewed from 124 studies from 52 countries on five continents published between 1989 and 2004.

Modified from Santos N al. Rev Med Virol. 2005; 15: 29-56

第1章 はじめに

国立感染症研究所感染症疫学センターの病原微生物検出情報によると、日本においては2017年から2021年の間に検出され遺伝子型が明らかになっており、G1、G2、G3、G9が多く、G4、G12は10%にも満たない出現率である。(Figure 1-5)

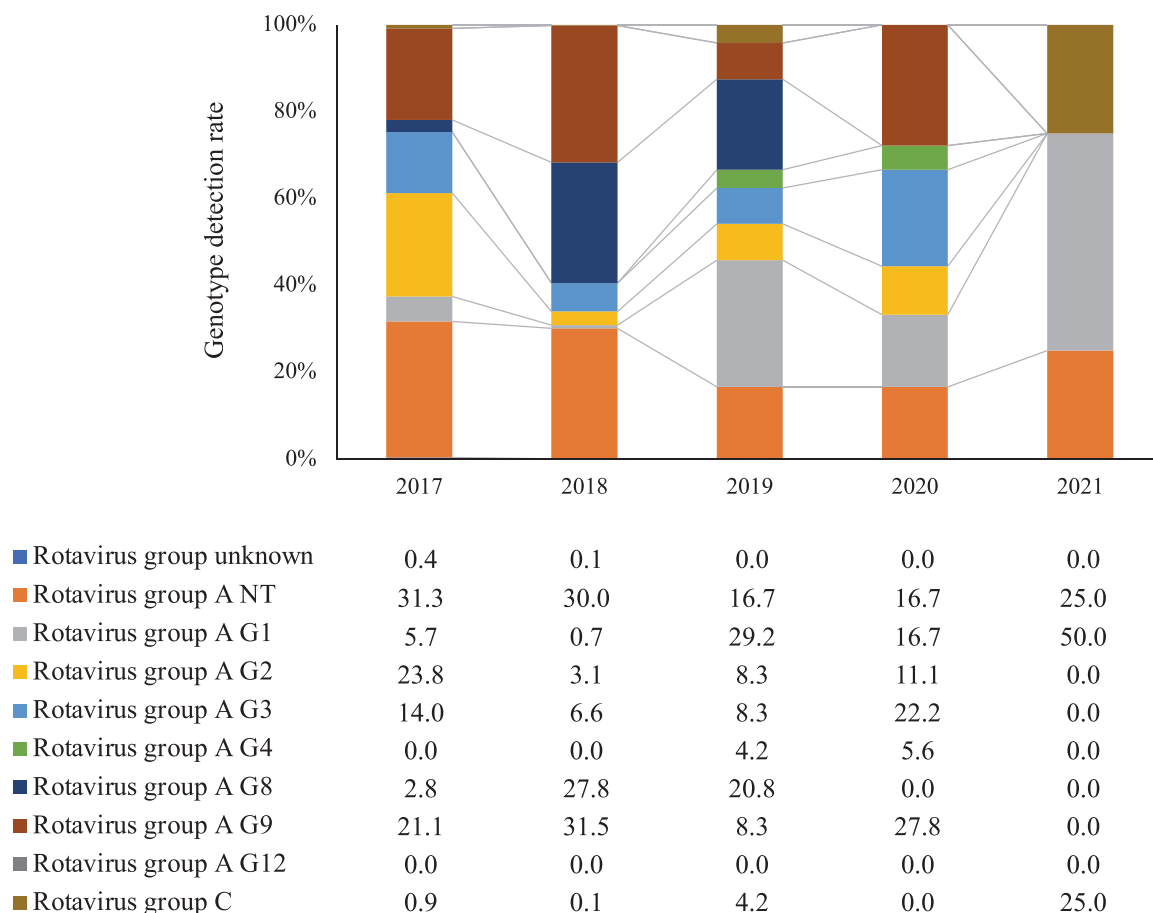


Figure 1-5 Seasonal transition of rotavirus genotype (serotype) in Japan.

Compiled from information on detection of pathogenic microorganisms from the National Center for Infectious Disease Epidemiology, National Institute of Infectious Diseases (NIID).

[September-August of the following year]

2008年から、従来の血清型による表記分類ではなく11分節すべての各遺伝子セグメント（VP7, VP4, VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5/6）に対応する遺伝子型（G: Glycosylated, P: Protease sensitive, I: Inner capsid, R: RNA-dependent RNA polymerase, C: Core protein, M: Methyltransferase, A: Interferon Antagonist, N: NTPase, T: Translation enhancer, E: Enterotoxin, H: pHosphoprotein）によるそれぞれの遺伝子が持つ機能による分類法が導入された。この分類法によると、現在までに35種類のG（VP7）、50種類のP（VP4）、

第1章 はじめに

26 種類の I (VP6)、21 種類の R (VP1)、19 種類の C (VP2)、19 種類の M (VP3)、30 種類の A (NSP1)、20 種類の N (NSP2)、21 種類の T (NSP3)、26 種類の E (NSP4)、21 種類の H (NSP5) の遺伝子型が見つまっている¹¹。(Table 1-1)

ヒトから検出される RVA 株のほとんどは、Wa 型 (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1)、DS-1 型 (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)、AU-1 型 (G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3) の 3 種類であった。これまで G1、G3、G4、G9 型ウイルスは Wa-like 遺伝子型構成 (P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) を有し、G2、G8 型ウイルスは DS-1-like 遺伝子型構成 (P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) を有していた。2012 年には、ヒトや動物間での異なる遺伝子型の遺伝子再集合体(リアソータント)によると考えられる DS-1-like G1 株 (G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) が報告された。その他、これまで稀だった遺伝子型 (G8) や、動物 RV 由来と考えられる遺伝子を持つ株 (ウシ様 G8 (G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2) および Equine-like G3 株 (G3-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)¹² および DS-1-like G9 株 (G9-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)¹³、G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1¹⁴ が国内外で報告されるようになった。

RV の多様性は、リアソートメントやリアレンジメントによるとされている。リアソートメントは、一つの細胞に複数の RV 株が同時感染した場合に様々な RV セグメントが組み合わさって新しいウイルス株が生じることを言う。発展途上国を中心に、ヒト RV と動物 RV のリアソートメントが起こることは前述のとおりである。リアレンジメントは、各遺伝子分節における塩基配列の部分的な重複や欠失により生じる。これまでに VP6、NSP1-5/6 遺伝子でリアレンジメントが報告されている¹⁵。

1.3 ロタウイルス胃腸炎の疫学

RV は、前述のように 5 歳未満の小児における下痢症の原因の 1 つで、感染力が非常に強く、衛生状態に関わらず世界中のほとんどの乳幼児が感染し発症する¹⁶。2003 年には、世界中で 5 歳未満の児において 1 億 1400 万件の RV 感染が報告され、そのうち 2400 万件が外来通院を必要とし、230 万件が入院を必要とした¹⁷。さらに、2016 年には世界中で 2 億 5800 万件以上の RV 感染が報告された¹⁸。一方、死亡例については 5 歳未満児の RV 関連死亡者数は 2013 年には 20 万人以上¹⁹、2016 年には 128,500 人と推察されている¹⁷。下痢で入院した小児の RV 感染の有病率は世界中で大きな差はない (30-50%) が、RV 感染に伴う死亡例の 90% 以上は低所得国に限られており、2013 年はインド、ナイジェリア、パキスタン、コンゴ民主主義共和国で総死亡例の 49% を占めており¹⁹、2016 年には南アフリカ、東南アジア、および南アジアでの死亡率が高かった¹⁸ (Figure 1-6)。

Child mortality from rotavirus, 2016

Mortality rate in children under 5 per 100,000 individuals. Rotavirus the leading causes of diarrheal diseases in children.

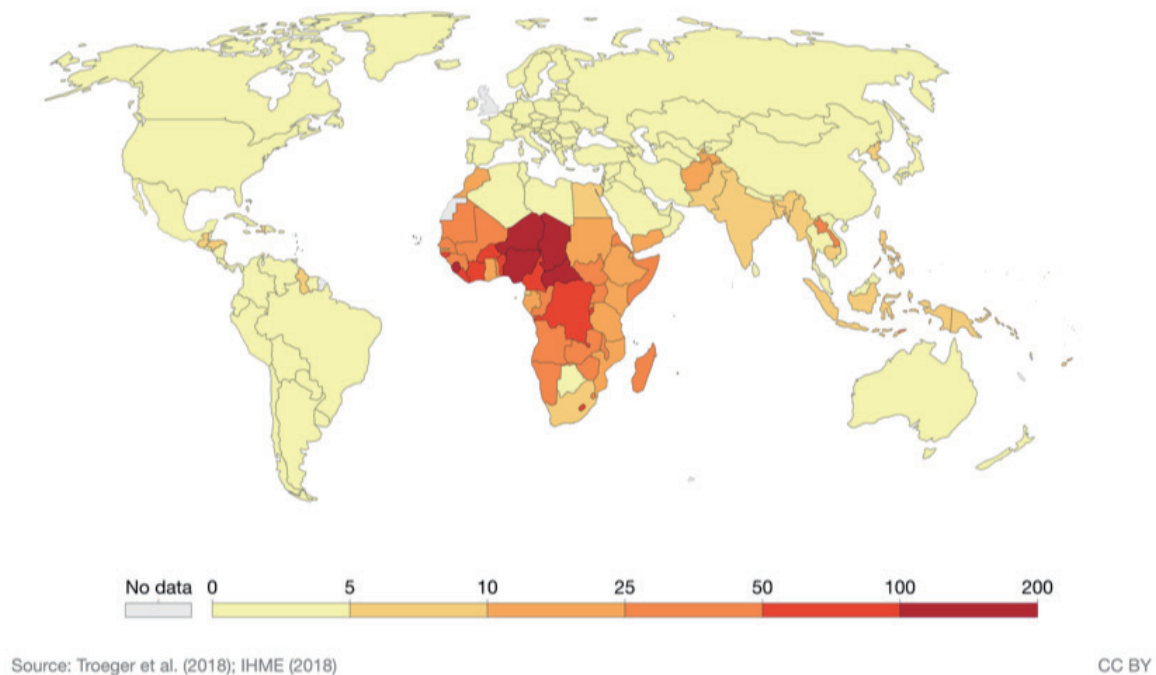


Figure 1-6 Geographic Distribution of Rotavirus-Associated Mortality Rates Among Children Younger Than 5 Years in 2016.

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), Global Disease Burden.

<https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/fullarticle/2696431>

日本では、RV ワクチン導入前の 5 歳未満児の RV 胃腸炎入院率の調査は、地域や年度によるばらつきはあるものの、4.1-5.3 人/1,000 人年（京都：2008～10 年）²⁰、2.8-4.7 人/1,000 人年（三重：2007～09 年）²¹、13.7 人/1,000 人年（秋田：2001～11 年）²²、5.59 人/1,000 人年（愛知：2007～13 年）²³と報告されている。この結果は、他の先進国と比べて同程度の入院率であった。Nakagomi らは、国内で年間 80 万人が RV によって医療機関を受診し、うち 26,000-78,000 人が入院加療を要し、10 名ほどが死亡するという疾病負担を有していたと報告している²⁴。

1.4 ロタウイルス胃腸炎の病態

RV は小腸の腸管上皮細胞に感染し、微絨毛の欠落などの組織障害を起こす。下痢の発症機序としては、小腸絨毛上皮細胞の破壊による吸収不良、ウイルスの非構造蛋白である

第1章 はじめに

NSP4 の細胞外エンテロトキシン様作用によるカルシウム依存的な細胞膜透過性亢進があげられている。RV 感染に伴い破壊された細胞から放出された NSP4 が、未感染細胞の NSP4 レセプターに結合し、細胞膜上のホスホリパーゼ C イノシトール三リン酸経路を活性化、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸が加水分解されることによって生じるイノシトール 1,4,5 三リン酸によって小胞体から Ca^{2+} を放出、これが細胞膜の Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャンネルを開き Cl^- の分泌を亢進する。さらに、消化管への Cl^- 流出に伴う Na^+ および水の再吸収減少によって浸透圧性下痢が誘起されると考えられている²⁵。しかしながら、動物実験により示された NSP4 による RV 感染に伴う下痢の発症機序が、果たしてヒトにも当てはまるかどうかは解明されていない。さらに、下痢発症には RV が小腸上皮細胞で効率よく増殖することが必要条件となるため、NSP4 以外にも RV 増殖効率に影響する因子などが関与している可能性も考えられている。

他のウイルス感染性胃腸炎に比べ、RV 感染のほうが胃腸炎症状とそれに伴う脱水が重症とされている。通常 1、2 日の潜伏期間を経て発症し、患者の便 1 mL 中には 1 兆個もの RV 粒子が排出されている。ウイルスの便中排出は発症前から始まり、発症後最長 57 日間持続するとの報告がある²⁶。生後 1 か月未満では移行抗体と母乳を介した IgA 抗体により RV 感染症は無症状か軽症で²⁷、発展途上国では 6~12 か月で、先進国では 12~24 か月の小児で明確な胃腸炎症状を伴い発症する²⁶。RV の自然感染においては、初感染時が最も重症で、反復感染により症状は軽減する²⁸。RV 胃腸炎の主な症状は、嘔吐、下痢（非血液性の水様便）などの激しい消化器症状と発熱である。かつては、小腸上皮細胞での局所感染と考えられていたが、小腸上皮細胞への感染後その組織を超えて血流に侵入し全身感染を起こし、RV 抗原やウイルス RNA が血清や脳脊髄液から検出されることもある^{29,30}。RV の腸外感染については動物モデルでも報告されており³¹、RV 胃腸炎患児における RV 抗原血症や RNA 血症についても報告されている。小腸で増殖した RV がどのような経路で到達するのか明らかではないが、一部の死亡例では RV 全身伝播がみられ、心臓、精巣、腎臓、肺、肝臓、膀胱で RV 抗原やウイルス RNA が検出されている³²。臨床的には、RV 感染に伴い痙攣、腎不全、脳炎・脳症などの全身的な合併症も報告されている^{33,34}。

1.5 ロタウイルス感染に対する免疫とその防御

ウイルス感染に対しては、宿主は自然免疫と特異的な獲得免疫の両方を発動して対応する。感染初期における自然免疫は、獲得免疫による各微生物特異的な免疫誘導の前に生体をいち早く防御するシステムで、炎症性シグナル伝達経路の活性化やサイトカインの迅速な産生などによる。このシステムは免疫に重要な役割を果たすのみならず、疾患の発症にも重要な役割を果たしている。一般的な RV 胃腸炎の経過は、発病後 1 週間以内に回復し

第1章 はじめに

始めることが多く、この早期回復にはサイトカインなどの自然免疫が関連することが指摘されてきた³⁵。それによると RV 胃腸炎急性期の患児とコントロール群との比較では、患者血液中では IL-6、IL-10、IFN- γ などのサイトカインが有意に上昇していることが確認された。これらのサイトカインは、Th1 型（細胞性免疫）と Th2 型（液性免疫）の 2 群に分けられ、Th1 型のサイトカイン（IL-2 と IFN- γ ）は、発症から 3 日以内に収集されたものより、4 日以降に収集されたものの方が有意に高く、急性感染の後期に産生されることを示していた。IL-2 は活性化 T 細胞から分泌され、IFN- γ は主に活性化 T 細胞、NK 細胞、マクロファージから産生されることから、これら 2 つのサイトカインは自然免疫に続く獲得免疫における RV 感染に対応する宿主免疫応答に関連していると考えられている³⁶。

RV 感染の防御には、能動免疫における細胞性免疫と液性免疫の両者が重要である³⁶。Offit らは、RV 感染における細胞性免疫の重要性に関して乳児のマウスによる動物実験を行っている³⁷。RV で免疫したマウスからリンパ球を採取し、CD8(+)を枯渇させた上でそのリンパ球を乳児マウスに移植すると、RV チャレンジに対する防御が無効になる。また、*in vitro* では血清中に中和抗体が存在しなくとも疾病に対する防御効果が確認されたことから、RV 特異的細胞傷害性 T リンパ球は、急性感染症の改善や再感染に対する保護に重要であると報告している。

液性免疫においては、RV 感染で最も強い抗体反応は VP6 に対して誘導されることが報告されている。他にも VP7、VP4、NSP4 に対する特異的な IgG、IgA 抗体が誘導される³⁷ことが知られており、生後 IgG、IgA の抗体価の推移を検討した報告によると、抗 RV IgG は母親からの移行抗体が生後半ほどで低下し、その後経過に従い上昇する。一方、IgA は移行抗体と異なり生後から上昇する³⁸。また、小児は一般に生後複数回 RV 感染を反復するが、感染回数が多い児ほど RV 抗体価が高いとされている³⁸。RV 胃腸炎患児から採取した血清中の RV IgG と IgA 抗体価によると、IgA が検出された小児では臨床症状が軽く、IgG が検出された小児では差がみられないことから、IgG と比べ IgA の方が RV 感染防御により重要な役割を果たしていることを示唆した報告もある³⁹。2 つの RV シーズンにわたった研究では、どちらのシーズンにおいても RV に感染した児は、初めのシーズンに感染しその後感染しなかった児に比して、RV IgG および IgA 抗体価が有意に低く、抗体価を解析した結果 IgG 抗体価が 800 以上または IgA 抗体価が 200 以上あれば感染防御効果があるとされている⁴⁰。同様の液性免疫の防御効果が他の研究でも示されているが、メキシコで行われた検討では、防御効果に対する閾値は米国での研究結果より高く地域差があることが報告されている³⁸。

第1章 はじめに

1.6 ロタウイルスワクチン

前述のような疾病負荷を軽減するため、重篤化予防を目的としたワクチンが開発された。初めて市販化されたワクチンはサル由来の弱毒 RV 株を用いた Rotashield (Wyeth Laboratories, Marietta, Pennsylvania, USA) で、残念ながら市販後に腸重積症の発生リスクがあることが明らかになり頓挫した。その後、2006 年に 1 価ワクチン (RV1) の Rotarix[®] (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) と 5 価ワクチン (RV5) の RotaTeq[®] (Merck & Co., West Point, PA, USA) の 2 種類のワクチンが市販され、2009 年 4 月には WHO が RV ワクチンをすべての国の乳幼児予防接種スケジュールに組み込むことを推奨した。日本でも Rotarix[®] と RotaTeq[®] の 2 種類のワクチン接種が 2011 年から可能となり、2020 年からは定期接種化された。

RV1 ワクチンは、RV 胃腸炎の小児から最初に分離された RV 89-12 株 (G1P [8]株) を、アフリカミドリザル腎臓株化細胞で 33 回継代後、3 回限界希釈し選択された株をさらに 7 回 Vero 細胞で継代し弱毒化したワクチンである。RV1 はヒトの腸管でよく増殖し、RV5 と比較して少ないウイルス量で有効な免疫誘導が可能であり、接種回数も 2 回と RV5 よりも少ない。RV1 の親株は、G1P [8]でありこの型の重症下痢症に対し 92%、P [8]を共有する G1、G4、G9 株に対し 87%の有効性が確認されている。つまり、G 型、P 型は異なっても、交差免疫により重症化予防が成立していることを示している⁴¹。それに対し RV5 ワクチンは、2 種類のウイルスが同時感染した細胞中でそれぞれに由来する遺伝子が再集合 (リアソートメント) するという RV の性質を用い、ウシ RV G6P [5]をバックボーンとしてヒト RV の臨床分離株 G1P [8]、G2P [6]、G3P [8]、G4P [8] および G9P [8] の遺伝子分節を組み合わせたウシ-ヒトリアソータントワクチンである。G1P [5]、G2P [5]、G3P [5]、G4P [5] および G6P [8] の 5 種類の遺伝子型 RV から構成されている。RV5 は、生後 2 か月から 27 日以上接種間隔において 3 回投与が必要で、重症 RV 胃腸炎の発症を 98%、RV による入院を 96% 予防するとされている⁴²。

どちらのワクチンも RV 感染の重症化予防に大きな効果があり、これらワクチンが導入された世界各国で RV による死亡者数は減少している。しかしながら、先進国では重症の下痢症例の 72~98%を予防するが、発展途上国では 42~63%の重症化予防効果しかないとされ、疾病負荷のほとんどを占める発展途上国で重症化予防効果が低いことが大きな問題となっている。その理由として、移行抗体又は母乳を介した母体由来の RV 抗体による干渉、栄養失調、腸内細菌叢の相違などが関与している可能性が示唆されているが、いまだ明確な答えは出ていない⁴³。

最近、RV1、RV5 以外にも複数の新たなワクチンが開発されており、Rotavac[™] (Bharat Biotech International Ltd., Hyderabad, India) と Rotasiil[™] (Serum Institute of India Pvt. Ltd., Pune, India) の 2 つのワクチンは 2018 年に WHO 事前資格を得て世界的に認可されている。

第1章 はじめに

Rotavac™ はインドの新生児から分離された天然のヒト-ウシ天然リアソータント G9P [11] 株[116E]に由来する弱毒生 1 価ワクチンで、Rotasiil™ は G1、G2、G3、G4、および G9 血清型のヒト-ウシ再構成株を含む凍結乾燥 5 種混合ワクチンである。他にも、RV から特定のタンパク質を単離し単独で投与するサブユニット RV ワクチンや、感染性や病原性を消失させた不活化 RV ワクチン、RV タンパク質 VP4、VP6、および VP7 をコードするプラスミド DNA ワクチン、RV のゲノムを含まない外殻タンパク質のみを植物で作り、単離、精製した組み換え VLP（ウイルス様粒子）ワクチンなど、免疫誘導性の向上と腸重積症のリスク回避のために経口弱毒生ワクチン以外の様々なワクチンの開発が進んでいる^{11,44}。

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

2.1 目的

臨床現場における RV 胃腸炎の診断は、主にイムノクロマト法による便中 RV 抗原の検出が主であり、血清中 RV 抗体測定は通常行われていない。しかしながら、RV 胃腸炎や RV ワクチンによる宿主免疫誘導評価のためには、当然 RV 抗体価の測定が必要である。免疫誘導能の評価法の一つに中和抗体測定があるが、測定のためには感受性のある細胞（RV では MA104 細胞）が必要で、測定には生きたウイルス、細胞を用いるため測定者の熟練を要する。一方、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法は、簡便かつ多数検体を同時に測定可能、さらに高感度であり汎用性が高い。ELISA 法による RV IgG、IgM の定量測定キットはコマーシャルベースで入手可能だが、RV IgA が測定可能なキットは市販されていない。一般にワクチンによる免疫誘導能は IgG 抗体の推移で評価されるが、RV のような消化管感染症は血中の液性免疫よりも粘膜免疫がより重要と考えられ、IgG に加えて IgA 抗体価の測定も極めて重要となる^{1,3}。しかし、IgM 抗体は発症急性期に検出され短期間で消失するため⁴、ペア血清による抗体上昇確認には用いられない。

このような背景を基に、本研究では in house ELISA 法による RV IgG および IgA 定量法の開発、基礎検討を行った。さらに開発した in house ELISA 法を用いて新生児における RV ワクチン接種後の免疫誘導能評価（3 章）、および RV 自然感染患児の胃腸炎における急性期および回復期の抗体測定（4 章）を行いその有用性を確認すると同時に、3 章では抗体価とワクチン株便中排泄量との関連、4 章では抗体価と RV 抗原血症を比較した。最初に本章では、RV IgG、IgA 測定のための基礎検討、臨床応用のための初期検討について述べる。

2.2 方法

2.2.1 RV 大量培養

ELISA プレートに固相化する RV 抗原作製のため、RV の大量培養を行った。ヒト抗 RV 抗体の測定にはサル RV である SA11 株でも抗原性に問題がないことから広く使用されているが⁵、我々はヒト RV への特異性をより上げるため、ヒト RV 株である Wa 株を用いた。15cm 細胞培養用ディッシュ (No.168381, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に MA104 細胞（本学医学部ウイルス寄生虫学河本准教授から提供）をコンフルエントになるまで培養し、Phosphate-Buffered Saline (PBS) で 2 回洗浄した。その後、アセチル化ト

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

トリプシン (T-6763, Sigma, St. Louis, MO, USA) (10 µg/mL) で 37 °C、30 分間の活性化処理を行ったのち、Wa 株 5.2×10^6 /mL を MA104 細胞に接種した。37 °C で 1 時間、Wa 株を細胞に吸着させ、乾燥を防ぐために 15 分毎にディッシュを回転させた。血清無添加のトリプシン (10 µg/mL) を含む MEM 培地 (Eagle's MEM, Sigma, St. Louis, MO, USA) を 20 mL 加え、十分な細胞変性効果 (CPE) が観察されるまで、37 °C で 3~4 日間培養した。

2.2.2 RV の濃縮と精製

十分な CPE が確認されたのち 0.05% トリプシン-EDTA 溶液 2 mL を加え 37°C、5 分処理した後に細胞を回収した。細胞片除去のため 5,000 rpm で 30 分間遠心し、上清を回収した。その上清を 30,000 rpm、4°C で 3 時間超遠心し (RP45T, Hitachi, Ltd., Chiyoda-ku, Tokyo, Japan)、上清を除去した。その後、TNC buffer (10 mmol/L CaCl₂, 150 mmol/L NaCl 含有 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.6)) をペレットに 2 mL 加え懸濁し、1 mL ASAHIKLIN AK-225 (旭硝子株式会社, Chiyoda-ku, Tokyo) を加えてガラスビーズを使用しホモジナイズ、3,000 rpm で 10 分遠心した。水層を採取してその溶液を 30,000 rpm、3 時間遠心し、上清を除去した。0.5 mL の TNC buffer でよく懸濁し、密度勾配による比重遠心のために Nycodenz (Axis-Shield PoC, Kjelsasveien, Oslo, Norway) 4.5 mL を加え、30,000 rpm で約 15 時間以上の遠心分離を行なった。パスツールピペットで精製ウイルスバンド (青白いバンド) (Figure 2-1) を取得し、4 mL TNC buffer に再懸濁、30,000 rpm で 3 時間遠心分離して TNC buffer に溶解し精製 Wa 株溶液とし、-80°C で保存した。 (Figure 2-2)



Figure 2-1 virus fraction

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

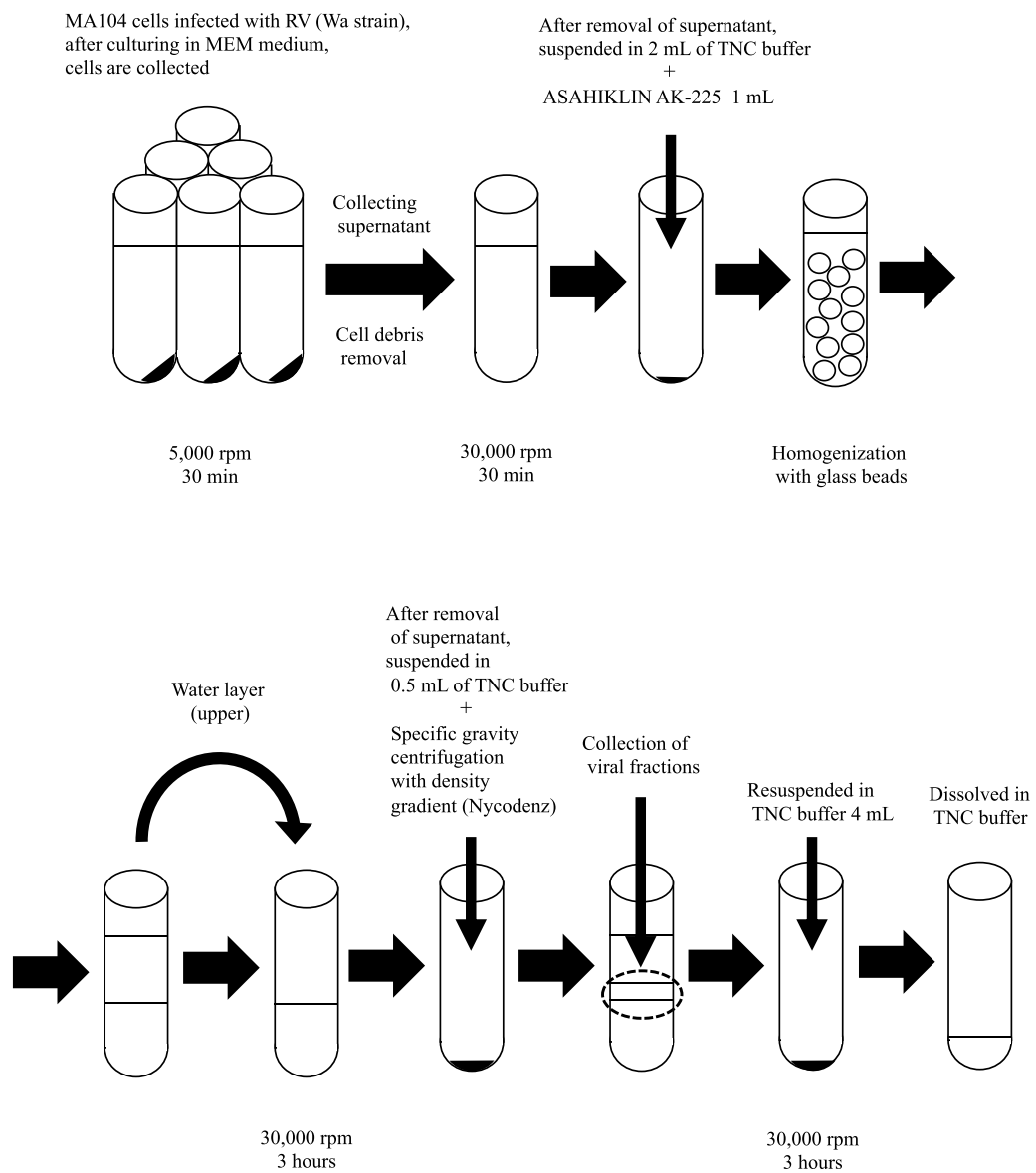


Figure 2-2 Purification of RV

2.3 In house ELISA 法の開発

2.3.1 In house ELISA 法手順

ELISA プレート (Coning® 96 ウェルハーフエリア平底高結合ポリスチレンマイクロプレート, CORNING, NY, USA) に、TNC buffer で $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ に希釈した上記の精製 Wa 株抗原を $25\text{ }\mu\text{L/well}$ で添加し 4°C で一晩静置固相化した。翌日、ウェル内の溶液を除去後、ブロッキングバッファーとして 0.3% ウシ血清アルブミンを加えた Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) を $160\text{ }\mu\text{L/well}$ 加え室温で 1 時間静置した。ウェル内の溶液を除去後、10 倍から 10^6 倍段階希釈した試料 $35\text{ }\mu\text{L}$ を各試料につき二重測定のために 2 ウェルずつ加え、室温で 1 時間静置した。ウェル内溶液を除去し、TBS-T $150\text{ }\mu\text{L}$ で 3 回洗浄後、二次抗体溶液として $25\text{ }\mu\text{L}$ のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG ($0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) または抗ヒト IgA ($0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を加え、室温で 1 時間静置、反応させた。ウェル内溶液を除去し、TBS-T で 6 回洗浄した後、基質液として 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を $25\text{ }\mu\text{L/well}$ 添加し、室温で 7 分間静置 (遮光) した後、 0.5 mol/L 硫酸を $25\text{ }\mu\text{L/well}$ 加え反応を停止させた。ELISA プレートリーダー (iMark Biolabs, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用して 450 nm で光学密度 (Optical density, OD) を測定した。 (table 2-1) (Figure 2-3)

Table 2-1 Protocol of in house ELISA

1)	Add $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ of antigen solution ($25\text{ }\mu\text{L/well}$) to a 96-well half-area plate.
2)	Incubate overnight (about 16 hours) under refrigeration.
3)	Remove solution from wells.
4)	Add diluent ($160\text{ }\mu\text{L/well}$) and incubate at room temperature for 1 hour.
5)	Remove the solution in the wells.
6)	Add 2 wells of step-diluted sample ($35\text{ }\mu\text{L/well}$) and incubate at room temperature for 1 hour.
7)	Remove the solution in the wells and wash the wells 3 times with washing buffer ($160\text{ }\mu\text{L/well}$).
8)	Add secondary antibody solution (IgG: $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$, IgA: $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$) ($25\text{ }\mu\text{L/well}$) and incubate at room temperature for 1 hour.
9)	Remove the solution in the wells and wash the wells 6 times with washing buffer ($160\text{ }\mu\text{L/well}$).
10)	Add substrate solution ($25\text{ }\mu\text{L/well}$) and incubate at room temperature for 7 minutes under light-shielded condition.
11)	Add 0.5 mol/L H_2SO_4 ($25\text{ }\mu\text{L/well}$).
12)	Measure absorbance (450 nm) with a plate reader.

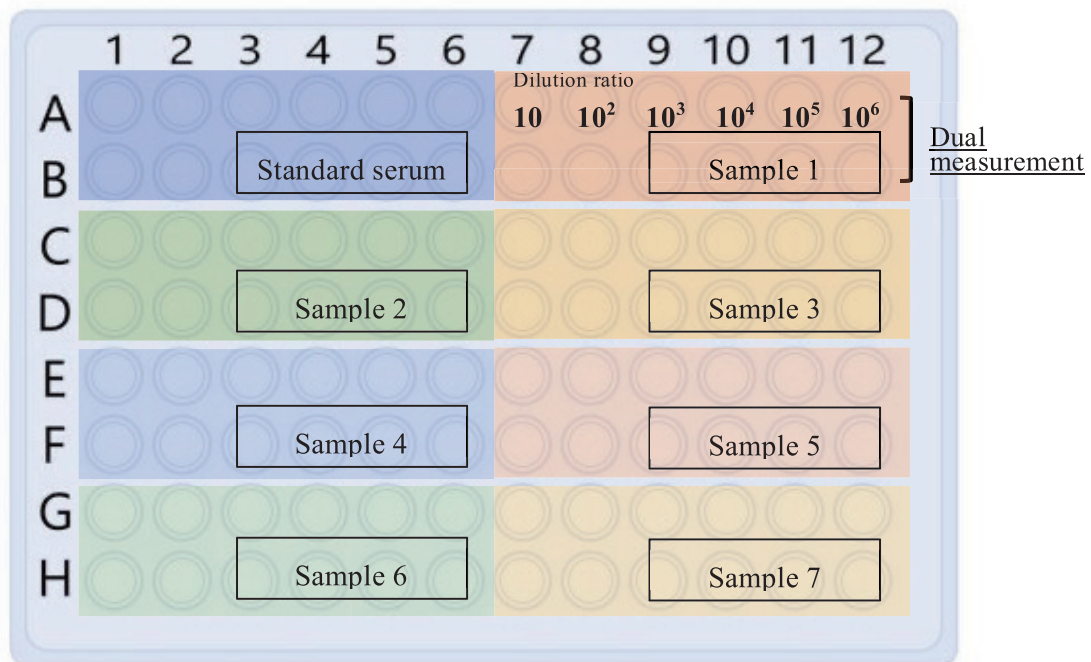


Figure 2-3 Arrangement of ELISA plate

2.3.2 OD カットオフ値の決定および抗体価算出法

RV 抗体陰性サンプルとして、在胎週数 26～29 週で嘔吐や下痢など急性胃腸炎症状の既往がない 5 名の乳児（生後 2～3 か月）の血清を 10 倍から 10⁶ 倍段階希釈し RV IgG、IgA ELISA を行い、450 nm の OD を測定した。一連の希釈倍率の反応曲線（4-parameter logistic model）から OD が急激に低下し、希釈倍率によらず一定の OD となった最も低い希釈倍率（RV IgG : 10³ 倍, RV IgA : 10² 倍）の OD から、5 名の乳児サンプルの平均 OD+3SD を RV IgG または、IgA の OD カットオフ値とした（IgG, IgA とともに OD 0.2）。

（Table 2-2）

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

Table 2-2 Definition of cut off value using negative sample of RV antibodies.

RV IgG

dilution ratio	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
1	2.751	0.821	0.147	0.072	0.043	0.040
2	1.197	0.242	0.064	0.043	0.042	0.046
3	1.490	0.288	0.071	0.040	0.038	0.042
4	2.240	0.663	0.125	0.052	0.048	0.049
5	1.052	0.243	0.063	0.060	0.051	0.048
mean	1.746	0.451	0.094	0.053	0.044	0.045
SD	0.725	0.272	0.039	0.013	0.005	0.004
mean+3SD	3.920	1.267	0.211	0.093	0.059	0.057

(OD)

RV IgA

dilution ratio	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
1	0.107	0.064	0.061	0.051	0.042	0.046
2	0.463	0.168	0.074	0.064	0.056	0.060
3	0.144	0.066	0.051	0.051	0.046	0.050
4	0.216	0.087	0.071	0.051	0.051	0.054
5	0.227	0.084	0.044	0.039	0.041	0.042
mean	0.231	0.094	0.060	0.051	0.047	0.050
SD	0.139	0.043	0.013	0.009	0.007	0.007
mean+3SD	0.648	0.222	0.098	0.078	0.067	0.071

(OD)

被検血清の RV IgG、IgA の抗体価は、ELISA 解析ソフト（Microplate Manager 6, Bio-Rad, Hercules, CA, USA）を用いて、二重測定した各血清段階希釈の反応曲線からカットオフ値を示す希釈倍率を求め（Figure 2-4）、その値を超えない2の倍数による希釈倍率を抗体価とした。回復期血清の RV IgG および RV IgA 抗体価が、急性期血清の4倍以上となったものを有意な上昇があると定義した。

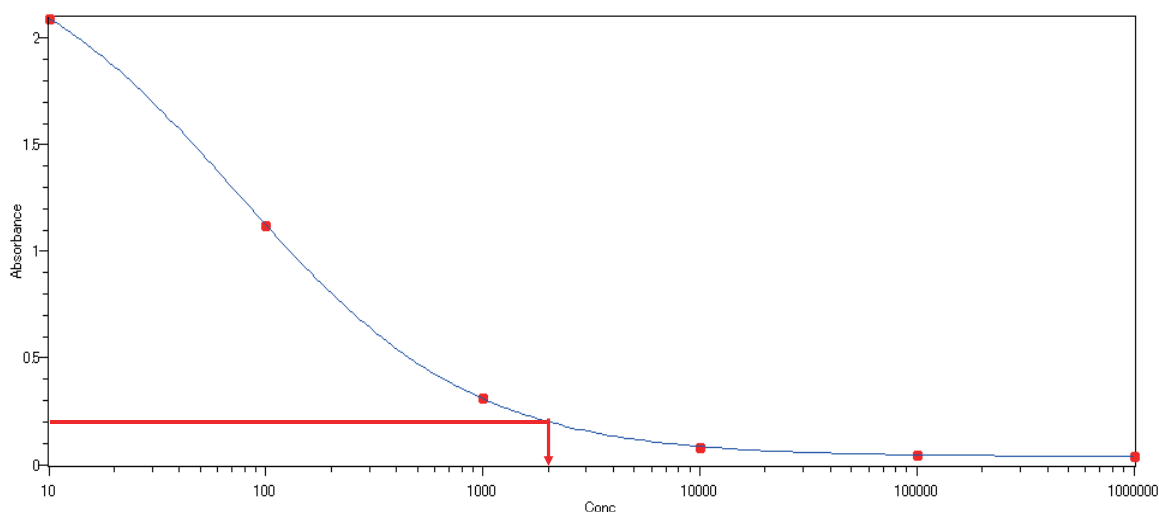


Figure 2-4 Reaction curve of in house ELISA.

The absorbance is shown on the vertical axis and the serum dilution factor is on the horizontal axis. Serum IgG and IgA titers were calculated as the highest two-fold dilution factor that gave a mean optical density greater than the cutoff value.

2.3.3 In house ELISA 法の再現性

市販のヒト血清 (Lot No.BRH1432894, Bioreclamation IVT, Westbury, NY, USA) を標準血清として用い測定法の再現性の確認を行った。血清希釈倍率 $10 \sim 10^6$ を使用し、OD 0.2 における希釈倍率を測定した。日内再現性として、1 枚の ELISA プレートでそれぞれの希釈試料を 2 重測定で 3 回、日差再現性として 3 日間行い、希釈倍率の平均値、標準偏差 (SD)、変動係数 (CV%) を算出し評価した。

2.3.4 RV 中和抗体測定法

RV 中和抗体は、MA104 細胞を 96 ウェルプレート (BioCoat Collagen I 96-well Black/Clear Plate, Cat No.356649, CORNING) に播種後、非働化処理した被検血清を培地により 10 倍から 1280 倍まで段階希釈し、 $100 \mu\text{g/mL}$ のトリプシン処理した MOI (Multiplicity of infection) 0.01 の RV (Wa 株) を加え 37°C で 1 時間静置した。ウサギ抗 RV ポリクロナール抗体 (LSBio, Cat#; LS-C56538-1000) および Alexa488 labelled anti-goat IgG (Thermofisher Scientific, Cat#; A-11055) で細胞中の RV と細胞核を染色した。画像解析装置 (InCell Analyzer 2200, GE healthcare life sciences) で撮影後、解析を行い、RV の感染率を算出、60% 以上の感染阻害率を示す最も高い希釈倍率を中和抗体価とした。

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

2.3.5 RV 中和抗体価測定法と in house ELISA 法の比較

Rotarix®を接種した乳児3名の血清（接種前, 1回目接種1か月後, 2回目接種1か月後）を用いて、RV 中和抗体価と in house ELISA 法と比較した。

2.3.6 臨床検体を用いた評価

便中 RV 抗原検出によって診断された RV 胃腸炎の乳幼児9名の、入院時と退院時のペ
ア血清の RV IgG および IgA を in house ELISA にて測定した。

2.4 結果

2.4.1 In house ELISA 法の再現性

標準血清を2重測定、1日3回、3日連続測定した結果を Table 2-3 に示す。2重測定、1日3回測定による RV IgG の日内再現性を評価した結果、CV%は3.8-9.4%、RV IgA についての CV%は2.3-16.9%だった。3日間の日差再現性を検討した結果、RV IgG の CV%が18.3%、RV IgA が14.0%だった。よって、RV IgG および RV IgA の日内再現性、日差再現性解析の結果、CV%はともに20%以下であった。

日差再現性の平均値の結果から、標準血清の許容範囲として最小値を平均値 $\times 0.65$ 、最大値を平均値 $\times (1 / 0.65)$ とした。以後の in house ELISA 測定では毎回本標準血清を測定し、この範囲内であることを確認した。（Table 2-3）

2.4.2 RV 中和抗体価と in house ELISA 法の比較

Table 2-4 に in house ELISA と RV 中和抗体価を測定した RV ワクチン接種乳児の抗体価を示す。RV 中和抗体価は、Case 1 と 2 ではいずれも4倍以上の上昇を認めたが、Case 3 では有意な上昇を確認できなかった。RV IgG でも同様に、Case 1 と 2 では抗体価が4倍以上上昇したが、Case 3 では上昇を認めなかった。Figure 2-5 に中和抗体価と in house ELISA 相関($P=0.0002$, $R=0.9100$)を示す。両者には有意な正相関が認められた。

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

Table 2-3 Reproducibility of in house ELISA

	RV IgG	RV IgA
Within-Run Precision of Antibody Titer		
Run 1	47540	3268
	51285	2358
	43431	2637
Mean(n=3)	47419	2754
SD(n=3)	3928	466
CV(%)	8.3	16.9
Run 2	63645	3839
	59031	3379
	61249	3437
Mean(n=3)	61308	3552
SD(n=3)	2307	251
CV(%)	3.8	7.1
Run 3	78413	3065
	68369	3003
	65726	3143
Mean(n=3)	70836	3070
SD(n=3)	6694	70
CV(%)	9.4	2.3
Between-Run Precision of Antibody Titer		
Mean(n=3)	59854	3126
SD(n=3)	10973	438
CV(%)	18.3	14.0

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

Table 2-4 List of Neutralizing antibody and RV IgG

		Neutralization titer	RV IgG
Case1	① pre	40	2048
	① post 1	40	8192
	① post 2	320	16384
Case2	② pre	40	4096
	② post 1	160	8192
	② post 2	320	16384
Case3	③ pre	20	1024
	③ post 1	40	2048
	③ post 2	15	1024

pre : Before vaccination

post 1 : 1 month after the first inoculation (Immediately before the second inoculation)

post 2 : 1 month from the second inoculation

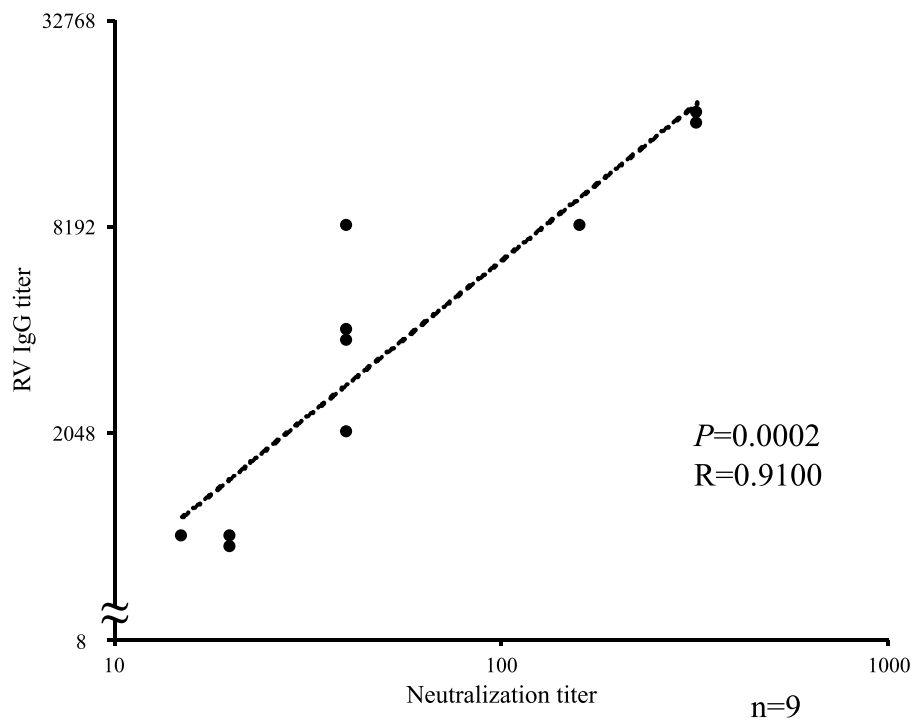


Figure 2-5 Comparison between neutralizing antibody titers and RV IgG titers

2.4.3 臨床検体の評価

RV 胃腸炎乳幼児 9 名の入院時と退院時のペア血清の in house ELISA 法による抗体価を Table 2-5 に示す。採血間隔は平均 12 日、5~28 日だった。RV IgG は 9 名中採血間隔が 7 日以下であった 4 名 (A-D) で抗体価の有意上昇を認めなかったが、RV IgA では、1 名 (A) を除いて抗体価の有意上昇を認めた。RV IgG と RV IgA の間には有意な正相関を認めた ($P=0.003$) (Figure2-6)。

Table 2-5 Antibody titer of infants with RV gastroenteritis

	Collection interval (days)	RV IgG dilution factor		RV IgA dilution factor	
		onset	recovery	onset	recovery
A	5	1024	1024	512	1024
B	5	1024	1024	512	4096
C	5	1024	2048	256	4096
D	7	512	1024	512	4096
E	12	512	8192	64	4096
F	12	1024	4096	512	4096
G	16	256	2048	1024	4096
H	19	512	8192	2048	8192
I	28	512	8192	512	4096

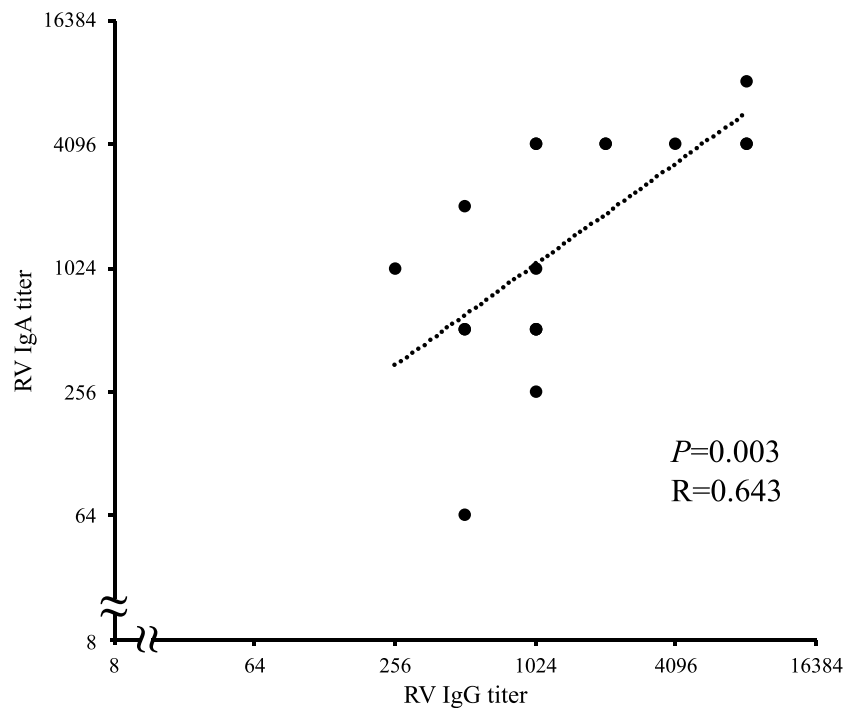


Figure 2-6 Correlation of IgG and IgA in infants with RV gastroenteritis

2.5 考察

ヒト RV (Wa 株) を固相化した特異的 RV IgG、IgA 抗体価測定のための in house ELISA 法を構築した。本法の日内再現性と、日差再現性は、ともに CV 20%以下だった。厚生労働省医薬食品局から出されている「医薬品開発における生体試料中薬品濃度分析法（リガンド結合）のバリデーションに関するガイドライン」では、分析単位内及び分析単位間の定量精度、つまり日内再現性及び日差再現性の CV は 20%以下でなければならないとされている。今回我々が構築した 2 種類の in house ELISA 法はいずれもその要件を満たし、臨床検体解析に使用可能な方法と考えられる。

既報の多くは RV 抗原として、増殖力が良好で実験室内で使用しやすいサル由来 RV 株である SA11 を使用している。RV 免疫反応においてはウイルス粒子蛋白の 50%を構成し⁶、遺伝子的に非常によく保存されている内殻蛋白である VP6 に対する反応が最も強いと報告されている⁷。一方で、VP4 と VP7 も共に中和抗体の標的となることが知られている⁸。サル由来 RV SA11 株とヒト由来 RV Wa 株のアミノ酸配列を比較すると、VP6 では 92%の高い相同性があるが、VP4 で 71%、VP7 では 82%である。また、系統樹解析では相同性の高い VP6 であっても、動物 RV とヒト RV では分かれている。我々はより正確なヒト RV 抗体の測定を目指し敢えてヒト RV 株 (Wa 株) を抗原として使用した。今回我々が構築した ELISA 法は、従来使用されているサル由来 RV SA11 株を抗原とする ELISA 法に比べ優位性があると考えられる。

Rotarix[®]接種乳児の RV 抗体を in house ELISA 法で評価したところ、中和抗体価の上昇した乳児では in house ELISA 法でも有意に抗体価が上昇しており、中和抗体が上昇しなかった患児では in house ELISA 法でも抗体価は上昇していなかった。Richard らは、RV に感染させた成人の血清を使用した RV 抗体の研究で RV IgG 抗体価と中和抗体価、RV IgA 抗体価と中和抗体価にそれぞれ有意な正相関を認め報告している⁹。我々の in house ELISA はそれと一致して IgG 抗体価と中和抗体価に有意な正相関を認め、感染防御の指標と考えられる中和抗体価を今回構築した ELISA 法でも十分評価が可能と考えられた。

RV 胃腸炎患児の入院時および退院時の血清抗体価を in house ELISA 法で測定したところ、RV IgG 抗体価の有意な上昇を認めなかった児がみられたが、これらの児は採血間隔が 7 日以下と短かったことが一因と考えられた。一方で RV IgA は 9 名中 8 名で有意な上昇を認めた。Hjelt らは RV 胃腸炎の児において IgG よりも IgA が早期に上昇することを報告しており¹⁰、今回の検討でも同じ結果を得たと考えた。RV IgG と IgA の相関についても従来の報告と一致していた^{9,11}。

これらの結果をまとめると、我々の構築した in house ELISA は RV IgG、IgA を測定目的とした臨床使用に十分耐えうる信頼性のある方法と考えられた。一般に生ウイルスを使用した中和抗体法が感染防御能の評価には最適とされているが、実験操作の簡便性、結果判

第2章 ロタウイルス抗体測定法の開発

定までに要する時間、**high throughput** 性の観点からは明らかに ELISA 法のほうが優れており、今回構築した方法を用いて臨床現場で採取された多数検体の解析が容易に実施できると思われる。

第3章 Rotarix[®]接種後の宿主免疫応答と便中ウイルス増殖の関連性解析

3.1 はじめに

急性下痢症は、世界中の小児の疾病罹患および死亡の主要な原因疾患の一つであり、5歳未満の小児では死因の約15%を占める¹。さらに、急性下痢症の原因としてRVによる胃腸炎があり、2016年の調査では年間128,500人の死亡者がRV胃腸炎によると推定されている²。世界保健機関(WHO)は、2009年にアフリカ諸国におけるRotarix[®](GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium)の有効性解析データを基に、5歳未満の小児死亡率が10%以上のすべての国家予防接種プログラムにRVワクチンを組み込むことを推奨している^{3,4}。WHOが承認した2つの主要なロタウイルスワクチンは、1価のヒトRVを弱毒化したワクチンであるRotarix[®](RV1)⁵と、5価のウシ-ヒトリアソータントワクチンであるRotaTeq[®](Merck & Co., West Point, PA, USA)(RV5)⁶である。

Rotarix[®]のワクチン株であるRIX4414のG遺伝子はG1、P遺伝子型はP[8]となる。現在までに35種類のG遺伝子型と50種類のP遺伝子型が報告されているが、ワクチン導入前に検出されていたヒトRVのG型とP型の組み合わせは、ほとんどがG1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]に限られていた⁷。しかし、ワクチン導入後は分子疫学にも変化が見られ、以前は検出されなかったG12株が世界中で出現しており、P[6]またはP[4]を持つG8株がアフリカのヒトRV株のかなりの割合を占めている⁸。このような遺伝的多様性は、ゲノムセグメントの頻繁なリアソータントやヒトと動物の間でのRVの種間感染によって生み出されていると考えられる。

RV1、RV5両ワクチンは120か国以上で認可されているが、日本では2011年からワクチンの使用が可能になり、2020年10月から定期接種化された。RV胃腸炎は世界中で認められるが、低所得国ではより重篤になることが多く、これは低栄養や医療レベルが低いため下痢症に伴い容易に重度の脱水に陥る可能性が高いことや、ヒト免疫不全ウイルス感染症などの基礎疾患が多いことが原因として推察されている⁹。現在のRVワクチンは、様々な遺伝子型のRVに対する重症予防効果があるが、先進国での重症化予防効果は72~98%と非常に高い。先進国では、RV1の親株であるG1P[8]の重症下痢症に対し92%、P[8]を共有するG1、G3、G4、G9株に対し87%の有効性を示すことが確認されている¹⁰。ヨーロッパの臨床試験では、血清型の交差性がないG2P[4]株によるRV胃腸炎に対しても80%の予防効果があると報告されている¹¹。それに対し、アジアやアフリカの発展途上国では42~63%とこれらの国々のワクチン効果が先進国に比較して著しく低いことが最大の問題である¹²。発展途上国でのワクチン効果低下のメカニズムはいまだよくわかっていない¹³。南

アフリカで行われた研究では RV1 ワクチンとポリオワクチン(OPV)を同時投与した群と接種時期を2週間ずらした群の間で、RV1の免疫原性に有意な差はなかったが¹⁴、Emperadorらは、バングラデシュの409名の乳児においてRV1とOPV同時投与された乳児は、両ワクチンを1日以上ずらして投与された乳児よりも抗体陽転率が低かったと報告し、OPVによる影響を示唆している¹⁵。Chilengiらは、420組の母子からワクチン接種前から経時的に採血、採乳し、母乳中のRV特異的IgA、血清中のRV特異的IgAおよびIgGを測定した。ワクチン接種前の血清中RV特異的IgA抗体陽性率は25.5%、RV1投与2回目の1か月後までに抗体陽転した乳児は60.2%であった。ワクチン接種前にIgA陽性であった約25%の乳児は、ワクチン接種前に抗体陰性の乳児に比べて抗体陽転率が有意に低かった。また、母乳中のRV特異的IgAの値が高いほど抗体陽転率が低く、さらに母乳中のRV特異的IgA抗体価には季節的な変動があり、寒冷乾燥期には有意に高い抗体価を認めた¹⁶。以上のような研究結果から、発展途上国におけるRV1の低い予防効果は、母乳中のRV IgA抗体が経口接種されたRV1ワクチン株の増殖に影響しているためと考えられた。また、IgAは母体から児への胎盤を経由した移行がないとされているが、ワクチン接種前に既に25%の乳児が血清中IgA抗体陽性だったことから、新生児期、乳児期早期のRV自然感染がRVワクチンによる免疫誘導能に影響している可能性が指摘されている。

RVの表面タンパク質であるVP4は、RVの遺伝子型に依存してhisto-blood group antigens (HBGA 組織血液型抗原)に結合することが示され、RVのレセプターの一つがHBGAであることが示唆された¹⁷。HBGAは、血液だけでなく体内の組織分泌物に広く分布している。このHBGAは唾液中や腸粘液中に分泌されるSe(分泌)型、分泌されないse(非分泌)型に大別される。Nordgrenらは、アフリカのブルキナファソで行った検討において、P[8]RV株がルイスおよび分泌型の乳児のみに感染し、ルイス陰性の乳児には感染せず、一方で、P[6]RV株は主にルイス陰性の乳児に感染し、分泌型、非分泌型には関係がなかったことを報告した¹⁸。ニカラグアでも、P[8]RV株に感染した乳児が、ルイスおよび分泌型であるとされており、これらのデータは、宿主のHBGAの遺伝子多型が、特定のRV遺伝子型に対する感染制御に関わっていることを示している。ルイス陰性の乳児が特定のP[8]株に耐性を持つという発見は、アフリカのようにルイス陰性の割合が高い集団におけるワクチン効果の低下(感染阻止)を説明できるかもしれないとしている。以上の様に、発展途上国においてワクチン効果が低いことの要因に関してはいくつか報告されており、こうした要因が複合して関与することもあると考えられる。

その他の要因として近年注目されているのは、腸内の細菌叢とRVワクチン効果の関連についてである¹⁹。腸内細菌叢は、地域、年齢によって大きく異なることが明らかにされており²⁰、この差異によってRVワクチンの免疫原性に差が生じるという仮説である。Harrisらは、RVワクチン接種を受けたパキスタンの20名の児を抗体上昇群(10名)と非上昇群

(10名)に分けて、次世代シーケンサを用いた腸内細菌叢の網羅的解析を行い、2群間のワクチン接種前における腸内細菌叢組成を比較した。抗体上昇群はグラム陽性菌に対するグラム陰性菌の比率が有意に高く、腸内細菌叢の4種の代表的門の中でも Firmicutes 門、特に Clostridium Cluster XI に属する細菌、および Proteobacteria 門の割合が有意に高かったとしている。さらに目レベル (genus-like) の解析により、Serratia 属と Escherichia coli などのグラム陰性菌の相対的な割合は抗体応答に正の相関を認め、非上昇群では Serratia 属が約2倍に、Escherichia coli が4分の1に減少していた。さらに先進国の乳児はほとんどが抗体上昇群と仮定し、先進国の児とパキスタン児の抗体上昇群、非上昇群を比較している。その結果、先進国であるオランダの乳児ではパキスタンの非上昇群と比べ、Proteobacteria が有意に多く、その中でもセラチア、大腸菌、クレブシエラ、エンテロバクターのガンマプロテオバクテリアが多かったと報告している¹⁹。

腸内細菌叢とワクチンに対する免疫応答の関連性を解析するうえで、抗体価の推移のみならず消化管内でのワクチン株増殖の程度についても解析する必要がある。RV の感染様式は、小腸絨毛先端部の上皮細胞膜上のシアル酸をレセプターとして感染し、細胞質内で増殖する。新たな上皮細胞への感染拡大により、成熟上皮細胞の障害とそれによる吸収不良が生じ、下痢の原因となる。感染後には液性及び細胞性免疫が誘導されるが、感染防御免疫としては腸管粘膜上の RV 特異的抗体が重要とされている²¹。腸管局所の粘膜免疫を効率的に誘導するために経口投与による弱毒生ワクチンが用いられているが、局所での弱毒生ワクチン株増殖が宿主免疫応答の程度に関連する可能性が考えられる。Rotarix[®]株はヒト由来でありの腸管で増殖しやすいとされ、初回投与から1か月後にも約20%の被験乳児で便中にワクチン株が排泄されるとされている²²。我々が行った児童養護施設における RV1 接種の安全性評価のための検討では、ワクチン接種児の RV1 排泄量に明確な個人差を認めている²³。

そこで、本研究では RV 感染によって重症化しやすい新生児集中治療室 (NICU) に入院してきた早産児において、腸管内でのワクチン株増殖と宿主免疫応答の関連性を調べるため、経時的な便中ワクチン株排泄のモニタリングに合わせ、前章で我々が開発した in house ELISA 法を用いて RV 特異的 IgG、IgA 抗体価を測定、解析することにした。

3.2 方法

3.2.1 対象

2018年6月から2020年11月に藤田医科大学病院（愛知県豊明市）NICU の入院中に RV1 を接種された男児11名、女児9名の合計20名を対象とした。全員が生後6週間に RV1 初回接種が行われ、4週間後に2回目のワクチン接種が行われている。すべての児が帝

王切開によって出生し、入院時の診断は、低出生体重児が 18 名、Pierre Robin 症候群 1 名、多発奇形（右脳室拡大、水腎症、先天性心疾患、口蓋裂、喉頭腔狭窄、気管軟化）が 1 名であった。児の出生体重は中央値 1151 g（最小値 555 -最大値 3204 g）、在胎週数は中央値 30 週 0 日（26 週 1 日 - 40 週 2 日）であった。

本研究に参加する児については、事前に親または保護者に対してインフォームドコンセントを行い、書面での同意を得ている。本研究は藤田医科大学倫理委員会の承認を得て行われた（承認番号 HM17-037）。

3.2.2 検体採取

・採血スケジュール

RV1 の経口接種直前（pre）と 1 回目接種後 1 か月（post 1：2 回目接種前）、2 回目接種 1 か月（post 2：2 回目接種後 1 か月）に採血した。採血後、遠心分離（3,500 rpm 5 分）により血清を分離し、IgG、IgA 抗体測定に用いた。血清は測定まで -20℃に保存した。

・採便スケジュール

RV1 の経口接種直前に採便し、接種後 1 週間後まで可能な限り毎日採便した。2 回目直前と 2 回目接種後 1 週間後まで同様に採便した。便検体については RNA 抽出まで -20℃に保存した。RV1 接種と採血、採便スケジュールを Figure 3-1 に示す。

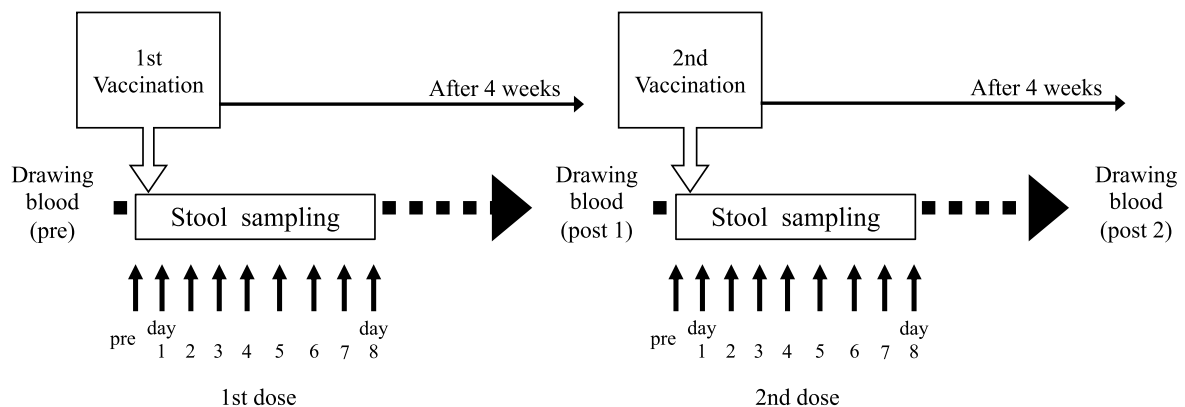


Figure 3-1 RV1 oral inoculation and sample collection schedule

3.2.3 RNA 抽出

採取した便 0.1 g に生理食塩水 900 μ L を加え、ボルテックスミキサーを使って完全に溶解、10%懸濁液とした。懸濁液は 5000 rpm で 20 分間遠心後、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) と QIAcube (QIAGEN, Hilden, Deutschland) を使用して最終溶出量 30 μ L で RNA を抽出した。抽出した RNA は -80°C で保存した。

3.2.4 Real-time RT-PCR

Rotarix®特異的 real-time RT-PCR は Gautam R.らの報告による primer、probe を使用した²⁴。測定機器は、46 well StepOne™ (Applied Biosystems Inc., MA, USA) で、試薬は TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-Step Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を使用した。試薬 18 μ L に RNA をサンプルとして 2 μ L を加え、total volume は 20 μ L に調整した。最初に reverse transcription 反応を 15 分、95°C 10 分で酵素を失活させた後、95°C 15 秒、60°C 1 分にて anneal と extension 反応を 45 サイクル行った。Forward、backward primer 濃度は、それぞれ 400 nM、probe 濃度は、200 nM である。標準曲線作成のために、Rotarix®内服液 (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) から RNA を抽出、RIX4414 株の塩基配列をもとに抽出 RNA のコピー数を決定し、 10^7 - 10^2 /well まで段階希釈して用いた。具体的な手順は以下のとおりである。スタンダード系列と便抽出 RNA 5 μ L を RNase free water 45 μ L に混合し、96°C 5 分の熱変性した後 2 μ L をテンプレートとして Rotarix®特異的 real-time RT-PCR に用いた。

3.2.5 In house ELISA

RV IgG、IgA 抗体測定の in house ELISA の詳細については第2章に記載した。概略については以下のとおりである。ヒト RV Wa 株を培養し、濃縮・精製した。ELISA プレート (Costar Assay Plate, CORNING, NY, USA) に 25 μ L の精製 Wa ビリオン (1 μ g/ mL) を加え 4 °Cで一晩静置し固相化した。その後、Tween 20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) に 0.3%ウシ血清アルブミンを加えた溶液でブロッキングを行った。 10^{-1} - 10^{-6} 倍に 10 倍段階希釈した血清 35 μ L を各ウェルに加え、室温で 1 時間放置した。TBS-T で洗浄した後、25 μ L のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (0.1 μ g/mL) (Kirkegaard&Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) または抗ヒト IgA (0.5 μ g/mL) (Kirkegaard&Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) を使用して、室温で 1 時間静置した。25 μ L の 1-step Ultra TMB-ELISA 基質溶液 : TMB (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を加え 7 分静置し、25 μ L の H₂SO₄ (0.5 mol/L) を各ウェルに加えて反応を停止後、ELISA プレートリーダーを使用して 450nm で光学密度 (OD) を測定した。抗 RV IgG および IgA 抗体のカットオフ値は妊娠 30 週未満 (28 週 \pm 10 日) の乳児から収集された 5 つの RV 抗体陰性血清サンプルの OD を元に、RV IgG、IgA とともに 0.20 とした。本法は 2 重測定で行われ、段階希釈によって得ら

第3章 Rotarix®接種後の宿主免疫応答と便中ウイルス増殖の関連性解析

れた反応曲線を用いてカットオフ値を越える平均 OD 値の最高希釈倍率を求め、その値を超えない 2 の倍数による希釈倍率を血清 RV IgG および IgA 抗体価とした。プレート間での再現性の確認のため、毎回測定毎に標準血清の抗体価の値が 20%以内であることを確認した。回復期の抗体価が急性期の 4 倍以上であることを有意な抗体価上昇と定義した。

3.2.6 統計解析

抗体価上昇群と非上昇群の 1st dose、2nd dose の平均ウイルス量を比較した。RV IgG、IgA が、有意な上昇を認めた児と認めなかった児の 2 群において各時期の平均便中 RV1 ウイルス排出量を比較した。各時期の便中ウイルス量の 2 群間比較には、Wilcoxon 順位和検定をおこなった。IgG、IgA 抗体価と各期平均便中 RV1 ウイルス排出量について、Pearson の相関係数を求めた。統計解析には、JMP Ver14.0 (SAS Institute, NC, USA) を用いた。

3.3 結果

3.3.1 観察期間における RV IgG、IgA 抗体価測定結果

対象 20 人中 pre、post 1 については全員で血清が採取されたが、post 2 については 6 名の児で血清が採取できなかった。抗体の推移を Figure 3-2、抗体測定結果のまとめを Table 3-1 に示す。Pre - post 1 の間で RV IgG の有意な上昇が確認できたのは 14 名 (70.0%) だった。Pre - post 2 間の比較では、血清が採取された 14 名のうち 10 名で (71.4%) で IgG 抗体価の有意な上昇を認めた。RV IgA については、pre - post 1 間で有意な上昇が確認できたのは 18 名 (90.0%) あった。Pre - post 2 間では、post 1 で IgA 抗体価の有意な上昇が認められた児のうち血清が得られた全員において、post 2 でも IgA 抗体価が維持されており post 2 でのブースタ効果は見られなかった (Figure 3-2)。Pre - post 1 で IgA 抗体価の上昇がなかった児 2 名のうち 1 名は post 2 で血清が採取できず、1 名は post 2 でも抗体価上昇を認めなかった。

第3章 Rotarix[®]接種後の宿主免疫応答と便中ウイルス増殖の関連性解析

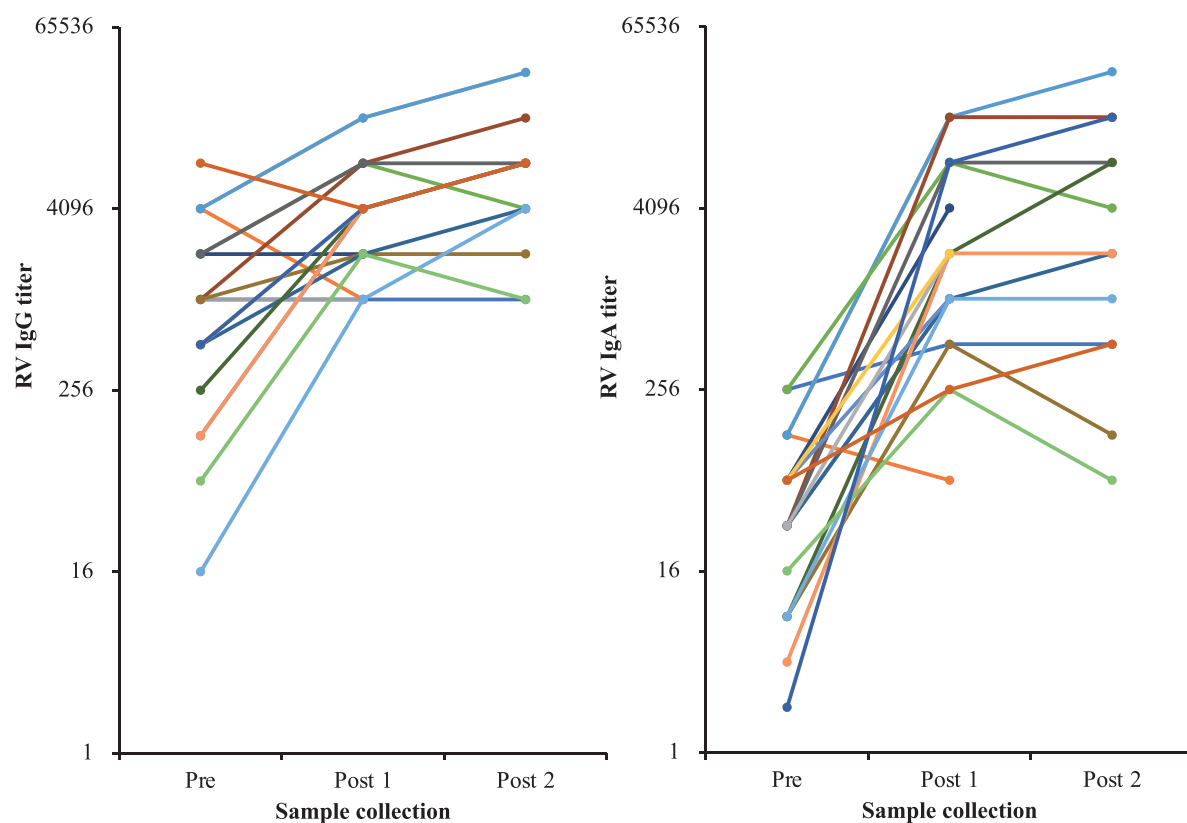


Figure 3-2 Serum RV IgG and IgA responses in singletons and twins during the observation period.

Table 3-1 Comparison of significant increase antibodies titer in each observation periods

Period	Pre-post 1			Pre-post 2		
	N	Significant increase		N	Significant increase	
		YES	NO		YES	NO
IgG						
(%)	20	14 (70.0%)	6 (30.0%)	14	10 (71.4%)	4 (28.6%)
IgA						
(%)	20	18 (90.0%)	2 (10.0%)	14	13 (92.9%)	1 (7.1%)

3.3.2 RV1 ワクチン接種後の便中への RV ワクチン株ゲノム排泄

1st dose 後では day 8 に 3 名の児が採便できなかったが、ほとんどの児において接種前から接種後 8 日間においてほぼすべて採便が可能であった (177 検体、98.3%)。同様に 2 回目接種前と 2nd dose では、pre、day 3、day 4、day 5、day 8 でそれぞれ 2、1、2、1、3 検体 (合計 9 検体) の採便ができなかった (171 検体、95.0%)。RV1 接種後の便中 RV1 ウイルス排出量推移を Figure 3-3 に示す。

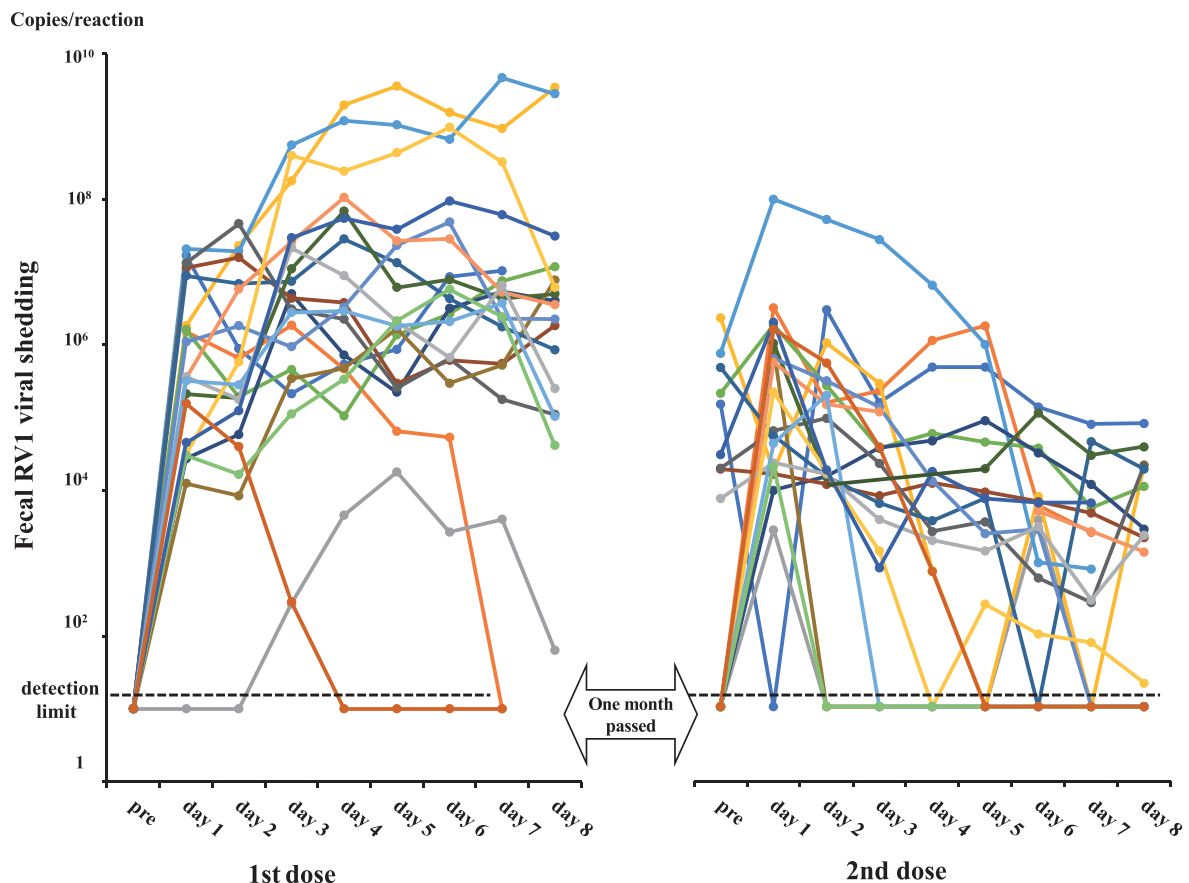


Figure 3-3 Kinetics of RV1 shedding in the stool after RV1 inoculation

20 名の乳児において、RV1 接種以前に便中から RV1 が検出された児はいなかった。接種前 20 検体をのぞいた 1st dose の便 157 検体では 150 検体 (95.5%) から RV1 RNA が検出された。一方、2 回目の接種前の便では、採取できなかった 2 名を除く 18 名中 9 名 (50%) の乳児便から RV1 RNA が検出された。それを含めて 2nd dose では、171 検体のうち 115 検体 (67.3%) で RV1 RNA が検出され、検出されたゲノム量は経過に従って緩やかに低下していた。1st dose における便中 RV1 ウイルス排出量は day 1 で急激に上昇、day 8 までほぼ横

ばい、または day 8 まで上昇した。一方、20 名中 3 名 (15.0%) の児では、1 名で day 3 以後、1 名が day 7 で検出限界以下となり、残りの 1 名で day 8 の時点ではほぼ検出感度付近まで便中 RV1 ウイルス排出量は減少していた。便中 RV1 ウイルス排出量がほぼ横ばい、または上昇していた児でも、排泄量には個人差がみられ、day 8 の排泄量には最大で 10^4 倍の差がみられた。1st dose における便中 RV1 ウイルス排出量の排泄ピークは、day 1-2 の期間の間に観察された児が 4 名 (20.0%)、day 3-5 までが 7 名 (35.0%)、day 6-8 までが 9 名 (45.0%) だった。2nd dose の便中 RV1 ウイルス排出量は、2nd dose day2 までにピークを認めた児が 18 名 (90.0%) とほとんどを占めた。その他 2nd dose の day 3-5 で 1 名 (5.0%)、day 6-8 で 1 名 (5.0%) が便中 RV1 ウイルス排出量の最高値を示した。2nd dose の RV1 投与によって便中 RV1 ウイルス排出量は一時的に上昇したが、その量は 1st dose の day 1 より減少し、ほとんどの児において、その後徐々に便中 RV1 ウイルス排出量が減少した。

3.3.3 RV IgG、IgA と便中 RV1 ウイルス排出量

Figure 3-4 に、各時期における RV IgG の有意な抗体上昇が認められた児と認められなかった児の間における、1st dose の平均便中 RV1 ウイルス排出量の比較を示す。Pre - post 1 間において RV IgG 抗体上昇群では 2.1×10^8 コピー/反応、非上昇群で 1.4×10^6 コピー/反応で、平均便中 RV1 ウイルス排出量は RV IgG 抗体上昇群の方が有意に高値を示した ($P=0.006$)。Pre - post 2 間においても、平均便中 RV1 ウイルス排出量は RV IgG 抗体上昇群では 2.6×10^8 コピー/反応、非上昇群で 2.2×10^6 コピー/反応との平均便中 RV1 ウイルス排出量は IgG 抗体上昇群、非上昇群に有意差を認めなかった ($P=0.056$)。

同様に、各時期における RV IgA の有意な抗体上昇が認められた児と認められなかった児の間での 1st dose 平均便中 RV1 ウイルス排出量の比較を Figure 3-5 に示す。Pre - post 1 間においては、RV IgA 抗体上昇群の平均便中 RV1 ウイルス排出量は 1.6×10^8 コピー/反応、非上昇群では 2.7×10^6 コピー/反応と両者間に有意差は認められなかった ($P=0.413$)。同様に Pre - post 2 間でも、それぞれ 2.6×10^8 コピー/反応、 5.0×10^6 コピー/反応で両者に有意差を認めなかった ($P=1.000$)。

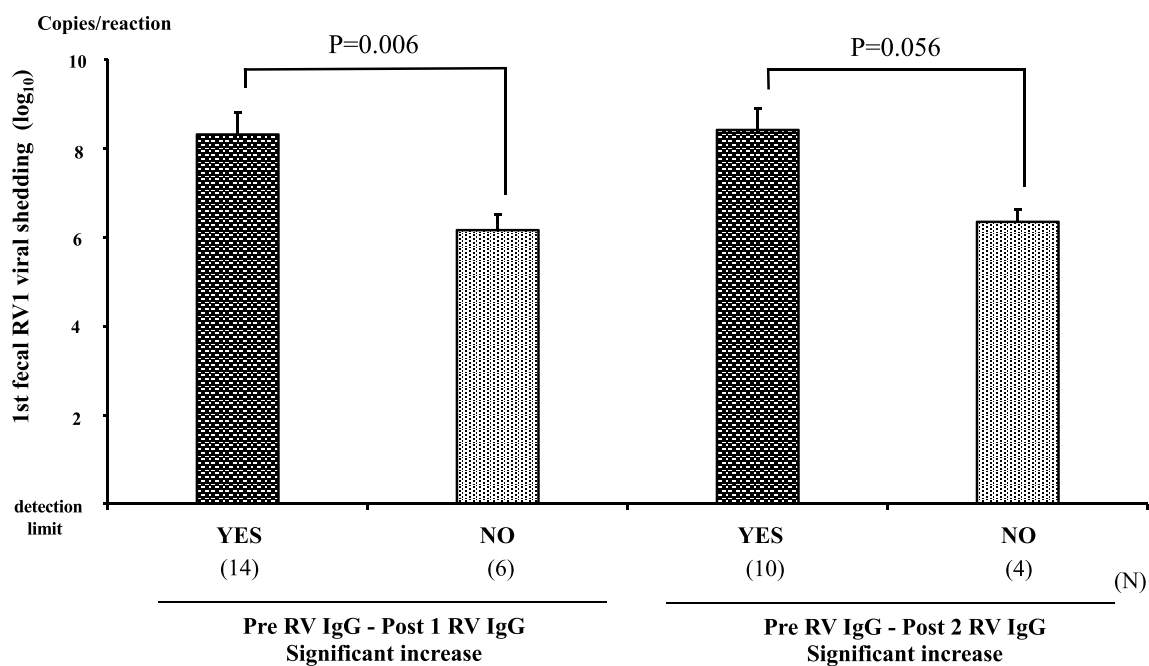


Figure 3-4 Comparison of mean 1st RV1 viral loads in children with and without significant increase of RV IgG antibody

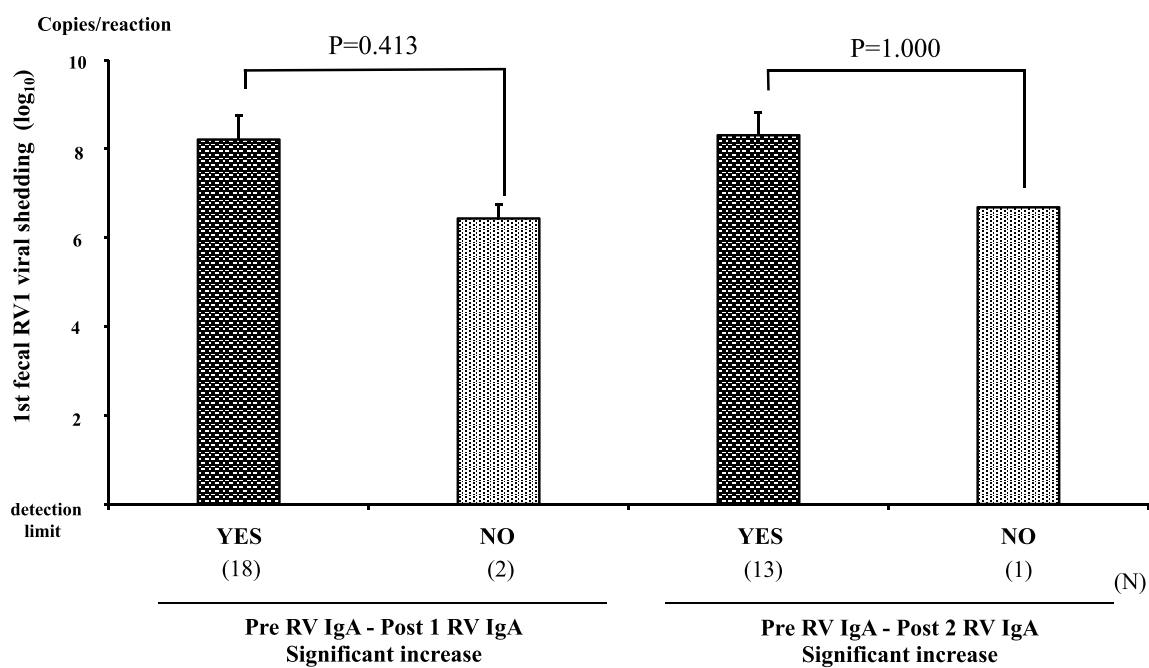


Figure 3-5 Comparison of mean 1st RV1 viral loads in children with and without significant increase of RV IgA antibody

第3章 Rotarix[®]接種後の宿主免疫応答と便中ウイルス増殖の関連性解析

2nd dose の平均便中 RV1 ウイルス排出量については、Figure 3-3 に示した経時的变化から強い RV1 増殖は起きていないと考え、RV IgG、IgA と 2nd dose の便中 RV1 ウイルス排出量の解析は行わなかった。

3.3.4 RV IgG、IgA と便中ウイルス排泄量の相関

1st dose の平均便中便中 RV1 ウイルス排出量と血清中 IgG、IgA の相関を示す。Pre の RV IgG と 1st dose 平均便中 RV1 ウイルス排出量には有意な相関を認めなかった。1st dose 平均便中 RV1 ウイルス排出量と 2 回目ワクチン接種直前の post 1 の IgG の間に有意な正相関 ($P=0.006$ 、 $R=0.592$) を認め、post 2 の IgG の間にも有意な正相関 ($P=0.039$ 、 $R=0.556$) を認めた (Figure 3-6)。RV IgA では pre と 1st dose 便中 RV1 ウイルス排出量の間には有意な相関を認めなかったが、1st dose 平均便中 RV1 ウイルス排出量と post 1 IgA の間は $P=0.006$ 、 $R=0.592$ 有意な相関を認めた。Post 2 IgA と 1st dose 便中 RV1 ウイルス排出量の間には有意な正相関を認めなかった ($P=0.053$ 、 $R=0.528$) (Figure 3-7)。

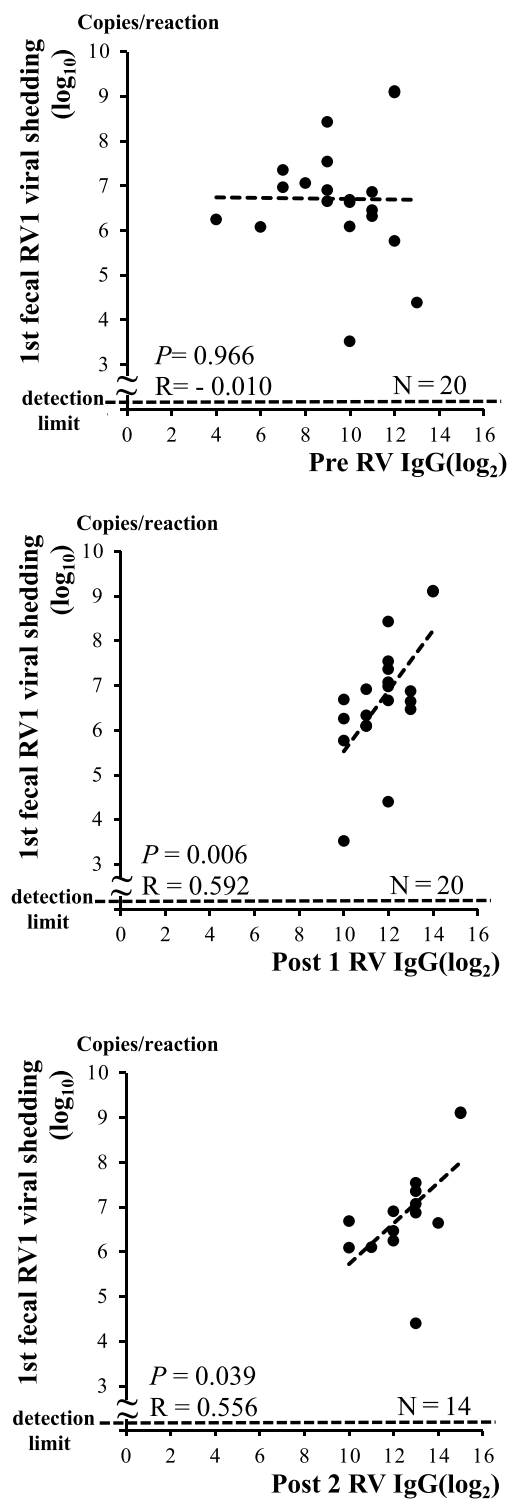


Figure 3-6 Comparison of mean 1st RV1 viral loads and RV IgG antibody titer in each observation period.

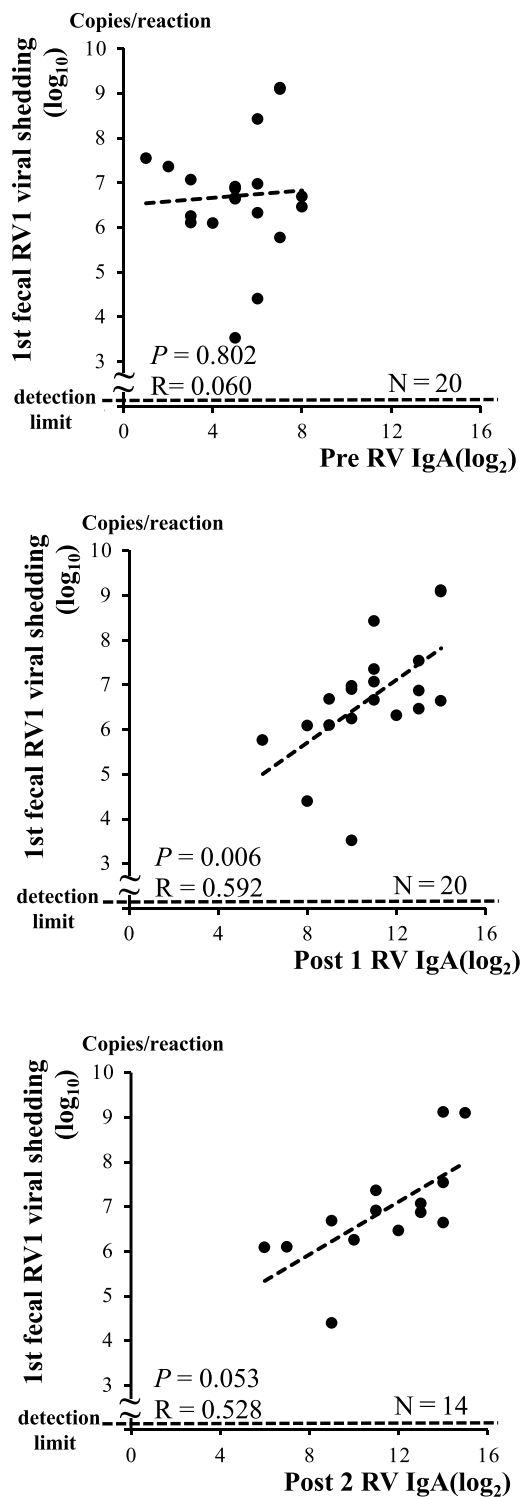


Figure 3-7 Comparison of mean 1st RV1 viral loads and RV IgA antibody titer in each observation period.

3.4 考察

Rotarix[®]の免疫原性やワクチン効果に関する臨床試験は、全世界で行われデータが蓄積されている。フィンランド、アメリカ、カナダ、シンガポールでは、血清 RV IgA の推移を解析し、67 - 96%と良好な抗体応答が確認されている。さらに、ヨーロッパ、東南アジアでは、重症 RV 感染症に対する 90 - 96%以上のワクチンによる重症化予防効果が報告されている²⁵。一方、ラテンアメリカにおける RV ワクチンによる血清 RV IgA 抗体応答は先進国より低く 61%、重症 RV 感染症に対するワクチン重症化予防効果は 85%と報告されている^{26,27}。日本の研究では、RV IgA の抗体陽転率は 85.3%で、重症 RV 感染症に対するワクチン予防効果は 91.6%であった²⁸。本研究でも、1 回目投与により 1 か月後の RV IgA の有意な抗体上昇は 90.0%、2 回目投与後には 92.9%と良好な免疫応答が確認された。一方、RV IgG は 1 回投与によって 70.0%で有意上昇を認め、2 回目投与後では 71.4%と RV IgA と比較するとやや低値だった。母親からの胎盤を通した抗体移行は胎生 16 週から始まり満期出産時まで増加する²⁹。本研究の乳児は在胎週数が中央値で 30 週であり、移行抗体による RV1 ワクチン前の IgG 抗体が影響し有意な抗体上昇が十分認められなかった可能性が考えられた。血清中の IgA は IgG よりも早期に上昇することが知られている³⁰が、我々のデータでも 1 回目投与後に IgA 抗体価はすでにほとんどの症例 (90.0%)で有意な上昇を認めており、2 回目投与後の抗体価はほぼ横ばいで大きな変化は見られなかった。

本研究では、RV1 経口摂取後の 8 日間可能な限り採便し便中 RV1 ウイルス排出量を測定した。RV1 ワクチン接種後のウイルス株排泄についてはいくつかの報告がある³¹⁻³³。本研究では Figure 3-3 に示すように、1st dose において 8 日後まで緩やかな便中 RV1 ウイルス排出量の増加を示す児が多いが、そのなかでも最大 10^4 倍の症例間での便中 RV1 ウイルス排出量の差が認められた。Mijatovic-Rustempasic らは、1st dose のみ 33 名の児に RV1 を投与した臨床試験を行い、便中 RV1 ウイルス排出量について詳細な検討を行っている³¹。この研究では、多くの児において便中 RV1 ウイルス排出が継続したが、33 名中 3 名 (9.1%) で 3 日目以降は排泄を認めなかったとしており、本研究でも 1st dose において 20 名中 2 名 (15.0%) で 3 日または 7 日以降の排泄を認めず、残り 1 名もほぼ検出限界レベルまで減少し類似した結果を得ている。一方で 1st dose の便中 RV1 ウイルス排出量のピークは day 1-2 の間だったものが 20.0%、day 3-5 までは 35.0%、day 6-8 までは 45.0%と、そのピークは 1st dose 観察期間の後期に認められた症例が多かった。これは、便中便中 RV1 ウイルス排出量のピークが概ね 1 週間以内にあることを示した先の報告と同様であった。さらに、便中 RV1 排泄の個人差についても、 10^3 倍の差異があったと報告しており、RV ワクチン株の腸管内増殖はかなり個人差があることが伺われる。Vesikari らは、異なったワクチン力価の RV1 を投与した結果、RV1 投与量が多い群では便中 RV1 ウイルス排出量の数値が高

く、ウイルス増殖が強くなるにつれ免疫応答が増強する傾向があったとしている³²。よって、個々の RV1 ワクチン株増殖の差が、抗体価に影響している可能性は十分考えられる。

1st dose と 2nd dose 後の便中 RV1 ウイルス排出量の推移を比較検討した先行研究では、1st dose より 2nd dose 後の方において便中 RV1 ウイルス排出量が抑制されることを示唆していた³²。我々の便中 RV1 ウイルス排出量変化結果も同様であり、2nd dose の平均便中 RV1 ウイルス排出量において強い RV1 増殖は起きておらず、1st dose によって誘導された宿主免疫応答が RV1 増幅を抑制すると考えられた。

また、本研究では、9 名 (50.0%) で 1st dose 1 か月後 (2 回目の経口接種前) でも便中 RV1 ウイルス排出があり、長期間にわたる便中排泄が確認されている。他の報告でも 1st dose 1 か月後でも 21% の児において便中 RV1 ウイルス排出が認められ長期に渡る便中 RV1 ウイルス排出が確認されていた³¹。本研究の方が高い割合であるが Real-time RT-PCR 法の感度や宿主の遺伝的感受性がワクチン有効性に影響している可能性もある^{18,34}。

熱処理によって不活化したアカゲザルロタウイルス (Rhesus rotavirus: RRV) と未処理の RRV をマウスに接種した実験によって、不活化したウイルスでも下痢を起こしたが腸管分泌中の IgA は未処理の生ウイルスと比較すると著しく低下していたことが確認されている。また、細胞への感染に必須である VP4 及び VP7 をモノクローナル抗体によって中和したウイルスでは、下痢を誘発せず、腸管分泌中の IgA を誘導できなかったとしており、腸管内でのウイルス複製が抗体誘導に必須であったとしている³⁵。

本研究では、接種前の RV IgG 抗体と 1st dose 平均便中 RV1 ウイルス排出量には関連がなく、本コホートにおいて移行抗体はワクチン株増殖に影響していない可能性が考えられた。しかし、抗体価上昇群の 1st dose 平均便中 RV1 ウイルス排出量は有意に高く、接種後便中 RV1 排泄量と RV IgG 抗体価間に正相関がみられたことから、初回接種後 RV1 増殖が RV IgG 抗体の誘導に重要と考えられた。RV IgA 抗体上昇の有無で平均便中 RV1 ウイルス排出量を比較したが 2 群間に有意差を認めなかった。この理由としては、20 名中 18 名とほぼすべての被験児で RV IgA 抗体価が上昇していたためと考えられる。しかし、初回接種後便中 RV1 ウイルス排出量と RV IgA 抗体価間には正相関がみられたため、RV IgG 同様、初回接種後 RV1 増殖は RV IgA 抗体の誘導にも重要と考えられた。前述の 1st dose の観察期間において速やかに便中 RV1 ウイルス排出量が減少した 3 名は、いずれも RV IgG 抗体の有意上昇を認めず、IgA についても 2 名で有意上昇を確認できなかった。IgA の有意上昇を確認した残り 1 名でもその値は高値ではなかった。我々は、RV1 ワクチン接種後のワクチン株腸内増殖が抗体反応の誘導には必須であり、1st dose での増殖が良好なほど抗体反応が優れていることを明らかにした。

自然感染における腸内の RV 感染の最初のステップは、小腸絨毛先端部の上皮細胞膜上のレセプターに外殻にある VP4、VP7 が結合することである³⁶。細胞質内に侵入後、上皮

第3章 Rotarix®接種後の宿主免疫応答と便中ウイルス増殖の関連性解析

細胞内で増殖した RV は上皮細胞の脱落を引き起こし、再び腸管内に放出される³⁷。放出された RV は、M 細胞から取り込まれてパイエル板において抗原提示細胞など常在免疫細胞（マクロファージ、樹状細胞、リンパ球）に食食免疫応答を引き起こす。B 細胞から産生された RV IgA は、局所における初期の感染防御に必須である。ワクチン接種によっても同様の感染、増殖ルートをたどることが予想され、ワクチン株の増殖による免疫刺激は、RV に対する抗体産生に重要である。Table 3-1 の抗体測定結果と照らし合わせて考えると、RV IgG よりも急速に上昇した Post 1 による RV IgA が、2 回目の経口接種後の腸内のウイルス増殖を抑制したことが予想された。自然感染時においても血清 RV IgA は、RV IgG よりも早期に上昇³⁰し、十二指腸液や便中には RV IgG が検出されないことから感染防御として重要である³⁸ことも報告されている。

我々のデータは、ワクチン接種後の腸内における RV1 増殖（特に 1 回目）が免疫応答に重要であることを具体的に証明した初めてのデータである。一方で RV1 の腸内増殖には個人差があることを示している。近年、RV ワクチンにより抗体レスポンスのあった群となかった群の腸内細菌叢の組成を比較し Firmicutes 門、Proteobacteria 門などの特定の細菌叢と抗体レスポンスの関連性が報告されている³⁹。この理由としてグラム陰性菌である Proteobacteria の持つ鞭毛成分や LPS が自然のアジュバントとしての機能を発揮、自然免疫を活性化し抗体応答に有益に働いた⁴⁰と推論している。腸内マイクロビオーム解析と RV1 腸内増殖の関連を明らかにすることができれば、ワクチン接種前のプロバイオティクス投与によって、免疫応答に有利に働く腸内環境の構築を誘導し、免疫能獲得に期待することができることから、特に発展途上国におけるワクチン効果の低下に対する免疫誘導能の向上が期待できる。現在、本コホートにおいて腸管マイクロビオーム解析を行っており、今後その成績を本研究のデータと照らし合わせ、RV1 ワクチン株増殖に最適な宿主環境の同定を進める予定である。

第4章 急性ロタウイルス胃腸炎患者におけるロタウイルス抗原血症と液性免疫応答との関連性解析

4.1 はじめに

RVは乳幼児における重篤な急性胃腸炎の起因ウイルスである。RVワクチンが発売される前の2004年のRVによる全世界での年間死亡者推定数は527,000人であり、小児死亡原因の約17%を占めていた¹。ワクチン導入が進んだ後の2013年の調査でも、発展途上国を中心に年間20万人以上のRV感染に伴う死亡例があると推計されている²。

RV感染症の予後は発展途上国と先進国で異なっており、RVによる死亡の90%以上を発展途上国が占めている³。本邦を含む先進国ではRV感染症による死亡例は少ないが、下痢や嘔吐による脱水で入院が必要となることが多い。ワクチン導入前の2011年までのRVによる年間入院数は、1,000人年あたり2.8~13.7だった⁴。RVの自然感染やワクチン接種により、宿主に誘導されたRV特異的液性免疫、細胞性免疫がその後の反復感染時の重症化予防に重要な役割をはたす⁵⁻⁹。

RV胃腸炎は当初、消化管の局所感染と考えられていたが、2003年以後RV抗原血症が免疫不全や合併症のない児でも起こっていることが報告された^{10,11}。RV抗原血症の検出率は43%~90%であり、発症後7~10日で消失する^{12,13,14}。肝炎¹⁵、肺炎¹⁶や、脳炎、脳症などの神経合併症¹⁷は局所感染だけでは説明がつかず、RV抗原血症をはじめとしたRVの全身感染が先の合併症の発症機序としては考えやすい。我々もRV胃腸炎小児についてRV抗原血症の推移を解析した結果、血中RV抗原量は第2病日でピークを示したのち漸減し、血清中RV抗原量と発熱や肝機能障害といった消化管外症状との相関があることを明らかにした¹²。

上記のようにRV胃腸炎の抗原血症については多くの報告があるが、RV抗原血症がどのような機序で制御されているのかについてはいまだ明らかになっていない。そこで、本章では、我々の開発したin house ELISA法によるRV IgGおよびIgA抗体測定法を用いて、RV胃腸炎患児におけるRV抗原血症と宿主液性免疫応答の関連性について解析した。

4.2 方法

4.2.1 研究デザイン

期間は2006年1月から2019年3月で、藤田医科大学病院（愛知県豊明市）、江南厚生病院（愛知県江南市）、刈谷豊田総合病院（愛知県刈谷市）、豊川市民病院（愛知県豊川

市)にRV胃腸炎で入院した患児を対象とした。すべての患児は、発熱、嘔吐、下痢などのRV胃腸炎の典型的な症状を示し、免疫クロマトグラフィー検査(Dipstick'Eiken'Rotaキット, Eiken Chemical, Tokyo Japan)によって糞便中からRV抗原がされRV胃腸炎と診断された。年齢、性別、下痢、および嘔吐などの臨床情報は、担当医によって収集された。この臨床情報からRV胃腸炎の重症度を点数化するVesikariスコアを計算した¹⁸。血清サンプルは、症状出現日を第1病日として第5病日までを急性期と(32検体)し、回復期の血清(32検体)は第6病日から第31病日に収集された。血清は分析するまで-20℃で保存した。この研究は、藤田医科大学倫理委員会(IRB No.HM17-477)によって承認された。書面によるインフォームドコンセントは、サンプル収集の前に患児の保護者から得られた。

4.2.2 血清RV IgGおよびIgA抗体価を測定するためのin house ELISA

RV IgG、IgA抗体価測定in house ELISAの詳細については第2章に記載した。概略については以下のとおりである。ヒトRV Wa株を培養し、濃縮・精製した。ELISAプレート(Costar Assay Plate, CORNING, NY, USA)に25 µLの精製Waビリオン(1 µg/mL)を加え4℃で一晩静置し固相化した。その後、Tween 20を含むトリス緩衝生理食塩水(TBS-T)に0.3%ウシ血清アルブミンを加えた溶液でブロッキングを行った。10⁻¹⁰倍に10倍段階希釈した血清35 µLを各ウェルに加え、室温で1時間放置した。TBS-Tで洗浄した後、25 µLのペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(0.1 µg/mL)(Kirkegaard&Perry Laboratories, MD, USA)または抗ヒトIgA(0.5 µg/mL)(Kirkegaard&Perry Laboratories, MD, USA)を使用して、室温で1時間静置した。25 µLの1-step Ultra TMB-ELISA基質溶液:TMB(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を加え7分静置し、25 µLのH₂SO₄(0.5 mol/L)を各ウェルに加えて反応を停止後、ELISAプレートリーダーを使用して450nmで光学密度(OD)を測定した。抗RV IgGおよびIgA抗体のカットオフ値は妊娠30週未満(28週±10日)の乳児から採取された5検体のRV抗体陰性血清のODを元に、RV IgG、IgAともに0.20とした。本法は2重測定で行われ、段階希釈によって得られた反応曲線を用いてカットオフ値0.20を越える希釈倍率を求め、その値を超えない2の倍数による希釈倍率を血清IgGおよびIgA抗体価とした。プレート間での再現性の確認のため、毎回測定毎に標準血清の抗体価の値が20%以内であることを確認した。回復期の抗体価が急性期の4倍以上であることを有意な抗体価上昇と定義した。

4.2.3 血清検体中のRV抗原の検出

血清中RV抗原は、以前の報告と同様のプロトコルでウイルスのVP6抗原を検出するRVモノクローナル抗体(YO-156)を用いたin house ELISA法によって測定された¹²。概略は以下のとおりである。ELISAプレート(Nalgen Nunc International, NY, USA)を、RVの

第4章 急性ロタウイルス胃腸炎患者におけるロタウイルス抗原血症と液性免疫応答との関連性解析

VP6 抗原に対するモノクローナル抗体 (YO-156) で 4°C、一晚固相化した。プレートを 10 mM PBS で洗浄した後、Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T) に 1% ウシ血清アルブミン 250 μ L 加えた溶液を添加してブロッキングし、4 時間静置した。プレートを再度洗浄した後、50 μ L の血清 (PBS-T で 1:16 希釈) とともに 4°C で一晚インキュベートした。プレートを PBS-T で洗浄した後、2.5% スキムミルクを含む PBS-T で 1 : 5000 に希釈した 50 μ L の抗ヒト RV 免疫ウサギ血清を各ウェルに加えた。プレートを 37°C で 1.5 時間反応後、PBS-T で洗浄、ペルオキシダーゼ結合ロバ抗ウサギ免疫グロブリン G (Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc, PA, USA) の 1 : 5000 希釈液とともに 37°C で 1.5 時間反応させた。RV VP6 抗原に結合したモノクローナル抗体の量は、基質の添加後に 450nm の波長で分光光度法によって測定された¹²。Base line 値は非 RV 感染血清の OD 値を元に 0.13 とした。

4.2.4 RV IgG および IgA 抗体価に関連する因子

RV IgG または IgA 抗体価の有意な上昇を認めた児と認めなかった群に分け、性別、年齢、検体採取時期および採取間隔、急性期 RV 抗原血症 OD 値、急性期 RV IgG および IgA 抗体価、RV IgA 抗体価、Vesikari スコアを比較した。

4.2.5 統計分析

統計解析は JMP Ver 14.0 (SAS Institute, NC, USA) を用いて行った。急性期と回復期の RV IgG および IgA 抗体価、急性期と回復期の抗原血症の OD レベルを Wilcoxon 符号順位検定で比較した。カテゴリ変数間の比較には、カイ二乗検定を使用した。P < 0.05 を統計学的有意とした。

4.3 結果

4.3.1 患者背景

本研究に登録された患児は 32 名で、月齢中央値は 19.5 か月、範囲は 5 か月から 90 か月、男児が 18 名、女児が 14 名だった。全ての乳児で、発熱、嘔吐、下痢、脱水症など RV 胃腸炎の典型的な症状を示していた。急性期血清は、第 1~5 病日 (中央値第 3 病日) までに採取され、回復期血清は、第 6~31 病日 (中央値第 8 病日) に得られた。急性期と回復期の採取間隔は、4 日間から 27 日間 (中央値 5 日間) だった。これらの患児には、熱性けいれん、脳炎、肝炎などの腸管外合併症は認められなかった。

4.3.2 RV IgG および IgA 抗体価

32 例中 14 例 (43.8%) で RV IgG 抗体価の 4 倍以上の有意な上昇を認めた。急性期の抗体価は中央値 512、四分位範囲 (interquartile range: IQR) 512-1,024、回復期の抗体価は、中央値 2,048、IQR 1,024-4,096 と両者の間には有意差を認めた ($P<0.0001$)。RV IgA 抗体価は、3 人を除くすべての患児 (90.6%) で 4 倍以上の有意な上昇を認め ($P<0.0001$)、急性期の抗体価は、中央値 : 512、IQR : 128-512、回復期の IgA 抗体価は、中央値 : 4,096、IQR : 2,048-4,096 であった (Figure 4-1)。また、発症後日数と RV IgG ($R=0.522$, $P<0.0001$) および IgA ($R=0.615$, $P<0.0001$) 抗体価との間に強い正の相関が見られた (Figure 4-2)。

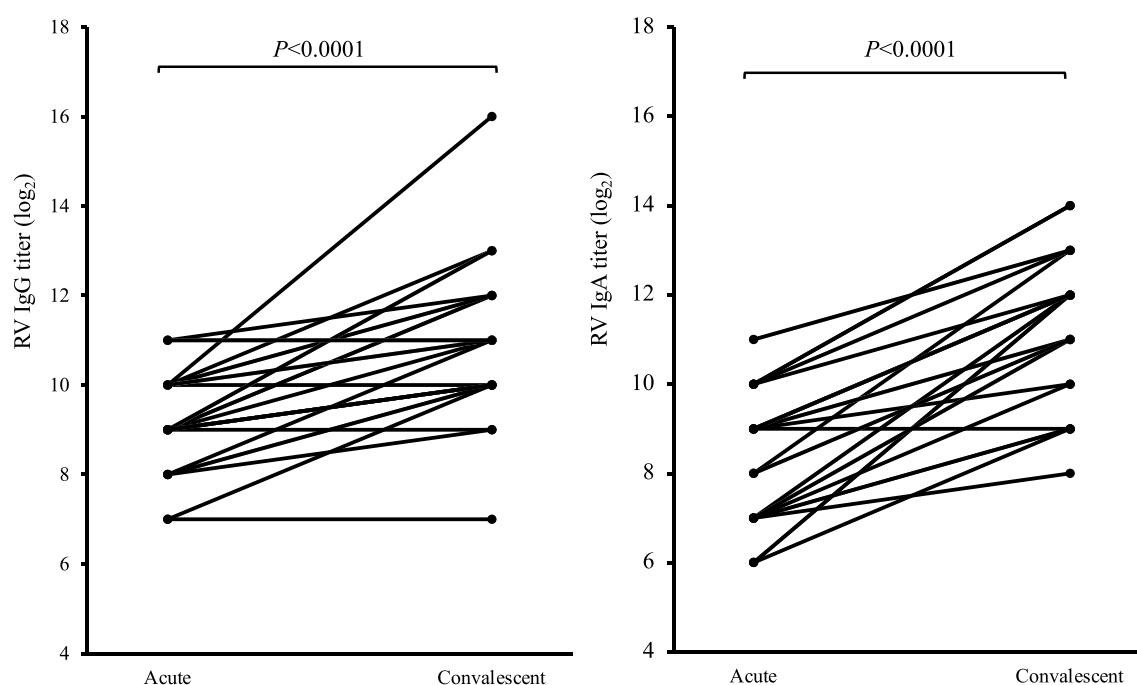


Figure 4-1 Comparison of RV IgG and IgA between acute and convalescent phase.

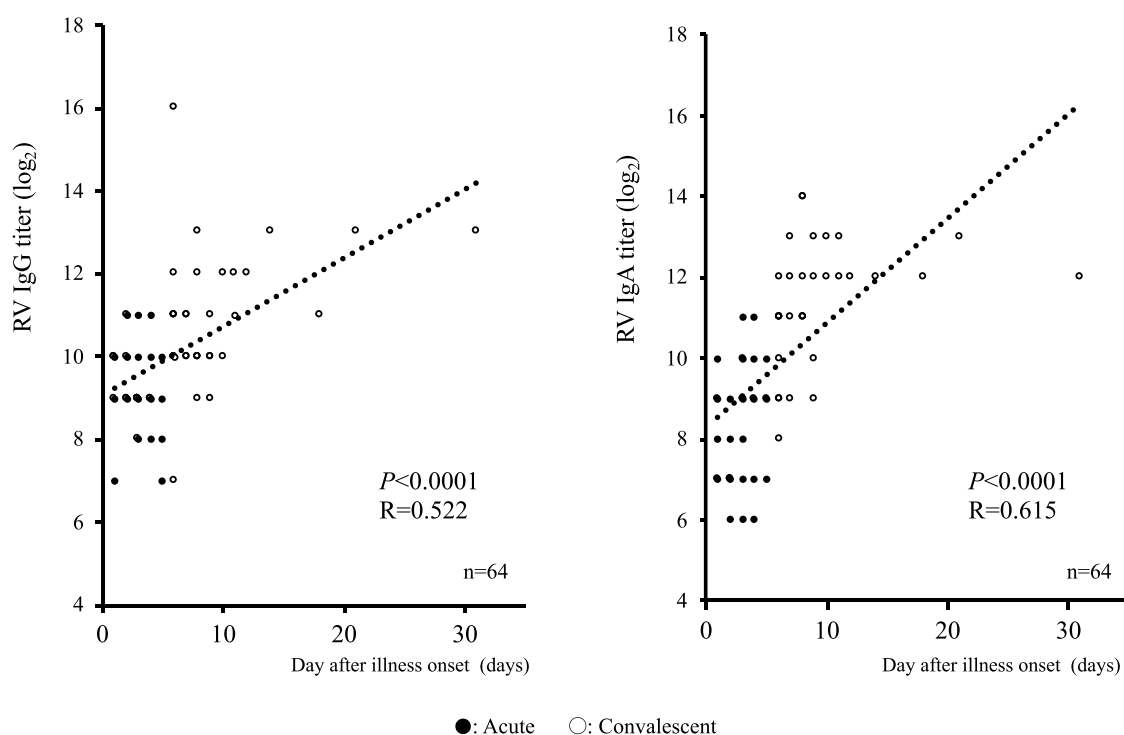


Figure 4-2 Relationship between days after onset and RV IgG, IgA antibody titer.

4.3.3 RV 抗原血症

RV 抗原は急性期血清全検体で検出された。RV 抗原血症の OD 値は急性期（中央値 1.82, IQR:1.392 - 2.180）から回復期（中央値 0.00, IQR:0.000 - 0.224）で有意に低下した（ $P < 0.0001$ ）（Figure 4-3）。32 名中 3 名を除いて回復期に血清 RV 抗原は Base line 値 (0.13) 以下であった。回復期において Base line 値以上となった 3 名の児は、いずれも第 6 病日の採血であった。

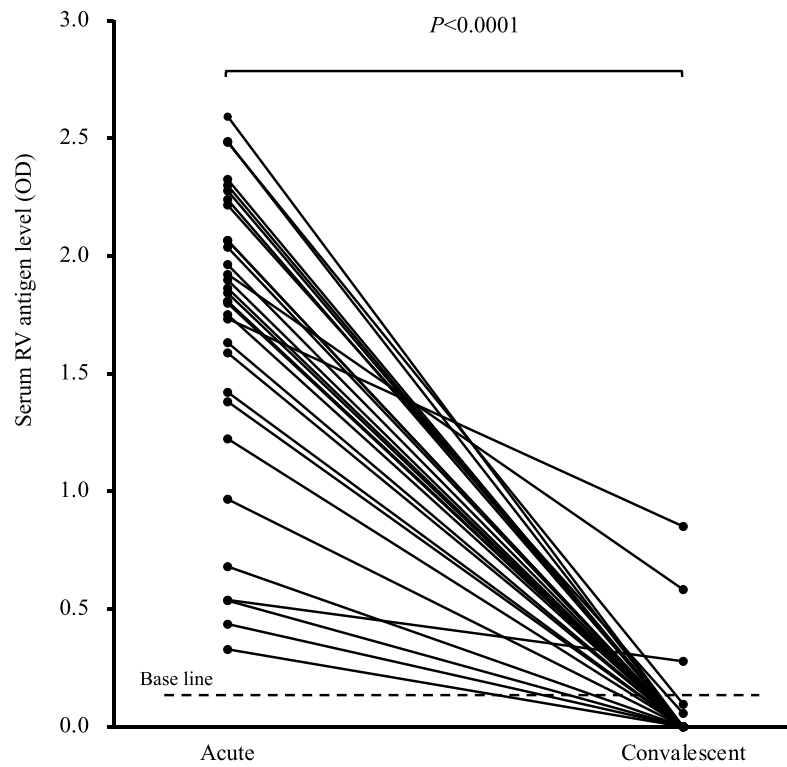


Figure 4-3 RV antigenemia in paired acute and convalescent samples in serum.

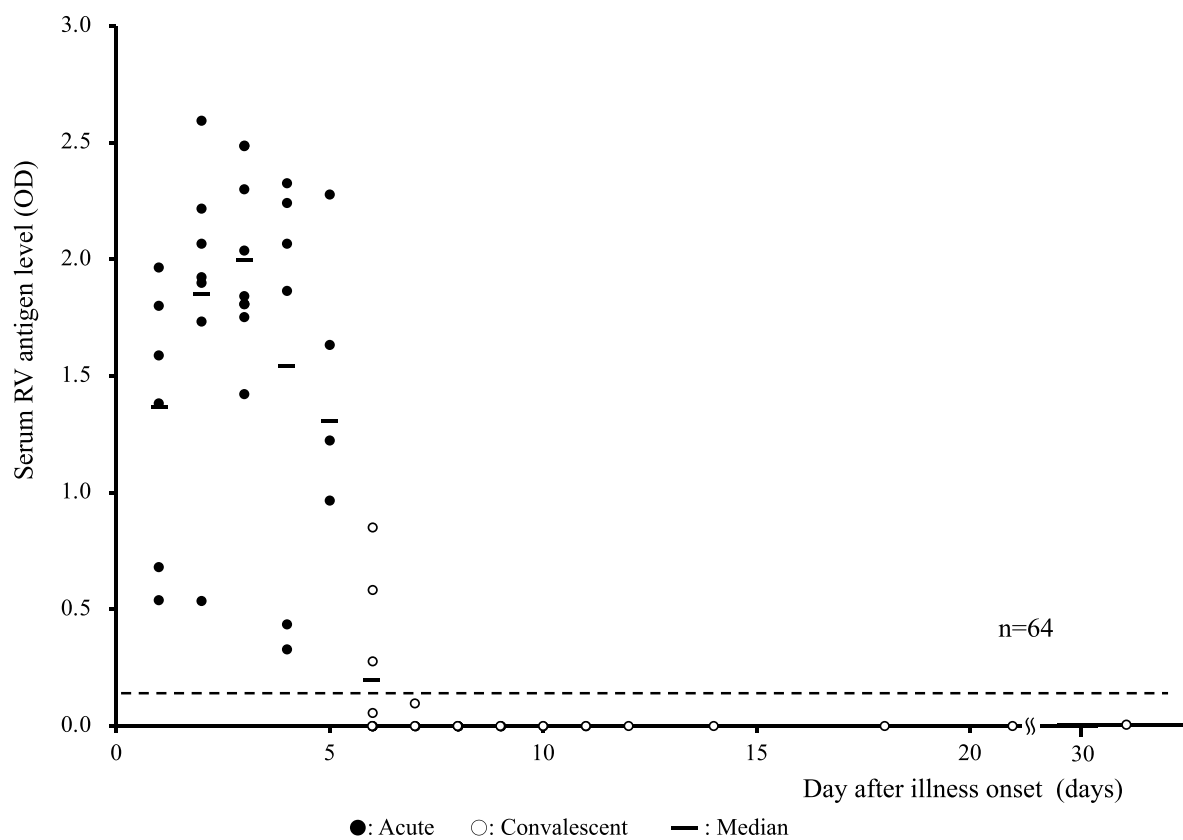


Figure 4-4 Relationship between days after onset and serum RV antigen levels.

RV 胃腸炎患児の血清中 RV 抗原量の経時的推移は、第3病日に最大となり（中央値 1.84）その後、急速に抗原量は低下、第7病日までは一部の検体で陽性となったが第8病日には全例で検出感度未満となった（Figure 4-4）。

4.3.4 RV 抗原血症と抗体価の相関性

観察期間中の 64 検体を用いて、RV 抗原血症と RV IgG または IgA 抗体価との関連を検討した。RV 抗原血症 OD 値と IgG 抗体価（ $R=-0.371$ 、 $P=0.0026$ ）（Figure 4-5）および IgA 抗体価（ $R=-0.620$ 、 $P<0.0001$ ）にはそれぞれ有意な負の相関が見られた（Figure 4-6）。

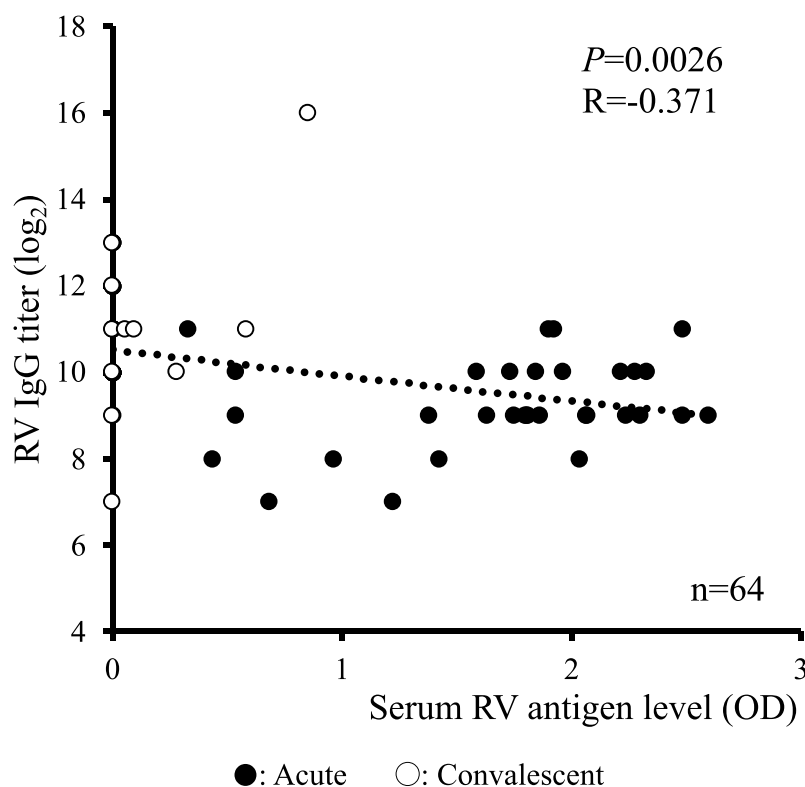


Figure 4-5 Correlation between rotavirus antigen levels and RV IgG antibody titers

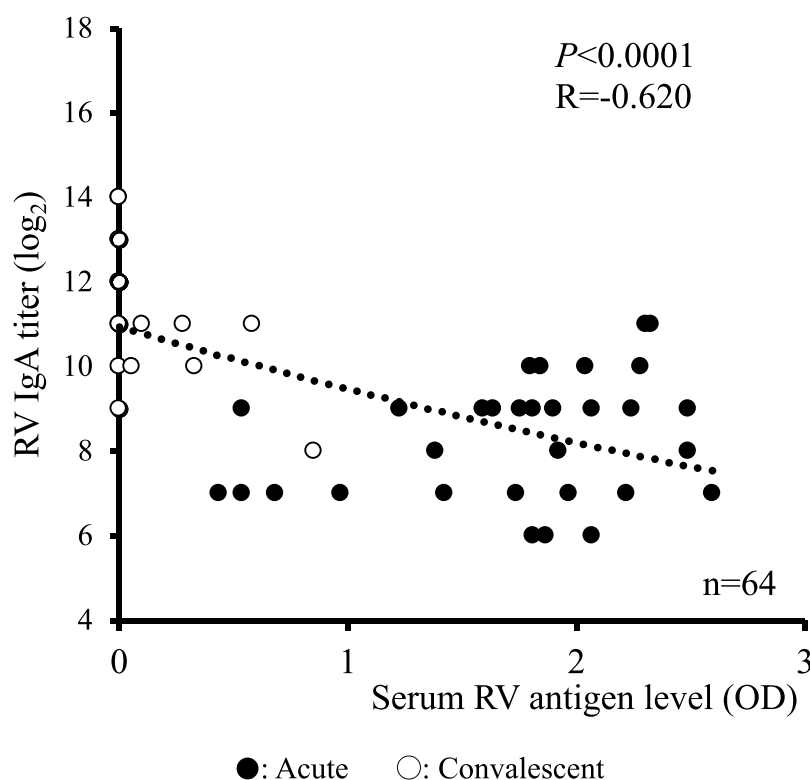


Figure 4-6 Correlation between rotavirus antigen levels and RV IgA antibody titers

4.3.5 RV IgG および IgA 抗体価に関連する因子

宿主免疫反応に関連する因子を明らかにするために、RV IgG または IgA 抗体価の有意上昇を認めた児と認めなかった児の間で種々の因子を比較した (Table 4-1)。RV IgG 抗体価が有意上昇しなかった患児では、有意に回復期の血清サンプリングのタイミングが早く、サンプリング間隔も有意に短かった。RV IgG 抗体価が有意上昇、または上昇しないにかかわらず抗原血症のレベル、急性期 RV IgG、IgA 抗体価、Vesikari スコアなど他の因子に有意差を認めなかった。一方、回復期血清の RV IgA 抗体価は 3 名を除いてほとんどの患児で有意に上昇しており、統計解析を行うには RV IgA 免疫反応を伴わない患児の数が不十分であったことが示唆された。RV IgA 抗体価の有意な上昇を認めた患児と認めなかった患児の間には、いずれの因子においても有意差は認められなかった。

Table 4-1 Demographic and virological characteristics by immune response

	Significant increase in IgG antibody titers				P value	Significant increase in IgA antibody titers				P value
	Yes (14)		No (18)			Yes (29)		No (3)		
Sex, F:M	7:7		7:11		0.530	13:16		1:2		0.700
Age (months)	Median	IQR	Median	IQR		Median	IQR	Median	IQR	
	15	9 – 31.5	21	14.8 – 38	0.189	20	12.5 – 35.5	15	9 – 19	0.332
Sampling day (days)										
Acute phase	3	1 – 4	3	2 – 4	0.712	3	2 – 4	3	2 – 5	0.574
Convalescent phase	9.5	7.8 – 15	7	6 – 9	0.017*	8	6 – 10.5	7	6 – 9	0.470
Sampling interval (days)	6.5	4.8 – 12	4	4 – 5	0.005*	5	4 – 6.5	4	4 – 4	0.058
Acute phase										
Antigenemia (OD)	1.80	1.41 – 1.98	1.91	0.90 – 2.29	0.414	1.86	1.40 – 2.23	1.73	1.22 – 1.81	0.365
IgG antibody titer	512	256 – 1,024	512	512 – 1,280	0.143	512	512 – 1,024	512	128 – 1,024	0.517
IgA antibody titer	384	128 – 1,024	512	128 – 512	0.891	512	128 – 768	512	128 – 512	1.000
Vesikari score	12.5	10 – 15.3	13.5	10.8 – 16.3	0.434	13	10.5 – 16	13	10 – 15	0.795

Sampling days indicate days after illness onset. IQR, Interquartile rang; F:M, Female: Male; OD, Optical density.

4.4 考察

本研究では RV 胃腸炎入院患児の血清を用いて、RV 抗原血症および RV 抗体価と臨床像の解析を行った。本研究は入院患児を対象としたため、Vesikari スコア 7～10 の中等症から 11 以上の重症 RV 感染症における解析となった。

本研究において RV IgG は 43.8%、IgA は 90.6%で抗体価の有意な上昇が確認された。Azim らが行った急性期と回復期間隔が 14 日以上の 28 名による報告では、有意な RV IgG (96.4%) および IgA (71.4%) 抗体価の上昇が観察されている¹⁹。本研究では入院時と退院直前にペア血清が採取されたため、急性期と回復期の採血時期の中央値がそれぞれ第 3 病日、第 8 病日とこれまでの報告に比べ非常に短かった。Hjelt らは血清中の RV IgA 抗体価が発症後 2 週間以内に上昇し、IgG 抗体価は発症後 1 か月以内に上昇した²⁰としており、本研究の検体採取時期が早かったため RV IgG の有意な上昇が少なかったと考えられた。また、RV 感染後の血清中 RV IgA は約 6 か月で消失するとされる一方で、RV IgG は 6 か月以後も高い抗体価が持続することも報告されている²¹。本研究の対象は、RV ワクチン接種が行われていないことが確認されているが過去の RV 感染歴は不明なことから、急性期 IgG 抗体価高値例は過去の RV 感染による影響である可能性が考えやすい。したがって急性期の RV IgG 抗体価が高い症例においては、有意な抗体上昇が認められなかった可能性がある。

本研究ではウイルス感染後の RV IgA 価の上昇と RV IgG 価の上昇の違いを明らかにした。Figure 4-2 から、RV 胃腸炎では IgA 反応が IgG 反応よりも速いことが示唆された。RV 感染初期には、小腸の絨毛先端に感染した RV が上皮細胞内で増殖し、消化管内腔に放出、M 細胞に取り込まれパイエル板の抗原提示細胞に貪食される。抗原提示細胞からヘルパー T 細胞へ提示され、ヘルパー T 細胞が活性化するとともにその刺激により、RV IgA を作成する B 細胞の増殖を促す。その後、リンパ節、リンパ管を経由して血中に入ったのち最終的に腸管粘膜固有層に戻り形質細胞として RV 特異的分泌型 IgA を分泌する。この一連の免疫応答が感染初期の防御に非常に重要である²²。この IgA は、便中 RV 特異的分泌型 IgA として検出可能であり、血清中の IgA 抗体価と相関するとの報告⁵もあり、血清中の RV IgA は、感染初期に急速に上昇する。しかし、本研究のように発症後短い病日での RV IgA 有意上昇を示した報告はなく、この採血間隔でも RV IgA の有意上昇は 90%以上とこれまでの報告と比較しても十分高いことが示され、RV IgA 抗体はかなり早期から上昇することが裏付けられた。

急性期 RV 抗原血症の検出率は報告によってばらつきはあるが、RV 胃腸炎の 43-90%で検出されたと報告されている^{12,15,16}。本研究では、第 5 病日までの急性期血清の全ての検体から RV 抗原が検出された。血清中 RV 抗原は、感染初期からすぐに検出され、第 3 病

日にピークに達し、第8病日に全症例で検出限界未満となった（本研究の対象では腸外感染は確認されなかった）。これらの経過は、以前の我々の報告と同様であった¹²。RV 抗原血症の感染初期の変化を示した Figure 4-4 から考えると採血時期による検出率のばらつきについては、検体収集時期が大きく影響すると考えられた。本研究では、RV IgG または IgA 抗体価と血清 RV 抗原値との間に明確な負の統計的相関が示された。特に、RV 抗原量と RV IgA 抗体価の負の相関は、RV 抗原量と RV IgG 抗体価の相関よりも強かった。前述のように、RV 抗原血症は発症後 1 週間以内に終息し、IgA 抗体反応は IgG 抗体反応より速かった。これらの結果から、RV 胃腸炎患児における RV 抗原血症の迅速な消退には、体液性免疫反応、特に IgA 抗体が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

Burns らは、RV 感染の動物モデルを使って RV 感染後 5 日目の便懸濁液中の RV IgA と便 RV 排泄量が逆相関していることを示し、小腸での RV IgA と腸における RV 排除の関係を報告した²³。臨床検討では、Fisher らが急性期 RV IgG 抗体価の低い患児において、有意に高い抗原血症を確認している¹⁴。Blutt らは、急性期の RV 抗原血症と RV IgG、IgA 抗体価の相関を解析し、両抗体とも RV 抗原血症と有意な負の相関がみられたことを報告している¹³。両者の関係については、RV 抗体が抗原血症を阻止する可能性と、血清中の抗体が RV 抗原に吸着し ELISA 法による抗原血症検出系に影響している可能性が示唆されている¹³。十二指腸液や便中では RV IgG が検出されない²⁴との報告や、感染後早期に有意な上昇が確認できるのは RV IgA であることから、RV 抗原の血液中からの排除における液性免疫の関連は、IgA がその主体であると考えられるが、両者の関係を明らかにするには、更なる検討が必要と考えられた。

免疫不全マウスに RV を投与した実験では、RV 抗原血症のクリアランスにリンパ球が必須であり、重症結合型免疫不全（SCID）マウスでは、回復期の RV 特異的血清抗体を投与すると RV 抗原血症の発症やレベルが抑制されたとし、血中からの RV 抗原の除去にリンパ球による細胞性免疫応答と RV 抗体の両者が関与しているとしている²⁵。Offit らも動物実験によって RV 特異的細胞傷害性 T リンパ球は、急性 RV 感染症の改善や再感染に対する保護に重要であると報告²⁶しており、感染早期における RV 抗原血症とサイトカインを含めた細胞性免疫に関する検討も必要である。

栄養失調、他の腸内感染症との同時感染、経口ポリオワクチンの投与、腸内マイクロバイオーム、母乳育児、受動的に獲得した母体抗体による干渉が RV ワクチンによる免疫反応に影響を与えることが報告されている²⁷。本研究では、RV 感染後の宿主免疫反応と RV 抗原血量などの各種要因の関連について検討した（Table 4-1）。サンプリング間隔は RV IgG 抗体価の有意な上昇と関連していたが、抗原血症レベルを含む他の因子は IgG 反応と関連していなかった。さらに、本研究で評価したいずれの要因も RV IgA 抗体価の有意な上昇とは関連していなかった。上述の様に、移行抗体や過去の RV 感染による既往抗体が

宿主免疫反応²⁸やRV抗原血症レベルに寄与している可能性がある¹⁴。しかし、本研究ではRV IgG または IgA 抗体価の有意な上昇の有無にかかわらず、急性期血清抗体価に統計学的差異はみられなかった。サンプリング間隔が短かったことが、この否定的な結果に影響したのかもしれない。さらに、急性期のRV抗原血症レベルも、RV IgG または IgA 抗体価が有意に上昇した患児とそうでない患児で統計学的な差はなかった。Das らは、Vesikari スコアと前述の抗原血症との相関関係を明確に示したが²⁹、対照的に、この研究を含む他の研究は実証できなかった。Das らの結果では、特に Vesikari スコアが<10 の患児において抗原血症 OD 値が少なく特に相関が強く、逆に>10 場合は、Vesikari スコアにかかわらず OD 値がほぼ一定となっていた。我々の対象では、入院を必要とする児が対象であり、中等度から重症な児であることが本研究で相関を得ることができない理由かもしれなかった。Vesikari スコアと抗原血症の関係を判断するには、さらなる研究が必要である。今後、RV 抗原血症レベルと宿主免疫反応との関連を正確に把握するためには、より長い間隔で採取した急性期、回復期の血清試料を用いた解析が必要である。

ELISA のウイルス抗原として精製 RV Wa 株を用いたことから、本測定系は RV で最も豊富に存在、ウイルス粒子精製工程において暴露された VP6 抗原が標的となっている可能性が考えられた。また VP6 に対する IgG および IgA 抗体は、RV 胃腸炎重症化の予防に重要であることも報告されている^{30,31}。一方、非構造タンパク質 (NSP) 4 は、RV 感染後に異型抗体の標的となることが証明されている^{9,32}。したがって、今後は VP6 抗原に対する IgG および IgA 反応に加えて、NSP4 抗原に対する抗体と RV 抗原血症の動態の関連性についても検討が必要であろう。

第5章 総括

臨床現場における RV 胃腸炎の診断は便中 RV 抗原の検出が主であるが、RV 胃腸炎時の免疫応答や RV ワクチンによる宿主免疫誘導能の評価をするには RV 抗体価の定量的解析が必要となる。一般的な感染症の抗体検査法として、IgM 抗体は発症急性期にのみ検出され急性期の診断には使用されるが、免疫誘導能の評価にはペア血清を用いた IgG 抗体価上昇の解析が不可欠である。しかしながら、IgG は母体から胎盤経由して児に移行し、その移行抗体が生後 6 か月までは乳児から検出されるため、早期乳児の免疫誘導能評価に IgG を使用する場合には注意が必要である。一方、IgA は胎盤を移行せず、感染時には IgM より多少遅れて出現するが IgM より長期間検出可能である。また、RV のような消化管感染症では、感染防御における粘膜免疫の重要性が高く IgA 抗体は重要な役割を担っている。よって、RV ワクチンによる免疫誘導能評価にとっても重要で、ワクチン効果の判定を行う多くの研究で測定されてきた。

本研究では、in house ELISA 法による RV IgG、IgA 抗体の測定法を構築することを目標とした。In house ELISA 法による RV IgG および IgA 定量法の開発、基礎検討（2 章）を行い、その方法を用いて RV ワクチン接種後の免疫誘導能評価（3 章）、および RV 胃腸炎における RV 抗原血症と宿主免疫応答との関連性解析（4 章）を行った。

第 2 章で行った基礎検討において、in house ELISA 法の再現性は標準血清を使って評価された。同時再現性評価の指標として CV%を用い、その値が RV IgG では 3.8-9.4%、RV IgA では 2.3-16.9%、RV IgG の日差再現性は CV%が 18.3%、RV IgA 14.0%であり、臨床検査法として良好な再現性を確認し、その後の毎測定におけるコントロールに利用した。初期検討として、RV ワクチン Rotarix[®]接種乳児の臨床検体を用いた RV IgG および IgA 抗体価測定を行った。RV 中和抗体価の上昇した乳児では in house ELISA 法でも有意に抗体価が上昇しており、中和抗体が上昇しなかった患児では抗体価は上昇していなかった。また、in house ELISA 法による IgG 抗体価と中和抗体価に有意な正相関も確認された。また、RV 胃腸炎患児の入院時および退院時の血清抗体価を in house ELISA 法で測定したところ、急性期と回復期において 4 倍以上の抗体価の上昇を有意と規定した場合、RV IgG において 9 名中 5 名（55.6%）で有意な上昇を確認できた。一方で RV IgA は 9 名中 8 名で有意な上昇を認めた。これらの初期検討の結果から、我々の構築した in house ELISA は、RV 特異的 RV IgG、IgA 抗体価測定を行う上で信頼性の高い方法であると考えられた。

第 3 章では、RV 感染によって重症化しやすい NICU に入院した早産児において、腸管内でのワクチン株増殖と宿主免疫応答の関連性を調査するため、藤田医科大学 NICU 入院中に RV1 を接種された男児 11 名、女児 9 名の合計 20 名を対象とし、第 2 章で構築した in

house ELISA 法を用いた。RV IgG は RV1 の 1 回目投与によって 70.0% で有意上昇を認め、2 回目投与後では 71.4%、IgA 抗体価は、1 回目投与後にすでにほとんどの症例で有意に上昇 (90.0%) しており、2 回目投与後の抗体価はほぼ横ばいで大きな変化は見られなかった。また、初回接種後便中 RV1 ウイルス排出量と RV IgG、IgA 抗体価間には正相関がみられた。我々の開発した in house ELISA 法によって RV1 ワクチン接種後の腸内増殖が免疫誘導には必須であり、特に 1 回目の RV1 増殖が免疫応答に重要であることを明らかにできた。

RV 胃腸炎の抗原血症や免疫反応に対する報告は多くされてきているが、抗原血症と抗体価の関連性を解析した研究は少なく、第 4 章では、RV 抗原血症と in house ELISA 法による免疫反応の関連を解析した。糞便中から RV 抗原が検出され、RV 胃腸炎で入院した患児を対象とし、急性期と回復期のペア血清を採取、血清中 RV 抗原量と IgG、IgA 抗体価を測定した。発症後日数と RV IgG および IgA 抗体価との間に強い正の相関が見られ、RV 特異的 IgG 抗体に比して IgA 抗体の上昇が非常に早く上昇すること、また RV IgG、IgA 抗体価と血清 RV 抗原値との間に明確な負の相関が示された。特に、RV 抗原量と RV IgA 抗体価の負の相関は RV 抗原量と RV IgG 抗体価の相関よりも強く、血清から RV 抗原を排除する上で特に RV IgA 抗体が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

以上の様に、我々の開発したヒト RV 株 Wa を使用した in house RV ELISA を基礎として、本文に示した貴重なデータを明らかにすることができた。本法は今後、RV 感染症における免疫応答を解析してゆく上で非常に有用な方法であると考えられた。

謝辞

本論文を結ぶにあたり、ご指導、ご鞭撻とご援助をいただいた方々に感謝の意を表します。

医療科学部・診断支援機器科学分野 井平勝教授には、本論文をまとめるにあたり、終始激励とご指導、ご鞭撻をいただきました。研究に取り組む姿勢について様々なご助言に、甚大なる感謝の意を表します。

研究をするための環境を与えていただき、研究の方向性、解析等に数多くのご助言、ご指導をいただいた医学部・小児科学 吉川哲史教授、河村吉紀講師に心より感謝申し上げます。

検体、データの収集にご協力を頂き、多くの知識や示唆を頂いた医学部・小児科学 小澤慶助教、医療科学部・細胞機能解析学分野 東本祐紀医療講師、藤田医科大学病院・薬剤部 鈴木竜太先生、平松裕之先生、刈谷豊田総合病院・小児科 服部文彦先生に深く感謝いたします。

医学部ウイルス・寄生虫学 谷口孝喜名誉教授、河本聡志准教授には、ウイルス株の提供や技術指導ならびに貴重なご意見をいただきました。厚く御礼申し上げます。

田辺三菱製薬株式会社・創薬本部薬物動態研究所 清水浩之氏には ELISA 共同開発にあたって数多くのご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

実験を実施するにあたり数々のご指導をいただきました、小児科研究室内の吉川明子先生、森恵子先生、刑部陽子先生に心からお礼申し上げます。

ここに記しきれない多くの方々のご支援によって本論文が成立していることを銘記し、お世話になった全ての方々に深く感謝いたします。

第 1 章 引用文献

1. Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*. 1973 Dec 29;2(7844):1497.
2. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973 Dec 8;2(7841):1281-3.
3. World Health Organization. Rotavirus vaccines. *Wkly Epidemiol Rec*. 2007 Aug 10;82(32):285-95. English, French.
4. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Steele AD, Duque J, Parashar UD. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and metaanalysis. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(12):136-141.
5. Parashar UD, Nelson EA, Kang G. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. *BMJ*. 2013 Dec 30;347:f7204.
6. Markkula J, Hemming-Harlow M, Salminen MT, Savolainen-Kopra C, Pirhonen J, Al-Hello H, Vesikari T. Rotavirus epidemiology 5-6 years after universal rotavirus vaccination: persistent rotavirus activity in older children and elderly. *Infect Dis (Lond)*. 2017 May;49(5):388-395.
7. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg Infect Dis*. 1998 Oct-Dec;4(4):561-70.
8. Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*. 2005 Jan-Feb;15(1):29-56.
9. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol*. 2012;2(4):426-433.
10. Glass RI, Bresee JS, Parashar U, Turcios R, Fischer TK, Jiang B, Widdowson MA, Gentsch J. Rotavirus vaccines: past, present, and future. *Arch Pediatr*. 2005 Jun;12(6):844-7.
11. Sadiq A, Bostan N, Yinda KC, Naseem S, Sattar S. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev Med Virol*. 2018 Nov;28(6):e2003.
12. Komoto S, Ide T, Negoro M, Tanaka T, Asada K, Umemoto M, Kuroki H, Ito H, Tanaka S, Ito M, Fukuda S, Suga S, Kamiya H, Nakano T, Taniguchi K. Characterization of unusual DS-1-like G3P[8] rotavirus strains in children with diarrhea in Japan. *J Med Virol*. 2018 May;90(5):890-898.
13. Fukuda S, Tacharoenmuang R, Guntapong R, Upachai S, Singchai P, Ide T, Hatazawa R, Sutthiwarakom K, Kongjorn S, Onvimala N, Ruchusatsawast K, Rungnopakun P,

- Mekmallika J, Kawamura Y, Motomura K, Tatsumi M, Takeda N, Murata T, Yoshikawa T, Uppapong B, Taniguchi K, Komoto S. Full genome characterization of novel DS-1-like G9P[8] rotavirus strains that have emerged in Thailand. *PLoS One*. 2020 Apr 22;15(4):e0231099.
14. Fujii Y, Oda M, Somura Y, Shinkai T. Molecular Characteristics of Novel Mono-Reassortant G9P[8] Rotavirus A Strains Possessing the NSP4 Gene of the E2 Genotype Detected in Tokyo, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2020 Jan 23;73(1):26-35.
15. Yoshikawa T, Ihira M, Higashimoto Y, Hattori F, Miura H, Sugata K, Komoto S, Taniguchi K, Iguchi A, Yamada M, Ariga T. Persistent systemic rotavirus vaccine infection in a child with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Med Virol*. 2019 Jun;91(6):1008-1013.
16. Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis*. 2003 May;9(5):565-72.
17. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, Armah G, Bines JE, Brewer TG, Colombara DV, Kang G, Kirkpatrick BD, Kirkwood CD, Mwenda JM, Parashar UD, Petri WA Jr, Riddle MS, Steele AD, Thompson RL, Walson JL, Sanders JW, Mokdad AH, Murray CJL, Hay SI, Reiner RC Jr. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr*. 2018 Oct 1;172(10):958-965.
18. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD; World Health Organization–Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis*. 2016 May 1;62 Suppl 2:S96-S105.
19. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, Franco MA, Greenberg HB, O’Ryan M, Kang G, Desselberger U, Estes MK. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Nov 9;3:17083.
20. Ito H, Otabe O, Katsumi Y, Matsui F, Kidowaki S, Mibayashi A, Nakagomi T, Nakagomi O. The incidence and direct medical cost of hospitalization due to rotavirus gastroenteritis in Kyoto, Japan, as estimated from a retrospective hospital study. *Vaccine*. 2011 Oct 13;29(44):7807-10.
21. Kamiya H, Nakano T, Kamiya H, Yui A, Taniguchi K, Parashar U; Rotavirus Epidemiology Study Group. Rotavirus-associated acute gastroenteritis hospitalizations among Japanese children aged <5 years: active rotavirus surveillance in Mie Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011;64(6):482-7.
22. Kinoshita S, Noguchi A, Miura S, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. A retrospective, hospital-based study to determine the incidence of rotavirus hospitalizations among children

- less than 5 years of age over a 10-year period (2001-2011) in Akita prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2014;67(6):464-8.
23. Yoshikawa T, Matsuki T, Sato K, Mizuno M, Shibata M, Hasegawa S, Morita M, Iwasa M, Gopala K, Holl K. Impact of rotavirus vaccination on the burden of acute gastroenteritis in Nagoya city, Japan. *Vaccine.* 2018 Jan 25;36(4):527-534.
 24. Nakagomi T, Chang BR, Nakagomi O. Rotavirus hospitalization and molecular epidemiology in northern Japan, 1987-1996. *Vaccine.* 2009 Nov 20;27 Suppl 5:F93-6.
 25. Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science.* 1996 Apr 5;272(5258):101-4.
 26. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E, Lund JS. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1983 Jul 14;309(2):72-6.
 27. Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996 Oct 3;335(14):1022-8.
 28. Franco MA, Angel J, Greenberg HB. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. *Vaccine.* 2006 Apr 5;24(15):2718-31.
 29. Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol.* 2004 78: 10213-0220.
 30. Nishimura S, Ushijima H, Nishimura S, Shiraishi H, Kanazawa C, Abe T, Kaneko K, Fukuyama Y. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of the reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev.* 1993 Nov-Dec;15(6):457-9.
 31. Crawford SE, Patel DG, Cheng E, Berkova Z, Hyser JM, Ciarlet M, Finegold MJ, Conner ME, Estes MK. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. *J Virol.* 2006 May;80(10):4820-32.
 32. Salmi TT, Arstila P, Koivikko A. Central nervous system involvement in patients with rotavirus gastroenteritis. *Scand J Infect Dis.* 1978;10(1):29-31.
 33. Lynch M, Lee B, Azimi P, Gentsch J, Glaser C, Gilliam S, Chang HG, Ward R, Glass RI. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clin Infect Dis.* 2001 Oct 1;33(7):932-8.
 34. Lynch M, Shieh WJ, Tatti K, Gentsch JR, Ferebee-Harris T, Jiang B, Guarner J, Bresee JS, Greenwald M, Cullen S, Davies HD, Trevenen C, Zaki SR, Glass RI. The pathology of rotavirus-associated deaths, using new molecular diagnostics. *Clin Infect Dis.* 2003 Nov 15;37(10):1327-33.

35. Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis*. 2002 May 15;34(10):1351-61.
36. Jiang B, Snipes-Magaldi L, Dennehy P, Keyserling H, Holman RC, Bresee J, Gentsch J, Glass RI. Cytokines as mediators for or effectors against rotavirus disease in children. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003 Nov;10(6):995-1001.
37. Offit PA, Dudzik KI. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes passively protect against gastroenteritis in suckling mice. *J Virol*. 1990 Dec;64(12):6325-8.
38. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis*. 2000 Dec;182(6):1602-9.
39. Hjelt K, Grauballe PC, Paerregaard A, Nielsen OH, Krasilnikoff PA. Protective effect of preexisting rotavirus-specific immunoglobulin A against naturally acquired rotavirus infection in children. *J Med Virol*. 1987 Jan;21(1):39-47.
40. O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK, Pickering LK. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis*. 1994 Mar;169(3):504-11.
41. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, Meurice F, Han HH, Damaso S, Bouckennooghe A. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet*. 2007 Nov 24;370(9601):1757-63.
42. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, Dallas MJ, Heyse JF, Goveia MG, Black SB, Shinefield HR, Christie CD, Ylitalo S, Itzler RF, Coia ML, Onorato MT, Adeyi BA, Marshall GS, Gothefors L, Campens D, Karvonen A, Watt JP, O'Brien KL, DiNubile MJ, Clark HF, Boslego JW, Offit PA, Heaton PM; Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*. 2006 Jan 5;354(1):23-33.
43. Patel M, Shane AL, Parashar UD, Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? *J Infect Dis*. 2009 Nov 1;200 Suppl 1(0 1):S39-48.
44. Wang Y, Li J, Liu P, Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum Vaccin Immunother*. 2021 Mar 4;17(3):880-896.

第2章 引用文献

1. Blutt SE, Miller AD, Salmon SL, Metzger DW, Conner ME. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunol.* 2012 Nov;5(6):712-9.
2. Patel M, Glass RI, Jiang B, Santosham M, Lopman B, Parashar U. A systematic review of anti-rotavirus serum IgA antibody titer as a potential correlate of rotavirus vaccine efficacy. *J Infect Dis.* 2013 Jul 15;208(2):284-94.
3. Angel J, Steele AD, Franco MA. Correlates of protection for rotavirus vaccines: Possible alternative trial endpoints, opportunities, and challenges. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(12):3659-71.
4. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis.* 2000 Dec;182(6):1602-9.
5. Bishop RF, Cipriani E, Lund JS, Barnes GL, Hosking CS. Estimation of rotavirus immunoglobulin G antibodies in human serum samples by enzyme-linked immunosorbent assay: expression of results as units derived from a standard curve. *J Clin Microbiol.* 1984 Apr;19(4):447-52.
6. 谷口孝喜. ロタウイルスの遺伝子と蛋白質. *ウイルス.* 1998;48(2):137-151
7. Lappalainen S, Blazevic V, Malm M, Vesikari T. Rotavirus vaccination and infection induce VP6-specific IgA responses. *J Med Virol.* 2017 Feb;89(2):239-245.
8. 谷口孝喜. ロタウイルスワクチン. *ウイルス.* 2012;62 (1) :87-96
9. Ward RL, Bernstein DI, Shukla R, Young EC, Sherwood JR, McNeal MM, Walker MC, Schiff GM. Effects of antibody to rotavirus on protection of adults challenged with a human rotavirus. *J Infect Dis.* 1989 Jan;159(1):79-88.
10. Hjelt K, Grauballe PC, Andersen L, Schiøtz PO, Howitz P, Krasilnikoff PA. Antibody response in serum and intestine in children up to six months after a naturally acquired rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1986 Jan;5(1):74-80.
11. McLean B, Holmes IH. Transfer of antirotaviral antibodies from mothers to their infants. *J Clin Microbiol.* 1980 Sep;12(3):320-5

第3章 引用

1. Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, Jha P, Campbell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C; Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*. 2010 Jun 5;375(9730):1969-87.
2. Troeger C, Khalil IA, Rao PC, Cao S, Blacker BF, Ahmed T, Armah G, Bines JE, Brewer TG, Colombara DV, Kang G, Kirkpatrick BD, Kirkwood CD, Mwenda JM, Parashar UD, Petri WA Jr, Riddle MS, Steele AD, Thompson RL, Walson JL, Sanders JW, Mokdad AH, Murray CJL, Hay SI, Reiner RC Jr. Rotavirus Vaccination and the Global Burden of Rotavirus Diarrhea Among Children Younger Than 5 Years. *JAMA Pediatr*. 2018 Oct 1;172(10):958-965.
3. The World Health Organization. Meeting of the immunization strategic advisory group of experts, April 2009 - conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009;84:220–236.
4. O’Ryan M., Lucero Y., Linhares A.C. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10:1645–1659.
5. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Cheuvart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavía-Ruz N, Salmerón J, Rüttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O’Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2006 Jan 5;354(1):11-22.
6. Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, Van Damme P, Santosham M, Rodriguez Z, Dallas MJ, Heyse JF, Goveia MG, Black SB, Shinefield HR, Christie CD, Ylitalo S, Itzler RF, Coia ML, Onorato MT, Adeyi BA, Marshall GS, Gothefors L, Campens D, Karvonen A, Watt JP, O’Brien KL, DiNubile MJ, Clark HF, Boslego JW, Offit PA, Heaton PM; Rotavirus Efficacy and Safety Trial (REST) Study Team. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med*. 2006 Jan 5;354(1):23-33.
7. Rahman M, Matthijnssens J, Yang X, Delbeke T, Arijs I, Taniguchi K, Iturriza-Gómara M, Iftekharuddin N, Azim T, Van Ranst M. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *J Virol*. 2007 Mar;81(5):2382-90.
8. Cunliffe NA, Gentsch JR, Kirkwood CD, Gondwe JS, Dove W, Nakagomi O, Nakagomi T, Hoshino Y, Bresee JS, Glass RI, Molyneux ME, Hart CA. Molecular and serologic

- characterization of novel serotype G8 human rotavirus strains detected in Blantyre, Malawi. *Virology*. 2000 Sep 1;274(2):309-20.
9. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis*. 2018 Nov;18(11):1211-1228.
 10. Cortes JE, Curns AT, Tate JE, Parashar UD. Trends in healthcare utilization for diarrhea and rotavirus disease in privately insured US children <5 years of age, 2001-2006. *Pediatr Infect Dis J*. 2009 Oct;28(10):874-8.
 11. Vesikari T, Karvonen A, Prymula R, Schuster V, Tejedor JC, Cohen R, Meurice F, Han HH, Damaso S, Bouckennooghe A. Efficacy of human rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis during the first 2 years of life in European infants: randomised, double-blind controlled study. *Lancet*. 2007 Nov 24;370(9601):1757-63.
 12. Tanmoy AM, Ahmed AN, Arumugam R, Hossain B, Marzan M, Saha S, Arifeen SE, Baqui AH, Black RE, Kang G, Saha SK. Rotavirus Surveillance at a WHO-Coordinated Invasive Bacterial Disease Surveillance Site in Bangladesh: A Feasibility Study to Integrate Two Surveillance Systems. *PLoS One*. 2016 Apr 20;11(4):e0153582.
 13. Parashar UD, Johnson H, Steele AD, Tate JE. Health impact of rotavi-rus vaccination in developing countries: progress and way forward. *Clin Infect Dis*. 2016;62(suppl 2):S91-S9
 14. Steele AD, De Vos B, Tumbo J, Reynders J, Scholtz F, Bos P, de Beer MC, Van der Merwe CF, Delem A. Co-administration study in South African infants of a live-attenuated oral human rotavirus vaccine (RIX4414) and poliovirus vaccines. *Vaccine*. 2010 Sep 7;28(39):6542-8.
 15. Emperador DM, Velasquez DE, Estivariz CF, Lopman Ben, Jiang B, Parashar U, Anand A, Zaman K. Interference of Monovalent, Bivalent, and Trivalent Oral Poliovirus Vaccines on Monovalent Rotavirus Vaccine Immunogenicity in Rural Bangladesh. *Clin Infect Dis*. 2016;62:150-6.
 16. Chilengi R, Simuyandi M, Beach L, Mwila K, Becker-Dreps S, Emperador DM, Velasquez DE, Bosomprah S, Jiang B. Association of Maternal Immunity with Rotavirus Vaccine Immunogenicity in Zambian Infants. *PLoS ONE*. 2016;11(3) 11:e0150100.
 17. Liu Y, Huang P, Tan M, Liu Y, Biesiada J, Meller J, Castello AA, Jiang B, Jiang X. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *J Virol*. 2012 Sep;86(18):9899-910.
 18. Nordgren J, Sharma S, Bucardo F, Nasir W, Günaydın G, Ouermi D, Nitiema LW, Becker-Dreps S, Simporé J, Hammarström L, Larson G, Svensson L. Both Lewis and secretor status

- mediate susceptibility to rotavirus infections in a rotavirus genotype-dependent manner. *Clin Infect Dis*. 2014 Dec 1;59(11):1567-73.
19. Harris V, Ali A, Fuentes S, Korpela K, Kazi M, Tate J, Parashar U, Wiersinga WJ, Giaquinto C, de Weerth C, de Vos WM. Rotavirus vaccine response correlates with the infant gut microbiota composition in Pakistan. *Gut Microbes*. 2018 Mar 4;9(2):93-101.
 20. Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012 May 9; 486(7402):222-7.
 21. Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I, Pickering LK, Estes MK. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis*. 1993 Mar;167(3):577-83.
 22. Vesikari T, Karvonen A, Korhonen T, Espo M, Lebacqz E, Forster J, Zepp F, Delem A, De Vos B. Safety and immunogenicity of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in adults, toddlers and previously uninfected infants. *Vaccine*. 2004 Jul 29;22(21-22):2836-42.
 23. Miura H, Kawamura Y, Sugata K, Koshiyama N, Yoshikawa A, Komoto S, Taniguchi K, Ihira M, Yoshikawa T. Rotavirus vaccine strain transmission by vaccinated infants in the foster home. *J Med Virol*. 2017 Jan;89(1):79-84.
 24. Gautam R, Esona MD, Mijatovic-Rustempasic S, Ian Tam K, Gentsch JR, Bowen MD. Real-time RT-PCR assays to differentiate wild-type group A rotavirus strains from Rotarix(®) and RotaTeq(®) vaccine strains in stool samples. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(3):767-77.
 25. Ward RL, Bernstein DI. Rotarix: a rotavirus vaccine for the world. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan 15;48(2):222-8.
 26. Salinas B, Pérez Schael I, Linhares AC, Ruiz Palacios GM, Guerrero ML, Yarzabal JP, Cervantes Y, Costa Clemens S, Damaso S, Hardt K, De Vos B. Evaluation of safety, immunogenicity and efficacy of an attenuated rotavirus vaccine, RIX4414: A randomized, placebo-controlled trial in Latin American infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2005 Sep;24(9):807-16.
 27. Ruiz-Palacios GM, Pérez-Schael I, Velázquez FR, Abate H, Breuer T, Clemens SC, Cheuvart B, Espinoza F, Gillard P, Innis BL, Cervantes Y, Linhares AC, López P, Macías-Parra M, Ortega-Barría E, Richardson V, Rivera-Medina DM, Rivera L, Salinas B, Pavía-Ruz N, Salmerón J, Rüttimann R, Tinoco JC, Rubio P, Nuñez E, Guerrero ML, Yarzabal JP, Damaso S, Tornieporth N, Sáez-Llorens X, Vergara RF, Vesikari T, Bouckennooghe A, Clemens R, De Vos B, O'Ryan M; Human Rotavirus Vaccine Study Group. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med*. 2006 Jan 5;354(1):11-22.

28. Kawamura N, Tokoeda Y, Oshima M, Okahata H, Tsutsumi H, Van Doorn LJ, Muto H, Smolenov I, Suryakiran PV, Han HH. Efficacy, safety and immunogenicity of RIX4414 in Japanese infants during the first two years of life. *Vaccine*. 2011 Aug 26;29(37):6335-41.
29. 堤裕幸. 健常児におけるウイルス感染症. *小児感染免疫*. 2010 Vol. 22 No.4 403-407
30. Hjelt K, Grauballe PC, Andersen L, Schiøtz PO, Howitz P, Krasilnikoff PA. Antibody response in serum and intestine in children up to six months after a naturally acquired rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1986 Jan;5(1):74-80.
31. Mijatovic-Rustempasic S, Immergluck LC, Parker TC, Laghaie E, Mohammed A, McFadden T, Parashar UD, Bowen MD, Cortese MM. Shedding of porcine circovirus type 1 DNA and rotavirus RNA by infants vaccinated with Rotarix®. *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Apr 3;13(4):928-935.
32. Vesikari T, Karvonen A, Korhonen T, Espo M, Lebacqz E, Forster J, Zepp F, Delem A, De Vos B. Safety and immunogenicity of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in adults, toddlers and previously uninfected infants. *Vaccine*. 2004 Jul 29;22(21-22):2836-42.
33. Hsieh YC, Wu FT, Hsiung CA, Wu HS, Chang KY, Huang YC. Comparison of virus shedding after live attenuated and pentavalent reassortant rotavirus vaccine. *Vaccine*. 2014 Feb 26;32(10):1199-204.
34. Cunliffe N., Nakagomi O. Reoviruses. In: Greenwood D., Slack R., Peutherer J., Barer M., editors. *Medical Microbiology*. 17th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2007. pp. 545–552.
35. Shaw RD, Hempson SJ. Replication as a determinant of the intestinal response to rotavirus. *J Infect Dis*. 1996 Dec;174(6):1328-31.
36. Isa P, Arias CF, López S. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J*. 2006 Feb;23(1-2):27-37.
37. Ramig RF. Systemic rotavirus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007 Aug;5(4):591-612
38. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis*. 2000 Dec;182(6):1602-9.
39. Harris V, Ali A, Fuentes S, Korpela K, Kazi M, Tate J, Parashar U, Wiersinga WJ, Giaquinto C, de Weerth C, de Vos WM. Rotavirus vaccine response correlates with the infant gut microbiota composition in Pakistan. *Gut Microbes*. 2018 Mar 4;9(2):93-101.
40. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*. 2001;7(3):167-202.

第4章 引用文献

1. Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, et al. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis.* 2009;200
2. Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD; World Health Organization–Coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, Regional, and National Estimates of Rotavirus Mortality in Children <5 Years of Age, 2000-2013. *Clin Infect Dis.* 2016 May 1;62 Suppl 2:S96-S105.
3. Tate JE, Patel MM, Steele AD, Gentsch JR, Payne DC, Cortese MM, Nakagomi O, Cunliffe NA, Jiang B, Neuzil KM, de Oliveira LH, Glass RI, Parashar UD. Global impact of rotavirus vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2010 Apr;9(4):395-407.
4. Fujii Y, Noguchi A, Miura S, Ishii H, Nakagomi T, Nakagomi O, Takahashi T. Effectiveness of rotavirus vaccines against hospitalisations in Japan. *BMC Pediatr.* 2017 Jul 11;17(1):156.
5. Midthun K, Pang LZ, Flores J, Kapikian AZ. Comparison of immunoglobulin A (IgA), IgG, and IgM enzyme-linked immunosorbent assays, plaque reduction neutralization assay, and complement fixation in detecting seroresponses to rotavirus vaccine candidates. *J Clin Microbiol.* 1989;27(12):2799-2804.
6. Xu J, Dennehy P, Keyserling H, Westerman LE, Wang Y, Holman RC, Gentsch JR, Glass RI, Jiang B. Serum antibody responses in children with rotavirus diarrhea can serve as proxy for protection. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Feb;12(2):273-9.
7. McLean B, Sonza S, Holmes IH. Measurement of immunoglobulin A, G, and M class rotavirus antibodies in serum and mucosal secretions. *J Clin Microbiol.* 1980;12(3):314-319.
8. Bishop RF, Cipriani E, Lund JS, Barnes GL, Hosking CS. Estimation of rotavirus immunoglobulin G antibodies in human serum samples by enzyme-linked immunosorbent assay: expression of results as units derived from a standard curve. *J Clin Microbiol.* 1984;19(4):447-452.
9. Ray P, Malik J, Singh RK, Bhatnagar S, Bahl R, Kumar R, Bhan MK. Rotavirus nonstructural protein NSP4 induces heterotypic antibody responses during natural infection in children. *J Infect Dis.* 2003 Jun 1;187(11):1786-93.
10. Blutt SE, Kirkwood CD, Parreño V, Warfield KL, Ciarlet M, Estes MK, Bok K, Bishop RF, Conner ME. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? *Lancet.* 2003 Nov 1;362(9394):1445-9.
11. Blutt SE, Fenaux M, Warfield KL, Greenberg HB, Conner ME. Active viremia in rotavirus-infected mice. *J Virol.* 2006;80(13):6702-6705.

12. Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Miyake F, Suga S, Asano Y, Ohashi M, Suzuki K, Nishimura N, Ozaki T, Yoshikawa T. Analysis of rotavirus antigenemia and extraintestinal manifestations in children with rotavirus gastroenteritis. *Pediatrics*. 2008 Aug;122(2):392-7.
13. Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, Piedra PA, Conner ME. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med*. 2007 Apr;4(4):e121.
14. Fischer TK, Ashley D, Kerin T, Reynolds-Hedmann E, Gentsch J, Widdowson MA, Westerman L, Puh N, Turcios RM, Glass RI. Rotavirus antigenemia in patients with acute gastroenteritis. *J Infect Dis*. 2005 Sep 1;192(5):913-9.
15. Gilger MA, Matson DO, Conner ME, Rosenblatt HM, Finegold MJ, Estes MK. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr*. 1992;120(6):912-917.
16. Santosham M, Yolken RH, Quiroz E, Dillman L, Oro G, Reeves WC, Sack RB. Detection of rotavirus in respiratory secretions of children with pneumonia. *J Pediatr*. 1983 Oct;103(4):583-5.
17. Alfajaro MM, Cho KO. Evidences and consequences of extra-intestinal spread of rotaviruses in humans and animals. *Virusdisease*. 2014;25(2):186-194.
18. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infect Dis*. 1990;22(3):259-67.
19. Azim T, Zaki MH, Podder G, Sultana N, Salam MA, Rahman SM, Sefat-e-Khuda, Sack DA. Rotavirus-specific subclass antibody and cytokine responses in Bangladeshi children with rotavirus diarrhoea. *J Med Virol*. 2003 Feb;69(2):286-95.
20. Hjelt K, Grauballe PC, Andersen L, Schiøtz PO, Howitz P, Krasilnikoff PA. Antibody response in serum and intestine in children up to six months after a naturally acquired rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1986 Jan;5(1):74-80.
21. Hjelt K, Grauballe PC, Schiøtz PO, Andersen L, Krasilnikoff PA. Intestinal and serum immune response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1985 Feb;4(1):60-6.
22. Matson DO. Protective immunity against group A rotavirus infection and illness in infants. *Arch Virol Suppl*. 1996;12:129-39.
23. Burns JW, Krishnaney AA, Vo PT, Rouse RV, Anderson LJ, Greenberg HB. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology*. 1995 Feb 20;207(1):143-53.
24. Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. The role of serum antibodies in the protection against rotavirus disease: an overview. *Clin Infect Dis*. 2002 May 15;34(10):1351-61.
25. Marcelin G, Miller AD, Blutt SE, Conner ME. Immune mediators of rotavirus antigenemia clearance in mice. *J Virol*. 2011 Aug;85(15):7937-41.

26. Offit PA, Dudzik KI. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes passively protect against gastroenteritis in suckling mice. *J Virol*. 1990 Dec;64(12):6325-8.
27. Patel M, Shane AL, Parashar UD, Jiang B, Gentsch JR, Glass RI. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? *J Infect Dis*. 2009 Nov 1;200 Suppl 1(01):S39-48.
28. Velázquez FR, Matson DO, Guerrero ML, Shults J, Calva JJ, Morrow AL, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Serum antibody as a marker of protection against natural rotavirus infection and disease. *J Infect Dis*. 2000 Dec;182(6):1602-9.
29. Das S, Sahoo GC, Das P, Singh UK, Jaiswal AK, Singh P, Kumar R, Kumar R. Evaluating the Impact of Breastfeeding on Rotavirus Antigenemia and Disease Severity in Indian Children. *PLoS One*. 2016 Feb 1;11(2):e0146243.
30. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):104-7.
31. Svensson L, Sheshberadaran H, Vene S, Norrby E, Grandien M, Wadell G. Serum antibody responses to individual viral polypeptides in human rotavirus infections. *J Gen Virol*. 1987 Mar;68 (Pt 3):643-51.
32. Johansen K, Hinkula J, Espinoza F, Levi M, Zeng C, Rudén U, Vesikari T, Estes M, Svensson L. Humoral and cell-mediated immune responses in humans to the NSP4 enterotoxin of rotavirus. *J Med Virol*. 1999 Nov;59(3):369-77.