

総括研究報告書

1. 研究開発課題名: 下痢症ウイルスの分子疫学と感染制御に関する研究
2. 研究開発代表者: 国立感染症研究所 ウイルス第二部 第一室長 片山 和彦
3. 研究開発の成果

下痢症ウイルス研究総括

1. 全日本的規模の分子疫学研究成果

第一世代ノロウイルス(NoV) VLP ワクチンのシーズ開発のため、NoV の分子系統樹に基づき、GI, 9 種類、GII, 19 種類の VLP シードウイルス作製、それぞれの VLP を特異的に認識可能なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体の作製をおこなった。ワクチンシーズは、ほぼ完成した。

流行株予測法開発のベースデータとするため、全日本規模の分子疫学を展開し、下痢症ウイルスの網羅的全ゲノム塩基配列解析をおこなった。2000 年以降の時系列データの解析に成功し、我が国におけるロタウイルス(RV)の流行、NoV の流行のパターン解析、ゲノム塩基配列変化の解析を進行させた。NoV については、始祖ウイルスからの分岐年代に従って、GI が二つのリネージ、GII が三つのリネージに分別可能であり、リネージ別流行予測が重要であることを発見した。この発見は、ワクチンのブレンドを予測する上で極めて重要なファクターとなる。時系列データ解析は、新規流行株である GII.P17-GII.17 Kawasaki2014 variant の流行予測に成功し、本新規ウイルスの大流行を未然に防ぐことに成功した。

全日本的分子疫学調査によって発見された NoV 株の VLP 作出に成功し、ワクチンシーズに加えるべく、特異的なモノクローナル抗体などの作製が進行した。

流行予測システムのプロトタイプが完成した(Microbiology and Immunology, in press)。モジュール式になっており、予測ファクターをモジュールとして追加可能な柔軟性のあるシステムである。

2. 基礎研究成果を生かしたモデル動物・インビトロ評価システムの構築に関して

NoV レセプターを発見し、レセプターを細胞に発現させれば、人工的に NoV 感受性細胞を作り出すことが可能となる。ヒトに感染する NoV に感受性を示す株化培養細胞はないが、同じ NoV 属のネズミノロウイルス(MNV)には、感受性細胞 RAW 細胞がある。MNV と RAW 細胞を用いて、レセプターの検索を行った。CRISPR/Cas9 システムでゲノムワイドな機能スクリーニングを行うことで、レセプター分子をコードする遺伝子を同定した(PNAS 投稿中)。MNV の VLP 作製に成功し、マウス、MNV, MNV-VLP, MNV 中和モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、リバースジェネティクス、レセプター、感受生細胞、レセプター導入感受生細胞、レセプターノックアウトマウスなど、全ての研究ツールが揃った。マウスに MNV-VLP を様々なルート、アジュバンドを試験しつつワクチンとして接種し、中和抗体の誘導、細胞への結合、侵入阻害効果、CCID50 による力価試験、マウスを用いた力価試験などが実現可能となった。マウスのシステムは、ヒト NoV のモデルとしてワクチン開発に使用可能である。

ヒト NoV-VLP が特異的に結合する細胞 Caco2, Intestine407 のクローンを得た。この細胞に発現しているタンパク質性の分子が、特異的結合に関与している可能性を見いだした。細胞クローンをマイクロタイタープレートに播種し、モノレイヤーとした後、ホルマリン固定したプレートを用いた VLP の結合阻害実験が、ワクチン力価測定に応用可能となった。本システムは、ヒト NoV ワクチンのインビトロ評価系として利用可能である。

ヒト NoV-VLP ワクチン開発では、ヒト NoV が結合する組織血液型抗原(HBGA)への結合阻害が、ワクチン力価推定法の一つとして用いられている。HBGA のうち、VLP に結合する中心骨格 α 1-2Fucose を化学合成し、プレートに結合させて ELISA を行うことに成功した。 α 1-2Fucose を使用した ELISA は、血液型に対応した HBGA の分子骨格の差に影響されず、ほぼ全ての遺伝子型の VLP の ELISA が可能である。