

「腸管粘膜免疫誘導能向上のための最適な宿主環境の解明」

現在の所属 職位 藤田医科大学 教授

氏名 吉川哲史

要旨

早産児は重症ロタウイルス（RV）胃腸炎のハイリスク群であるが、新生児集中治療室（NICU）で管理された児における RV ワクチンに対する免疫応答や腸管マイクロバイオームのデータはない。本研究では、当院 NICU で管理された早産低出生体重児を対象に、RV1 または RV5 ワクチン接種後の免疫応答と腸管マイクロバイオームとの関連性を前向きに解析した。対象は早産児 31 例で、ワクチン接種前後に採取した便検体について 16S rRNA 遺伝子解析を実施した。また、血清抗 RV IgA 抗体価および便中ワクチン株ウイルス排泄量を定量し、ワクチン誘導免疫応答を解析した。IgA 抗体価は異なる RV 株を使用している 2 種類のワクチン間で直接比較できないため、各ワクチン接種後 RV IgA 抗体価の中央値を基に、高反応群・低反応群に分けて検討した。その結果、高反応群では初回接種後の便中ワクチン株ウイルス排泄量が高い傾向を示した。一方、腸管マイクロバイオームの α 多様性は個人差が大きく、ワクチン接種前の α 多様性が高い児では接種期間を通じて α 多様性は高い値で維持され、 α 多様性が低い児では成長に伴い α 多様性の増加率が有意に高値を示した。

背景・目的

ロタウイルス（RV）は乳幼児の感染性胃腸炎の代表的な病原体で、発展途上国を中心に年間 40 万例の小児死亡例が推定されていた¹⁾。現在までに Rotarix®（RV1）と RotaTeq®（RV5）の 2 種類の弱毒生ワクチンが開発され、世界中で導入が進んでおり、我が国においても入院例・外来受診例の明らかな削減効果が報告されている²⁾。しかしながら、導入後もいまだ発展途上国を中心に年間 20 万例の小児死亡の原因となっていることが報告されている³⁾。我が国をはじめとした先進国における RV 感染に伴う疾病負荷は、主に脱水に伴う外来、ER 受診、輸液のための入院費用で、本邦では年間 26,500~78,000 人の小児が入院加療を要すると推計されていた⁴⁾。一方、世界的な観点からは、年間 20 万人の小児死亡のうち約 80%を発展途上国の小児が占めているにもかかわらず、その発展途上国でワクチンの予防効果が先進国に比べ明らかに劣っていることが大きな問題となっている⁵⁾。ワクチンに対する免疫応答には個人差があることが知られており、特に粘膜免疫応答における局所マイクロバイオームの果たす役割は大きいと考えられ、これらの関連性解明は有効なワクチン開発を進めるうえで重要な課題である⁶⁻⁸⁾。よって、本研究では、**RV ワクチン接種により効率的に高い免疫応答を惹起するための最適な宿主環境を明らかにする**ことを目的とした。粘膜免疫は RV をはじめとした消化管感染症のみならず、パンデミックを起こし問題となった SARS-CoV-2 をはじめとした呼吸器ウイルス感染症、HIV 等の性感染症を防ぐためにも重要で、**効率的な粘膜免疫誘導環境の解明は今後の新興再興感染症対策の面でも重要な課題となる**。

方法

1. NICU 入院中の早産低出生体重児における RV ワクチン免疫応答と腸管マイクロバイオームの関連性解析

1) ワクチン接種ならびにサンプリング：2018年7月から2020年10月までの期間に、藤田医科大学病院 NICU に入院中の早産児を対象として前向き観察研究を行った。消化管疾患や消化管手術の既往がない児を対象とし、RV ワクチン (RV1 または RV5) は保護者の選択により接種された。便検体は、ワクチン接種時に腸管マイクロバイオー姆解析用として採取したほか、初回接種後 0 日から 8 日まで連日採取し、便中 RV ゲノム量の測定に用いた。血清検体は、各回のワクチン接種前および最終接種 1 か月後に採取し、免疫応答評価に供した。あわせて、診療録より患者背景情報を収集した。十分な検体が得られなかった症例、正期産児、または初回接種が生後 104 日を超過して実施された症例は解析対象から除外した。

2) RV ワクチン株便中排泄モニタリング：RV1 特異的、RV5 特異的 (5 種類の遺伝子型特異的) リアルタイム RT-PCR 法⁹⁾によるワクチン接種後便中排泄量のモニタリング。

3) 免疫応答解析：ワクチン接種前から接種後 1 ヶ月半までに経時的採取した血清中 RV IgA 抗体価を in-house の ELISA 法で測定した¹⁰⁾。

4) マイクロバイオー姆解析：出生時、ワクチン投与前、後の児の便中マイクロバイオー姆解析。腸管マイクロバイオー姆解析には 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスを用いた。DNA 抽出後、Illumina MiSeq によりシーケンスを行い、QIIME ソフトウェアを用いて菌叢構成および α 多様性 (Simpson index) を解析した。

5. 統計解析：各ワクチン内で IgA 抗体価の中央値を基準に高反応群・低反応群に分類し、免疫応答および腸管マイクロバイオー姆との関連を検討した。連続変数には Mann-Whitney U 検定、カテゴリ変数には Fisher の正確確率検定を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

2. 健康小児における RV ワクチン定期接種後の宿主免疫応答と腸管マイクロバイオー姆解析

1) ワクチン接種ならびにサンプリング：対象は、2020年7月2日から2020年12月10日の期間に、刈谷豊田総合病院小児科外来において RV ワクチン接種を受けた健康乳児とした。RV1 および RV5 の両者が定期接種として使用可能なため、使用するワクチンの選択は保護者の判断に委ねられた。血清検体は、各ワクチン接種前、最終接種 1 か月後、および 1 歳時に採取し、RV1 接種児では計 4 回、RV5 接種児では計 5 回採取した。これらの血清検体を用いて、ワクチン接種後の免疫応答を評価した。腸内マイクロバイオー姆解析のため、便検体は各ワクチン接種時および最終接種 1 か月後に採取し、RV1 接種児では計 3 回、RV5 接種児では計 4 回、さらに 1 歳時にも追加採取した。登録された全被験者について、診療録より背景情報 (性別、在胎週数、出生体重、授乳状況など) を収集した。臨床検体が十分に得られなかった症例は解析対象から除外した。

2) 免疫応答解析：ワクチン接種前から接種後 1 ヶ月半までに経時的採取した血清中 RV IgA 抗体価を in-house の ELISA 法で測定した¹⁰⁾。

4) マイクロバイオー姆解析：出生時、ワクチン投与前、後の児の便中マイクロバイオー姆解析。腸管マイクロバイオー姆解析には 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンスを用いた。DNA 抽出後、Illumina MiSeq によりシーケンスを行い、QIIME ソフトウェアを用いて菌叢構成および α 多様性 (Simpson index) を解析した。

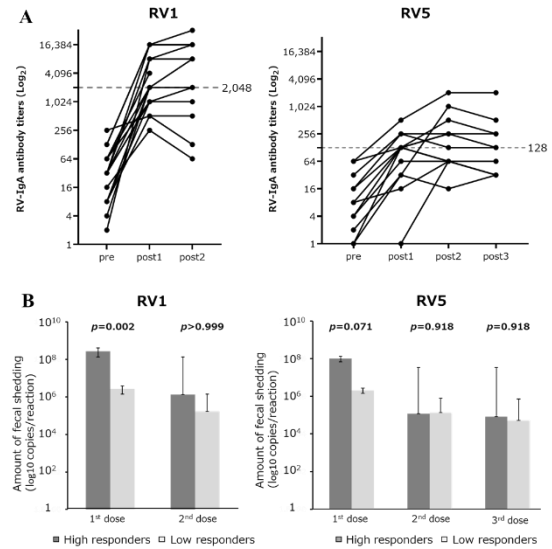
5. 統計解析：各ワクチン内で IgA 抗体価の中央値を基準に高反応群・低反応群に分類し、免疫応答および腸管マイクロバイオー姆との関連を検討した。連続変数には Mann-Whitney U 検定、カテゴリ変数には Fisher の正確確率検定を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

1. NICU 入院中の早産低出生体重児における RV ワクチン免疫応答と腸管マイクロバイオームの関連性解析

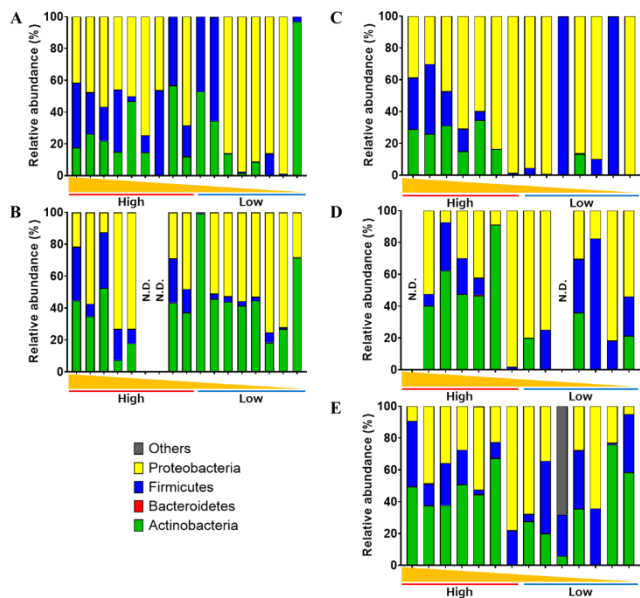
本研究の観察期間中に、RV1 接種児 26 例、RV5 接種児 22 例が登録されたが、同意未取得例や定期接種スケジュールから逸脱した症例、正期産児を除外し、最終的に RV1 接種児 17 例、RV5 接種児 14 例の計 31 例を解析対象とした。ワクチン誘導免疫応答については、ELISA 法により測定した血清抗ロタウイルス IgA 抗体価が RV1 と RV5 で直接比較できないため、各ワクチン内で接種後最高抗体価の中央値を基準に高反応群・低反応群に分類した。その結果、RV1 接種児では高反応群で初回接種後の便中ワクチン株ウイルス排泄量が低反応群に比して有意に高く ($P=0.002$)、RV5 接種児でも同様の傾向が認められた ($P=0.071$) (Fig. 1 A and B)。腸管マイクロバイオーーム解析では、接種前後で個人差が大きく、初回接種前に α 多様性の高い児では *Proteobacteria*、*Firmicutes*、*Actinobacteria* が混在する菌叢が認められた一方、 α 多様性の低い児では *Proteobacteria* が優占する傾向がみられた。接種の進行とともに、特に初期に α 多様性の低かった児で *Actinobacteria* の割合が増加し、全体として多様性が高まる傾向が観察された (Fig. 2)。属レベル解析においても、 α 多様性の高い群では複数の属が優位に検出され、菌叢構成の多様性が示された (data not shown)。初回接種前の Simpson index 中央値により高多様性群 (16 例) と低多様性群 (15 例) に分類して検討したところ、在胎週数、出生体重、栄養法、初回接種時期、ワクチン種別などの背景因子に有意差は認められなかった。縦断解析では、高 α 多様性群は最終接種前および最終接種 1 か月後においても有意に高い α 多様性を維持していた。一方、低 α 多様性群では時間経過に伴う α 多様性の増加量が有意に大きく、腸管マイクロバイオーームの成熟がより顕著であることが示された (Table 1)。しかし、初回接種前の α 多様性とワクチン免疫応答 (高反応群の割合) との間

Figure 1



RV ワクチン接種後の RV IgA 抗体価の推移 (A) とワクチン接種後の便中ワクチン株ウイルスゲノム量の高反応群と低反応群間での比較 (B)

Figure 2



RV1 および RV5 接種前後における腸管マイクロバイオーーム (門レベル) の変化。RV1 接種児では、初回接種前 (A) および 2 回目接種前 (B) の菌叢構成を示す。RV5 接種児では、初回接種前 (C)、2 回目接種前 (D)、3 回目接種前 (E) の菌叢構成を示す。いずれの図も、左側から初回接種前の腸管マイクロバイオーーム α 多様性 (Simpson index) が高い被験者順に並べ、各被験者における主要細菌門の相対存在割合を示している。

に有意な関連は認められなかった。RV1 および RV5 別解析においても同様に、 α 多様性と IgA 抗体応答との明確な関連性は示されなかった (data not shown)。以上より、NICU で長期間管理された早産児では、腸管マイクロバイオームは発育に伴い動的に変化し、特に初期多様性の低い児で成熟が顕著であることが明らかとなったが、 α 多様性単独では RV ワクチン免疫応答を予測する指標とはならないことが示唆された。

Table 1. α diversity of participants

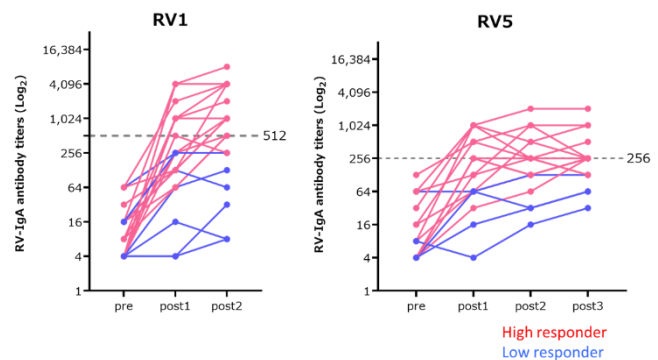
median [interquartile range]	High n = 16	Low n = 15	P value
Simpson Index before 1 st vaccination	0.69 [0.62, 0.74]	0.39 [0.28, 0.48]	<0.001
Simpson Index before last vaccination (n=29)	0.71 [0.67, 0.76]	0.60 [0.55, 0.66]	0.016
Simpson Index 1 month after last vaccination (n=27)	0.75 [0.69, 0.79]	0.66 [0.58, 0.70]	0.015
Δ Simpson Index between before 1 st and last vaccination (n=29)	0.05 [-0.04, 0.09]	0.22 [0.19, 0.35]	0.001
Δ Simpson Index between before 1 st and after last vaccination (n=27)	0.06 [-0.02, 0.13]	0.28 [0.15, 0.40]	0.002

Analyzed by Mann Whitney-U test

2. 健康小児における RV ワクチン定期接種後の宿主免疫応答と腸管マイクロバイオーム解析 (解析途中)

観察期間中に、RV1 を 21 名、RV5 を 17 名の乳児に接種した。腸内マイクロバイオーム解析に関しては、1 歳時の便検体が得られなかった症例を除外し、最終的に RV1 接種児 18 名、RV5 接種児 14 名を解析対象とした。本研究では、Wa 株を抗原とした ELISA 法により測定した血清抗 RV IgA 抗体価は、各ワクチン群内における接種後抗体価の最高値の中央値を基準として、高反応群および低反応群に分類した。中央値は RV1 接種児で 512、RV5 接種児で 256 であり、これ以上の抗体価を示した症例を高反応群と定義した。そ

Figure 3



RV ワクチン接種後の RV IgA 抗体価の推移。RV1 接種後 (A) と RV5 接種後 (B) の比較。赤線が高反応群で青線が低反応群。

の結果、RV1 接種児では 11 名、RV5 接種児では 9 名が高反応群に分類された (Fig. 3)。RV1 接種児における腸内細菌叢組成の縦断解析では、ワクチン接種前から接種期間初期 (pre~post 2) にかけて、*Proteobacteria* が優勢であり、特に *Acinetobacteria* が高い割合を占めていた。これらの傾向は高反応群および低反応群のいずれにおいても共通しており、接種期間中に *Acinetobacteria* の相対存在量が徐々に増加する傾向が認められた。一方、1 歳時 (post 3) には、すべての被験者において *Firmicutes* の相対存在量が明らかに増加しており、免疫応答の良否による腸内細菌叢組成の顕著な差異は認められなかった (Fig. 4A)。同様の年齢依存的な腸内細菌叢の推移は、RV5 接種児においても確認された (Fig. 4B)。 α 多様性については、Shannon index を代表指標として解析した結果、いずれの採取時点においても高反応群と低反応群の間に有意な差は認められず (data not shown)、また RV1 接種児と RV5 接種児の

間にも有意差は認められなかった。一方、1歳時にはすべての被験者において α 多様性の増加が一貫して認められた。Simpson index および Fisher index を用いた解析においても同様の結果が得られた。

Figure 4 A

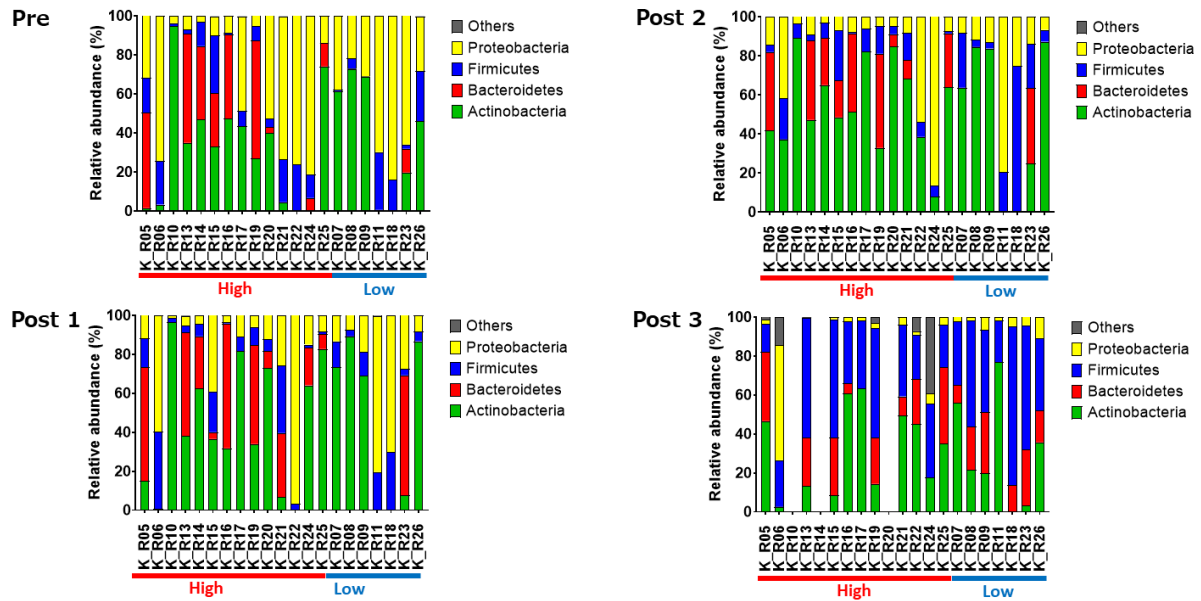
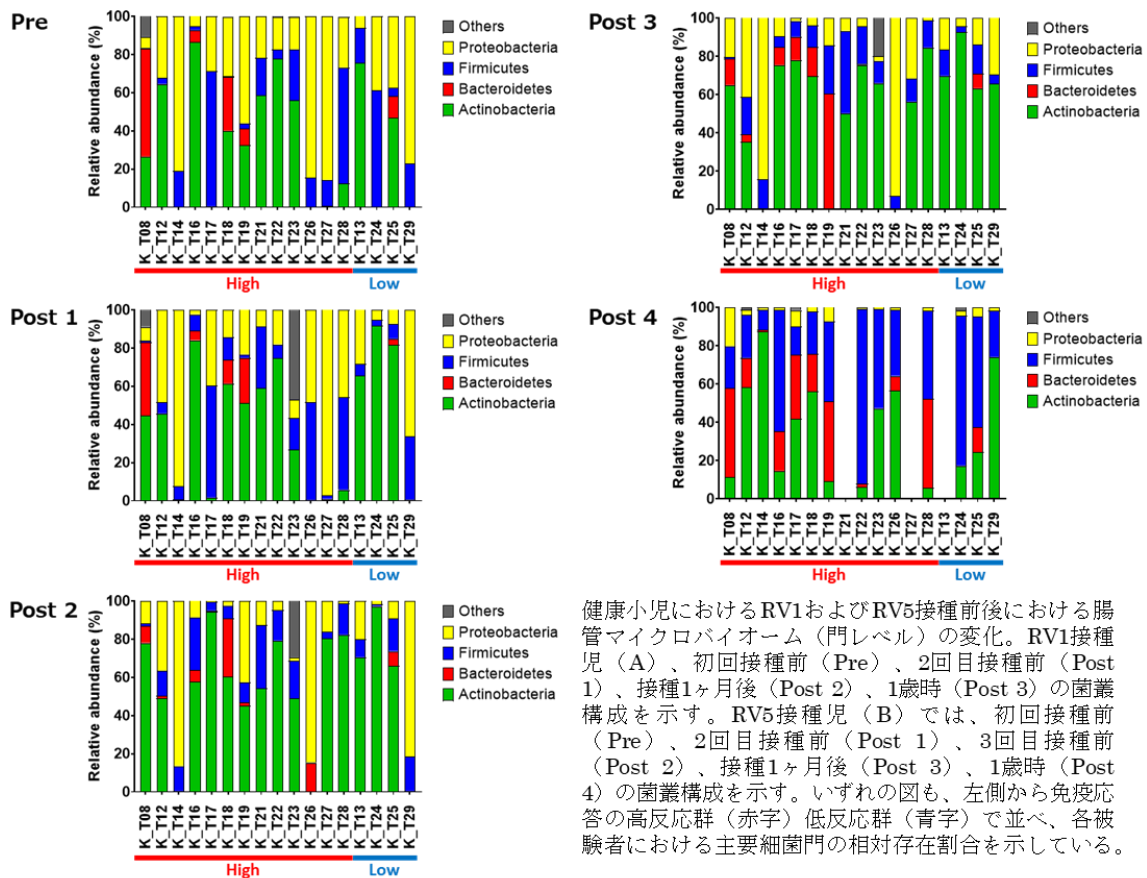


Figure 4 B



健康小児におけるRV1およびRV5接種前後における腸管マイクロバイオーム（門レベル）の変化。RV1接種児（A）、初回接種前（Pre）、2回目接種前（Post 1）、接種1ヶ月後（Post 2）、1歳時（Post 3）の菌叢構成を示す。RV5接種児（B）では、初回接種前（Pre）、2回目接種前（Post 1）、3回目接種前（Post 2）、接種1ヶ月後（Post 3）、1歳時（Post 4）の菌叢構成を示す。いずれの図も、左側から免疫応答の高反応群（赤字）低反応群（青字）で並べ、各被験者における主要細菌門の相対存在割合を示している。

考察

本研究は、先進国である日本の NICU において長期間管理を要した早産児を対象に、RV ワクチン接種後の免疫応答と腸管マイクロバイオームの動態を縦断的に解析した点に大きな特徴がある。特に、RV1 接種児において初回接種後の便中ワクチン株ウイルス排泄量が高反応群で有意に高かったことは、生ワクチンが腸管内で十分に複製されることが有効な免疫応答誘導に重要であるという既存の概念を¹¹⁾、NICU 管理下の早産児集団においても支持する知見である。一方、RV5 接種児では同様の傾向が認められたものの統計学的有意差には至らず、抗原株の違いによる ELISA 測定系の制限が影響した可能性が示唆された。

本研究のもう一つの重要な新規性は、ワクチン接種前の腸管マイクロバイオーム α 多様性と免疫応答との関連を詳細に検討した点にある。NICU 入院中の早産児という均質性の高い集団において、初回接種前の α 多様性はワクチン誘導 IgA 抗体応答と有意な関連を示さなかった。この結果は、発展途上国の乳児を対象とした研究で報告されている「接種前マイクロバイオームと免疫原性の関連」⁶⁾とは対照的であり、先進国 NICU 環境下では抗菌薬使用、無菌的管理、比較的標準化された母乳中心の栄養環境などにより、マイクロバイオーム多様性のばらつきが相対的に圧縮されている可能性を示唆する。

さらに注目すべき点として、本研究では初回接種前の α 多様性が低い群において、接種期間を通じて α 多様性の増加率が有意に高かった。これは、新生児期から乳児期にかけての腸管マイクロバイオーム成熟過程が、初期状態に依存して異なる速度で進行する可能性を示すものであり、これまで主に定性的に示唆されてきたマイクロバイオームの成熟¹²⁾¹³⁾を定量的に捉えた点で新規性がある。すなわち、初期に多様性の低い早産児においても、時間経過とともに顕著な成熟が進行することが示された。RV ワクチン接種時期が、早産低出生体重児における腸管マイクロバイオーム構成のダイナミックな変化（成熟）時期に一致していたため、本研究ではその過程を詳細に観察することが可能となった。

一方で、本研究では母体由来抗体、ヒト血液型抗原表現型、腸管 virome といった、経口ワクチン免疫原性に影響する可能性が示唆されている他の要因¹⁴⁾を十分に評価できておらず、症例数が限られた単施設研究である点は制限として挙げられる。しかしながら、前記のように NICU 管理下の早産児における縦断的腸管マイクロバイオーム解析データは乏しく、本研究はその未知の情報を埋める基礎的データとなると考えられる。現在進行中のショットガンメタゲノム解析により、菌種・菌株レベルの解析に加え、代謝機能や腸管 virome を含めた包括的理解が進むことで、今回観察されたマイクロバイオーム成熟と免疫応答の関係性を、より機能的な観点から解明できることが期待される。

また、先進国健康小児の RV ワクチン接種後免疫応答と腸管マイクロバイオームの関連性解析については、つい最近 RV5 接種後の免疫応答と腸管マイクロバイオームとの関連性に関して肯定的な報告がなされた¹⁵⁾。今回の我々の研究では、我が国では 2 種類のワクチンを保護者が選択可能という優位性を生かし、RV1 と RV5 接種者における免疫応答と腸管マイクロバイオームの関連性を 2 群間で比較することができた。残念ながらいずれのワクチン接種者においても免疫応答と腸管マイクロバイオームの間に明確な関連性を見出すことはできなかったが、先の NICU 管理を受けた早産低出生体重児に比して健康小児においては生後 2 か月から 6 ヶ月にかけてそれほどダイナミックなマイクロバイオームの変化が見られないことが明らかとなった。さらに、1 歳時には接種ワクチンの種類に関わらず、多くの児において腸管マイクロバイオームの多様性が大幅に増しており、成熟が進んでいることも確認できた。本研究成果も、これまで明らかにならなかった RV ワクチン接種が健康小児腸管マイクロバイオームに及ぼす効果を解明できた点で有意義な成績と考えられる。本研究で得られたサンプルについても、今後ショットガンメタゲノム解析を実施することでより詳細な解析が進むことが期待される。

共同研究者

河村吉紀・藤田医科大学医学部、小児科学・准教授
小澤 慶・藤田医科大学医学部、小児科学・助教
三浦浩樹・藤田医科大学医学部、小児科学・講師
井平 勝・藤田医科大学医療科学部、医療検査学科、診断支援機器科学・教授
東本祐紀・藤田医科大学医療科学部、細胞機能解析学分野・講師
平松裕之・藤田医科大学病院、治験・臨床研究支援センター・課長
國澤 純・国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・センター長
細見晃司・大阪公立大学 獣医感染症学教室 准教授
堀田将志・国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 ヘルス・メディカル微生物研究センター ワクチンマテリアルプロジェクト 研究員

引用論文

- 1) Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD; WHO-coordinated Global Rotavirus Surveillance Network. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000–2013. *N Engl J Med.* 2016;374(8):757–768. doi:10.1056/NEJMoa1510800.
- 2) Yoshikawa T, Kamiya H, Okada K, et al. Impact of rotavirus vaccine introduction on rotavirus gastroenteritis in Japan. *Vaccine.* 2017;35(4):595–602. doi:10.1016/j.vaccine.2016.12.003.
- 3) Troeger C, Khalil IA, Rao PC, et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhoea among children younger than 5 years, 2016: a systematic analysis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):292–302. doi:10.1016/S1473-3099(17)30452-X.
- 4) Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, et al. Estimating the burden of rotavirus gastroenteritis in Japan. *Vaccine.* 2011;29(47):819–825. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.077.
- 5) Armah GE, Sow SO, Breiman RF, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in sub-Saharan Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* 2010;362(4):289–298. doi:10.1056/NEJMoa0907721.
- 6) Harris VC, Armah G, Fuentes S, et al. Significant correlation between the infant gut microbiome and rotavirus vaccine response in rural Ghana. *J Infect Dis.* 2017;215(1):34–41. doi:10.1093/infdis/jiw518.
- 7) Parker EPK, Praharaj I, Zekavati A, et al. Influence of the intestinal microbiota on the immunogenicity of oral rotavirus vaccine in low-income countries. *Nat Commun.* 2021;12(1):1397. doi:10.1038/s41467-021-21583-3.
- 8) Zimmermann P, Curtis N. The influence of the intestinal microbiome on vaccine responses. *Vaccine.* 2018;36(30):4433–4439. doi:10.1016/j.vaccine.2018.04.066
- 9) Hiramatsu H, Suzuki R, Nagatani A, et al. Rotavirus Vaccination Can Be Performed Without Viral Dissemination in the Neonatal Intensive Care Unit. *J Infect Dis* 2018; 217:589-96.
- 10) 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; 19:447-52.

- 11) Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, et al. Breastfeeding, neutralizing antibodies, and efficacy of live oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1022–1028.
- 12) Yatsunenkeno T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 2012;486(7402):222–227.
- 13) Stewart CJ, Ajami NJ, O'Brien JL, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood. *Nature*. 2018;562(7728):583–588.
- 14) Parker EPK, Ramani S, Lopman BA, et al. Causes of impaired oral vaccine efficacy in low-income countries. *Natur Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(9):525–536. doi:10.1038/s41575-018-0033-3
- 15) Miranda JN, Sohn M, Velasquez-Portocarrero D, et al. Early-life gut microbiome is associated with immune response to the oral rotavirus vaccine in healthy infants in the US. doi: <https://doi.org/10.1101/2025.09.22.25336338>

助成研究に関連した発表論文

Association of Rotavirus Infection With Biliary Atresia: A Retrospective Comparative Analysis of Virus-Specific Antibodies. Kawamura Y, Ihira M, Miura H, Higashimoto Y, Matsuo A, Ito N, Kawada J, Yoshikawa T. *J Med Virol* (in press)