專　欄

DOI: 10.6526/ICJ.201808_28(4).0004

發展疫苗以防治諾羅病毒感染
Development of vaccines against norovirus infections

周彥宏

國家衛生研究院　感染症與疫苗研究所

前　言

在小孩病毒性腸道感染是引起主要的致病率及致死率。其中人類諾羅病毒 (human norovirus, HuNoV) 是腸道主要的致病原。尤其是發展中國家或地區每年約有 200,000 年齡小于 5 歲孩童死於諾羅病毒感染。諾羅病毒對所有的年齡層皆有可能感染，為一傳染力極強之病毒好發于溫度濕冷季節。感染引起之症狀主要為噁心、嘔吐、腹瀉及腹絞痛，也可能合併發燒、寒顫、倦怠、頭痛及肌肉酸痛。大部分感染諾羅病毒的人可以完全恢復，但對幼童與老人造成的嘔吐或腹瀉可能導致脫水，進而抽搐甚至死亡。近年來已有許多國家報導大流行，因此亟待發展出有效的疫苗來預防諾羅病毒感染。

諾羅病毒流行病研究

全世界的急性腸胃炎患者在 2006 到 2011 年間大約有 38.8 億人[1]。其中在美國有 1.8~3.55 億人就醫[1]，並導致每年 20 億美元的經濟負擔[2]。根據美國疾病防治中心統計 48 個國家涵蓋 25 年的研究指出其中 18% 的急性腸胃炎患者是由人類諾羅病毒引起，分別 14~19% 在發展中國家及 20% 在已發展國家急性腸胃炎患者是由人類諾羅病毒引起。

諾羅病毒

諾羅病毒首先在 1968 年美國俄亥俄州的諾瓦克 (Norwalk) 腸胃炎患者的糞便裡檢出病毒，被稱為諾沃克病毒 (Norwalk virus)。1972 年，通過電子顯微鏡觀察發現其形態呈小

型、圓狀，被認為是小圓結構病毒 (small round structured virus, SRSV) 的一種。與從非細菌性急性胃腸炎患者身上接連發現與諾沃克病毒相似的小圓狀結構病毒，被稱為「類諾沃克病毒」(Norwalk-like viruses) 或小圓結構病毒。另外在日本還發現了札幌病毒 (Sapporo virus)。

這種引起非細菌性急性胃腸炎的小圓結構病毒有兩種，即類諾沃克病毒和類札幌病毒 (Sapporo-like viruses)。2002 年 8 月，在巴黎召開的第 12 屆國際病毒學會議 (international congress of virology) 上，這兩種病毒按發現地點分別被正式命名為「諾羅病毒」(Norovirus) 和「札幌病毒」(Sapovirus)。

諾羅病毒是個無封套的正向單股 RNA 病毒，二十面體顆粒，屬於 Caliciviradae 病毒家族屬。目前有五個基因型 (GI-GV) 可以感染人類，豬，牛，羊，貓，狗或嚙齒類等。人類感染案例 10% and 90% 分別由 GI and GII 基因型引起。在 GII 基因型分別區分為 22 種亞基因型，其中 70% 人類大規模感染案例是由 GII.4 亞基因型感染引起。人類諾羅病毒的遺傳物質為在5’端帶有 VPg 蛋白質及在 3’端有 polyadenylated 尾端的 7.5~8.0 kilo base RNA，擁有 3 個蛋白質轉譯區 (open reading frames, ORFs) [3]。相對於鼠諾羅病毒 (murine norovirus, MuNoV) 則有 4 個蛋白質轉譯區[4]。ORF1 表達多重非結構型蛋白質，ORF2 及 ORF3 則是表達結構型蛋白質包括 VP1 及 VP2 [3]，在鼠諾羅病毒的 ORF4 是表達內生性免疫調節蛋白質 VF1 [4]。多重非結構型蛋白質可以再被蛋白酵素切割成六個蛋白質片段，分別為 p48 (NS1/2), helicase (NS3-NTPase), p22 (NS4), VPg (NS5), protease (NS6pro) and RNA-dependent RNA polymerase (NS7pol) [5]。這些蛋白質參與諾羅病毒的複製。結構型蛋白質 VP1 由殼蛋白質 (shell, S) 及突觸蛋白質 (protruding, P) 橋接組成[6]。P 蛋白質會再區隔為 P1 及 P2 片段[7]。VP2 蛋白質藉由與 VP1 的殼蛋白質 (S) 作用，會幫助病毒顆粒結構的穩定[8]。

諾羅病毒感染途徑

諾羅病毒主要感染途徑為 1. 食入被諾羅病毒污染的食物或飲水。2. 接觸被諾羅病毒污染的物體表面，再碰觸自己的嘴、鼻或眼睛黏膜傳染。3. 諾羅病毒只需極少的病毒量便可傳播，因此與病人密切接觸或吸入病人嘔吐物及排泄物所產生的飛沫也可能受感染。諾羅病毒的潛伏期為 24 至 48 小時，由於諾羅病毒的傳染力非常強，有些人感染恢復後二星期內，其糞便內尚有病毒，仍然具有感染力。諾羅病毒因基因變異大而產生多種型別病毒株，單一次的感染並無法對其他型別之諾羅病毒產生完全的保護力，未來仍有遭受感染的可能。目

前並沒有治療諾羅病毒感染的藥物，治療原則是適度補充水分與電解質，以防止脫水和電解質的流失。

研究上的困境

許多研究嘗試發展人類諾羅病毒培養模式在黏膜性上皮細胞[9]，同時，也用人的血液衍生巨大吞噬細胞及突觸細胞培養人類諾羅病毒但是結果皆失敗[10]，反而鼠諾羅病毒可以成功培養在鼠巨大吞噬細胞株(RAW264.7) 及突觸細胞[11]及 B 細胞株這些細胞[12]。當人類諾羅病毒培養在 3D 培養方式的分化型 Caco-2 細胞或其衍生的 CBBe2 細胞，利用 qRT-PCR 偵測方法，病毒的 RNA 量會複製並增加 100~1,000 倍[13]。另外，人類諾羅病毒培養在人 B 細胞或小腸 enteroids 細胞，病毒的 RNA 量會複製並增加 100~1,000 倍[12]。然而產出完整的人類諾羅病毒顆粒及數量仍不足以在實驗室試驗，因此對於人類諾羅病毒感染在動物試驗中研究其免疫或病理反應了解有限。

諾羅病毒引起的免疫反應

抗體及 B 細胞在諾羅病毒感染扮演很重要角色，同時 B 細胞參與在諾羅病毒的複製。實驗小鼠研究顯示血清內抗體對 HBGA (histo-blood group antigens) 蛋白質抑制能力與保護諾羅病毒感染具有相關性[14]，同時諾羅病毒特異性的唾液 IgA 抗體及可以釋出 IgG 的 B 細胞也顯示與保護諾羅病毒感染有相關性，而具備記憶的 B 細胞可以在諾羅病毒感染後只能維持 180 天[15]。這些抗體主要是辨識在 VP1 P2 區段，可以抑制病毒感染。另外，糞便的 IgA 量也跟抑制病毒量有關[15]。在人的研究較少但也證實有同樣現象[16]。最近研究發現人類或鼠諾羅病毒皆可以直接感染細胞培養的 B 細胞[12] 顯示諾羅病毒導致較弱的抗體反應及存在時間較短的 B 細胞，因此關於諾羅病毒感染 B 細胞的後續研究對於了解其保護性機轉是很重要的。

對於人類諾羅病毒感染在人或實驗動物引起的細胞性免疫反應的研究較少。已知鼠諾羅病毒感染在巨大吞噬細胞會引起 Th1 細胞激素的表達[17]。鼠諾羅病毒 CW3 型或 CR6 型在 C57BL/6 小鼠分別引起急性及持續性的感染，導致 T 細胞的差異反應；如活化的 CD8+T 細胞數量在 CR6 型感染小鼠比在 CW3 型感染小鼠少[18]，CD8+T 細胞可以降低病毒量[18]。同時在小鼠研究顯示 CD4+T 細胞可保護鼠諾羅病毒感染[19]。另外人類諾羅病毒感染天竺鼠的迴腸，會增加 CD8+IFN-γ+ T 細胞和免疫調節性 T 細胞 (regulatory T cells, Tregs) 數量[20]。由於免疫調節性 T 細胞會抑制 T 細胞反應使得T 細胞的活化無法發展成具有記憶性而呈現短效性反應，因此人在感染到諾羅病毒

42 個月後仍可以再被感染[21]。顯示人類諾羅病毒會引起 Th1 免疫反應，並具有短效對抗後來同型諾羅病毒的感染。然而 T 細胞可保護諾羅病毒感染的機制仍然不清楚。

諾羅病毒疫苗發展

最早開始發展人類諾羅病毒疫苗是在 1972 年發現 Norwalk 病毒。由於目前尚無法於生體外系統直接培養諾羅病毒，因此無法開發去活化形式的疫苗。目前以重組鞘膜蛋白包括類病毒顆粒 (viral-like particles, VLPs) 及 P 顆粒為疫苗 (表一) [22]。

利用桿狀病毒 (baculovirus)，酵母菌及植物表達的類病毒顆粒具有非複製性及類似自然界人類諾羅病毒的結合性[23]。在天竺鼠研究中表達 GII.4 型的類病毒顆粒可以部分抑制不同基因型的諾羅病毒感染引起的腹瀉。研究顯示人類諾羅病毒的類病毒顆粒可以引起基因型專一性免疫反應及針對其他變異型諾羅病毒產生部分保護力[20]。另外利用病毒載體來生產諾羅病毒的類病毒顆粒例如水泡性口膜炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) [24]，禽副黏液病毒科新城病毒 (paramyxoviruses, Newcastle disease virus, NDV) [25]，腺病毒 (adenovirus) [26] 及委內瑞拉馬腦炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV) [27]等。與其他系統表達類病毒顆粒比較，病毒載體疫苗可以產生相當的類病毒顆粒，因此需要施打一劑就可以產生不錯的免疫，然而疫苗安全性及自體存在對抗病毒載體的免疫反應皆會影響病毒載體疫苗的使用及效力。VSV 病毒表達 HSP70 及 VP1 (VSV-HSP70-VP1) 為疫苗，施打在小鼠發現有嚴重體重降低[24]。重組性 NDV LSaSota 病毒表達 VP1 (NDV-VP1) 在免疫小鼠研究顯示引起專一性抗體 IgG 及脾臟

表一　目前發展的諾羅病毒疫苗

Type	VP1 domain	HBGA binding pattern	Expression system	Size (nm)	As foreign antigen carrier	Animal studies	Clinical trials
VLPs	S and P	Same as native virion	Eukaryotic: baculovirus, yeast, potato, tobacco, tomato	27~38 nm	Yes: rotavirus	Mice, rabbits, chimpanzees, Gn pigs	Yes: several formulations
Vector VLPs	S and P	Not determined	Viral: Vesicular stomatitis virus, Newcastle disease virus, adenovirus, Venezuelan equine encephalitis virus	27~38 nm	Not determined	Mice	No
P particles	P	Same as native virion	Prokaryotic: *E. coli*, Eukaryotic: yeast	~20 nm	Yes: rotavirus, influenza, hepatitis E virus	Mice, Gn pigs	No

IFN-γ, IL-2 和 TNF-α 分泌[25]。

表達諾羅病毒的 VP1 的 P 蛋白質形成的顆粒為另一種疫苗發展，P 顆粒包含最外層可與接受體 HBGA 結合的 P2 及內層的 P1 [28]。P 顆粒構型與自然的諾羅病顆粒及類病毒顆粒相似[29]，天竺鼠研究指出 P 顆粒的免疫抗原性相似於類病毒顆粒[30]。在天竺鼠以 GII.4/2006b 感染的研究，當鼻腔注射 3 次每次劑量 100 μg 的 GII.4/VA387-derived P particle 疫苗可提供 47% 的保護力在預防下痢[20]。每次劑量提高至 250 μg 可提供 60% 的保護力在預防下痢及抑制病毒量。注射 3 次每次劑量 100 μg 的 P 顆粒疫苗具有引起 CD4+T，CD8+IFN-γ+T 及調節 T 細胞活化等[30]，顯示 P 顆粒具有引起長效性免疫反應。

結　語

防治人類諾羅病毒的感染至今進展緩慢。由於目前培養諾羅病毒的細胞培養尚未完善，因此無法開發去活化形式的疫苗。最近的研究是以表達類病毒顆粒及 P 顆粒為疫苗抗原，其中類病毒顆粒有些研究已在臨床試驗去證實安全性及有效性，相對於 P 顆粒疫苗進展在臨床前小鼠試驗，證明可以引起諾羅病毒顆粒抗原的特異性抗體及細胞性免疫反應。最後，由於不同基因型的諾羅病毒 VP1 抗原差異性大，類病毒顆粒及 P 顆粒疫苗產生的抗體及細胞免疫反應對於不同基因型的諾羅病毒保護效力不足 (低於 50%)。因此多價型的諾羅病毒疫苗仍是未來研發諾羅病毒疫苗的主要方向。

參考文獻

1. Karve S, Krishnarajah G, Korsnes JS, et al: Burden of acute gastroenteritis, norovirus and rotavirus in a managed care population. Human Vaccines & Immunotherapeutics 2014;10:1544-56.
2. Hoffmann S, Batz MB, Morris JG, Jr: Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. J Food Protect 2012;75:1292-302.
3. Jiang X, Wang M, Wang K, et al: Sequence and genomic organization of Norwalk virus. Virology 1993;195:51-61.
4. McFadden N, Bailey D, Carrara G, et al: Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. PLoS pathog 2011;7:e1002413.
5. Belliot G, Sosnovtsev SV, Mitra T, et al: In vitro proteolytic processing of the MD145 norovirus ORF1 nonstructural polyprotein yields stable precursors and products similar to those detected in calicivirus-infected cells. J Virol 2003;77:10957-74.
6. Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, et al: Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. J Virol 1994;68:5117-25.
7. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, et al: X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science 1999;286:287-90.
8. Vongpunsawad S, Venkataram Prasad BV, Estes MK: Norwalk virus minor capsid protein VP2 associates within the VP1 shell domain. J Virol 2013;87:4818-25.
9. Papafragkou E, Hewitt J, Park GW, et al: Challenges of culturing human norovirus in three-dimensional organoid intestinal cell culture

models. PloS one 2014;8:e63485.

10. Lay MK, Atmar RL, Guix S, et al: Norwalk virus does not replicate in human macrophages or dendritic cells derived from the peripheral blood of susceptible humans. Virology 2010;406:1-11.
11. Wobus CE, Karst SM, Thackray LB, et al: Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. PLoS biol 2004;2:e432.
12. Jones MK, Watanabe M, Zhu S, et al: Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. Science 2014;346:755-9.
13. Straub TM, Bartholomew RA, Valdez CO, et al: Human norovirus infection of caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure. J water health 2011;9:225-40.
14. Czako R, Atmar RL, Opekun AR, et al: Serum hemagglutination inhibition activity correlates with protection from gastroenteritis in persons infected with Norwalk virus. Clin vaccine immunol: CVI 2012;19:284-7.
15. Ramani S, Neill FH, Opekun AR, et al: Mucosal and Cellular Immune Responses to Norwalk Virus. J Infect Dis 2015;212:397-405.
16. Lindesmith LC, Donaldson E, Leon J, et al: Heterotypic humoral and cellular immune responses following Norwalk virus infection. J Virol 2010;84:1800-15.
17. Waugh E, Chen A, Baird MA, et al: Characterization of the chemokine response of RAW264.7 cells to infection by murine norovirus. Virus Res 2014;181:27-34.
18. Tomov VT, Osborne LC, Dolfi DV, et al: Persistent enteric murine norovirus infection is associated with functionally suboptimal virus-specific CD8 T cell responses. J Virol 2013;87:7015-31.
19. Zhu S, Regev D, Watanabe M, et al: Identification of immune and viral correlates of norovirus protective immunity through comparative study of intra-cluster norovirus strains. PLoS path2013;9:e1003592.
20. Kocher J, Bui T, Giri-Rachman E, et al: Intranasal P particle vaccine provided partial cross-variant protection against human GII.4 norovirus diarrhea in gnotobiotic pigs. J Virol 2014;88:9728-43.
21. Parrino TA, Schreiber DS, Trier JS, et al: Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. New Engl J Med 1977;297:86-9.
22. Atmar RL, Estes MK. Norovirus vaccine development: next steps. Expert Rev Vaccines 2012;11:1023-5.
23. Cheetham S, Souza M, McGregor R, et al: Binding patterns of human norovirus-like particles to buccal and intestinal tissues of gnotobiotic pigs in relation to A/H histo-blood group antigen expression. J Virol 2007;81:3535-44.
24. Ma Y, Duan Y, Wei Y, et al: Heat shock protein 70 enhances mucosal immunity against human norovirus when coexpressed from a vesicular stomatitis virus vector. J Virol 2014;88:5122-37.
25. Kim SH, Chen S, Jiang X, et al: Newcastle disease virus vector producing human norovirus-like particles induces serum, cellular, and mucosal immune responses in mice. J Virol 2014;88:9718-27.
26. Guo L, Wang J, Zhou H, et al: Intranasal administration of a recombinant adenovirus expressing the norovirus capsid protein stimulates specific humoral, mucosal, and cellular immune responses in mice. Vaccine 2008;26:460-8.
27. Harrington PR, Yount B, Johnston RE, et al: Systemic, mucosal, and heterotypic immune induction in mice inoculated with Venezuelan equine encephalitis replicons expressing Norwalk virus-like particles. J Virol 2002;76:730-42.
28. Tan M, Huang P, Meller J, et al: Mutations within the P2 domain of norovirus capsid affect binding to human histo-blood group antigens: evidence for a binding pocket. J Virol 2003;77:12562-71.
29. Tan M, Jiang X. The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. J Virol 2005;79:14017-30.
30. Fang H, Tan M, Xia M, et al: Norovirus P particle efficiently elicits innate, humoral and cellular immunity. PloS One 2013;8:e63269.