



Title	Protective Immunity Induced in Squirrel Monkeys with Recombinant Serine Repeat Antigen (SERA) of <i>Plasmodium falciparum</i>
Author(s)	鈴江, 一友
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40703
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	鈴江一友
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13712号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Protective Immunity Induced in Squirrel Monkeys with Recombinant Serine Repeat Antigen (SERA) of <i>Plasmodium falciparum</i> (熱帯熱マラリア原虫のレコンビナント SERA 蛋白質によるリスザルでの防御免疫の誘導)
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司
	(副査) 教授 上田 重晴 教授 木下タロウ

論文内容の要旨

【目的】

マラリアは年間感染者数が約2億7千万人、年間死者数が約2百万人(WHO統計)と、第三世界を中心に世界で最も人類に甚大な被害を与えていた感染症の一つである。1960年代以降、多くの研究者がマラリアワクチンの開発を手がけてきたが、現在でもなお成功には至っていない。SERA蛋白質(126kd)は、*in vitro*での熱帯熱マラリア原虫の増殖を抑制するモノクローナル抗体に反応する抗原である。本研究では大腸菌の大量発現系を用いて調製したレコンビナント SERA 蛋白質によるワクチンの開発を目指した。

【方法ならびに成績】

一般に熱帯熱マラリア原虫の遺伝子は極端にAT含量が高く、GC含量が高い大腸菌では原虫遺伝子の発現効率は非常に悪い。そこで本研究では、まず大腸菌のコドン使用頻度に適合した SERA 蛋白質の N 末端側 47kd 断片(SE47') の人工合成遺伝子を構築し、大腸菌の大量発現系での SE47' の調製を試みた。次に得られた SE47' を用いてラットで抗血清を調製し、その *in vitro* での熱帯熱マラリア原虫の増殖に与える影響を検討した。さらに熱帯熱マラリア感染モデルであるリスザルを用い、SE47' のワクチンとしての効果を検討した。

1) SE47' の人工合成遺伝子の構築とその大量発現

大腸菌のコドン使用頻度に適合するように、SE47' をコードする人工合成遺伝子全長を設計した。次に約120塩基の (+) 鎖 (-) 鎖 DNA 合計25本を DNA 合成機を用いて合成し、約20塩基の部位でアニールさせた後、DNA ポリメラーゼで完全な2重鎖にしてクローニングベクターに組み込み、1098塩基対からなる SE47' 遺伝子を再構築した。これを T7 プロモーターを用いた大腸菌の発現系に導入することで SE47' の大量発現に成功した。

2) 抗 SE47' ラット抗血清による *in vitro* 原虫増殖に与える影響

得られた SE47' を精製した後、種々の条件下でラットを免疫して抗血清を調製した。得られた抗血清を熱帯熱マラリア原虫の *in vitro* 培養系に加えて培養し、抗血清の原虫の増殖に与える影響を評価したところ、SE47' 抗血清群で対照血清群より原虫感染率が低く抑えられ、原虫の増殖を阻害する事が明らかとなった。

3) リスザルでの SE47' を用いたワクチン試験

種々の条件で10頭のリスザル(R11~20)を免疫し、十分に抗体価が上昇したことを確認した後、熱帯熱マラリア

原虫の感染赤血球を注入し、その後5週間にわたり原虫感染率の推移を見た。

感染の初期（感染19日目まで）において、コントロール群のサルと比較してSE47'を免疫したサルの群で原虫感染率が著しく低く押さえられており、SE47'による防御免疫の効果が観察された。次にSE47'群の4頭のリザル（R12, 15, 18, 20）について、原虫感染率の推移を詳細に解析した。感染初期では4頭ともにコントロール群のサルよりも原虫感染率が低く押さえられていたが、感染後期（19日目以降）で、R12とR15においては原虫感染率の上昇が見られたのに対し、R18とR20では逆に原虫感染率が下降していた。原虫感染率と抗SE47'抗体値の推移を経時的に調べたところ、R12とR15では感染中の抗体値の上昇は認められなかったのに対して、R18とR20では顕著な抗体値の上昇が認められた。このことからレコンビナントSERA蛋白質であるSE47'によって誘導された免疫は原虫の感染で増強され得ること、またこの増強効果によって原虫の増殖がより強力に抑制されることが示唆された。

次にSE47'で誘導される防御免疫において液性免疫が貢献していることを確認するため、最終免疫後のリザルの血清を原虫の*in vitro*培養系に加えて、その増殖に対する影響を調べたところ、ラット抗血清での実験結果と同様に増殖阻害効果が見られた。

【総括】

- 1) 大腸菌のコドン使用頻度に適合したSE47'の人工合成遺伝子を再構築し、これを大腸菌の発現系に導入してSE47'の大量発現に成功した。
- 2) 抗SE47'ラット抗血清は*in vitro*培養系における熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害する事が観察された。
- 3) リザルへのSE47'ワクチンの投与によって熱帯熱マラリア原虫に対する防御免疫が誘導されると共に、この免疫は原虫感染によって増強されうることを示した。

論文審査の結果の要旨

マラリアは最も大きな被害を及ぼしている原虫感染症である。なかでも熱帯熱マラリアは致死性が高く、有効なワクチンの開発が望まれている。一方、マラリア原虫ゲノムDNA配列はAT含量が高く、マラリア抗原蛋白質をレコンビナント蛋白質として生産することが困難である。本研究ではマラリア症状の原因となる赤血球期のマラリア原虫が生産するSERA蛋白質に着目し、大腸菌のコドン使用頻度に適合させた人工遺伝子を合成することによって、SERAのN末端ドメインを大腸菌で大量発現させることに成功した。精製したSERAのN末端ドメインに対するラット抗血清が培養熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害する事を確認し、さらに、リザルをSERAのN末端ドメインで免疫した結果、熱帯熱マラリア原虫に対する防御免疫が誘導されることを示した。本研究において特筆すべきは、レコンビナントSERA蛋白質に対するリザルの抗体値が原虫チャレンジ感染によって増強された点であり、さらにこの増強効果が原虫感染率の増加を顕著に抑制したことである。レコンビナントマラリア抗原によるこのような観察は世界的にも初めてであり、マラリアワクチンの開発に大きく貢献するものである。従って、学位を授与するに値する研究であると認める。