マラリアワクチンの臨床開発

特集 感染症対策に資する新規ワクチンシステムの開発

東岸任弘・石井 健・堀井俊宏*

Clinical development of malaria vaccine

Malaria is one of the most serious infectious disease in tropical and subtropical regions. Despite tremendous scientific efforts, an effective malaria vaccine has not yet been realized and remains an elusive goal.

Here, we review recent clinical trials of candidate vaccines including our SE36 malaria vaccine as well as our second generation vaccine which combines CpG adjuvant, that was recently identified to stimulate innate immunity and protective epitopes in SE36 molecule.

熱帯熱マラリアは熱帯・亜熱帯地域を中心に流行し、抜本的な対策としてマラリアワクチンの開発に期待が寄せられているが、いまだ著効を示すワクチン実用化の目処はたっていない。

本稿では、世界で実施されてきたマラリアワクチン開発のレビューとともに、筆者らが発見したマラリア原虫のアキレス腱と考えられる SERA5 抗原から開発した SE36 マラリアワクチン臨床開発の現状を報告する。また、最近筆者らが見いだした防御エピトープと自然免疫アジュバントの一つである CpG を組み合わせることにより、より抗原性を改良した第二世代 SE36 マラリアワクチンの展望について述べる。

*Takahiro Tougan · Ken Ishii · Toshihiro Horii**

key words : malaria, Plasmodium falciparum, SERA, SE36, vaccine

ヒトに寄生するマラリア原虫は4種類あるが、なかでも致死性の高い熱帯熱マラリア原虫はアフリカのサブサハラ地域を中心に、年間に100~300万人の犠牲者を出す。さらに、流行地域においては医療費、労働力をも奪われ、マラリアによる経済的損失は年間に1兆5,000億円と推定されている。

一方、わが国でも海外渡航者や来日外国人によって国内に持ち込まれる輸入マラリアが年間に約100例程度あり、熱帯熱マラリアによる死亡例が散発している。近年、薬剤耐性マラリア原虫が蔓延し、また地球温暖化による流行地域の拡大の懸念から、抜本的な対策として効果的なマラリアワクチンの開発が切望されている。

マラリアはハマダラカによって媒介されるマラリア原虫を病原体とする。蚊の唾液腺から侵入したマラリア原虫(スポロゾイト)がヒト肝臓細胞で増殖して数千のメロゾイトとなり、メロゾイトはさらに赤

血球で対数的増殖を行う。発熱、貧血、脾腫などのマラリア症状はこの赤血球期の原虫増殖によってもたらされる。

天然痘や麻疹などに対しては、効果が長期間持続するワクチンが開発されている。もし、これらの感染症のように一度の感染によって防御免疫が容易に獲得できるのであれば、ワクチン開発は容易であろう。マラリアによる死亡者の90%は、サハラ砂漠以南に居住する5歳以下の児童であり、高度流行地域においては出生する子どもの5人に1人がマラリアで死亡するといわれている。流行地域住民は幼児期に幾度も感染を繰り返し、ようやく重症化を免れるまでの免疫を獲得する。幼児期を過ぎてもなお多くの住民はマラリア原虫を体内に宿し、また、成人してからマラリアを発症することもまれではない。

一度の感染で防御免疫を獲得できる天然痘や麻疹との大きな違いは、マラリア原虫ゲノムには数千の抗原遺伝子が存在し、これらがヒトの免疫防御を回避する方向に寄生適応してきたことである。欧米を中心に四半世紀にわたりさまざまに開発努力がなさ

* Department of Molecular Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University 大阪大学微生物病研究所分子原虫学分野

れてきたが、まだ有望なワクチン候補はあらわれていない。その主たる理由は流行地域住民で観察されるマラリア防御免疫の正体が不明であることによる。

マラリア原虫が発達させた寄生戦略の最も重要な機構の一つは、多重族遺伝子群や遺伝子多型によって防御免疫の標的となる抗原分子を変化させることである¹⁾。さらに、マラリア原虫がヒトの免疫を攪乱するために多数の decoy(おとり)抗原を放出することもまた重要な寄生適応戦略と考えられている。

マラリア初感染においても、ヒトの免疫は多数のマラリア抗原に対して迅速に反応するが、それによってマラリア原虫が殺滅されるということはまれで、むしろマラリア原虫の急所となる抗原への免疫応答を遅らせてしまう。マラリア患者や流行地域住民の血清にはマラリア原虫が生産する無数の抗原に反応する抗体が存在し、これらのなかから、マラリア感染あるいは発症に対して防御的に働く抗体を見いだすことは容易ではない。これまでは防御的に働く抗体の標的となる最適の抗原が不明のまま、研究者はワクチン開発を続けるというジレンマがあった。

これまで行われたワクチン試験と問題点

ワクチンによってマラリア原虫の感染サイクルを断つ可能性は、その生活環において4カ所が考えられている(図1)。それぞれ標的とする抗原、期待するエフェクター機構、予防効果など、さまざまな点で異なり、ワクチンの開発戦略も大きく異なる。

開発が進められているワクチン候補抗原を図中に示した。これらの候補抗原のうち、動物試験で効果を確認した後、臨床試験がなされた試作ワクチンを表1にまとめる。マラリアワクチンはワクチン候補蛋白質のアミノ酸配列をもとに、合成ペプチドあるいは組換え蛋白質が合成され、ワクチン抗原とするのが一般的である。その他接種方法としては、DNA ワクチンやマラリア抗原遺伝子を結核ワクチンである BCG 菌に導入した組換え BCG などの基礎研究が進められている。

最近では DNA ワクチンでプライミングしたの

ち、組換え蛋白や組換えワクシニアウイルスなどでブーストをかける免疫方法が有望視されているが、ワクチンの安全性や流行地における接種の煩雑さから、マラリアに対するワクチンとして実用化は疑問である。

1. スポロゾイトワクチン

スポロゾイトの主要表面抗原は CSP(circum sporozoite protein) とよばれる蛋白質で、その中央部に NANP という4つのアミノ酸の配列が約40回連続して繰り返す構造を持つ。動物実験から、この繰り返し配列が防御抗体を誘導することが知られている。この配列を32回繰り返したアミノ酸配列(R32tet32)を、アジュバントとして水酸化アルミニウムに吸着させた FSV-1 ワクチンの第I相臨床試験が行われた。スポロゾイトワクチンは蚊から侵入したすべてのスポロゾイトを中和しなければならず、一つでも肝細胞に侵入すればマラリアを発症する。

報告された臨床試験の成績は発症までの時間が遅延したものであり、この結果は大半のスポロゾイトはワクチン効果によって中和されたが、少数が肝細胞に到達し増殖をしたことによる発症の遅延と考察される²⁾。また、このような短鎖のペプチドは長鎖の組換え蛋白質にくらべ、免疫誘導能力および免疫持続力において著しく劣ることも問題点の一つである。

2. 肝細胞期ワクチン

スポロゾイトはまず肝細胞に侵入し、そこで増殖したのちに赤血球に侵入する。上記の CSP は MHC クラス I とともに感染肝細胞表面に提示されることから、細胞性免疫の標的となりうる。これまでに確認されたワクチン効果はスポロゾイト表面抗原 CSP の CTL(cytologic T lymphocyte) エピトープを含む組換え蛋白質をリン酸化リピッド A と QS21 をアジュバントとして試作した RTS,S/AS02 であった。

第I相臨床試験ではボランティアに3回免疫した3週間後、熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトを持つ蚊に吸血させ感染させた。その結果、このワクチン

図1 熱帯熱マラリア原虫の生活環とワクチン候補抗原

スポロゾイトワクチン：蚊からヒトに侵入したスポロゾイトをスポロゾイト表面抗原に対する特異抗体で中和する。

肝細胞期ワクチン：マラリア原虫感染肝細胞をキラーT細胞によって除去する。細胞性免疫の誘導が必要であり、スポロゾイトワクチンと同様に100%の効果がなければ発症に至る。

赤血球期ワクチン：赤血球期のマラリア原虫の増殖を、マラリア抗原特異的な抗体依存的に抑制し発症を予防する。80～90%の増殖阻害効果で十分な発症予防が期待できる。

伝播阻止ワクチン：生殖母体や生殖体の表面抗原に特異的な抗体が吸血とともに蚊に移行し、蚊の中腸内で原虫細胞を殺滅する。ワクチン接種によって個人の発症を予防しないが、感染の伝播を阻止する。

を接種した7人のうち6人は感染しなかった(有効率86%)³⁾。成人男性250名にこのワクチンを3回接種したガンビアにおける第Ⅱ相臨床試験ではフォローアップ期間中の前半9週の有効率は71%であったのに対し、後半6週の有効率は0%であった。

肝細胞期ワクチンにおいてはスポロゾイトワクチンと同様に100%の効果がなければ発症に至るため、いかにこのワクチンによる免疫力を高いまま長期間持続させるかが今後の重要課題である。とはいえ、RTSS/AS02 ワクチンは一定のワクチン効果を示した数少ないワクチンであり、現在は第Ⅲ相の臨床試験が進行中である。肝細胞期に特異的に発現しているその他の原虫抗原も同定されており基礎研

究が進められている。

3. 赤血球期ワクチン

マラリア対策のためには感染予防よりはむしろ、充分な発症予防効果があればマラリアの脅威を取り除くことができる。したがって、赤血球期ワクチンは100%の中和効果がなければ効果としてあらわれない上記のワクチンとは異なり、赤血球期ワクチンは当初効果が充分でなくても原虫の増殖率を低下することによる発症経過の速度の低下と、それについて原虫からの抗原提示によるワクチン免疫のブースト効果によって最終的には自然治癒を期待できる。

表1 マラリア試作ワクチンとこれまでに実施されたワクチントライアル

ワクチンのタイプ	ワクチンの名称/抗原名	由来する抗原	アジュバント	臨床試験	効果	研究/生産国
スポロゾイトワクチン	FSV-1	CSPのNANP配列	Alum	第I相終了	発症遅延	米国
肝細胞期ワクチン	RTS, S/AS02A	CSPのCTLを含む	AS02A	第II相終了(第III相進行中)	34%の発症の抑止	米国
複合タイプ(マルチステージ)	SPf66	CSP/MSP-1/55k/35k	Alum	第III相終了	効果無し	コロンビア
	NYVAC-Pf7	CSP, SSP-2, LSA-1, MSP-1, SERA, AMA-1, Pfs25	(組換えウイルス)	第I-IIa相終了	効果無し	米国
赤血球期ワクチン	FMP1/AS02A	MSP-1 ₄₂	AS02A	第IIb相終了	効果無し	米国
	FMP2.1/AS2A	AMA-1	AS02A	第I-IIb相進行中	安全かつ免疫原性あり	米国
	SE36	SERA5	Alum	第Ia相終了	安全かつ免疫原性あり	日本
	Combination B	MSP1/MSP2/RESA	Montanide ISA720	第I-IIa相終了	ワクチンと同じMSP-2配列を持つ原虫株に対してのみ原虫率減少	オーストラリア
	MSP3-LSP	MSP-3(186-276)		第Ib相終了	安全	フランス
	LR67	GLURP(85-213)	Alum / Montanide ISA720	第Ia相終了	安全かつ免疫原性あり	デンマーク/フランス
伝播阻止ワクチン	Pfs25/ISA51	Pfs25	ISA51	第Ia相終了	被験者血清によるオオシスト数の減少	米国
	Pvs25H	Pvs25	Alum	第Ia相終了	被験者血清によるオオシスト数の減少	米国

ワクチン候補抗原として最も注目されてきたのはメロゾイト表面抗原(MSP: merozoite surface antigen)である。なかでもMSP-1抗原はネズミマラリア原虫を用いた動物実験で大きな成功をおさめ、ヒト熱帯熱マラリア原虫においても同様の効果が期待できると考えられ、現在でも最も活発に研究が進められている抗原である。しかしながら、大阪工業大学(現大阪大学)の田辺和祐らが証明したように、MSP-1遺伝子は最も多様な遺伝子多型を示し⁴⁾、また流行地の血清疫学調査においてもマラリア免疫と抗MSP-1血清抗体価の相関は乏しいものである⁵⁾。

遺伝子多型がワクチン効果を無効にするという仮説はオーストラリアのグループが行ったMSP-2を含むCombination Bワクチンの第II相臨床試験で見事に証明された。このCombination BワクチンはRESA, MSP-1, MSP-2の3種の組換え蛋白質を混合したものであり、臨床試験ではワクチングループにみられる平均原虫率が対象群のそれに比べて62%低下していた。しかしながら、効果が認められたのは、組換えMSP-2蛋白質と同一の対立遺伝子を持つ原虫株に対してだけで、ほかのMSP-2対立遺伝子を持つ原虫株には効果が認められず、逆にほかの対立遺伝子を持つ原虫率が增加する結果となった⁶⁾。

また、メロゾイトの先端に存在するAMA-1

(apical membrane antigen-1)も遺伝子多型は大きいものの重要なワクチン候補抗原として米国を中心に臨床試験が進められている。

4. 伝播阻止ワクチン

伝播阻止ワクチンはヒト体内にマラリア原虫の生殖体やオーキネートなどの表面抗原に対する抗体を誘導し、吸血した蚊の中腸内で原虫を殺滅することにより以降のマラリア伝播を防ぐことを目的とする。したがって、伝播阻止ワクチンの接種は直接予防に役立つものではない。

しかしながら、島嶼など隔離されたコミュニティにおいて集団接種を行えばマラリア撲滅に貢献する可能性がある。

5. これまでに実施されたその他のワクチン試験

単一の組換え蛋白質で効果が得られないのであれば、いくつかの抗原を混合して使用すれば、効果が期待できるかもしれない。このような発想からSPf66やCombination B, NYVAC-Pf7ワクチンのような混合サブユニットワクチンが考案された。しかしながら、Combination Bワクチンで実際に効果を示したのはMSP-2抗原だけであり、ほかのRESAやMSP-1には防御効果が認められなかった⁶⁾。

また、ポリオウイルスベクターを用いた

NYVAC-Pf7 は 7 種類の原虫抗原遺伝子を組み込んだが、効果は得られなかった⁷⁾。これらの結果は混合することがよくないということではなく、各抗原がそれぞれなんらかの効果を示すことを確認したうえで、混合しなければ意味がないということを物語っている。

これまでに最も大規模に臨床試験が行われたのは、45 残基のアミノ酸からなる SPf66 合成ペプチドワクチンである。そのアミノ酸配列は赤血球期に発現する数種類の抗原から B 細胞エпитープを選んだものであり、T ヘルパー細胞エпитープは明確ではなく、抗体の産生誘導と持続に問題がある。動物試験で効果が確認された SPf66 においても、第 II 相、第 III 相臨床試験についてのレポートは報告される年ごとに効果が少なくなっている⁸⁾。ワクチントライアルでは対象年齢、対象人数、流行度の違い、効果の判定基準等が重要な問題であり、これまでの SPf66 臨床試験では条件設定がさまざまであったため一概に効果があったとする報告が誤りであるとは結論できない。

SE36 マラリアワクチンの開発

大阪大学微生物病研究所において筆者らがワクチン候補抗原として開発研究しているのは熱帯熱マラリア原虫の SERA (serine repeat antigen, 120kD) とよばれる蛋白質である。特にその SERA のなかでも N-末端領域は最も重要なワクチン候補抗原である (図 2)。

筆者らは SERA の N-末端領域の一部 (SE47 蛋白質) に対する人工合成遺伝子を合成し、大腸菌において発現させ、精製した後、ラット、マウス、リスザルなどの動物免疫においてマラリア原虫の増殖を抑制する抗体が誘導されることを示してきた^{9,10)}。

SERA ワクチン開発において重要な点は、SERA の N-末端領域がマラリア原虫の急所となる標的抗原であるか否かである。そのために、SE47 蛋白質に対する抗体価について疫学調査を行った。

アフリカ中央部に位置するウガンダのマラリア高度流行地域に住む児童を、マラリア感染により発熱を示すグループと発熱していないグループにわけた

ところ、SE47 蛋白質に対する IgG3 抗体を持つ児童は全く発熱をしていなかった。また、児童の血中マラリア原虫率と SE47 蛋白質に対する IgG3 抗体価を調べた結果、IgG3 抗体価と血中のマラリア原虫率には、はっきりとした負の相関関係が認められた^{5,11)}。

SE47 蛋白質に対する抗体陽転率と防御免疫との間には、ほかのマラリアワクチン候補抗原には認められない顕著な相関があり、ヒトが自然感染において獲得するマラリア免疫の主要な標的抗原の一つが SERA の N-末端領域 (SE47 蛋白質) であることを意味するものであった。

SERA の N-末端領域が重要な防御抗原であれば、マラリア原虫はその寄生適応進化の過程でなんらかの免疫回避機構を発達させている可能性が大きい。一般にマラリアワクチンの開発においては、標的抗原について宿主免疫回避機構を解析し、ワクチン耐性株出現の可能性について検討する必要がある。SERA の遺伝子多型についてはこれまでの解析から抗原性において問題となるほどの多型は観察されなかった¹²⁾。

一方、熱帯熱マラリア原虫のゲノムプロジェクトにより、熱帯熱マラリア原虫には SERA 遺伝子の homologue が第 2 染色体上に 8 個 (SERA1-8) 存在することが明らかとなった。これまで筆者らがワクチン候補としてきたのは SERA5 に相当する。SERA 多重族遺伝子群が抗原性変換による宿主免疫監視からの回避機構に関与している可能性について解析を行った⁵⁾。

各 SERA 遺伝子から転写される RNA 量の解析を行った結果、すべての SERA 多重族遺伝子は主に栄養体から分裂体期にかけて転写されていた。なかでも RNA の発現量の多かった SERA3, SERA4, および SERA6 について、ウサギ抗血清を調製し既存のマウス抗 SERA5 抗体とともに間接蛍光体法による観察を行った結果、すべての細胞において SERA5 と SERA3, 4, 6 蛋白質は共発現しており、局在も同様であることが明らかとなった。

この結果は SERA 多重族遺伝子群が抗原性変換に関与しないことを示しており、SERA マラリアワクチンに対する耐性株出現の可能性が低いことを示

図2 熱帯熱マラリア原虫 SERA のプロセッシング断片と SE36 蛋白質の構造

SERA5 蛋白質(N-末端ドメインにセリン残基の繰り返し配列を持つ)は赤血球期の分裂前に多量に生産され、寄生胞に多量に蓄積される。感染赤血球が壊裂する直前にプロテアーゼによる分解を、矢印Ⅰ、Ⅱ、Ⅲの順番で受け、断片のP47とP18はメロゾイト表面に結合するが、P50は外部に放出される。SE36 蛋白質はSE47'蛋白質からセリン残基の繰り返し配列を除去したものである。下図は抗SERA5抗体を用いた免疫電子顕微鏡写真である。SERA5がメロゾイト周辺の寄生胞に存在することが金コロイドの分布から示される。(愛媛大学医学部、鳥居本美教授の撮影)

唆する。さらに40人分のウガンダ人成人血清を用いて、SERA3, 4, 5, 6組換え蛋白質、および、MSP-1(C-terminal 19 kD)に対する抗体価を測定するとともに、これらの血清を用いて原虫増殖阻害実験を行ったところ、SERA5でのみ抗体価と阻害効果に正の相関が観察された。

さらに驚くべき発見は、SERA5はマラリア原虫細胞において、RNAレベルにおいても蛋白質レベルにおいても最も強く発現している抗原の一つであるにもかかわらず、流行地においてはSERA5に対する抗体陽性者はほかのSERA蛋白質やMSP-1蛋白質にくらべて最も低いことであった。この事実はマラリア自然感染においてSERA5に対するヒトの

免疫応答がなんらかの機構によって抑制されていることを示唆すると同時に、SERA5が熱帯熱マラリア原虫に対する防御抗原であることを強く示唆する。

上記の結果はソロモン諸島における疫学調査によっても裏づけられた(東京医科歯科大学、太田伸生先生との共同研究)。ソロモン諸島は南太平洋に位置するマラリア高度流行地域であるが、ソロモン諸島の住民における抗SE36-IgG3抗体価の陽性率を年齢別に比較してみたところ、10歳以下の年齢層では抗体保有者が10%以下であり、成人をみても50%に満たない。疫学調査を実施した地域は高度マラリア流行地域であり、住民はほぼ例外なく乳

幼児の時期からマラリア感染に晒されている。

一方、代表的なワクチン候補抗原である MSP-1 蛋白質に対する抗体陽性率は、年齢にかかわらずきわめて高い割合であり、住民の大半がマラリア原虫抗原に応答していた。これらの結果から、自然にマラリア感染を繰り返しても抗 SE36 抗体陽転がきわめて生じにくいことがわかる。SERA5 が分裂期の感染赤血球内において MSP-1 蛋白質の数倍発現し最も多量に蓄積する抗原分子であることから考えると、ヒト免疫系の SERA5 に対する応答が抑制されている背景には未知のメカニズムが潜んでいる可能性がある。

自然感染では抗体応答がきわめて低いという観察は、防御抗体の標的抗原である SERA5 の N-末端領域に対する免疫回避機構が主としてヒトの免疫不応答にあることを示唆する。したがって、SERA 抗原の N-末端ドメインがマラリア原虫の「アキレス腱」ともいうべき標的抗原であり、組換え SE36 ワクチンによって人工的に抗体価を上昇させることによって防御効果が期待できる。

臨床試験をめざす SE36 マラリアワクチン

WHO では高度流行地域における 5 歳以下の児童についてワクチン接種による 30% 以上の死亡率の低下を、マラリアワクチンの効果基準の一つとしている。きわめて低いハードルともいえるが、マラリア問題の深刻さをあらわすものともいえる。

上記の研究結果に基づき、SERA5 の N-末端領域をもとにマラリアワクチンの臨床開発を目指すこととなった。これまで研究を進めてきた組換え蛋白質は疎水性が高く、量産化が困難であったため、筆者らは疎水的にふるまうセリン残基の繰返し配列を除去した SE36 蛋白質を構築し、(財)阪大微生物病研究会と協力して、厳正な品質管理のもと組換え SE36 蛋白質を高純度に精製した。

GMP(good manufacturing practice)条件を遵守して生産された SE36 マラリアワクチン臨床治験製剤を図 3 に示す。一本のバイアルには、水酸化アルミニウム(1 mg)に吸着させた SE36 蛋白質(50 μ g)が、凍結乾燥した状態で封入されている。本製剤の

図 3 SE36 マラリアワクチン治験製剤

(財)阪大微生物病研究会観音寺研究所において GMP(good manufacturing practice)条件を遵守して生産された SE36 マラリアワクチン臨床治験製剤である。1本のバイアルには、1回のワクチン接種に用いる水酸化アルミニウム(1 mg)に吸着させた SE36 蛋白質(50 μ g)が、凍結乾燥した状態で封入されている。

前臨床試験(GLP 条件)を 2003 年に行った。試験項目は、① ラット/イス単回投与毒性試験、② ラット反復投与毒性試験、③ ウサギ局所刺激性試験、④ 遺伝毒性(Ames, マウスリンフォーマ)試験、⑤ 安全性薬理試験(ラット呼吸器系、ラット腎機能)である。その結果、問題となる所見は認められなかった。

GMP 条件下で生産された SE36 治験製剤の免疫原性について試験するため、ヒトと同様の免疫系を持つチンパンジーに対して免疫試験を行った。その結果、きわめて高い抗体価の上昇が確認され、副作用もあらわれなかった。動物愛護の観点からチンパンジーに対する感染実験は行えないが、この免疫実験によって SE36 マラリアワクチンは最長で 2 年間の抗体誘導が維持され、1 回の追加免疫で抗体応答は最高値が回復することが明らかとなった。

つぎにワクチン効果を確認するため、リスザルを用いた感染実験を行った(東京大学大学院、松本芳嗣先生との共同研究)。宿主特異性が高い熱帯熱マラリア原虫にとってリスザルは数少ない感染動物モデルである。

SE36 マラリアワクチンを蒸留水で懸濁し、2 週

第一世代SE36 マラリアワクチン

流行地域住民(特に乳幼児)がマラリアに対する防御免疫を獲得するのを促進する。

Phase Ia 2005
Phase Ib 2010
Phase II ↓ 臨床試験進行中
Phase III

第二世代SE36 マラリアワクチン

流行地域住民だけではなく、短期滞在者や旅行者などにも有用な次世代のワクチンである。

図4 第二世代 SE36 ワクチンの開発

防御免疫に必要な領域を追加した改良型組換え SE36 マラリアワクチン抗原に自然免疫アジュバントを添加することで、流行地域住民だけではなく、短期滞在者や旅行者にも有用な第二世代 SE36 マラリアワクチンの開発が進行中である。

間隔で2回皮下投与した。マラリア原虫感染赤血球を静脈注射によって感染させたところ、対照群にくらべて、ワクチン群では原虫率(全赤血球に対する感染赤血球の割合)がきわめて低く抑制された。本実験では大量の感染赤血球を導入したため、感染後数日でマラリア原虫が観察されたが、感染後3日目ですでに対照群とワクチン群の間に原虫率に大きな違いが認められた。

この結果はワクチンによって誘導された抗体が原虫増殖抑制に直接関わっていることを示唆する。もう一つ重要な観察は、SE36 ワクチンによって誘導された抗体価が原虫の感染によって増強(ブースト)されたことである。これは感染したマラリア原虫によって提示される SERA5 蛋白質によって増強されたものであり、流行地域において SE36 ワクチンを接種したヒトでは感染を受けることによってワクチン効果が増強されることを示唆するものである。

2005年には、国内においてヒトに対する安全性を調べる第I相臨床試験が終了した。その結果、安全性とともにワクチン接種者で100%の抗体陽転が認められた。抗SE36抗体保有者はマラリア感染を繰り返す高度マラリア流行地域の住民においてすら

50%にも満たないことから、流行地域ではSE36 ワクチンがマラリア発症抑止効果を与えるであろうと期待できる。2010年にウガンダにおいて臨床試験を実施すべく、着々と準備を整えつつある(図4)。

第二世代 SE36 マラリアワクチンの開発

第I相臨床試験において誘導されたSE36に対する日本人抗体価の平均値はアフリカ人の high titer group の1/4程度であった。このレベルの抗体価でも流行地域においては重症マラリアの抑制効果とマラリア発症防御効果が期待できる。

一方、流行地域に出かける旅行者は、一般にマラリア感染に暴露されていないため、より高いワクチン効果を必要とする。そのためにはアフリカ人の high titer group と同等かそれ以上の免疫力をワクチン接種で獲得することが望まれる。

SE36 抗原蛋白質は、334個のアミノ残基の配列からなり、この全領域をカバーする15本のペプチドを合成し、自然に免疫を獲得したアフリカ人抗体がどの領域を認識するかを調べた。その結果、驚くべきことに、SE36に対するほとんどの抗体が60残

基程度の同一の配列に反応し、ほかの領域にはほとんど反応を示さなかった。この事実はこれらの領域が主たる防御エピトープであることを意味する。

そこで、遺伝子組換え技術により、SE36にこの配列をさらに3回挿入することで、この配列に対する抗体価を有意に上昇させることに成功した。

一方、組換え蛋白質やペプチド抗原のみを生体内に投与しても十分な獲得免疫反応が誘導されることはまれで、アジュバントが必要である。toll様受容体(TLR)などの宿主の受容体は特異的にLPSやリポ蛋白、核酸などの成分を認識し、その後の自然免疫反応、そして獲得免疫反応の誘導に重要な役割を担っている。

たとえば非メチル化CpG塩基配列を持ったオリゴDNA(CpG DNA)はTLR9を介して自然免疫を活性化するだけでなく、蛋白抗原と一緒に投与するとTh1細胞やCTLを誘導するすぐれたアジュバントでもある。今回筆者らはSE36蛋白質とCpGを組み合わせることで、カニクイザルにおいて従来の免疫原性を数十倍高めることに成功した。

現在、筆者らは上記の改良型SE36蛋白質と自然免疫アジュバントを組み合わせ、第二世代のSE36マラリアワクチンの開発を進めている。このワクチンは単に先進国の人々のためのトラベラーズワクチンとしてだけでなく、CpGを添加することによって接種する抗原の量を大幅に削減する事が期待できるため、将来的には流行地域で低廉なワクチンとしても大きな期待が持てる(図4)。

文 献

- 1) 堀井俊宏：マラリア原虫寄生の分子戦略とワクチン開発。蛋白質核酸酵素 46：2154-2162, 2001.
- 2) Ballou WR et al. : Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine. Lancet 1(8545) : 1277-1281, 1987.
- 3) Bojang KA et al. : Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia : a randomised trial. Lancet 358(9297) : 1927-1934, 2001.
- 4) 田辺和裕・他：マラリア原虫の抗原多型と集団生物学。蛋白質核酸酵素 47：5-12, 2002.
- 5) Aoki S et al. : Serine repeat antigen (SERA5) is predominantly expressed among the SERA multigene family of *Plasmodium falciparum*, and the acquired antibody titers correlate with serum inhibition of the parasite growth. J Biol Chem 277(49) : 47533-47540, 2002.
- 6) Genton B et al. : A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea. J Infect Dis 185(6) : 820-827, 2002.
- 7) Stanley SL Jr : Malaria vaccines : are seven antigens better than one? Lancet 352 : (9135)1163-1164, 1998.
- 8) Snounou G et al. : The vaccine is dead--long live the vaccine. Trends Parasitol 23(4) : 129-132, 2007.
- 9) Sugiyama T et al. : Production of recombinant SERA proteins of *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli* by using synthetic genes. Vaccine 14(11) : 1069-1076, 1996.
- 10) Suzue K, Ito M, Matsumoto Y, Tanioka Y, Horii T : Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant serine repeat antigen (SERA) of *Plasmodium falciparum* Parasitology International 46 : 17-25, 1997.
- 11) Okech BA et al. : Natural human immunoglobulin G subclass responses to *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen in Uganda. Am J Trop Med Hyg 65(6) : 912-917, 2001.
- 12) Morimatsu K et al. : Sequence diversity in the amino-terminal 47 kDa fragment of the *Plasmodium falciparum* serine repeat antigen. Mol Biochem Parasitol 86(2) : 249-254, 1997.