

趙 子 江 論文内容の要旨

主論文

Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice
日本脳炎ウイルスの PrM-E 蛋白を発現するプラスミドを金コロイドと一緒に接種することにより BALB/c マウスでは発症を予防できる免疫を誘導する。

趙 子江、 脇田 隆字、 保井 孝太郎

掲載雑誌: Journal of Virology 77(7) 4248-4260 2003年
紹介者: 長崎大学大学院医学研究科病理系専攻 岩崎琢也教授

緒言

ワクチンは重篤な疾患の予防と治療において効果を挙げている。しかし、使用できるワクチンの種類は限られている。1990年に簡便なワクチンとしてプラスミド DNA を用いる DNA ワクチンが考案された。この利点に、容易なワクチン開発、安価な費用、容易な輸送と高い Th1 誘導能が挙げられる。しかし、免疫誘導には大量のプラスミド DNA を必要とするため、より少量の DNA ワクチン法の開発が望まれている。

日本脳炎は日本脳炎ウイルス (JEV) による重篤な神経疾患である。本邦では予防接種の普及により症例が激減したが、東南及び東アジア地域では未だに流行し、毎年 35,000 人以上が発症し、10,000 人以上が死亡している。日本脳炎の予防に使用される不活化ワクチンはネズミ脳を用いて調製するため、アレルギー等の副反応を伴う。獲得免疫の記憶も持続しないため、3 回以上の接種を必要とし、経費もかさんでいる。金コロイドを用い少量の DNA 量で済む新しい JEV DNA ワクチンの接種法を開発した。

対象と方法

CAG プロモーター (ニワトリアクチン遺伝子プロモーターと CMV のエンハンサー) と SR α プロモーター (SV40 初期プロモーターと HTLV I の LTR) の各プロモーター下流に JEV PrM-E 遺伝子を挿入し発現プラスミド (pCAGJ12 及び pSR α J12) を作製した。これらのプラスミド DNA を 0.01% 金コロイド溶液と混合し、BALB/c マウスの静脈、皮下あるいは筋肉内に接種した。 β -galactosidase 遺伝子を組み込んだ pCAGLacZ も同様に作製し、接種した。3 日後にマウス組織内の JEV の PrM-E 遺伝子と β -galactosidase 遺伝子の発現を蛍光抗体ならびに組織化学により検討した。免疫応答は ELISA 法による抗 JEV 抗体価とプラーク法による中和抗体価、攻撃感染に対する防御能により解析した。さらに、免疫マウスの脾細胞及び血清の SCID マウスへの移入による受動的免疫防御能を解析した。

結果

金コロイドと混合した pCAGJ12 または pCAGLacZ のプラスミド DNA 接種後の発現細胞の解析では、筋肉内接種では横紋筋細胞に、静脈内接種では脾の赤脾内に、皮内接種では真皮内の紡錘型細胞に遺伝子発現を認めた。pCAGJ12 を用いた金コロイドの有効性の検討では、金コロイドが共存した方が、単独よりも、早期により高い力価の血清中和抗体を誘導できた。接種ルートの比較では静脈内または皮下接種は、筋肉内接種よりも、早期により高い力価の JEV 特異的中和抗体を誘導した。DNA 量の比較では、50, 5, 0.5 μ g の 3 段階の

pCAGJ12 を金コロイドと共に接種したところ、いずれの量でも中和抗体を誘導し、抗体の誘導時期と力価に差はなかった。金コロイド加 pCAGJ12 または pSR α J12 (50, 5, 0.5 μ g) を 2 度接種したマウスに 10^6 LD₅₀ の JEV (北京-1 株) の攻撃感染を行ったところ、全頭で発症が完全に防御され、pCAGJ12 と pSR α J12 に有意の差はなかった。受動的免疫防御能の検討では、金コロイド加 pCAGJ12 接種マウスの脾細胞及び血清を SCID マウスに移入し、 10^2 LD₅₀ の JEV 攻撃感染を行ったところ発症は防御され、移入したマウスは受動的免疫防御能を獲得した。金コロイド加 DNA の接種では誘導される免疫グロブリンのサブクラスは IgG1 優位で、DNA 単独では IgG2a 優位であった。

考察

金コロイドと共にプラスミド DNA を接種することにより、JEV に対する防御免疫反応を効率よく誘導できる。従来の DNA 免疫では、50 から 100 μ g の DNA を投与する必要がある。今回、金コロイドと共に接種することにより 0.5 μ g という微量で十分な免疫反応を誘導できた。金コロイドと共に DNA を接種すると脾臓内で遺伝子発現が検出でき、その脾細胞を組織培養した場合に付着細胞により強く発現することから、マクロファージなどの抗原提示細胞での発現が増強されることが推測された。また、pCAGJ12 と金コロイドを接種したマウスの血清を移入された SCID マウスは JEV に対する免疫防御能を獲得した。これは JEV に対する免疫防御には中和抗体の誘導が重要であることを示している。金コロイドと共に DNA を接種すると、免疫グロブリンのサブクラスが IgG1 優位になることから、Th2 優位のヘルパー T 細胞が活性化され、より抗体産生能が増強されることも示唆された。この論文では BALB/c マウスのみを使用しているため、今後、他の系統のマウスまたはラットで確認する必要がある。さらに、より大型の動物で、JEV に感受性を有したブタ、サル等の実験により、この実用化に向けて有効性を確認する必要がある。