

学位論文題名

Development of Anti-tick Vaccines using Serine Protease Inhibitors (SERPINs) from Ixodid Ticks

(マダニ由来セリンプロテアーゼインヒビター (セルピン) を用いた
抗ダニワクチンの開発)

学位論文内容の要旨

吸血性で各種病原体のベクターとなるマダニを免疫学的方法で防除する抗ダニワクチン開発は、薬剤使用に変わるベクターコントロール法として有望である。抗ダニワクチン標的抗原として蛋白分解酵素とその阻害分子の有用性が多い研究者によって指摘されてきたにも拘らず、その解析はあまり行われていない。そこで本研究はマダニ由来のセリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)に着目し、候補分子の探索と性状解析、組み換え蛋白を用いたワクチン実験を行った。ワクチン実験には、実験室レベルでの *Haemaphysalis longicornis*-ウサギモデルと、野外応用を視野に入れた *Rhiphicephalus appendiculatus*-牛モデルを用いた。

はじめに、セルピンの保存アミノ酸配列を基にプライマーを設計し完全長セルピン cDNA のクローニングを行った。得られたクローン *H. longicornis serpin-2* (HLS2) の機能解析の結果、HLS2 はダニのヘモリンフ凝固の制御因子と考えられた。また、組み換え HLS2 を用いたウサギの免疫実験では約 40% 程度のダニにおいて吸血中および吸血後の死亡が確認された。

ワクチン開発の観点から考えると、ダニ分子は吸血時に宿主体内に分泌される暴露型と分泌されない非暴露型分子に大別される。非暴露型抗原による免疫は一般に暴露型抗原よりもワクチン効果が強く発揮する事が経験的に知られている。セルピンの有効性は以上の理由からも支持されるが、野外応用を視野に入れた場合、1 種類の抗原を用いたワクチンでのダニ排除は完全ではないと考えられる。

そこで次に複数の抗原を混ぜたセルピンカクテルワクチンの効果を検討した。材料には、HLS2 同様ダニの恒常性維持に必須と考えられる *R. appendiculatus serpin-1* と *-2* (RAS-1、-2) に着目し、組み換え蛋白を作製した。このカクテルで自然宿主の牛を免疫し、抗ダニ効果を判定した結果、約 60% の若ダニの飽血を阻害し、約 28% の成ダニに死亡が確認された。

本研究で得られた知見は、セルピンが抗ダニワクチン候補抗原分子として有用である事を示している。ダニの吸血阻害のみならずダニ媒介性病原体の伝播阻止をも誘導しうる抗ダニワクチンの開発には、更なるワクチン効果の増強が必要と思われる。その為には、候補抗原の探索は勿論の事、免疫方法

の検討、唾液に由来する暴露型抗原などをカクテルに添加する事が重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 片 倉 賢
副 査 助 教 授 奥 祐三郎
副 査 助 教 授 大 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

Development of Anti-tick Vaccines using Serine Protease Inhibitors (SERPINs) from Ixodid Ticks

(マダニ由来セリンプロテアーゼインヒビター (セルピン) を用いた
抗ダニワクチンの開発)

吸血性で各種病原体のベクターとなるマダニを免疫学的な方法で防除する抗ダニワクチン開発は、薬剤使用に変わるベクターコントロール法として有望である。本研究ではマダニ由来のセリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)に着目し、候補分子の探索と性状解析、組み換え蛋白質を用いた抗ダニワクチン効果を検討した。

はじめに、セルピンの保存アミノ酸配列を基にプライマーを設計し *Haemaphysalis longicornis* (フタトゲチマダニ) の完全長セルピン cDNA のクローニングを行った。得られたクローン *H. longicornis serpin-2* (HLS2) の機能解析の結果、HLS2 はダニのヘモリンフ凝固の制御因子と考えられた。また、組み換え HLS2 を用いたウサギを使っての抗ダニワクチン試験では、約 40% 程度のダニにおいて吸血中および吸血後の死亡が確認された。

ワクチン開発の観点から考えると、ダニ分子は吸血時に宿主体内に分泌される暴露型と分泌されない非暴露型分子に大別される。非暴露型抗原による免疫は一般に暴露型抗原よりもワクチン効果が強く発揮する事が経験的に知られている。セルピンの有効性は以上の理由からも支持されるが、野外応用を視野に入れた場合、1 種類の抗原を用いたワクチンでのダニ排除は完全ではないと考えられる。そこで複数の抗原を混ぜたセルピンカクテルワクチンの効果を検討した。 *Rhipicephalus appendiculatus* (コイタマダニ) の *serpin-1* と *-2* に着目し、組み換え蛋白質を作製した。このカクテルで牛を免疫し、抗ダニ効果を検討した結果、約 60% の若ダニの飽血を阻害し、約 28% の成ダニに死亡が確認された。

本研究により、セルピンが抗ダニワクチン候補抗原として有用である事が明らかになった。よって、審査委員一同は、今村彩貴君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。