

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：16301  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21406010  
 研究課題名（和文） 新規マラリア伝播阻止ワクチンの開発  
 研究課題名（英文） Development of novel malaria transmission blocking vaccine  
 研究代表者  
 鳥居 本美（TORII MOTOMI）  
 愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：20164072

研究成果の概要（和文）： 三日熱マラリア原虫の生殖母体に発現する抗原（Pvs230）に対する特異抗体が、蚊によるマラリアの伝播を阻止する活性を有するか否かの検定を、流行地であるタイ王国の調査地において実施した。患者から採血したマラリア原虫を含む血液に組換えタンパク質を抗原として作成したウサギ抗Pvs230抗体を混合し、人工吸血器を用いてマラリア媒介蚊に吸血させた。吸血蚊を約20日後に解剖して中腸に寄生するマラリア原虫数を計測した結果、Pvs230を標的とする抗体が有効な伝播阻止活性を有することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： The aim of the malaria transmission-blocking vaccine (TBV) is to block the development of malaria parasites in the mosquito and prevent the following infection to the host. We focused on the Pvs230 as a candidate molecule, and produced recombinant Pvs230 protein using cell-free system. Rabbit antisera against the rPvs230 reacted on the surface of *P. vivax* gametocytes taken from Thai patients. The antisera reduced the infectivity of *P. vivax* parasites to *Anopheles dirus* mosquitoes by membrane feeding assay.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、ワクチン、伝播阻止

1. 研究開始当初の背景

マラリア伝播阻止ワクチンは、蚊が吸血した際に取り込まれた血液に含まれる抗体が、媒介蚊体内で発育する原虫を標的として作用することによって原虫を殺滅することをめざすもので、それ単独でマラリア流行抑制効果

が期待できるのみならず、肝細胞や赤血球等の他ステージ原虫に対するマラリアワクチン及び治療薬に対する耐性原虫の拡散を阻止できる点で、マルチステージ・カクテルマラリアワクチンの必須構成成分と考えられている。熱帯熱マラリア伝播阻止ワクチン候補として

第1相臨床試験にまで進んでいるオーキネート表面タンパク質 (Pfs25) はヒト血流中の生殖母体には発現しないため、Pfs25ワクチン接種後のマラリア感染による抗体価の上昇（ブースト効果）が期待できず、継続的に追加免疫を行わないと抗体価の維持が困難である。そこで、自然感染によるブースト効果が期待される伝搬阻止ワクチンが注目されている。

## 2. 研究の目的

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法で作製した組換えタンパク質を用いたスクリーニングによって、ブースト効果が期待できる新規伝搬阻止ワクチン候補抗原として、生殖母体で発現する複数のマラリア原虫タンパク質を見いだした。本研究ではこれらのタンパク質に対する抗血清が、実際に伝搬阻止活性を有するか否かについて、流行地のマラリア患者から採血した原虫を用いた人工吸血法（メンブレンフィーディング法）によって検討し、流行地住民の自然感染による免疫のブースト効果が期待できるマラリア伝搬阻止ワクチンの開発をめざした。

## 3. 研究の方法

### (1) コムギ胚芽無細胞法を用いた組換えタンパク質の大量合成と抗血清の作製

三日熱マラリア原虫生殖母体表面に発現するタンパク質 (Pvs230) の基本構造であるEGF様ドメインをもとに6個の部分に分けて作成した発現プラスミドから、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて、組換えPvs230の大量合成及びアフィニティー精製を行った。また、新たな伝搬阻止ワクチン候補タンパク質についても、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いてタンパク質の合成、精製を行った。精製した組換えタンパク質でウサギ、マウスを免疫し、抗血清を作製した。抗体価の検定を、組換えタンパク質を用いたELISA法および三日熱マラリア原虫を用いた間接蛍光抗体法によって実施した。

### (2) 調査研究実施国

タイ王国西部ミャンマーとの国境に位置するMae Sod及びカンチャナブリ地域に設定した調査地において研究を実施した。対象地域

内のマラリア診療所を訪れた三日熱マラリア患者の血液を、インフォームドコンセントを得た後に肘静脈から採血して研究に用いた。

### (3) 抗血清の伝搬阻止活性の測定

患者から採血した生殖母体を含む血液と伝搬阻止ワクチン候補抗原で免疫したウサギ抗血清及び正常ヒト血清を混合し、メンブレンフィーダーを用いてタイ王国の主要なマラリア媒介蚊である*Anopheles dirus* に吸血させた（メンブレンフィーディング法）。

十分に吸血した蚊を選別して1週間室温で飼育した後に、個別に蚊を解剖し、中腸壁に形成された原虫（オーシスト）数を顕微鏡下で算定し、抗血清の伝搬阻止活性を評価した。コントロール血清を吸血させた蚊に形成されたオーシスト数と、抗血清を吸血させた蚊のオーシスト数とを比較して、伝搬阻止活性の評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 組換え Pvs230 タンパク質の作成

Pvs230 を Fig1. に示すように7個のFGFドメインの2個ずつを含むように発現プラスミドを作成し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて、タンパク質の大量合成とアフィニティー精製を行ったところ、Fig2. に示すようにそれぞれの組換えタンパク質が合成されていた。

Fig1. 各組換え Pvs230 の発現部位

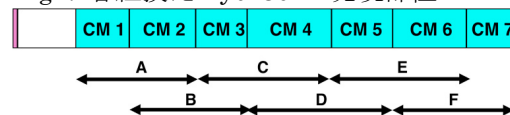
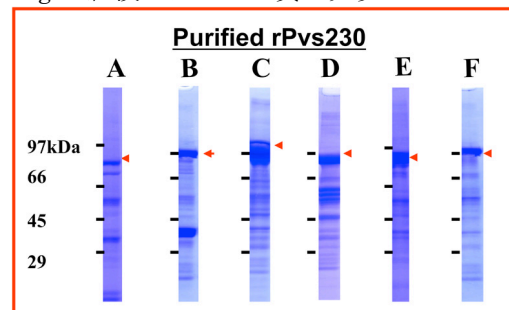


Fig2. 組換えタンパク質の発現



作成された組換えタンパク質 (rPvs230A、rPvs230B、rPvs230C、rPvs230D、rPvs230E、

rPvs230F) を抗原としてウサギを免疫して抗血清を作成した。

(2) 抗血清の三日熱マラリア患者血液中の虫体(生殖母体)に対する反応性の検討

ウサギ抗血清の三日熱マラリア原虫に対する反応性を確認するために、生殖母体を含む患者血液を抗原としたウエスタンブロット(Fig3.)を実施した。

また、三日熱マラリア患者血液を抗原とする間接蛍光抗体法を用いてウサギ抗血清の抗原特異性を検討した(Fig4.)。

その結果、ウサギ抗血清は全てタイ国の三日熱マラリア患者血液中の生殖母体の虫体表面の Pvs230 に特異的に反応することが確認された。

Fig3. 抗血清の反応性(ウエスタンブロット)

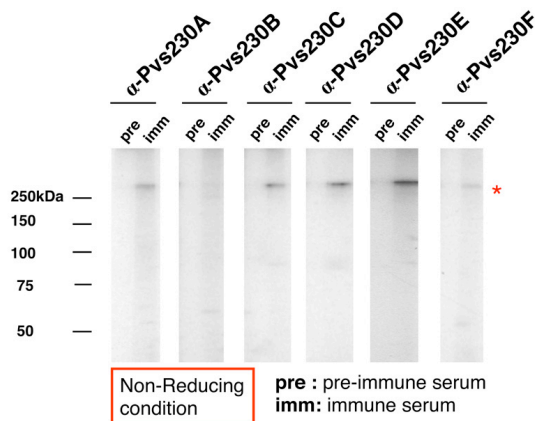
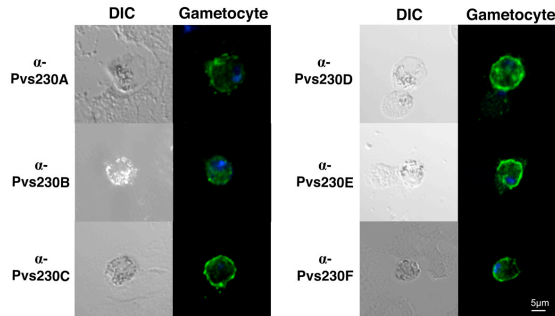


Fig4. 間接蛍光抗体法による抗血清の反応性



(3) 三日熱マラリア原虫生殖母体表面抗原 Pvs230 を抗原とするワクチン効果の判定

作成したウサギ抗血清のうち三日熱マラリア原虫生殖母体に対して強い反応性を示した抗 Pvs230D 抗体および抗 Pvs230E 抗体を用いて伝搬阻止活性の検討を行った。タイの

マラリア診療所を訪れた三日熱マラリア患者から採血した血液に、ウサギ抗血清をいくつかの希釈倍率で加えたものを、人工吸血装置を用いて蚊に吸血させ、約 20 日後に中腸に形成されたオーシスト数を計測した結果、Fig5、Fig6 に示すように、抗血清添加群で優位なオーシスト数の減少が認められた。

Fig5. 抗 Pvs230D 抗体の伝搬阻止活性

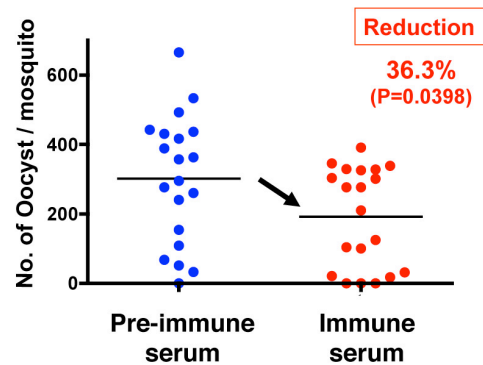
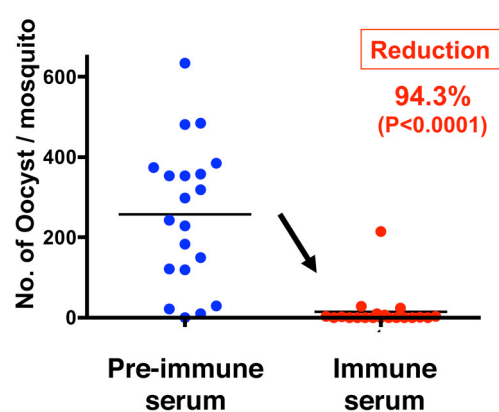


Fig6. 抗 Pvs230E 抗体の伝搬阻止活性



以上の結果から、組換え Pvs230 タンパク質は三日熱マラリアの伝搬阻止ワクチン候補抗原であることが示された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Tachibana M, Satoh C, Otsuki H, Sattabongkot J, Kaneko M, Torii M, Tsuboi T. *Plasmodium vivax* gametocyte protein Pvs230 is a novel transmission-blocking vaccine candidate. *Vaccine*, 30 (10): 1807-1812, 2012. 査読あり

- ② Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Muratova O, MacDonald NJ, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. N-terminal pro-domain of Pfs230 synthesized using cell-free system is sufficient to induce the complement dependent malaria transmission-blocking activity. Clin Vaccine Immunol, 18(8): 1343-1350, 2011. 査読有り

[学会発表] (計8件)

- ① 橘真由美、石野智子、横内ゆき、坪井敬文、鳥居本美 ネズミマラリア原虫の蚊人工吸血法(メンブレンフィーディング法)の確立 第81回日本寄生虫学会、西宮市、2012年3月23-24日
- ② 宮田健、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、鳥居本美、新川武 三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原(Pvs25)の高分子量化による可溶性凝集体構築とそのワクチン効果 第81回日本寄生虫学会、西宮市、2012年3月23-24日
- ③ Tachibana M, Sudo M, Yokouchi Y, Ishino T, Tsuboi T, Torii M. Identification of novel molecule that is specifically expressed on the surface of microgamete. MAM 2012 Conference (Molecular Approaches to Malaria), Lorne, Victoria, Australia, February 19-23, 2012
- ④ 橘真由美、須藤萌、横内ゆき、石野智子、坪井敬文、鳥居本美 雄性生殖体に発現する新規伝搬阻止ワクチン候補抗原の同定 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年7月17~18日
- ⑤ Kangwanrangsan Niwat、橘真由美、坪井敬文、石野智子、鳥居本美 マラリア原虫スオオキネート表面に発現する新規タンパク質の同定と性状解析 第80回日本寄生虫学会、東京都、2011年7月17~18日
- ⑥ Rachaneeporn Jenwithisuk, Niwat Kangwanrangsan、橘真由美、石野智子、坪井敬文、鳥居本美 A novel protein is targeted to the crystalloids of

*Plasmodium yoelii* ookinetes 第79回日本寄生虫学会、北海道、2010年5月20-21日

- ⑦ 橘真由美、石野智子、Rachaneeporn Jenwithisuk, Niwat Kangwanrangsan、横内ゆき、Statabongkot Jetsumon、坪井敬文、鳥居本美 コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いた三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原Pvs230の作製 第79回日本寄生虫学会、北海道、2010年5月20-21日
- ⑧ Mayumi Tachibana, Hideyuki Iriko, Olga Muratova, Guanhong Song, Yimin Wu, Jetsumon Sattabongkot, Satoru Takeo, Hitoshi Otsuki, Motomi Torii, Takafumi Tsuboi. Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58<sup>th</sup> Annual meeting, Washington, DC, USA, November 18-22, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/parasitology/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥居 本美 (TORII MOTOMI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20164072

### (2) 研究分担者

橘 真由美 (MAYUMI TACHIBANA)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00301325