

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05282

研究課題名(和文) マルチプレックス法と流行地住民コホートをを用いたマラリア・ワクチン候補抗原の発掘

研究課題名(英文) Vaccine candidate discovery for malaria with multiplex assay and cohort study in endemic area.

研究代表者

藤井 仁人 (FUJII, Yoshito)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：10404237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：新たなマラリアワクチン候補を発掘するために、ケニア共和国内の流行地にある小学校を調査地として選定した。在籍する小学生全員を対象としたマラリア発症についての追跡調査を半年間行う事で、対象者の免疫状態を正確に知る事ができた。マラリアに対する免疫状態が明らかな血液検体を得られたので、含まれる抗体を用いた新たな候補抗原の探索が可能となった。期間内にワクチン候補を同定する事はできなかったが、今後継続して完結させる。

研究成果の概要(英文)：To identify new vaccine candidate for malaria, we set a research field at a primary school in malaria endemic area in Republic of Kenya. Through 6 months follow-up study about malaria infection targeting all of pupils, we got reliable immunological status to malaria of them. By using collected blood samples, including specific antibodies, it will be possible to identify new vaccine candidates. We will continue this research until it succeeds.

研究分野：生化学、血清疫学

キーワード：マラリアワクチン コホート研究

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは、主に熱帯地で流行している媒介蚊により伝播する原虫感染症であり、患者数は全世界で 10 億人以上、年間の犠牲者が 100~300 万人と言われる世界最大規模の感染症である。特に、熱帯熱マラリアは重症化のリスクが高く、実用に堪えられるワクチン開発が望まれている。しかし、マラリア原虫の生物学的特性から、有効なワクチンの開発には未だ至っていない。これまでに 10 種を超えるワクチン候補が臨床試験段階に入っているものの、成功したとは言い難く、新たなワクチン候補となる抗原の発掘が望まれている。

一方、マウスモデルやプロテイン・アレイ等による網羅的な探索を含む実験室での検討から、多数のワクチン候補となる抗原が同定されており、それらの中に、有望なワクチン抗原が含まれている可能性がある。しかし、マウスモデルを用いる評価結果は、必ずしもヒトでは再現されておらず、また、サル・モデルによる安全性と有効性の評価やヒトでの臨床試験によるワクチン候補抗原の評価を行うには、膨大な時間と予算を要する。従って、その候補抗原すべてに対し、これまでの方法を用い、評価することは不可能に近く、ワクチン開発に向けての障害となっている。

一つの解決方法は、マラリア感染状態を正確に掴んだヒト検体を入手し、効率の良いアッセイ系により多数の候補抗原の比較・評価を一括して行う事により、定型的な評価の前に候補抗原の絞り込みをする事である。

流行地では、繰り返し感染する事により免疫を獲得し、かつ症状の無い不顕性感染者の存在が知られている。この事は、感染抵抗性の獲得が難しい事と共に、発症を抑えるワクチン、あるいは重症化を防ぐワクチンが、より有望である事を示唆している。発症抑制ワクチンを開発するためには、不顕性感染者を検出する必要があり、流行地での疫学的な調査が必須となる。

効率良く候補抗原の比較を行うには、一括して多数の抗原を比較・評価できる Luminex 社のマルチプレックス法が有用と考えた。

## 2. 研究の目的

流行地に設定したコホートにおいて、マラリア発症の追跡調査と血液検体の採取を行う事で、対象者のマラリアに対する免疫状態（感受性、不顕性、抵抗性）を把握

する事で、ワクチン候補抗原の評価のための検体を収集し、マルチプレックス法による候補抗原の比較・評価を目的とした。計画当初は、すでに報告のある候補抗原の評価のみを目的としていたが、まずは自ら探索同定を行う事に変更した。最終的には、自ら見出す新規な候補抗原と、すでに報告された候補とを合わせて、マルチプレックス法による比較検討を行う。主目的はワクチン候補の同定であるが、血清学的な感染検査抗原としての評価も二次的な目的とした。ケニア側共同研究者からの希望があったため、マラリア発症の疫学的な調査も目的に加えた。

## 3. 研究の方法

ケニアのマラリア流行地である Busia 県にある Alupe 小学校を対象地とし、生徒全員のうち同意が得られた者約 600 人を対象として、マラリア発症に関する追跡調査を約半年間に渡って行った。発熱等のマラリアが疑われる症状が出た生徒は、全員が共同研究先であるケニア中央医学研究所の Busia 研究所内で採血によるマラリア診断を行うよう誘導した。診断には、簡易診断キットと血液スメアの顕微鏡検査を用いた。発症者の追跡だけでは不顕性感染者の検出ができないので、生徒全員からの採血を研究期間中に 2 度学校において行い、血液中のマラリア原虫の有無を検査した。

顕微鏡検査は検査技師の技量への依存が大きいので、PCR 法を用いて分子レベルでの診断も導入する事とした。

なお、現在はケニア国外への検体持ち出しが難しくなっているので、全ての実験を長年の共同研究先であり機器等も整備済みであるケニア中央医学研究所内で行う事とした。

また、マラリア感染についての疫学的な解析を視野に、調査員が生徒全員の自宅を訪問し、自宅位置、家屋の形態、蚊帳の使用状況などの調査を行った。

## 4. 研究成果

本研究では追跡調査が最もハードルが高いポイントと考えた。慎重を期して、大まかな感染状況の把握と調査システムの確認のための予備調査を 1 ヶ月間行った。ところが、長期間に渡る教員のストライキにより、予備調査の開始が大幅に遅れ、そのため、当初 1 年間の追跡調査を予定していたが、半年間に短縮せざるを得なかった。

そのためマラリア発症についての季節的な解析は諦めざるを得なかったが、マラリアに対する免疫状態については、少なくとも抗原評価に耐えられる数の検体は確保できたと考えている。

流行地では繰り返し感染する事で免疫を獲得できるので、一定年齢以上を免疫獲得グループとした先行研究も見受けられるが、我々の検討では免疫獲得では個人差が大きく、年齢での線引きでは不正確であり、個人の追跡調査の重要性が明らかになった。

マラリア診断のための顕微鏡検査と簡易診断キットの間に予想以上に多くの乖離が見られ、また多くの非熱帯熱マラリアが検出された。そこで、PCR法による分子診断を試みたが、初期から実験室内でのコンタミネーションが発生したため、まずはその対策を打った。PCRプロダクトによる汚染と考えられたので、汚染試薬の同定、現地スタッフへのトレーニングを行い、最終的にはPCR前後で実験室と機器試薬を分離し、解決できたと考えている。実験環境と人材育成の両者が揃わなければ正確な結果は出せないが、特に人材育成には時間がかかる。一般に途上国から国外への検体持ち出しが難しくなっているので、現地での粘り強い能力向上は避けられず、我々も継続して分子診断を行う。

解析に耐えられる診断結果が揃ったら、候補抗原の比較・評価に用いる事ができる上、疫学的な解析も可能となる。

当初の目的を達成するには、PCR法による診断を今後も継続し、信頼できる検体を増やしていく。しかし、おそらくその完了には時間がかかる。幸い追跡調査では情報量が多いため、すでに得られた診断情報からでも免疫学的な状態を間違えなく判定できるサンプルを、各グループ(感受性、不顕性、抵抗性)につき一定数は得る事が出来た。特に目指している新規な発症抑制ワクチン同定を行うには十分な数の検体を得る事が出来た。独自の候補抗原同定は、不顕性感染グループの血液サンプルから抗体を精製し、工夫して抵抗性に関与しない抗体を除いた後、マラリア原虫の溶解溶液からのプルダウン法により候補抗原を選択する。得られた候補抗原は、LC/MS/MS法により同定する。これまでケニア国内の政治的混乱も手伝って、プルダウン法に必要な検体の日本への持ち出し許可が下りなかったために、研究期間内に結果を得る事が出来なかったが、現在のケニアは政治的に落ち着いて来ており、またケニア国内で困難な実験を国外で行うので、認可の手応えを得ている。国内の準備として精製マラリア原虫は入手しており、またLC/MS/MSまでの試薬と共同研究などの段取りは付いているので、検体を入手次第、直ちに候補の同定を行う。

独自の候補抗原が得られたら、他の候補抗原と合わせてマルチプレックス法を構築し、ワクチン抗原としての比較・評価を行う。解析の視点を変える事で、血清診断のための検査抗原としての評価も可能と考えている。

## 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 仁人 (FUJII, Yoshito)  
長崎大学・熱帯医学研究所・准教授  
研究者番号：10404237

### (2) 研究分担者

金子 聡 (KANEKO, Satoshi)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号：00342907

後藤 健介 (GOTO, Kensuke)  
大阪教育大学・学校危機サポートセンター・准教授

研究者番号：60423620

(3)連携研究者  
なし。

(4)研究協力者

Matilu Mwau  
ケニア中央医学研究所

Samson Muuo Nzou  
ケニア中央医学研究所

Joan Josephine Wangui  
長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点

Anne Mwangi  
ケニア中央医学研究所