

令和元年5月14日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05815

研究課題名(和文)ハマダラカ唾液抗体価を指標とした「マラリア感染危険度」評価法の開発

研究課題名(英文) Development of a new evaluation tool for measuring malaria infection risk based on antibody responses to Anopheles saliva protein

研究代表者

吉田 栄人 (Yoshida, Shigeto)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10296121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ハマダラカによる吸血(暴露)頻度をマラリアに対する「感染危険度」として数値化することにより、ベクターコントロールに対する新しい評価手法を開発することを目的とする。インドネシアとの海外共同研究において、マラリア感染地域であるインドネシア スンバ島の住民から採血した血液を使って、我々が独自に発見したハマダラカ唾液タンパクAAPP(大腸菌発現)に対する抗体価を測定した結果、コントロールである日本人と比較してスンバ島住民の血清には抗AAPP抗体が非常に高いことが確認された。但し、非特異的に反応する血清も見られたことより、小麦胚芽無細胞系での抗原タンパクの発現・精製を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア感染地域住民のハマダラカ唾液に対する抗体価を季節毎(雨季乾季)に測定し、その季節変動とマラリア感染率との相関関係を解明することが可能となる。これにより、衛生動物学的手法と血清疫学的手法を融合でき、マラリアベクターコントロールの有効性を評価することに加えて再流行のリスク管理に有効な手法となる。さらには、インドネシア島嶼群のマラリア疫学調査および三日熱マラリアワクチンの抗原性評価研究成果をもって、日本-インドネシア二国間の持続的研究協力体制を確立することができる社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to determine whether the IgG antibody response to the Anopheles stephensi saliva antigen, AAPP, is an immuno-epidemiological marker of exposure specific to Anopheles mosquito bites in the Sumba Islanders in Indonesia. Recombinant AAPP was produced in E. coli system. Anti-AAPP IgG prevalences and levels were significantly higher in the sera of the Sumba Islanders as compared to non-exposed Japanese controls. These observations show that the AAPP is immunogenic, evokes in exposed individuals an IgG antibody response. This initial test provided encouraging preliminary information on the immunogenicity of the AAPP protein; however, the E. coli-expressed AAPP generated a relatively high background in control sera (i.e. sera from individuals not exposed to Anopheles bites) even though it was apparently pure. We are trying to establish another protocol for recombinant AAPP using cell-free system without any trace of bacterial contamination.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア ハマダラカ 唾液タンパク バイオマーカー 抗体価

1. 研究開始当初の背景

マラリア感染地域では、ベクターコントロールと薬物治療法という異なる介入試験をしばしば同時に実施しており、それぞれの有効性を正確に評価する適正な方法がない。たとえば殺虫剤含有の蚊帳 (ITNs) や蚊取り線香 (SR) によるマラリアベクターコントロールの効果はマラリア感染率低下と吸血頻度減少で評価されるが、前者はマラリア伝播率が低い地域ではほとんど差はでない。後者は、ヒューマンベイトによる蚊の捕獲の困難さ、ITNs や SR を家々で適切に使用していることを前提としている不確かさがある。さらにデータ解析に必要な十分量のデータを同時期に収集することは難しい。マラリア流行率増加・低下を吸血頻度と連結させる「マラリア感染危険度」という新たなクライテリアの設定が望まれている。

マラリア抗体疫学調査の最大の難点は、現地住民の血清が大腸菌組換えタンパクに対して非特異的に反応することが頻繁に見られることである。このため、高純度精製タンパクを抗原とすることが不可欠である。好ましくは合成ペプチドを使用することで検査の標準化が可能となるが、その場合は抗原の B 細胞エピトープ解析が必要となる。

2. 研究の目的

本研究は、吸血性節足動物による吸血 (暴露) 頻度を病原体に対する「感染危険度」として数値化することにより、ベクターコントロールに対する新しい評価手法を開発することを目的とする。具体的手法としてインドネシア、バングラデシュとの海外共同研究において、マラリアベクターであるハマダラカへの暴露頻度をモニターする。マラリア感染地域住民のハマダラカ唾液に対する抗体価を季節毎 (雨季乾季) に測定し、その季節変動とマラリア感染率との相関関係を解明する。これにより、衛生動物学的手法と血清疫学的手法を融合でき、マラリアベクターコントロールの有効性を評価することに加えて再流行のリスク管理に有効な手法となる。さらには、インドネシア島嶼群のマラリア疫学調査および三日熱マラリアワクチンの抗原性評価研究成果をもって、日本・インドネシア二国間の永続的研究協力体制を確立することである。

3. 研究の方法

インドネシア島嶼部 (スンバ島) では未だ年間 10% 前後がマラリアに罹患する中程度マラリア流行地域であり、マラリアコントロールが求められている。その対策として殺虫剤含有の蚊帳や蚊取り線香によるマラリアベクターコントロール (媒介蚊の制御) が試みられているが、効果を判定する適正な方法がない。そこでハマダラカがマラリア原虫を伝搬する際に必ず注入する唾液タンパクに注目し、それに対する宿主の免疫応答をベクター暴露率とみなす新規のバイオマーカーを開発する。スンバ島に赴き、共同研究者と共に現地住民の採血を行う。このサンプルを用いて、AAPP 抗体価測定に関して、採取した血清について 7 種類の組換え AAPP タンパクに対する抗体価を ELISA にて測定する。マラリア感染率と AAPP 抗体価の変動を数値化し、相関性を明らかにする (データ解析)。AAPP 抗体価が高い検体については、断片化した組換え AAPP 5 種を用いて AAPP B 細胞エピトープの分布解析を行い、ユニバーサル合成ペプチドを設計する。

4. 研究成果

スンバ島住人延べ 3,000 人を対象とした先行研究では、蚊の増える雨季に AAPP 抗体価が上昇することが明らかとなっており、このことから継続的な研究が必要であると考えられる。2017 年 8 月に 11 日間、日本側研究者 5 名がインドネシア島嶼群のマラリア感染地域であるスンバ島に滞在し、相手国研究者とともにマラリア感染流行地域での疫学調査を行った。共同研究者、看護師及び顕微鏡技師からなるマラリア研究グループのフィールド調査に同行し、現地住人の体温測定、採血、マラリア迅速診断キット及び血液塗抹標本によるマラリア感染有無の評価ならびに一般血液検査などを実施した。調査後の会議において共同研究者とともに血清調査の進捗情報を共有する一方で、渡航期間ならびに 2017 年に採取されたマラリア感染者血清 (100 名分) ならびに非感染者血清 (60 名分) の提供を受けた。薄・濃血液塗抹標本を作製しギムザ染色を行い、マラリア感染率を確認した。2018 年はインドネシアに赴き共同研究者である Syafruddin 博士のエクマン研究所 (ジャカルタ市) で研究ミーティングを行った。ハサウディン大学 (マカッサル市) にも訪問し、共同研究者である Yenni Yusuf 博士、Isra Wahid 博士と研究ミーティングを行った。同時にハサウディン大学で医学部学生を対象としたセミナーを開催し、学生と交流を図り、本プロジェクトの次の世代を担う若手研究者に本共同研究の意義を説明した。さらに、マカッサル市郊外のスラベシ島熱帯雨林地域で Isra Wahid 博士と共同でマラリア媒介蚊のフィールド調査を実施した。この調査にはインドネシア若手研究者が中心となってライトトラップによる蚊の捕獲を行い、ハマダラカの種類を鑑別した。AAPP および各種マラリア特異抗体価の検出については、高純度精製タンパク抗原を準備し実験に供したがそれでも非特異的反応を抑えることには至っていない。現在は引き続き大腸菌発現系とは異なる小麦胚芽無細胞系での抗原タンパクの発現・精製を実施している。すでにミニスケールでの発現は確認している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- (1) Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Yoshida M, Mizukami H, Fukumoto S, Yamamoto DS, Alam A, Emran TB, Amelia F, Islam A, Otsuka H, Takashima E, Tsuboi T, Yoshida S. Adeno-associated virus as an effective malaria booster vaccine following adenovirus priming. *Front Immunol*. 2019. in press (査読有り)
- (2) Islam A, Emran TB, Yamamoto DS, Iyori M, Amelia F, Yusuf Y, Yamaguchi R, Alam MS, Silveira H, Yoshida S. Anopheline antiplatelet protein from mosquito saliva regulates blood feeding behavior. *Sci Rep*. 9(1):3129, 2019. (査読有り)
- (3) Amelia F, Iyori M, Emran TB, Yamamoto DS, Genshi K, Otsuka H, Onoue Y, Yusuf Y, Islam A, Yoshida S. Down-selecting circumsporozoite protein-based malaria vaccine: a comparison of malaria sporozoite challenge model. *Parasite Immunol*. 2019. (査読有り)
- (4) Emran TB, Iyori M, Ono Y, Amelia F, Yusuf Y, Islam A, Alam A, Tamura M, Ogawa R, Matsuoka H, Yamamoto DS, Yoshida S. Baculovirus-induced fast-acting innate immunity kills liver-stage *Plasmodium*. *J. Immunol*. 201(8):2441-2451, 2018. (査読有り)
- (5) Yoshida K, Iyori M, Blagborough AM, Salman AM, Dulal P, Sala KA, Yamamoto DS, Khan SM, Janse CJ, Biswas S, Yoshii T, Yusuf Y, Tokoro M, Hill AVS, Yoshida S. Adenovirus-prime and baculovirus-boost heterologous immunization achieves sterile protection against malaria sporozoite challenge in a murine model. *Sci Rep*. 8(1):3896, 2018. (査読有り)
- (6) Iyori M, Blagborough AM, Sala KA, Nishiura H, Takagi K, Yoshida S. Protective efficacy of an IL-12-expressing baculoviral malaria vaccine. *Parasite Immunol*. 39(12) 2017. (査読有り)
- (7) Iyori M, Yamamoto DS, Sakaguchi M, Mizutani M, Ogata S, Nishiura H, Tamura T, Matsuoka H, Yoshida S. DAF-shielded baculovirus-vectored vaccine enhances protection against malaria sporozoite challenge in mice. *Malar J*. 16:390, 2017. (査読有り)
- (8) Mizutani M, Fukumoto S, Soubeiga AP, Soga A, Iyori M, Yoshida S. Development of a *Plasmodium berghei* transgenic parasite expressing the full-length *Plasmodium vivax* circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model. *Malar J*. 15(1):251, 2016. (査読有り)
- (9) Tamura T, Kawabata C, Matsushita S, Sakaguchi M, Yoshida S. Malaria sporozoite protein expression enhances baculovirus-mediated gene transfer to hepatocytes. *J Gene Med*. 18(4-6):75-85, 2016. (査読有り)

〔学会発表〕(計 28 件)

- (1) 吉田 栄人. ウイルスベクタープラットフォームを基盤とした乳児用次世代型マラリアワクチン. 2019年3月20-23日 日本薬学会第139年会 ホテルニューオータニ幕張(千葉)
- (2) 伊従 光洋, Emran TB, 小野 祐希, 吉田 栄人. The impact of baculovirus-induced innate immunity on elimination of the liver-stage *Plasmodium* through interferon signaling. 2019年3月13-15日 第88回日本寄生虫学会大会, 長崎大学(長崎)
- (3) 辻村 聡恵, 伊従 光洋, Emran TB, 吉井 達也, 吉田 栄人. 強力な抗肝臓期マラリア原虫効果を発揮する自然免疫応答. 2018年10月13-15日 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会 山口大学(山口)
- (4) 堀 直人, 伊従 光洋, 吉田 邦嵩, Emran TB, 島田 聡, Islam A, 志田 壽利, 吉田 栄人. 組換えワクシニアウイルス LC16m8 のマラリアワクチンとしての新規アプローチ. 2018年10月13-15日 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会 山口大学(山口)
- (5) 小野 祐希, 伊従 光洋, Emran TB, 田村 めぐみ, 尾上 裕太郎, 小川 良平, 吉田 栄人. パキユロウイルス投与による肝臓期マラリア原虫の殺傷メカニズムに関する研究. 2018年10月13-15日 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会 山口大学(山口)
- (6) 山下 陽夏, 伊従 光洋, 山口 莉理夏, Isram A, 吉井 達也, 吉田 栄人. 感染症媒介蚊由来唾液タンパクの種間比較. 2018年10月13-15日 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会 山口大学(山口)
- (7) 山越 彩葉, 伊従 光洋, 堀 直人, Emran TB, 志田 壽利, 吉田 栄人. 組換えワクシニアウイルス LC16m8 を基盤としたマラリアワクチンの感染防御効果の検討 (II). 2018年10月13-15日 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会 山口大学(山口)
- (8) 伊従 光洋, Emran TB, 小野 祐希, 松岡 裕之, 山本 大介, 吉田 栄人. 肝臓期マラリア原虫を完全排除可能な非感染性ウイルスベクターに関する研究. 2018年10月13-15日 第74回日本寄生虫学会西日本支部大会 山口大学(山口)
- (9) Emran TB, Iyori M, Yoshida S. Baculovirus-induced innate immunity confers complete

- protection against *Plasmodium* pre-erythrocytic stage parasites. 14th International congress of parasitology. 2018年8月18-25日 ICOPA 2018 韓国(大邱)
- (10) Iyori M, Yoshida K, Yusuf Y, Emran TB, Yoshii T, Hashizume H, Shimada S, Yamamoto DS, Fukumoto S, Mizukami H, Yoshida S. Development of a novel malaria vaccine based on heterologous prime-boost immunization regimen using adenovirus and adeno-associated virus vectors. 14th International congress of parasitology. 2018年8月18-25日 ICOPA 2018 韓国(大邱)
 - (11) Islam A, 伊従 光洋, 山本 大介, Emran TB, 都野 展子, 山口 莉理夏, Amelia F, Yenni Y, Silveira H, 吉田 栄人. 唾液タンパク AAPP を欠損したトランスジェニックハマダラカの吸血行動の著しい制約. 第70回日本衛生動物学会 2018年5月11日 帯広畜産大学(帯広)
 - (12) 伊従 光洋. マラリアワクチン開発を基盤とした新規感染用ワクチンプラットフォームの創出 非感染性バキュロウイルスナノ粒子ワクチンシステムの開発研究 -. 第120回日本小児科学会学術集会 2018年4月19-22日福岡国際会議場(福岡)
 - (13) Fitri A, 伊従 光洋, 玄師 健人, 尾上 裕太郎, Talha BE, Yenni Y, 吉田 栄人. マラリア PfCSP タンパクのワクチン抗原としての免疫原性および感染防御効果の検討. 日本薬学会第138年会 2018年3月25-28日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
 - (14) Islam A, 伊従 光洋, 山本 大介, Emran TB, 都野 展子, 山口 莉理夏, Silveira H, 吉田 栄人. コラーゲン誘導性血小板凝集阻害活性を有するハマダラカ唾液タンパク AAPP の機能を喪失すると吸血行動が制限される. 日本薬学会第138年会 2018年3月25-28日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
 - (15) Yenni Y, 吉田 邦嵩, 伊従 光洋, 吉井 達也, 橋爪 洋樹, 島田 聡, 水上 浩明, 山本 大介, 福本 晋也, 吉田 栄人. アデノウイルスとアデノ随伴ウイルスを用いた heterologous prime-boost immunization によるマラリアワクチンの開発研究. 日本薬学会第138年会 2018年3月25-28日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
 - (16) 大塚 広夢, 島田 聡, 伊従 光洋, 吉田 邦嵩, 吉田 栄人. ウイルスベクターと組換えタンパクを組み合わせたマラリアワクチンの開発研究. 日本薬学会第138年会 2018年3月25-28日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
 - (17) 吉井 達也, 伊従 光洋, 吉田 邦嵩, 島田 聡, Yenni Y, 水上 浩明, 吉田 栄人. アデノ随伴ウイルスベクターを用いたマラリアワクチン開発研究. 日本薬学会第138年会 2018年3月25-28日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
 - (18) 堀 直人, 伊従 光洋, 吉田 邦嵩, Emran TB, 島田 聡, 志田 壽利, 吉田 栄人. 組換えワクシニアウイルス LC16m8 のマラリアワクチン効果. 日本薬学会第138年会 2018年3月25-28日 TKP 金沢新幹線口会議室(金沢)
 - (19) 伊従 光洋. ウイルスベクターを基盤としたマラリアワクチンの開発. 日本薬学会第138年会 2018年3月25-28日 ホテル金沢(金沢)
 - (20) Islam A, Talha BE, Yamamoto DS, Iyori M, Fitri A, Yenni Y, Tuno N, Yoshida S. Transgene mediated inhibition of collagen-induced platelet aggregation by Anopheline Anti-Platelet Protein, regulates probing time and blood feeding success in malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. 第35回北陸病害動物研究会 2017年7月1日金沢医科大学(金沢)
 - (21) Alam A, Iyori M, Yoshida K, Yusuf Y, Sala KA, Blagborough AM, Takashima E, Tsuboi T, Yoshida S. Protective efficacy of viral vectored *Plasmodium falciparum* malaria vaccines by the prime-boost immunization regimen. 第86回日本寄生虫学会 2017年5月28-29日北海道大学(札幌)
 - (22) 伊従 光洋, 吉田 邦嵩, Ahmed S, Dulal P, Shahid K, Biswas S, 所 正治, Blagborough AM, Adrian H, 吉田 栄人. Protective efficacy of viral vectored *Plasmodium falciparum* malaria vaccines by the prime-boost immunization regimen. 第86回日本寄生虫学会 2017年5月28-29日北海道大学(札幌)
 - (23) Yoshida K, Iyori M, Salman AM, Dulal P, Khan SM, Janse CJ, Biswas S, Tokoro M, Blagborough AM, Hill AVS, Yoshida S. *Plasmodium falciparum* CSP vaccine based on a heterologous adenovirus prime and baculovirus-boost immunization regimen confers sterile protection against transgenic *P. berghei* sporozoite challenge. The U.S. Japan Cooperative Medical Sciences Program Presents the 19th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) 2017年2月7日-10日 Seoul (韓国)
 - (24) Iyori M, Blagborough AM, Ogata S, Nishiura H, Sakaguchi M, Mizutani M, Tamura T, Genshi K, Shimada S, Yamamoto DS, Matsuoka M, Yoshida S. Vectored PfCSP Vaccines based on Baculovirus Dual Expression System and AdHu5 induce Strong Protective Efficacy against Transgenic *Plasmodium berghei*. 65th ASTMH Annual Meeting 2016.11.13-17Atlanta,
 - (25) Yoshida K, Iyori M, Salman AM, Dulal P, Khan SM, Janse CJ, Biswas S, Tokoro M, Blagborough AM, Hill AVS, Yoshida S. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen. 第57回日本熱帯医学会大会 2016年11月5-6日 一橋大学(東京)

- (26) 吉田邦嵩, Salman AM, Dulal P, Khan SM, Janse CJ, Biswas S, 所 正治, 伊従 光洋, Blagborough AM, Adrian V.S. Hill, 吉田 栄人. アデノウイルスベクターとバキュロウイルスベクターを用いた新規ワクチンプラットフォームによる熱帯熱マラリアワクチンの開発. 72 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2016 年 10 月 15-16 日 岐阜大学 (岐阜)
- (27) Yoshida K, Salman AM, Dulal P, Khan SM, Janse CJ, Biswas S, Tokoro M, Iyori M, Blagborough AM, Hill AVS, Yoshida S. A hybrid *Plasmodium falciparum* malaria vaccine based on adenovirus-prime and baculovirus-boost immunization regimen. 第 14 回松山国際学術シンポジウム. 2016 年 9 月 15-26 日 愛媛大学 (松山)
- (28) 伊従 光洋, 吉田 栄人. 蚊唾液タンパクの能動免疫によるネズミマラリア原虫に対する感染防御効果. 第 68 回日本衛生動物学会 2016 年 4 月 16 日 栃木県総合文化センター (宇都宮)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：組換えアデノ随伴ウイルスを含むマラリアワクチン

発明者：吉田 栄人、水上 浩明、伊従 光洋、吉井 達也

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特願 2019-019247

出願年：2019

国内外の別：国内

名称：マラリアワクチン

発明者：吉田 栄人、志田 壽利、伊従 光洋、堀 直人、吉田 邦嵩

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特願 2018-038100

出願年：2018

国内外の別：国内

名称：マラリア治療剤、マラリア予防剤及び抗マラリア自然免疫賦活剤

発明者：吉田 栄人

権利者：国立大学法人金沢大学

種類：特許

番号：特願 2018-057311

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊従 光洋

ローマ字氏名：IYORI Mitsuhiro

所属研究機関名：金沢大学
部局名：薬学系
職名：准教授
研究者番号(8桁)：20608351

研究分担者氏名：砂原 俊彦
ローマ字氏名：SUNAHARA Toshihiko
所属研究機関名：長崎大学
部局名：熱帯医学研究所
職名：助教
研究者番号(8桁)：50264156

研究分担者氏名：都野 展子
ローマ字氏名：TUNO Nobuko
所属研究機関名：金沢大学
部局名：自然システム学系
職名：准教授
研究者番号(8桁)：60295102

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。