

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 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：2013～2015

課題番号：25305007

研究課題名(和文) 抗蚊唾液抗体価をバイオマーカーとしたマラリアベクターコントロールの評価法開発

研究課題名(英文) IgG responses to mosquito saliva proteins for evaluating human exposure to Anopheles bites

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ハマダラカの唾液タンパクAAPPを大腸菌で発現・精製し、これをELISA抗原として、スンバ島での住民の血清2617検体の抗AAPP抗体価を調べた結果、雨季の蚊の発生が多い時期には、抗AAPP抗体価は乾季のそれと比較して優位に上昇していた。特に、熱帯熱マラリアに感染している住民血清にはその上昇が顕著であった。三日熱マラリア感染者間では低い上昇であった。これは、三日熱マラリアに特有のヒブノゾイトによる再燃感染が原因であると推察している。以上の結果から、抗AAPP抗体価を追跡調査する事によりハマダラカに対する暴露、さらにはマラリア感染アウトブレイクを予想することが可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The IgG Ab level to AAPP was evaluated before, during and after the rainy season in cohorts of residents in Sumba. IgG responses to malaria antigens were also examined. A total of 2,617 samples of the sera were analyzed for the Ab levels in comparison with malaria incidence. In the residents during the rainy season, IgG response against AAPP was significantly increased, and this response was significantly higher in the cohort of individuals infected with *P. falciparum* than those of parasite-free population. Throughout the seasons, IgG levels toward anti-malaria antigens from *P. falciparum* were significantly increased in the cohort of individuals infected with *P. falciparum*, but those against *P. vivax* antigens were relatively weak. Our result demonstrates that anti-AAPP IgG response reflects *P. falciparum* infection during rainy season in response to higher mosquito exposure; hence this biomarker can be a powerful tool for the evaluation of exposure to malaria vector mosquitoes.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア ハマダラカ 唾液タンパク質 インドネシア

1. 研究開始当初の背景

マラリアコントロールの手段として、殺虫剤含有の蚊帳 (ITNs) や蚊取り線香 (SR) 等々が使用され、介入試験によりその効果を評価している。効果の評価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ない。後者は、ITNs や SR を家々で適切に使用していることを前提としており不確かな要素がある。さらに、蚊の捕獲の必要があり、多くのデータを収集することは難しい。このため、介入試験の有効性を正確に評価する新たな「マラリア感染危険度」のクライテリアの設定が望まれている。

2. 研究の目的

インドネシア政府は、2012年10月-2013年3月の間、蚊忌避剤が含有した蚊取り線香 (SR) のマラリア感染率低下効果を調べるために、三日熱マラリア感染地域であるスンバ島で大規模フィールド介入試験を実施する。本研究は、この介入試験統括者である Syafruddin 博士と共同で、我々が独自に発見したハマダラカ唾液タンパク AAPP を用いて介入試験期間とその直後3年間の試験地域住民 (SR 群 vs Placebo 群) の AAPP 抗体価の変動を調べ、マラリア感染率との相関関係を解明することを目的とする。AAPP 抗体価を「マラリア感染危険度」という新しいクライテリアとして定義し、数理予測モデルに導入することにより介入試験のシミュレーションにつながる。研究成果のアウトプットは、現地研究者との追跡調査によりマラリア疫学調査の新システムを開発する。世界のマラリアベクターコントロールの推進およびマラリアアウトブレイクを未然に防ぐ非常に重要で意義深い研究となる。

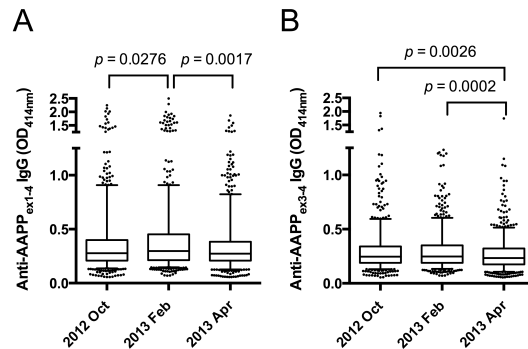
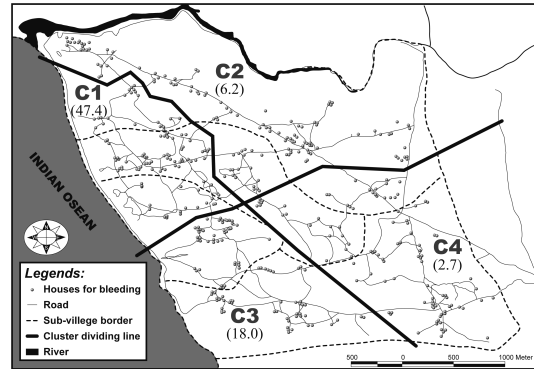
3. 研究の方法

我々は、ハマダラカの唾液よりコラーゲン刺激性の血小板凝集を強力に抑制するタンパク分子 AAPP を発見した。ハマダラカが吸血する際、口吻により傷つけた血管に作用し、血小板凝集止血反応を阻害し、速やかに吸血を終えるための必須分子であると我々は考えている。この AAPP に対する抗体価をマラリア感染地域であるインドネシア スンバ島住民の血清を用いて測定する。

4. 研究成果

スンバ島に調査に赴き、血清および蚊の採取を行った。マラリア媒介蚊であるハマダラカの唾液タンパク AAPP を大腸菌で発現・精製し、これを ELISA 抗原として、スンバ島での住民の血清 2617 検体の抗 AAPP 抗体価を調べた。その結果、雨季の蚊の発生が多い時期には、抗 AAPP 抗体価は乾季のそれと比較して優位に上昇していた。特に、熱帯熱マラリアに感染している住民血清にはその上昇が顕著であった。興味深いことに、三日熱マラリ

ア感染者間では低い上昇であった。これは、三日熱マラリアに特有のヒプノゾイトによる再燃感染が原因であると推察している。以上の結果から、抗 AAPP 抗体価を追跡調査する事によりハマダラカに対する暴露、さらにはマラリア感染アウトブレイクを予想することが可能となると期待される。



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 11件)

Sala, K. A., Nishiura, H., Upton, L. M., Zakutansky, S. E., Delves, M. J., Iyori, M., Mizutani, M., Sinden, R. E., Yoshida, S., and Blagborough, A. M. (2015) The *Plasmodium berghei* sexual stage antigen PSOP12 induces anti-malarial transmission blocking immunity both *in vivo* and *in vitro*. *Vaccine* 33, 437-445 (査読有り)

Mogi, M., Armbruster, P., Tuno, N., Campos, R., and Eritja, R. (2015) Simple Indices Provide Insight to Climate Attributes Delineating the Geographic Range of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Prior to Worldwide Invasion. *J Med Entomol* 52, 647-657 (査読有り)

Mogi, M., and Tuno, N. (2014) Impact of climate change on the distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in northern Japan:

retrospective analyses. *J Med Entomol* 51, 572-579(査読有り)

Bashar, K., and Tuno, N. (2014) Seasonal abundance of *Anopheles* mosquitoes and their association with meteorological factors and malaria incidence in Bangladesh. *Parasites & vectors* 7, 442(査読有り)

Sugiyama, K., Iyori, M., Sawaguchi, A., Akashi, S., Tame, J. R., Park, S. Y., and Yoshida, S. (2014) The crystal structure of the active domain of Anopheles anti-platelet protein, a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody. *J Biol Chem* 289, 16303-16312(査読有り)

Mizutani, M., Iyori, M., Blagborough, A. M., Fukumoto, S., Funatsu, T., Sinden, R. E., and Yoshida, S. (2014) Baculovirus-vectored multistage *Plasmodium vivax* vaccine induces both protective and transmission-blocking immunities against transgenic rodent malaria parasites. *Infect Immun* 82, 4348-4357(査読有り)

Yamamoto, D. S., Yokomine, T., Sumitani, M., Yagi, K., Matsuoka, H., and Yoshida, S. (2013) Visualization and live imaging analysis of a mosquito saliva protein in host animal skin using a transgenic mosquito with a secreted luciferase reporter system. *Insect Mol Biol* 22, 685-693(査読有り)

Sumitani, M., Kasashima, K., Yamamoto, D. S., Yagi, K., Yuda, M., Matsuoka, H., and Yoshida, S. (2013) Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an antisporezoite antibody in their salivary glands. *Insect Mol Biol* 22, 41-51(査読有り)

Iyori, M., Nakaya, H., Inagaki, K., Pichyangkul, S., Yamamoto, D. S., Kawasaki, M., Kwak, K., Mizukoshi, M., Goto, Y., Matsuoka, H., Matsumoto, M., and Yoshida, S. (2013) Protective efficacy of baculovirus dual expression system vaccine expressing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *PLoS One* 8, e70819(査読有り)

Hayashi, H., Kyushiki, H., Nagano, K., Sudo, T., Iyori, M., Matsuoka, H., and Yoshida, S. (2013) Identification of the active region responsible for the anti-thrombotic activity of anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito. *Platelets* 24, 324-332(査読有り)

Farjana, T., and Tuno, N. (2013) Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 50, 838-846(査読有り)

[学会発表](計 24件)

Alam Asrar, Chauhan Virander S, Yoshida Shigeto. Potential role of serine protease PfSUB3 for *Plasmodium falciparum* parasite, 第85回日本寄生虫学会, 2016年3月20日, 宮崎市民プラザ(宮崎)

伊従光洋, 藤吉里紗, Syafruddin Din, 吉田栄人. Antibody response against the Anopheles salivary gland protein reflects *Plasmodium falciparum* infection during the rainy season in Indonesia, 第85回日本寄生虫学会, 2016年3月20日, 宮崎市民プラザ(宮崎)

Enran Talha B., 天野隆之, Fitri Amelia, Asrar Alam, 松岡裕之, 小川良平, 伊従光洋, 吉田栄人. Baculovirus-induced innate immunity confers 100% protection against sporozoite challenge in a mouse model, 第85回日本寄生虫学会, 2016年3月20日, 宮崎市民プラザ(宮崎)

田村隆彦, 川井悠輔, 川端千明, 松下俊介, 坂口美亜子, 吉田栄人. 組織標的性を持つ遺伝子導入ベクターとしての次世代バキュロウイルスの開発, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月4日, 神戸ポートアイランド(兵庫)

Mitsuhiro Iyori, Risa Fujiyoshi, Din Syafrudin, Shigeto Yoshida. Differential antibody response to the *Anopheles stephensi* AAPP and *Plasmodium* antigens in individuals naturally exposed to bites of afrotropical malaria vectors, 64th ASTMH 2015年10月25日, Philadelphia, (US)

伊従光洋, 中山隆弘, 藤吉里紗, 吉田栄人. 高速原子間力顕微鏡を用いたハマダラカ由来唾液タンパク観察の試み, 第33回北陸病害動物研究会, 2015年6月13日, 金沢大学(石川)

吉田栄人. 「動画で見る病害動物」 ハマダラカ内のマラリア原虫を可視化する, 第33回北陸病害動物研究会, 2015年6月13日, 金沢大学(石川)

吉田栄人. トランスジェニック蚊 -新たなマラリアベクターコントロールに向けての挑戦-, 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月28日, 金沢大学(石川)

伊従光洋, 藤吉里紗, Din Syafruddin,

吉田栄人 . 抗蚊唾液抗体価を用いたマラリア疫学調査の新規評価法の開発 -インドネシア介入, 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月 28 日, 金沢大学 (石川)

伊従光洋, 藤吉里紗, Din Syafruddin, 吉田栄人 . 蚊唾液タンパクに対する抗体価を用いた新規マラリア疫学調査法の開発, 第 84 回日本寄生虫学会大会, 2015 年 3 月 22 日, 杏林大学 (東京) Shunsuke Matsushita, Takahiko Tamura, Chiaki Kawabata, Miako Sakaguchi, Shigeto Yoshida . Efficient gene delivery into hepatic cells mediated by recombinant baculovirus vectors expressing malaria sporozoite antigens, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

松下俊介, 田村隆彦, 川端千明, 坂口美亜子, 吉田栄人 . 新規肝細胞特異的遺伝子導入法の開発-マラリア原虫の肝臓侵入メカニズムを利用したベクタープラットフォーム構築への試み-, 日本薬学会北陸支部第 126 回例会, 2014 年 11 月 16 日, 金沢大学 (石川)

伊従光洋, 藤吉里紗, Din Syafruddin, 吉田栄人 . 抗蚊唾液抗体価を用いたマラリア疫学調査の新規評価法の開発 -インドネシア介入試験前のベースライン抗体価の調査- 第 69 回日本衛生動物学会西日本支部大会, 2014 年 11 月 8 日, 愛知医科大学 (愛知)

吉田栄人 . マラリア原虫のハマダラカ唾液腺侵入機構にせまる, 第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2014 年 10 月 18 日, 兵庫医療大学 (兵庫)

伊従光洋, 水谷征法, 舟津知宏, Blagborough AM, 福本晋也, Sinden RE, 吉田栄人 . バキュロウイルスベクターを用いた三日熱マラリアマルチステージワクチンの開発研究, 第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2014 年 10 月 18 日, 兵庫医療大学 (兵庫)

西浦秀里, 緒方壮大, 松岡祐之, 山本大介, 坂口美亜子, 伊従光洋, 水谷征法, 田村隆彦, 吉田栄人 . 補体抵抗性因子発現型バキュロウイルスベクターを用いたマラリアワクチンに関する研究, 第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2014 年 10 月 18 日, 兵庫医療大学 (兵庫)

水谷征法, 舟津知宏, 伊従光洋, AM. Blagborough, 福本晋也, RE.Sinden, 吉田栄人 . 感染防御-伝播阻止の両機能を搭載した三日熱マラリア 2 価ワクチンの開発, 第 22 回分子寄生虫学ワークショップ/第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2014 年 8 月 31 日, 帯広畜産大学 原虫病研究センター

PK ホール (北海道)

水谷征法, 舟津知宏, 伊従光洋, AM. Blagborough, 福本晋也, RE.Sinden, 吉田栄人 . 非感染性ウイルスベクターを用いたマルチステージ三日熱マラリアワクチンの開発研究, 第 83 回日本寄生虫学会大会, 2014 年 3 月 27 日, 愛媛大学城北キャンパス (愛媛)

田村隆彦, 木村一美, 由井克之, 吉田栄人 . 赤血球期マウスマラリア感染における従来型樹状細胞の減少は I 型, II 型インターフェロン依存的細胞死である, 第 83 回日本寄生虫学会大会, 2014 年 3 月 27 日, 愛媛大学城北キャンパス (愛媛)

伊従光洋, 藤吉里紗, 舟津知宏, 澤口明日香, Din Syafruddin, 吉田栄人 . インドネシア人における蚊唾液タンパクに対する抗体価とマラリア感染, 第 66 回日本衛生動物学会大会, 2014 年 3 月 21 日, 岐阜大学 (岐阜)

21 中谷大樹, 伊従光洋, 吉田栄人 . 免疫制御因子発現型バキュロウイルスベクターによるマラリアワクチンの開発研究, 第 69 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2013 年 10 月 19 日, アルファーあなぶきホール (香川)

22 吉田栄人 . Genetic modification (GM) ハマダラカの唾液腺内のマラリア原虫の動態の in vivo イメージング, 第 69 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2013 年 10 月 19 日, アルファーあなぶきホール (香川)

23 伊従光洋, 藤吉里紗, 澤口明日香, 石井明, 松岡裕之, 吉田栄人 . ハマダラカ唾液タンパク AAPP に対する抗体の特性, 第 54 回日本熱帯医学会大会, 2013 年 10 月 3 日, 長崎ブリックホール (長崎)

24 水谷征法, 舟津知宏, 伊従光洋, AM. Blagborough, 福本晋也, RE.Sinden, 吉田栄人 . 非感染性ウイルスベクターを用いた三日熱マラリア感染防御-伝播阻止 2 価ワクチンの開発研究, 第 11 回分子寄生虫・マラリアフォーラム, 2013 年 10 月 2 日, 長崎大学坂本キャンパス ポンペイ会館 (長崎)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 栄人 (YOSHIDA SHIGETO)  
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授  
研究者番号: 10296121

### (2) 研究分担者

都野 展子 (TUNO NOBUKO)  
金沢大学・自然システム系・准教授  
研究者番号: 60295102

### (3) 研究分担者

松岡 裕之 (MATSUOKA HIROYUKI)

自治医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10173816

(4)研究分担者

伊従 光洋 (IYORI MITSUHIRO)  
金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授  
研究者番号：20608351

(3)連携研究者

( )

研究者番号：