

- 2000年10月4日-6日(横浜)
16. 桑野信彦、小野真弓、和田守正、内海健、河野公俊  
血管新生・転移や ABC トランスポーターを標的とする治療の展開 第 59 回日本癌学会総会(シンポジウム) 2000年10月4日-6日(横浜)
  17. 桑野信彦  
作用機序からみたがん薬物療法の変遷と 21 世紀への展望 第 38 回日本癌治療学会総会(招請講演) 2000年10月22日-24日(仙台)
  18. 桑野信彦  
MDR の最近の研究 日本薬学会東海支部行事(特別講演) 2000年11月15日(名古屋)
  19. 和田守正、内海健、桑野信彦  
cMOAT/MRP2 と Dubin-Johnson 症候群 第 22 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(シンポジウム) 2000年11月16日-17日(京都)
  20. 日下英司、内海健、井口明彦、芳賀整、橋本健吉、久枝哲史、中村崇規、和田守正、桑野信彦  
ABC トランスポーター-MRP2 遺伝子の転写制御とヒストン脱アセチル化 第 23 回日本分子生物学会年会(ポスター発表) 2000年12月13日-16日(神戸)
  21. 井口明彦、日下英司、内海健、和田守正、野本実、河野公俊、桑野信彦  
炎症性サイトカインによるヒト肝細胞 ABC トランスポーター(MRP2) 遺伝子の発現低下の制御 第 23 回日本分子生物学会年会(ポスター発表) 2000年12月13日-16日(神戸)
  22. 持田泰、和田守正、日下英司、内海健、桑野信彦  
ABC トランスポーター強制発現による DNA 損傷の抑制 第 23 回日本分子生物学会年会(ポスター発表) 2000年12月13日-16日(神戸)
  23. 橋本健吉、内海健、芳賀整、日下英司、井口明彦、中村崇規、和田守正、桑野信彦  
Dubin-Johnson 症候群における MRP2 遺伝子変異とプロセッシング異常 第 23 回日本分子生物学会年会(ポスター発表) 2000年12月13日-16日(神戸)

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

特になし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

マラリア伝搬阻止ワクチンの開発に関する研究  
分担研究者 鳥居本美 愛媛大学医学部教授

**研究要旨** マラリア伝搬阻止ワクチン開発の基礎的研究の推進を目的として、免疫機構がより解明されているマウスとネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) を用いたマラリア伝搬阻止ワクチンの動物モデルを作成した。酵母で発現させた組換えオーキネート表面蛋白 (rPys21 または rPys25) を用いて免疫したマウス、および Pys21 または Pys25 の DNA ワクチンで免疫したマウスを、*P. yoelii* に感染させた3日後にハマダラ蚊に吸血させ、蚊の中腸に形成されるオーシスト数を計測してマラリア伝搬阻止活性を検討した。また、三日熱マラリア原虫の組換えオーキネート表面蛋白 (rPvs25 または rPvs28) による伝搬阻止ワクチンについても、チンパンジーを用いた動物実験およびタイ国の流行地患者株を用いた実験を実施して、その効果を検討した。

A. 研究目的

マラリア伝搬阻止ワクチンの開発はオーキネート表面蛋白を抗原として行われているが、改良すべき点が残されている。また、その作用メカニズムを解析するための動物モデルの開発も進んでいない。そこで、免疫機構がより解明されているマウスを宿主とするネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*) を用いて、マラリア伝搬阻止ワクチンの動物モデルを作成した。さらに、ヒトマラリアのうちアジア地域に多い三日熱マラリアの伝搬阻止ワクチンについて、遺伝子組換え蛋白を抗原として作成した抗血清を材料として、チンパンジーを用いた動物実験および流行地であるタイ国の患者血液を用いた実験を行い、その効果を確認した。

B. 研究方法

I. ネズミマラリア伝搬阻止ワクチンモデル

1. 組換え蛋白を用いたマウスの免疫：*P. yoelii* のオーキネート表面抗原を酵母を用いて発現させた組換え蛋白 (rPys21 または rPys25) をフロイントアジュバンドと共に DBA/2 マウスの腹腔内に3週間隔で3回接種して免疫した。
2. DNA ワクチンを用いたマウスの免疫：オーキネート表面蛋白遺伝子を基に作成した Pys21 または Pys25 の DNA ワクチンを DBA/2 マウスの耳介内に3週間隔で3回接種して免疫した。また、他のグループのマウスには遺伝子銃を用いて3週間隔で3回皮内免疫を行った。
3. 蚊を用いた伝搬阻止活性の判定：

オーキネート表面抗原に対する特異抗体価の上昇を確認した後、このマウスを *P. yoelii* に感染させた。感染3日後に媒介蚊の *Anopheles stephensi* に吸血させ、その9日後に蚊を解剖して中腸に形成されたオーシスト数を算定し、伝搬阻止効果を判定した。

## II. 三日熱マalaria伝搬阻止ワクチン

1. 三日熱マalaria原虫感染チンパンジーを用いた伝搬阻止実験： 三日熱マalaria原虫実験室内株 (Sal1 株) 由来のオーキネート表面抗原の遺伝子を基に酵母を用いて発現させた組換え蛋白 (rPvs25 または rPvs28) を、アルムアジュバントを用いてマウスに3週間隔で3回免疫した。特異抗体価の上昇を確認した後、このマウス血清を用いて以下の実験を行った。Sal1 株を感染させた後、生殖母体が確認されたチンパンジー血液と、上記免疫マウス血清を混合した後、メンブレンフィーディング法を用いてマalaria媒介蚊に吸血させ、中腸に形成されるオーシスト数を算定して伝搬阻止活性を検討した。

2. 患者血液を用いた三日熱マalaria伝搬阻止実験： 上記の実験で作成した Sal1 株由来のワクチン抗原に対する抗血清が流行地の三日熱マalaria原虫に対しても伝搬阻止活性を有するか否かを検討するため、タイ国の三日熱マalaria患者の血液とマウス抗血清を混合した後、メンブレンフィーディング法を用いてタイでマalariaを媒介している *Anopheles*

*dirus* に吸血させ、中腸に形成されたオーシスト数を算定して伝搬阻止活性を検討した。

(倫理面への配慮)

タイ国における三日熱マalaria患者血液の採取に当たってはタイ国保険証の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。動物実験は愛媛大学医学部附属動物実験施設の実施要領に基づいて実施した。

## C. 研究結果および考察

### I. ネズミマalaria伝搬阻止ワクチンモデル

1. 組換え蛋白を用いたマalaria伝搬阻止実験： 酵母を用いて発現させた組換え rPys21 または rPys25 で免疫したマウスから吸血した蚊の中腸に形成されたオーシスト数は、コントロールマウスから吸血した蚊の中腸のオーシスト数に比較して有意な低下が確認された。また、その効果は抗体価が高いほど顕著であった。

2. DNA ワクチンを用いたマalaria伝搬阻止実験： Pys21 または Pys25 の DNA ワクチンを耳介内に接種したもの、および遺伝子銃を用いて皮内免疫を行ったいずれの DNA ワクチン免疫マウスにおいても、特異抗体の上昇が観察された。これらのマウスから吸血した蚊の中腸に形成されたオーシスト数はコントロールマウスから吸血した蚊のものに比較して有意に減少しており、その効果は抗体価

が高いほど顕著であった。

以上の結果より、伝搬阻止ワクチンを異なる免疫源、免疫方法で投与しても特異抗体が誘導されること、また、その伝搬阻止効果は抗体価が高いほど顕著であることが確認された。

## II. 三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン

酵母の系で発現させた三日熱マラリア原虫実験室内株 (Sal1 株) 由来の組換えオーキネート表面蛋白 (rPvs25 または rPvs28) に対するマウス抗血清またはコントロール血清とチンパンジーに感染させて得た三日熱マラリア原虫 Sal1 株とを混合して吸血させた蚊を解剖して中腸のオーシスト数を計測したところ、rPvs25 または rPvs28 に対する抗血清を用いたものではオーシストの形成が全く認められなかった。また、rPvs25 および rPvs28 に対する抗血清とタイの三日熱マラリア患者血液を混合して吸血させた場合にもオーシストの形成が著しく抑制された。

以上の結果より、組み換え rPvs25 および rPvs28 をワクチン抗原として作成した抗血清は抗原遺伝子の由来する Sal1 株のみならず流行地の三日熱マラリア原虫の媒介蚊体内での発育を阻害することが示され、rPvs25 および rPvs28 が伝搬阻止ワクチンの抗原として有望であることが明らかとなった。

## E. 結論

マラリア伝搬阻止ワクチンの動物モデ

ルとして、免疫機構の解明が進んでいるマウスを宿主とするネズミマラリア原虫を用いて伝搬阻止活性の検討を行った。酵母を用いて発現させた組換え蛋白 (rPys21 または rPys25) で免疫したマウス、Pys21 または Pys25 の DNA ワクチンで免疫したマウスともに、伝搬阻止能を有する特異抗体の誘導が観察された。また、その伝搬阻止効果は抗体価が高いほど顕著であった。さらに、三日熱マラリア伝搬阻止ワクチンにおいても、チンパンジーを用いた動物実験およびタイ国の流行地患者株を用いた実験で、伝搬阻止効果を確認することができた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Langer RC, Hayward RE, Tsuboi T, Tachibana M, Torii M, Vinetz JM. Micronemal transport of *Plasmodium* ookinete chitinases to the electron-dense area of the apical complex for extracellular secretion. *Infect. Immun.* 2000, 68: 6461-6465.
- 2) Hisaeda H, Stowers AW, Tsuboi T, Collins WE, Sattabongkot J, Suwanabun N, Torii M, Kaslow, DC. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect. Immun.* 2000, 68: 6618-6623.

- 3) Shirano M, Tsuboi T, Kaneko O, Tachibana M, Adams JH, Torii M. Conserved regions of the *Plasmodium yoelii* rhoptry protein RhopH3 revealed by comparison with the *P. falciparum* homologue. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001, 112: 297-299.
- 4) Tachibana M, Tsuboi T, Templeton TJ, Kaneko O, Torii M. Presence of three distinct ookinete surface protein genes, Pos25, Pos28-1, and Pos28-2, in *Plasmodium ovale*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001, In Press.
- 5) Suwanabun N, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Maneechai N, Rachapaew N, Yim-amnuaychok N, Punkitchar V, Coleman R.E. Development of a method for the in vitro production of *Plasmodium vivax* ookinetes. *J. Parasitol.* 2001, In Press.
2. 学会発表
- 1) Shirano M, Tsuboi M, Tachibana M, Yano M, Torii M. Primary structure of the rhoptry protein (PyRhop100) from *Plasmodium yoelii*. 第 69 回日本寄生虫学会大会、*Parasitol. Int.* 増 (2000 年 4 月)
- 2) Torii M, Tsuboi T, Tachibana M, Yano M, Kaneko O, Shirano M. Cloning of 140kD merozoite rhoptry protein gene from *Plasmodium yoelii*. 第 69 回日本寄生虫学会大会、*Parasitol. Int.* 増 (2000 年 4 月)
- 3) Tachibana M, Tsuboi T, Yano M, Torii M. Gene cloning of ookinete surface protein of *Plasmodium ovale* by using sprinkerette DNA library. 第 69 回日本寄生虫学会大会、*Parasitol. Int.* 増 (2000 年 4 月)
- 4) Kobayashi F, Haruki K, Matsui T, Fujino T, Waki S, Tachibana M, Tsuboi T, Torii M, Tsuji M. Establishment of protective monoclonal antibodies against *Plasmodium berghei* XAT infection and the stage specificity of their target antigens. 第 69 回日本寄生虫学会大会、*Parasitol. Int.* 増 (2000 年 4 月)
- 5) Tsuboi T, Tachibana M, Yano M, Torii M. Sequence polymorphism in vivax malaria transmission-blocking vaccine antigens. 第 69 回日本寄生虫学会大会、*Parasitol. Int.* 増 (2000 年 4 月)
- 6) 坪井敬文、久枝一、Sattabongkot J、橘真由美、鳥居本美. 三日熱マラリア伝搬阻止ワクチンの開発. 第 56 回日本寄生虫学会西日本支部大会 (2000 年 10 月)
- 7) Sattabongkot J, Tsuboi T, Suwanabun N, Tachibana M, Torii M, Hisaeda H, Stowers AW, Coleman RE. Evaluation of the efficacy of *Plasmodium vivax* transmission blocking antibody naturally circulating human isolates from Thailand. 49th annual meeting of ASTMH, Huston, Texas, USA,

November 2000.

- 8) Tsuboi T, Tachibana M, Sattabongkot J, Suwanabun N, Kaneko A, Nagao T, Kanbara H, Kaslow DC, Torii M. Sequence diversity in Pvs25 and Pvs28 that are malaria transmission-blocking vaccine antigen of *Plasmodium vivax*. 49th annual meeting of ASTMH, Huston, Texas, USA, November 2000.
- 9) Tachibana M, Tsuboi T, Templeton TJ, Torii M. Gene cloning of ookinete surface proteins from *Plasmodium ovale* reveals the presence of a third P25 and P21/28 paralogue. 49th annual meeting of ASTMH, Huston, Texas, USA, November 2000.
- 10) Shirano, M., Tsuboi, T., Kaneko, O., Tachibana, M., Adams, J.H., and Torii, M. Conserved regions revealed by the of the comparison of *Plasmodium yoelii* 100kDa rhoptry protein with *P. falciparum* homologue (PfRhopH3). 49th annual meeting of ASTMH, Huston, Texas, USA, November 2000.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものはない

## 研究成果の刊行に関する一覧表

1. Karasawa, M., Kobayashi, K., Oku, H., Sato, K., Kano, S., Suzuki, M. and Katakai, R. Synthesis and structure of a peptide having partial sequence of *Plasmodium falciparum* enolase. In *Peptide Science 1999*; N. Fujii, Ed.; The Japanese Peptide Society: Osaka, 2000; pp 295-298 (2000).
2. Sato, K., Kano, S., Matsumoto, Y., Glanarongran, R., Krudsood, S., Looareesuwan, S., Aikawa, M. and Suzuki, M. Application of yeast enolase as antigen for immunodiagnosis of malaria. *South East Asia. J. Trop. Med. Pub. Health*, 31(suppl 1), (in press).
3. Kawazu, S-I, Tsuji, N., Hatabu, T., Kawai, S., Matsumoto, Y. and Kano, S. Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 109: 165-169 (2000).
4. Perlmann, P., Perlmann, P., Looareesuwan, S., Grudsood, S., Kano, S., Matsumoto, Y., Brittenham, G., Troye-Blomberg, M. and Aikawa, M. Contrasting functions of IgG and IgE antimalarial antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62: 373-377 (2000).
5. Oku, H., Fujimoto, J., Ohyama, T., Hiroki, A., Yoshida, M. and Katakai, R. Side chain conformational changes during the thermo-shrinking process:  $\gamma$ -Ray polymerization and spectroscopic study of uncrosslinked poly (methacryloyl-Ala-OMe). *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, vol. 38, pp 2671-2677 (2000).
6. Oku, H., Ohashi, H., Fujimoto, J., Shimizu, M., Yoshida, M. and Katakai, R. Conformational change of proline residues observed in swollen and shrunken phases:  $\gamma$ -Ray synthesis and variable temperature circular dichroism spectra of a thermo-responding polymer, poly (acryloyl-Pro-OMe). *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, vol. 38, pp. 4524-4530 (2000).
7. Langer, R. C., Hayward, R. E., Tsuboi, T., Tachibana, M., Torii, M. and Vinetz, J. M. Micronemal transport of *Plasmodium* ookinete chitinases to the electron-dense area of the apical complex for extracellular secretion. *Infect. Immun.*, 68: 6461-6465 (2000).
8. Hisaeda, H., Stowers, A. W., Tsuboi, T., Collins, W. E., Sattabongkot, J., Suwanabun, N., Torii, M. and Kaslow, DC. Antibodies to malaria vaccine candidates Pvs25 and Pvs28 completely block the ability of *Plasmodium vivax* to infect mosquitoes. *Infect. Immun.*, 68: 6618-6623 (2000).

9. Hinoshita, E., Uchiumi, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Maehara, Y., Sugimachi, K. and Kuwano, M. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Res.*, 6: 2401-2407 (2000).
10. Tada, Y., Wada, M., Kuroiwa, K., Harada, T., Tsuneyoshi, M., Nakagawa, M., Naito, S., and Kuwano, M. *MDR1* overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment. *Clinical Cancer Res.*, 6: 4618-4627 (2000).
11. Morikawa, W., Yamamoto, K., Ishikawa, S., Takemoto, S., Ono, M., Fukushi, J., Naito, S., Nozaki, C., Iwanaga, S. and Kuwano, M. Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 38912-38920 (2000).



200005011

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。