

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 24 年 5 月 27 日

新規	※新規か継続か、該当する方を記載		
研究分野	節足動物衛生工学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	非感染性ウイルスベクターを用いた新規三日熱マラリアワクチンの開発研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名・役割分担	
	よしだ しげと 吉田 栄人	金沢大学・医薬保健研究域薬学系・教授 研究統括・ワクチン作製・ワクチン効果の評価	
研究分担者	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授 感染防御効果の評価（ハマダラカ吸血チャレンジ実験）	
	いより みつひろ 伊従 光洋	金沢大学・医薬保健研究域薬学系・特任助教 ワクチン作製・ワクチン作用機序の解析	
	おがた そうた 緒方 壮太	金沢大学・医薬保健研究域薬学系・修士課程 1 年 ワクチン作製・ワクチン作用機序の解析	
研究期間	平成 24 年 4 月 1 日 ～ 平成 25 年度 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>[研究目的]非感染性ウイルスであるバキュロウイルスを用いて、三日熱マラリア原虫(<i>P. Vivax</i>)に対する Pv ワクチンを開発する。Pv ワクチンを評価するために、マウスマラリア原虫(<i>P. berghei</i>)の CSP 遺伝子(PbCSP)を Pv ワクチンの抗原である Pv の CSP に置換した遺伝子改変マラリア原虫(PvCSP/Pb)は既に作製済みである。本共同研究ではバキュロウイルスを用いて、三日熱マラリアワクチンを作製し、PvCSP/Pb によって、評価した。</p> <p>[趣旨]本共同研究で使用するバキュロウイルスベクターは家畜や家禽の感染症にも応用可能なため、帯広畜産大学との本共同研究は動物用ワクチン開発のプロジェクト研究を提案する契機となる。</p>		
研究経過の概要	<p>[研究結果] 三日熱マラリアワクチンのマウスモデルでの評価</p> <p>(1)ワクチンの作製と大量精製 作製済みのプロトタイプである PvCSP 遺伝子を組み込んだワクチン(AcNPV-Dual-PvCSP(B-PNG) -gp64)の大量精製を金沢大学で行い、PvCSP の発現量をウェスタンブロッティングによって確認した後、分注して保存した。バキュロウイルスのエンベロープタンパクの 1 つである gp64 ではバキュロウイルスエンベロープの 1 部にしかディスプレイさせることができないので、PvCSP をバキュロウイルスエンベロープ全体にディスプレイさせることによって、発現量を上げるため、gp64 を VSV-G に換え、改良型ワクチン(AcNPV-Dual-PvCSP(B-PNG)-VSV-G)を作製し、大量精製を金沢大学で行い、プロトタイプワクチンと同様に PvCSP の発現量をウェスタンブロッティングによって確認した後、分注して保存した。</p> <p>(2) チャレンジ感染(免疫、抗体価の測定とチャレンジ感染)</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>これら保存したワクチンを帯広畜産大学でマウス(1群 15匹で4群)に3週間隔で3回、筋肉内接種と改良型ワクチンは筋肉内接種に加え、点鼻接種し、最終免疫の2週間後に PvCSP/Pb に感染したハマダラカがマウスに吸血感染させることによってチャレンジ感染を行った。コントロール群として WT のバキュロウイルスを筋肉内接種した。各免疫前、チャレンジ感染前にマウスの尻尾から少量採血を帯広畜産大学で行い、ELISA によって抗体価の測定を金沢大学で行った結果、筋肉内接種の群で PvCSP の抗体価は3回の免疫を通してブースター効果がみられ、チャレンジ前のプロトタイプワクチン (AcNPV-Dual-PvCSP(B-PNG) -gp64) の抗体価は 1000 であり、改良型ワクチン (AcNPV-Dual-PvCSP(B-PNG)-VSV-G) の筋肉内接種群の抗体価は 10000 まで誘導することができた。筋肉内接種群において、プロトタイプと改良型ワクチンの両方のワクチン群でコントロール群に比べ、優位な差がみられた。点鼻接種させた群では PvCSP の抗体価を誘導することができなかった。要因は解析中。</p> <p>Pv の CSP に置換した遺伝子改変マラリア原虫 (PvCSP/Pb) を感染させたハマダラカを帯広畜産大学で作製し、ワクチンを接種したマウスに吸血感染によってチャレンジ感染を行った。感染防御率は感染後 14 日目のスメアーによって原虫の有無 (完全感染防御率) を調べるとともに、感染後 7 日目のパラシテミアを部分感染防御率とし、ワクチンの評価を金沢大学で行った。その結果、コントロール群と改良型ワクチンを点鼻接種させた群ではすべてのマウスが感染した。AcNPV-Dual-PvCSP(B-PNG) -gp64 筋肉接種群では 7% の完全感染防御率であり、改良型ワクチンである AcNPV-Dual-PvCSP(B-PNG)-VSV-G の完全防御率は 18% であった。チャレンジ感染 7 日目の感染率は、コントロール群では 1.58%、AcNPV-Dual-PvCSP(B-PNG) -gp64 群では 1.36%、改良型ワクチン群の筋肉接種群では 1.22%、点鼻接種群では 1.79% であった。これらの結果から、筋肉接種群において、プロトタイプ、改良型ワクチンの両方で感染の遅延がみられた。完全感染防御した個々のマウスの抗 PvCSP 抗体価は高い傾向はあるが、N 数が少ないため有意な相関関係は見られていない。</p> <p>以上結果課より、本共同研究では、Pv の CSP に置換した遺伝子改変マラリア原虫 (PvCSP/Pb) で Pv ワクチンの評価をすることができ、バキュロウイルスワクチンで PvCSP/Pb に対する完全防御能や感染の遅延させる能力を有していることが明らかになった。今後、本共同研究で開発したワクチンを改良し、完全防御率 100% を目指す。</p>
<p>研究成果の発表</p>	