

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月6日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390079

研究課題名（和文）マラリア原虫赤血球侵入関連分子の機能ドメインの同定と侵入の制御

研究課題名（英文）Identification and targeting of the functional domains of malaria parasite's molecules involved in the erythrocyte invasion

研究代表者

金子 修 (KANEKO OSAMU)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

研究成果の概要（和文）：ネズミマラリア原虫の RON5 が、増殖阻害抗体の標的である AMA1-RON 複合体の一部をなし、赤血球侵入期だけでなく肝細胞侵入期にも発現する事を見出し、RhopH 複合体の構成分子 RhopH1A の複合体形成に関与する領域を明らかにした。また、ネズミマラリア原虫の赤血球侵入タイムラプスイメージング解析の系を確立し、この原虫種が新たな赤血球に侵入するためには、感染赤血球から放出された後、形態変化する必要がある事を見出した。

研究成果の概要（英文）：We found that RON5 was a component of AMA1-RON complex, a target of the growth inhibitory antibodies, and was expressed at both merozoite and sporozoite stages of the rodent malaria parasite. We also identified the region of RhopH1A responsible for the complex formation. We established time-lapse imaging analysis of the erythrocyte invasion by rodent malaria parasite and found that morphological change of the released merozoite was required for the erythrocyte invasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：原虫、感染症、赤血球、侵入

## 1. 研究開始当初の背景

世界で年間 100 万人の死者を出すマラリアを起こすマラリア原虫はヒト体内で赤血球に侵入増殖してこれを破壊することで病害を与える。マラリア感染成立には赤血球へ侵入することが必須であるため、有効な予防方法を開発するための標的的探索には、マラリア原虫の赤血球侵入の分子機構を明らかに

することが必要である。

研究代表者は、上述した観点から赤血球侵入型原虫メロゾイトに発現する赤血球侵入関連分子群の解析を行ってきた。特にロプトリ一体部から放出され、感染赤血球内部に形成される寄生胞膜の形成に関与すると考えられ、特異抗体が原虫の増殖阻害効果を示す赤血球結合分子 RhopH 複合体について、その構成成分である RhopH1/C1ag および RhopH2

をコードする遺伝子群を新規に同定し (Kaneko et al. 2001; Ling et al. 2003; Ling et al. 2004; Kaneko et al. 2005)、赤血球側レセプターがタンパク質であること (Rungruang et al. 2005)、宿主免疫によるものと思われる淘汰圧による著しい多型を示すこと (Iriko et al. 2008)、多重遺伝子族にコードされる構成分子 RhopH1/Clag の一部が相互排他的に転写されていること (Cortés et al. 2007) などを明らかにしてきた。RhopH 複合体は、構成分子の遺伝子座の破壊ができないため、原虫の生存に必須のタンパク質でもある。ドメイン構造を明らかにする試みにより、現在までに RhopH1/Clag の全長 1417 アミノ残基のうち、C末端側約 300 残基は複合体形成には関与していないこと、N末端側の 483 残基だけでは複合体形成をしないことを明らかにしている (Ghoneim et al. 2007)。

一方、マラリア原虫のゲノムデータベースに対する相同性検索により、RhopH1/Clag の一部分と相同領域を有する RON2 を見出した。申請者は、両者間で何らかの共通する機能を有する可能性があると考え、多角的に研究を進めるために、RhopH 複合体に加えて RON2 を含む RON 複合体の機能解析を開始した。RON2、RON4、RON5 からなる RON 複合体は、侵入直前にロプトリー頸部から放出され、ワクチン標的として臨床試験も行われているマイクロネーム分子 AMA1 とさらに複合体を形成することが示唆されていたが、研究代表者らは、RON2 と AMA1 の複合体形成を特異抗体を用いて明らかにした (Cao J et al. 2009.)。侵入を阻害する抗 AMA1 抗体が AMA1-RON 複合体の形成を阻害することがわかり、AMA1 をベースとするワクチンの作用起点が、AMA1 と RON 複合体の複合体形成の阻害であることが強く示唆された。

精製した RhopH 複合体で作製した抗血清には原虫の増殖阻害作用があり、RhopH 複合体の赤血球結合領域は結合を機能的に阻害し、増殖を抑制する標的部位と予想される。また、AMA1-RON 複合体の形成を阻害すると、赤血球侵入が阻害されるため、RON 複合体と AMA1 の複合体形成インターフェイスが増殖抑制の標的部位と考えられる。AMA1 は高度多型性を示し、ワクチン臨床試験では型特異的な防御免疫効果を示したが、多型の問題を回避できれば、依然として有力なワクチン候補抗原の一つである。AMA1 ほどの高い多型を示さない RON 側を標的とし AMA1-RON 複合体形成を阻害し、AMA1 ワクチンと同じ作用起点で赤血球侵入を阻止することができれば、相補効果も期待でき、そのインパクトは非常に大きい。以上より、部分組換えタンパク質を発現するマラリア原虫を作出し、マラリア原虫由来の分

子との複合体形成や原虫で発現した組換えタンパク質の赤血球結合能を検討することで、赤血球結合と AMA1-RON 結合領域を明らかにすることを考えた。また複合体形成のタイミングを動的に明らかにするため、タイムラプスイメージング解析を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、最近の研究の進展により注目を浴びているロプトリーに局在する 2 つの複合体について、1) 複合体形成を阻害すると、赤血球侵入が阻害される AMA1-RON 複合体の複合体形成インターフェイスの同定、2) 特異抗体が増殖を阻害する RhopH 複合体の赤血球結合領域の同定を行い、赤血球侵入を制御する新しい標的部位を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換えネズミマラリア原虫 *P. yoelii* の作製と解析：

RhopH1A 遺伝子の種々の領域をネズミマラリア原虫 *P. yoelii* のゲノム DNA より PCR 増幅し、PyRhopH2 プロモーターから発現する遺伝子導入用のプラスミドを構築した。電気穿孔法によりネズミマラリア原虫にプラスミドを遺伝子導入し、薬剤選択により部分的な RhopH1A を発現する組換えネズミマラリア原虫を得た。発現させた部分組換えタンパク質は、C末端部に付与した HA エピトープタグや FLAG タグにより標識した。組換えタンパク質はタグに対する抗体やペプチド抗体による間接蛍光抗体法、免疫電子顕微鏡法により局在解析を行った。また、SDS-PAGE およびウェスタン解析により組換えタンパク質のサイズや断片化の有無を検討し、免疫沈降法により分子間の複合体形成の有無を検討した。

(2) 抗体作製：

AMA1-RON 複合体の構成分子 RON2、RON5 および AMA1 についてウサギとマウスを用いてペプチド抗体を作製した。原虫タンパク質に対する反応性はウェスタン解析により確認した。

(3) 組換えタンパク質の発現と赤血球結合アッセイ：

大腸菌での組換えタンパク質発現のためには、レアコドンを補充し、ジスルフィド結合形成も良いとされる Novagen 社の Rosetta-Gami 2 を使用した。また、コムギ胚芽無細胞タンパク質発現系を用いて GST 融合タンパク質として、愛媛大学の坪井敬文教授の協力により作製した。精製した組換えタンパク質は、正常赤血球や膜を反転させた赤血球と混合し、洗浄の後、高塩濃度溶液により赤血球膜から溶出することで行った。また赤血球との結合後、GST に対する抗体を用いてフローサイトメトリーによっても結合の検出を行った。

(4) 遺伝子組換え熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* の作製と解析：

RhopH1 と RON 遺伝子の種々の領域を熱帯熱マラリア原虫ゲノム DNA より PCR 増幅し、N 末端側に感染赤血球細胞質への移行シグナル (PEXEL モチーフ) を付与した組換えタンパク質として発現する遺伝子導入用のプラスミドを構築した。電気穿孔法により熱帯熱マラリア原虫にプラスミドを遺伝子導入し、薬剤選択により各組換えタンパク質を発現する熱帯熱マラリア原虫を得た。各組換えタンパク質に付与したタグに対する抗体により、発現を確認した。

(5) タイムラプスイメージング解析：

Perfect Focus System (Nikon) を備えた Nikon 社製の倒立型顕微鏡と 60 倍対物レンズを用いた。タイムラプスイメージは CCD カメラ (ORCA-R2) を用いて取得し、NIS-Element Advanced Research Imaging Software (Nikon) により解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①ネズミマラリア原虫 (*P. yoelii*) RhopH1A の PyRhopH 複合体形成に関与する領域を決定した：

ネズミマラリア原虫の RhopH1A にはゲノム上にパラログの RhopH1AP が存在しているため、当初、これらのパラログは互いに機能的に相補しあう可能性が高いと考え、RhopH1A 遺伝子座自体の改変を試みたが、部分的な RhopH1A のみを発現する組換えネズミマラリア原虫を得ることができなかった。このこと

は、RhopH1A と RhopH1AP はともに必須の遺伝子であることを示唆した。(実際、他のネズミマラリア原虫種 *P. berghei* において両者ともに遺伝子座破壊が出来ないことが、他の研究グループから後ほど発表された [Pasini et al. 2013]。)

そのため、組換えタンパク質を薬剤選択圧下にエピゾームとして原虫内に維持するプラスミドから発現させることとした。まず、C 末端側に HA エピトプタグを付けた組換え全長 RhopH1A を RhopH2 プロモーターにより発現する組換えネズミマラリア原虫を作製した。発現した組換え全長 RhopH1A は、ロプトリー体部に局在する RhopH2 と共局在し、免疫沈降法により組換え全長 RhopH1A と RhopH2 が共沈した。ゆえに、発現させた組換え全長 RhopH1A は RhopH2 を含む複合体に含まれている事が確認できた。続いて、図 1 の a - e の領域に 5 等分した組換え部分 RhopH1A を発現する組換えネズミマラリア原虫を作製し、RhopH2 を指標として複合体形成を検討したが、どの組換え部分タンパク質も複合体に含まれなかった。そのため、各領域を組み合わせた部分 PyRhopH1A (ab, abc, abcd) を発現する組換えネズミマラリア原虫を作製した。免疫沈降により、複合体形成を再検討したところ、ab, abc, abcd の全ての組換え部分 PyRhopH1A が RhopH2 を含む複合体に含まれる事を示唆する知見を得た。ゆえに、少なくとも RhopH2 を含む複合体形成には RhopH1A の N 末端側 473 アミノ酸配列に含まれる領域が必要で、c, d, e は不要であることが分かった (図 2)。

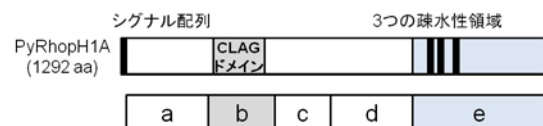


図 1. 作製した組換え PyRhopH1A に使用した領域。PyRhopH1A をエキソン・イントロン領域やドメイン予測により、a から e の領域に分割した。疎水性領域は、熱帯熱マラリア原虫 RhopH1 との相同性と膜貫通領域予想アルゴリズムを元に推定した。RON2 と RhopH1 の間での相同体領域 (CLAG ドメイン) を示す。

一方、2011 年 5 月に熱帯熱マラリア原虫の RhopH1 が感染赤血球表面のトランスポーター活性に関係しているとの報告があった (Nguitrage et al. 2011)。彼らのモデルでは、我々の同定した N 末端側の領域は赤血球膜内に局在し、また、C 末端側の多型領域の両端に存在する疎水性領域が赤血球膜に

挿入されていると予想されていた。RhopH2 には多型性がほとんど見られず、おそらく赤血球内に局在していると予想されるため、RhopH2 が RhopH1 の N 末端側と結合すると言う結果と良く合致する。また、彼らのモデルから、C 末端側の疎水性領域が RhopH 複合体の赤血球膜への結合（もしくは挿入）に関与していることも示唆された（図 2）。

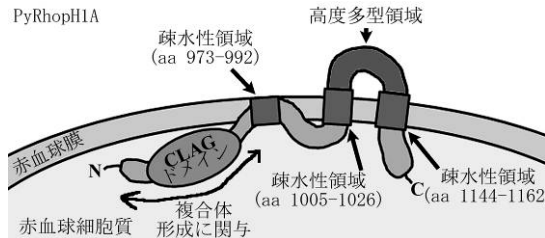


図 2. PyRhopH1A の模式図。推定された疎水性領域を図示する。今回の研究により、N 末端側に複合体形成に関与している領域が明らかとなった（図示）。

②ネズミマラリア原虫 RON5 がメロゾイトとスポロゾイトで発現していること、AMA1-RON 複合体中に含まれることを明らかにした：

AMA1-RON 複合体の複合体形成インターフェイスを同定するために、各種 RON に対する抗体を用いた免疫沈降法にて AMA1-RON 複合体形成が検出できることを確認した。ところが解析中に、RON2 の AMA1-RON 複合体形成インターフェイスが他の研究グループにより報告され (Lamarque et al. 2011)、さらに別の研究グループに AMA1 と RON2 由来ペプチドの共結晶も報告され (Tonkin et al. 2011)、RON2 の AMA1 への結合部位に対する抗体が原虫増殖阻害をすることもさらに異なるグループに報告された (Srinivasan et al. 2011)。そのため、本研究では RON5 に焦点を当てて研究を進めることとした。AMA1-RON 複合体の解析を行った結果、RON5 は RON2 と RON4 と共沈降したが、AMA1 とは共沈降しなかった。RON2/RON4 と AMA1 は共沈降するため、AMA1-RON 複合体の中で、RON5 と AMA1 は直接結合している可能性は低いと考えた。また、RON5 の発現を免疫蛍光抗体法で検討した結果、赤血球に侵入するメロゾイト期原虫においてロプトリー頸部マーカー分子 RON4 と共局在を示す事、さらに、蚊から注入され脊椎動物宿主の肝細胞に侵入するスポロゾイト期原虫においても RON5 が発現しており、RON4 と共局在をすることが明らかとなった。免疫電子顕微鏡にて局在をさらに詳細に検討したところ、RON5 はメロゾイト期原虫ではロプ

トリー頸部に局在するが、スポロゾイト期原虫ではロプトリー体部全般にわたり局在する事が明らかとなった。メロゾイトにおいては、ロプトリー体部に局在する RhopH 複合体が原虫の生存に重要な役割を果たす一方、RhopH 複合体を持たないスポロゾイトでは（未発表）、RON 分子群がより重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

一方、赤血球侵入中のメロゾイト期原虫における RON や AMA1 の局在を明らかにするために、いままで報告がないネズミマラリア原虫のメロゾイトを精製する方法、および、精製したメロゾイトを用いて赤血球侵入中のメロゾイトの経時的に観察する系を確立し、RON 分子の局在変化の経時的観察に成功した。

③RON2 および RhopH1 の部分組換えタンパク質の作製とこれらを感染赤血球内に発現する熱帯熱マラリア原虫の作出：

RON2 および RhopH1 の赤血球への結合部位を同定する目的で、これらの分子の部分組換えタンパク質の作製を行った。大腸菌による発現は発現量が極端に少なく実用に耐えなかった。そのため、コムギ胚芽無細胞タンパク質発現系に切り替えたところ、十分量の組換えタンパク質を得ることができた。しかし、精製した組換えタンパク質が、正常赤血球や膜を反転させた赤血球へ結合するかどうかを 2 種類の方法で検討したものの、コントロールと比べて、明らかな結合は検出する事はできなかった。そのため、これらの組換えタンパク質を熱帯熱マラリア原虫が感染した赤血球内に発現させ、発現した部分タンパク質を精製することで、相互作用する赤血球側分子を同定する事を計画し、組換え原虫の作製を行い、アッセイを行う準備を整えた。

④ネズミマラリア原虫の赤血球侵入をタイムラプスイメージング解析する系を確立し、感染赤血球から放出され、新たな赤血球に侵入するまでの間に形態を変化する事を見出した：

本研究計画の初年度に他の研究グループから RON2 の AMA1-RON 複合体形成インターフェイスが明らかにされたため (Lamarque et al. 2011)、当初の予定を進めてネズミマラリア原虫が赤血球侵入において AMA1-RON 複合体を形成するタイミングを明らかにすることを目的に、ネズミのマラリア原虫 *P. yoelii* の赤血球侵入をタイムラプス解析できる系を確立した。その結果、ネズミのマラリア原虫の赤血球への侵入過程は以前に報

告されていたサルマラリア原虫や熱帯熱マラリア原虫と同じく前侵入期、侵入期、棘状赤血球様期の3過程に分けられることが分かった。また、前侵入期はマラリア原虫種間で時間差はないが、感染赤血球から放出されてから新規赤血球に接着するまでの時間が熱帯熱マラリア原虫はネズミのマラリア原虫よりも短い一方、棘状赤血球様期は熱帯熱マラリア原虫ではネズミのマラリア原虫よりも長いことが観察された。興味深いことに、ネズミのマラリア原虫ではメロゾイトの形態が放出直後から数十秒の間にロッド状から球状に変化し、球状の原虫のみが赤血球に侵入していた。このような現象はサルマラリア原虫でも熱帯熱マラリア原虫でも観察されておらず、ネズミマラリア原虫メロゾイトは感染赤血球から血流に放出されてから赤血球侵入に向けて形態を変化させる必要がある可能性も考えられた。

## (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

①他のグループの研究により、RhopH 複合体の構成分子 RhopH1 が感染赤血球膜のトランスポーター活性と関係する事が分かったが、他の RhopH 複合体構成分子 RhopH2 や RhopH3 の関与の有無、また、関与しているとすればどのようにこの活性に係るのかは全く分かっていない。全貌は未だに明らかではないものの、本研究の成果は、原虫にとって必須の活性であることが示されているこのトランスポーターの実体を明らかにするための基礎データを提供することとなる。

②AMA1-RON 複合体はワクチンや創薬標的として世界的にも注目度が高く、当初計画していた実験は、世界各地の異なる3つの研究グループにより次々に成果発表がされた。しかし、我々は本研究により、RON5 がメロゾイトのみならずスポロゾイトにも発現していることを明らかにし、この分子が赤血球侵入と肝細胞侵入の二つの異なるステップで作用していることを示すことができた。このことは、RON5 を標的とすることで、スポロゾイトのヒトへの感染阻止と、赤血球期ステージの増殖阻害による発症阻止の二つの作用機序でマラリア原虫感染を抑制する事が期待できることを意味する。

③また、ネズミマラリア原虫の赤血球侵入をタイムラプスイメージング解析する系を確立し、感染赤血球から放出され、新たな赤血球に侵入するまでの間に形態を変化する事

を見出したが、メロゾイトは赤血球に侵入する際に多様な分子を異なる細胞内小器官から秩序だてて放出する必要があるため、今回観察されたネズミマラリア原虫のメロゾイトの形態変化は、他のマラリア原虫種では観察する事が出来ない種々の侵入関連分子の細胞内局在の変化や細胞内シグナルを解析するのに、適したモデルを提供する事となる。また、精製したメロゾイトがすぐに赤血球侵入能力を失ってしまう熱帯熱マラリア原虫ではタイムラプスイメージング解析が困難であるため、精製メロゾイトが強靱で、より簡便に解析ができるネズミマラリア原虫を用いた赤血球侵入のタイムラプスイメージング解析の確立と応用は、より一般的な手技と考えられる。

## (3) 今後の展望

①RhopH 複合体の構成分子のうち、RhopH1 の疎水性領域が赤血球膜へ挿入されるモデルが提唱された (Nguitrage et al. 2011)。しかし、研究代表者は以前に、赤血球のプロテアーゼ処理により、RhopH 複合体の赤血球への結合が消失する事を見出しており、RhopH1 の赤血球膜への結合（もしくは挿入）には、赤血球側のタンパク質成分の関与が必要であると考えられる。そのため、トランスポーター活性への関与を含めて、RhopH 複合体の機能を明らかにするために、RhopH1 の赤血球結合（もしくは挿入）に必要な領域および複合体の構造についての解析を、作製した組換えタンパク質および組換え原虫を用いて、引き続き行う予定である。

②赤血球から放出されたメロゾイトが次の赤血球に侵入するまで形態変化を起こす際に、種々の酵素が活性化されたり、AMA1-RON 複合体の構成成分や赤血球認識リガンド分子が細胞内小器官からメロゾイト表面に放出されることが予想される。本研究で確立したネズミマラリア原虫の赤血球侵入のタイムラプスイメージング解析系により、これらの分子動態を詳細に解析してゆくことで、マラリア原虫の赤血球侵入の分子機序がより明らかとなり、原虫増殖を抑制する多くの標的が明らかとなることが期待される。

## 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1件)

- ① Yahata K, Treeck M, Culleton R, Gilberger TW, Kaneko O. Time-lapse imaging of red blood cell invasion by the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. PLoS One. 2012;7(12):e50780. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① Yahata K, Kaneko O. "Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites." The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases and The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium、長崎、平成 24 年 12 月 10 日-12 日
- ② Mutungi JK, Kaewthamasorn M, Culleton R, Sakaguchi M, Yahata K, Kaneko O. "Expression of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein in merozoite and sporozoite." The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar、宮崎市、平成 24 年 5 月 23 日-25 日
- ③ Yahata K, Kaneko O. "Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites." The 7th Molecular Approaches to Malaria 2012、オーストラリア、平成 24 年 2 月 19 日-23 日
- ④ 矢幡一英, 金子修 「Time-lapse imaging を用いたマラリア原虫の赤血球侵入時における動態解析」感染症若手フォーラム、長崎市、平成 24 年 2 月 2 日-4 日
- ⑤ Mutungi JK, Kaewthamasorn M, Culleton R, Sakaguchi M, Yahata K, Kaneko O. "Expression of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein in merozoite and sporozoite." Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011 (II)、長崎市、平成 23 年 11 月 16 日-17 日
- ⑥ 矢幡一英, リチャード・カレトン, 金子修 「Time-lapse imaging を用いたマラリア原虫の赤血球侵入時における動態解析」第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会、東京都、平成 23 年 7 月 17 日-18 日
- ⑦ 矢幡一英, 金子修 「Live imaging を用いたマラリア原虫の赤血球侵入時における動態解析」第 9 回感染症沖縄フォーラム、宜野湾市、平成 23 年 2 月 10 日-12 日
- ⑧ 矢幡一英, Treeck M, Culleton R, 井上愛美, Gilberger TW, 金子修 「熱帯熱マラリア原虫とローデントマラリア原虫を用いた赤血球侵入時の動態観察」第 9 回分子寄生虫・マラリア学研究フォーラム、長崎

市、平成 22 年 10 月 8 日-9 日

- ⑨ Yahata K, Treeck M, Culleton R, Inoue M, Gilberger TW, Kaneko O. "Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites." The 12th International Conference of Parasitology、オーストラリア、平成 22 年 8 月 15 日-20 日
- ⑩ Mutungi JK, Kaewthamasorn M, Culleton R, Sakaguchi M, Yahata K, Kaneko O. "Characterisation of PyRON5, a *Plasmodium yoelii* rhoptry neck protein." 第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、平成 22 年 5 月 20 日-21 日
- ⑪ 矢幡一英, リチャード・カレトン, 井上愛美, 金子修 「熱帯熱マラリア原虫とローデントネズミマラリア原虫を用いた赤血球侵入時の動態観察」第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、平成 22 年 5 月 20 日-21 日
- ⑫ Yahata K, Culleton R, Inoue M, Kaneko O. "Time-lapse imaging of red blood cell invasion by rodent malaria parasites." 6th Annual Conference on the Biology and Pathology of the Malaria Parasite、ドイツ、平成 22 年 5 月 3 日-5 日

[図書] (計 1 件)

- ① 金子修: 【ノーベル賞と医学の進歩・発展】第 3 回 マラリア原虫発見の歴史と今日的課題。最新医学 2012;67(12):2828-2830.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金子 修 (KANEKO OSAMU)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号：50325370

### (2) 連携研究者

矢幡 一英 (YAHATA KAZUHIDE)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：40467965  
カレトン リチャード (CULLETON RICHARD)  
長崎大学・熱帯医学研究所・准教授  
研究者番号：10503782

### (3) 研究協力者

Morakot Kaewthamasorn  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程大学院生  
Joe Kimanthi Mutungi  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・博士課程大学院生