

片は容易に脱落するため、確実な種類同定はやっかいである。また、シマカ類の人為的な持ち込みは成虫だけでなく卵でも報告されており、卵で種類同定を行うことも重要な課題とされてきた。本研究で成虫を対象として作成されたプライマーが、卵に対しても適用できることがわかった。シマカ類にはネッタイシマカやヒトスジシマカのように広範囲に分布する種類に加えて、局所的に分布する多くの種類が記載されている。したがって、地域ごとに適切に選定されたシマカ類を対象とした分子分類システムを確立することが重要であり、本研究の成果はひとつのケーススタディとして評価できる。

E. 結論

形態的に酷似するハマダラカ属 *hyrcanus* グループの分子分類を行うための手法が確立され、我国産マラリア媒介蚊の分布の現状があきらかなった。北海道釧路湿原には、これまで我が国では生息が確認されていなかったハマダラカの一つが生息していることが明らかになった。

医学的な重要度の高いハマダラカ属、イエカ属、ヤブカ属の疾病媒介蚊を対象とした分子分類のシステムが確立できた。これによって、検疫業務で国際線航空機や船舶から得られた損傷の激しい蚊サンプルでも、確実に種類を同定することが可能となった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Park, M.H., Choochote, W., Kim,

S.J., Somboon, P., Saeung, A., Tuetan, B., Tsuda, Y., Takagi, M., Hoshi, D., Ma, Y. and Min, G.S. 2008. Nonreproductive isolation among four allopatric strains of *Anopheles sinensis* in Asia. J. Am. Mosq. Control Assoc., 24: 489-495.

Higa, Y., Toma, T., Tsuda, Y. and Miyagi, I. 2010. A multiplex PCR-based molecular identification of five morphologically related, medically important subgenus *Stegomyia* mosquitoes from the Genus *Aedes* (Diptera: Culicidae) found in the Ryukyu Archipelago, Japan. Jpn. J. Infect. Dis., 63: 312-316.

Somboon, P., Rory, A., Tsuda, Y., Takagi, M. and Harbach, R. E. 2010. Systematics of *Anopheles (Cellia) yaeyamaensis* sp. n., alias species E of the *An. minimus* complex in southeastern Asia (Diptera: Culicidae). *Zootaxa* 2651: 43-51.

2. 学会発表

今西望、高井憲治、金京純、津田良夫、小林睦生、糸山亨、沢辺京子。釧路湿原周辺に生息するハマダラカ成虫の形態的特徴。第62回日本衛生動物学会東日本支部大会、2010. 10. 16. 千葉県印西市。

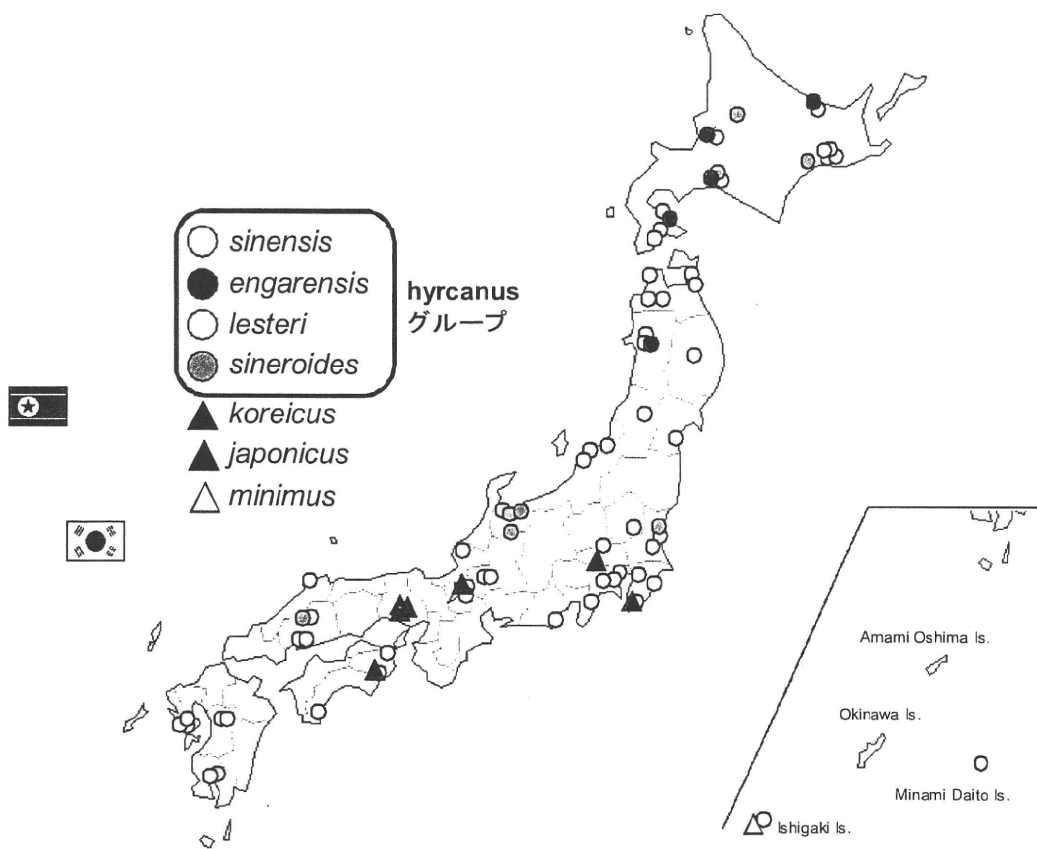


図1 本研究で生息が確認されたハマダラカ類とその採集場所

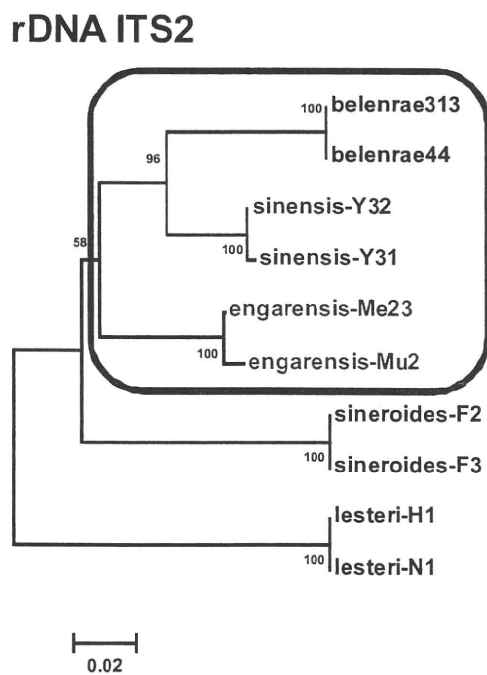


図2 rDNA・ITS2領域の塩基配列の類似度に基づいて描いた北海道産ハマダラカの樹状図

表 1 シマカ類の分子分類で検討した種類と分析に用いた系統

種 類	系 統
ネッタシマカ (<i>Aedes aegypti</i>)	ベトナム産、エルサルバドル産、タイ産、 インドネシア産、ケニア産
ヒトスジシマカ (<i>Aedes albopictus</i>)	日本産（沖縄、長崎および東京）、シンガ ポール産、ベトナム産
ヤマダシマカ (<i>Aedes flavopictus</i>)	日本産（佐賀および沖縄）
リバーシマカ (<i>Aedes riversi</i>)	日本産（沖縄）
ダイトウシマカ (<i>Aedes daitensis</i>)	日本産（南大東島）

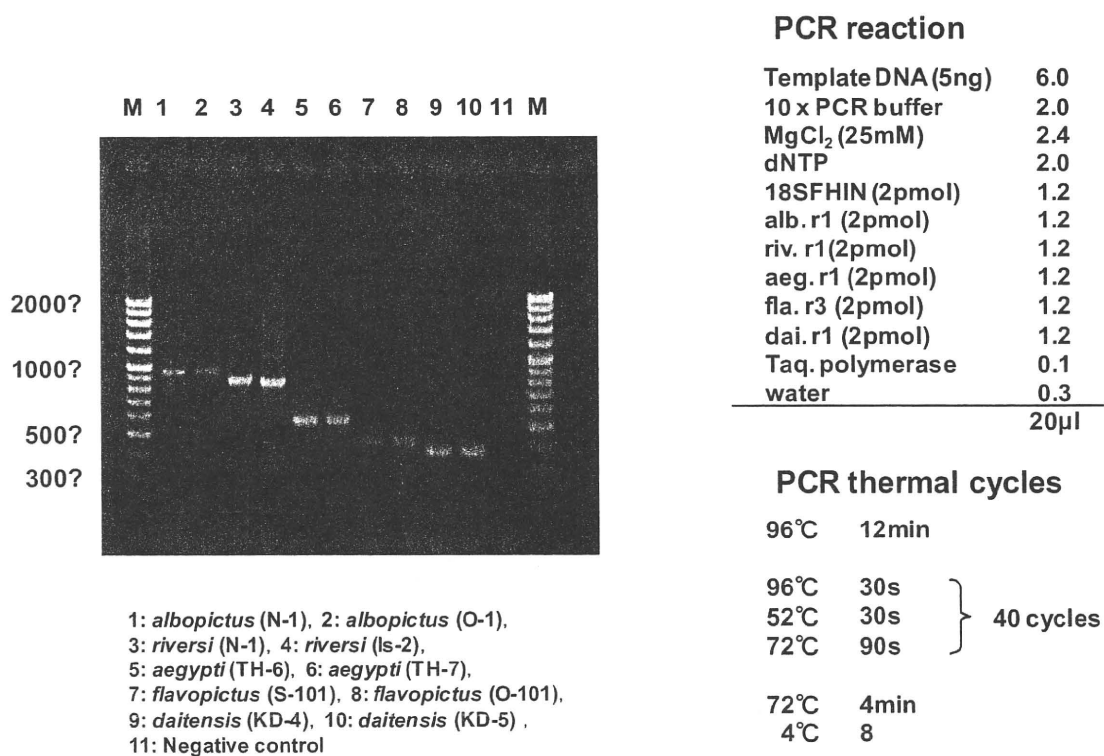


図 3 シマカ類 5 種の分子分類用プライマーによる種特異的バンドの検出結果と PCR 条件

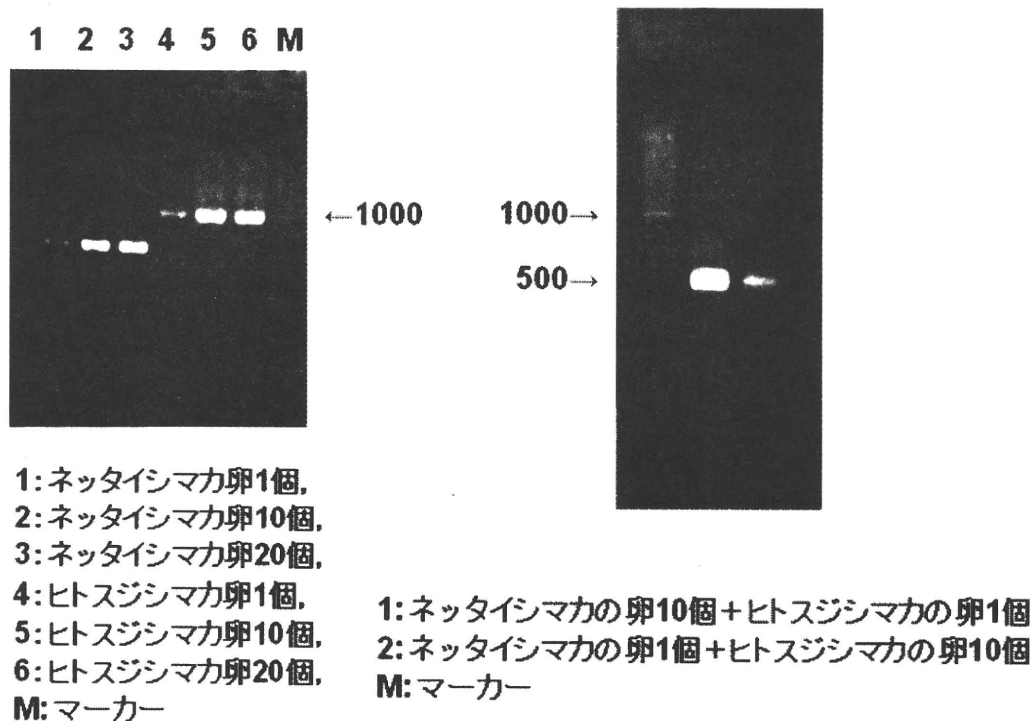


図4 ネットアイシマカとヒトスジシマカの卵を用いた種特異的な PCR 産物の増幅結果

表2. イエカ属の疾病媒介蚊とこれまでに開発したプライマー名と生成物のサイズ

種名	疾病媒介能	リバースプライマー名	生成物のサイズ
<i>Culex vishnui</i> subgroup			
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	JEV*	CT2REV	約536bp
<i>Cx. vishnui</i>	JEV	CT2REV	約246bp
<i>Cx. psuedovishnui</i>	JEV	CP1REV	約344bp
<i>Cx. univittatus</i> subgroup			
<i>Cx. fuscocephala</i>	JEV	CfscR1	約630bp
<i>Cx. gelidus</i> subgroup			
<i>gelidus</i>	JEV	CgliR1	約835bp
<i>Cx. sitiens</i> subgroup			
<i>sitiens</i>	JEV	CsitR1	約1,015bp
<i>Cx. pipiens</i> group			
<i>quinquefasciatus</i>	フィラリア	CquiR1	約470bp

フォワードプライマーは18SFHINを用いる

*JEV (日本脳炎ウイルス)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク」
平成20—22年度 総合分担研究報告書

マラリア原虫の遺伝的多様性とその分布

分担研究者 田邊 和祐, 大阪大学微生物病研究所 招聘教授

研究要旨 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の遺伝的多様性はマラリアの獲得免疫やワクチンの有効性と密接に関わる。しかるに遺伝的多様性の分布に関してはまだ不明な点が多く残されている。本研究では、世界各地の *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性の定量的解析及び、その多様性の決定における人類集団の歴史の影響の検討を行った。タンザニア、ガーナ、タイ、フィリピン、パプアニューギニア、ソロモン諸島、ブラジル、ベネズエラから約 1,300 株を集め、そのうち多重感染を除いた約 500 株について、非抗原タンパク遺伝子 (*serca*, Ca^{2+} -ATPase; *adsl*, adenylosuccinate lyase), ワクチン候補抗原遺伝子 (*mssl*, merozoite surface protein-1; *amal*, apical membrane antigen-1; *csp*, circumsporozoite protein) の全長シーケンスを得た。解析の結果、塩基多様度はどの地域でも非抗原遺伝子よりも抗原遺伝子において高く、どの遺伝子においてもアフリカが他の地域よりも高かった。調べたハウスキーピング遺伝子及び抗原遺伝子のすべてにおいて、各地域の原虫集団の塩基多様度は東アフリカからアジア、オセアニアに至る地理的距離と強い負の相関を示し、塩基多様度の約 7～9 割が地理的距離によって決定されていることが判明した。また、*P. falciparum* 集団の遺伝的多様性が現生人類集団の出現とその地理的拡散と深く関わりながら形成されてきたことを示唆する成績を得た。これらの結果は、世界各地の *P. falciparum* 集団が遺伝的多様性において大きく異なることを示し、マラリアの獲得免疫やワクチン効果が異なる原虫集団において必ずしも一様には現れないことを示唆する。

A. 研究目的

エイズ、結核と並び世界の 3 大感染症の一つとされているマラリアは毎年、3 億人がかかり、百万人以上の命を奪っている原虫感染症である。マラリアの制圧のためにマラリアワクチンの開発が求められ、これまでに多くの費用と努力が投入されてきた。

しかし、ワクチンはいまだ現実のものとなっていない。

一方、マラリアの免疫獲得や将来のワクチンの効果にはマラリア原虫の遺伝的多様性が密接に関わる。マラリア原虫集団には異なる遺伝子型が数多く存在し、抗原型の異なる株が多数あれば、感染防御免疫の獲

得は容易ではなく、度重なる感染を経た後にはじめて成立することが推察できる。従って、マラリア原虫の遺伝的多様性の地理的差異、及び、多様性の決定要因の解明は重要である。

ヒトマラリアのうちで最も重要な熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) に関するこれまでの遺伝的多様性に関する研究から、大陸間の原虫集団では多様性が異なり、遺伝的に分化している点が明らかにされている。しかし、どの地域において最大の多様性が見られるのかについては一致した結論が得られていない。さらに重要なことに、遺伝的多様性を決定する要因についてはこれまで解析されてこなかった。*P. falciparum* はヒトのみを自然宿主とするので、*P. falciparum* 集団の履歴は人類集団の起源とアフリカからの拡散に大きく依存すると考えられる。人類集団の遺伝的多様性は、アフリカを起点として地理的に離れるにつれてゆるやかに減少することが最近の研究で明らかにされている。一方、マラリア流行地域の疫学的状況や伝播度の地域差は非常に大きく、これらが地域の原虫集団の遺伝的多様性に影響を与えている可能性もある。また、薬剤や殺虫剤によるマラリア対策による選択圧も影響していると思える。

本研究では、世界各地の *P. falciparum* 集団における遺伝的多様性とその分布の解析を行い、遺伝的多様性に人類集団の歴史がどの程度関わっているのかを検討する。

B. 研究方法

P. falciparum の野外株は以下の国（地域）から得た。タンザニア東沿岸部 Rufiji 地区、356 株(1993 年-2003 年) (Tanabe et al., 2007)、タイ北西部 Mae Sot 地区(1995 年) (Sakihama et al., 1999)、フィリピンパラワン島、114 株(1996 年) (Sakihama et al., 2007)、ソロモン諸島ガダルカナル島、90 株(1996 年) (Sakihama et al., 2006)。ガーナ及びパプアニューギニアからは東京女子医科大学熱帯医学国際環境教室が採取したサンプルを用いた。ガーナは西沿岸部 Winneba 付近、182 株(2004 年)、パプアニューギニアは東 Sepik 州 Wewak 地区、195 株(2001-2002 年)。ベネズエラの 10 株はアリゾナ州立大学の Escalante 博士、ブラジルの 151 株はサンパウロ大学の Ferreira 博士から供与を受けた。

感染血液 75 ml を Whatman 社の濾紙 (31ETCHR) に吸着させ、乾燥させた。濾紙からのマラリア原虫のゲノム DNA は我々の方法によって抽出した (Sakihama et al., 2001)。

全長塩基配列を決定した遺伝子は、抗原遺伝子として、赤血球期の抗原である merozoite surface protein-1 (*mssl*, 約 5.0 kb) 及び apical membrane antigen-1 (*ama1*, 約 2.2 kb)、スポロゾイト期の抗原である circumsporozoite protein (*csp*, 約 1.4 kb)、非抗原遺伝子として Ca^{2+} -ATPase (*serca*, 約 3.7 kb)、adenylosuccinate lyase (*adsl*, 約 1.4 kb) の 5 種類である。塩基配列の決定は、PCR による *mssl* ハプロタイピングにより多重感染株を除いた単独遺伝子型感染株についてダイレクトシーケンス法で行った。

得た塩基配列は Clustal W によって整列化を行い、配列中の認められた反復配列と挿入・欠失部分は解析対象から除外した。塩基多様度は、塩基サイト当たりの多型サイト数 (θ_s) を用いた。これは DnaSP version 4.5 によって算出した。

世界各地の *P. falciparum* 集団の共通祖先の年代推定は、チンパンジーマラリア原虫 *P. reichenowi* の *serca* 及び *adsl* 遺伝子の塩基配列を決定し、それを外群にして *P. falciparum* との種間、及び、*P. falciparum* 集団内の遺伝的距離を測定して求めた (Tanabe, et al., 2004)。このとき、*P. reichenowi* と *P. falciparum* の分岐年代を 250 万年前から 600 万年前とした。

C. 研究結果

得られたシーケンス本数と認められた SNP (単塩基多型) サイトの数は以下である。*serca* では 514 本 (49 個)、*adsl* では 519 本 (14 個)、*mssl* (MAD20 タイプのみ) では 364 本 (454 個)、*ama1* では 505 本 (96 個)、*csp* では 550 本 (37 個)。

(1) 抗原遺伝子、非抗原遺伝子における塩基多様度

塩基多様度は、地域による差異、及び、遺伝子による差異が明瞭に認められた。しかし、調べたどの地域でも非抗原遺伝子 (*serca*, *adsl*) よりも抗原遺伝子 (*mssl*, *ama1*, *csp*) において 5-10 倍ほど高かった。また、どの遺伝子においてもアフリカが他の地域よりも高かった。*csp* では地域差が明瞭で、東南アジア > 南米 > オセアニアという順になった。

(2) 塩基多様度の地理的分布

アフリカからの地理的距離に依存して世界各地の *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性が減少しているかどうかを調べた。地域の原虫集団のアフリカからの距離は人類集団のアフリカからの移動ルートに沿って測った。ハウスキーピング遺伝子では、*P. falciparum* 集団の θ_s はタンザニアを起点として東南アジア、オセアニアに至り、高い負の相関 ($R^2 = 0.83$, $P = 0.004$) で地理的距離に依存して減少していた。南米では負の相関が認められなかった。ガーナを起点としても有意な相関 ($R^2 = 0.69$, $P = 0.02$) が認められたが、タンザニア起点の方が高かった。

P. falciparum 集団の遺伝的多様性が地理的距離以外の要因によって決定されている可能性があるため、マラリア流行度とマラリア伝播度が相関するかどうか検討した。その結果、文献的に調査した Annual parasite incidence (API), Entomological inoculation rate (EIR) はともに原虫の遺伝的多様度とは有意に相関しなかった。

抗原遺伝子においても東アフリカからの地理的距離に依存して塩基多様度が低下するかどうかを調べた。結果、調べた3種の抗原遺伝子のすべてにおいて θ_s は、タンザニアを起点として東南アジア、オセアニアに至り、高い負の相関で地理的距離に依存して減少していた。*mssl* では $R^2 = 0.81$, $P = 0.006$, *ama1* では $R^2 = 0.69$, $P = 0.02$, であり、*csp* では最も高い負の相関 ($R^2 = 0.90$, $P = 0.001$) が認められた。

(3) 地域原虫集団の年代推定

地域の *P. falciparum* 集団の年代推定の結果は、アフリカが 5.5 万年 – 14.6 万年、東南アジアが 3.1 万年 – 8.1 万年、オセアニアが 1.8 万年 – 6.2 万年、ブラジルが 4.6 万年 – 12.5 万年であった。この中で、ブラジルは南米における人類集団の出現年代と一致しない。南米における *P. falciparum* はおそらく、奴隷貿易時代の断続的なアフリカ人の移動に伴って移動したものと思える。また、バヌアツにおいても人類の出現時期（約 4 千年前）と原虫の年代推定が一致しない。それ以外の地域では、*P. falciparum* 集団の年代は人類集団の年代とおおまかに一致した。

D. 考察

世界各地の *P. falciparum* 集団における塩基多様度の比較を行ったのは本研究が初めてである。解析の結果、塩基多様度はどの地域でも非抗原遺伝子よりも抗原遺伝子において高く、どの遺伝子においてもアフリカが他の地域よりも高いことが明らかとなった。さらに、ハウスキーピング遺伝子の SNP による *P. falciparum* 地域集団の塩基多様度は東アフリカからアジア、オセアニアに至る地理的距離と強い負の相関を示すことが明らかとなった。地域の原虫集団の共通祖先の年代推定は現生人類集団の東アフリカ起源と約 6 万年前の出アフリカ移動と大まかに一致した。以上の結果は、*P. falciparum* はアフリカにおいて現生人類に古くから感染しており、ヒト集団の移動とともに世界に広まったという仮説を支持し、原虫集団の遺伝的多様性が現生人類集団の出現とその地理的拡散と深く関わ

りながら形成されてきたことを示唆する。

一方、地域におけるマラリア流行度・伝播度の差異や薬剤や殺虫剤による最近のマラリア対策は *P. falciparum* の遺伝的多様性に大きな影響を与えていなかった。例えば、ソロモン諸島ではマラリアコントロール計画により 1970 年代後半にはマラリアリア罹患率が大きく減少したが、このことによってアフリカからの地理的距離に依存した原虫の遺伝的多様性の低下という相関の例外となることはなかった。本研究の結果はさらに、世界各地で生息種が異なるマラリア媒介蚊の種類は *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性にそれほど影響を与えていないことも示唆する。

東アフリカからの地理的距離に依存した *P. falciparum* の遺伝的多様性の低下はハウスキーピング遺伝子のみならず、3 種類のワクチン候補抗原遺伝子についてもあてはまることが判明した。この知見はマラリア感染防御の獲得免疫や近い将来に開発されるであろうマラリアワクチンの効果に関し、重要な示唆を与える。マラリア感染では株特異的免疫が働くので、多様度の高いアフリカではマラリア防御免疫の獲得が多様度の低い東南アジア、オセアニア、南米よりも容易には成立しないことが推察できる。同時に、将来のマラリアワクチンの効果も多様度の低い地域でより有効なことが予想できる。

パプアニューギニアやソロモン諸島ではマラリア感染が場所によっては年数百回を超え、アフリカ並みに高い地域も存在する。

しかも、オセアニアでは抗原多様性が低い。こうした流行地では低い抗原レパートリーの度重なる感染が予想され、防御免疫の獲得が比較的早期に成立することが推定できる。オセアニアではマラリア流行度が高い割に脳マラリアなどの重症マラリアが希で、この理由については解明されていなかった。Maitland らはこのマラリア感染病態現象を Pacific enigma と読んでいる(Maitland et al., 1998) が、本研究によって、Pacific enigma のマラリア原虫の要因として抗原多様性の低さが強く示唆された。

E. 結論

本研究から、南米以外の世界各地における *P. falciparum* 集団の遺伝的多様性の約7～9割が東アフリカからの地理的距離によって決定されていることが明らかとなった。さらに、*P. falciparum* は約6万年前の現生人類の出アフリ移動より前にすでに人類に感染しており、人類の出アフリ移動に伴って南米以外の熱帯世界に広まったことが強く示唆された。本研究は過去の人類の移動が原虫集団の遺伝的多様性の分布に非常に大きな影響を与えていることを初めて示すものである。アフリカから地理的に遠くなるほど *P. falciparum* の抗原多様性が低くなる。これは、マラリア獲得免疫やワクチンの効果が地域によって大きく異なり、必ずしも一様には現れないことを示唆する。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. Kenji Hikosaka, Yoh-ichi Watanabe, Fumie Kobayashi, Seiji Waki, Kiyoshi Kita, Kazuyuki Tanabe. (2011) Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. **Parasitol. Int.** (in press).
2. Mary Chiaka Oguike, Martha Betson, Debbie Nolder, J. Russell Stothard, Immo Kleinschmidt, Carla Proietti, Teun Bousema, Mathieu Ndounga, Kazuyuki Tanabe, Edward Ntege, Richard Culleton, Colin J. Sutherland. (2011) *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. **Int. J. Parasitol.** (in press).
3. Kenji Hikosaka, Yutaka Nakai, Yoh-ichi Watanabe, Shin-Ichiro Tachibana, Nobuko Arisue, Nirianne Marie Q. Palacpac, Tomoko Toyama, Hajime Honma, Toshihiro Horii, Kiyoshi Kita, Kazuyuki Tanabe. (2011) Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. **Mitochondrion** 11:273-278.
4. Kazuyuki Tanabe, Sedigheh Zakeri, Nirianne Marie Q. Palacpac, Manada Afsharipad, Milijaona Randrianarivelojosia, Akira Kaneko, Aung Swi Prue Marma, Toshihiro Horii and Toshihiro Mita. (2011) Spontaneous mutations in the *Plasmodium falciparum* sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (PfATP6) gene among wide geographical parasite populations unexposed to artemisinin-based combination therapies. **Antimicrob. Agents Chemother.** 55: 94-100.

5. Fadile Yildiz Zeyrek, Shin-Ichiro Tachibana, Fehmi Yuksel, Nebiye Doni, Nirianne Palacpac, Nobuko Arisue, Toshihiro Horii, Cevayir Coban and Kazuyuki Tanabe (2010) Limited polymorphism of the *Plasmodium vivax* msp1 gene (*pvmsp1*) in isolates from Turkey. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 83: 1230-1237.
6. Moritoshi Iwagami, Seung-Young Hwang, Megumi Fukumoto, Toshiyuki Hayakawa, Kazuyuki Tanabe, So-Hee Kim, Weon-Gyu Kho, Shigeyuki Kano. (2010) Geographical origin of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea: haplotype network analysis based on the parasite's mitochondrial genome. **Malaria J.** 9: 184.
7. Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Mita, Thibaut Jombart, Anders Eriksson, Shun Horibe, Nirianne Palacpac, Lisa Ranford-Cartwright, Hiromi Sawai, Naoko Sakihama, Hiroshi Ohmae, Masatoshi Nakamura, Marcelo U. Ferreira, Ananias A. Escalante, Franck Prugnolle, Anders Björkman, Anna Färnert, Akira Kaneko, Toshihiro Horii, Andrea Manica, Hirohisa Kishino, Francois Balloux. (2010) *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. **Curr. Biol.** 70: 1-7.
8. Hiroshi Iseki, Satoru Kawai, Nobuyuki Takahashi, Makoto Hirai, Kazuyuki Tanabe, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi. (2010) Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method as a diagnostic tool of zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infection. **J. Clin. Microbiol.** 48: 2509-2514.
9. Hiromi Sawai, Hiroto Otani, Nobuko Arisue, Nirianne Palacpac, Leonardo de Oliveira Martins, Sisira Pathirana, Shiroma Handunnetti, Satoru Kawai, Hirohisa Kishino, Toshihiro Horii and Kazuyuki Tanabe. (2010) Lineage-specific positive selection at the merozoite surface protein 1 (*msp1*) locus of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. **BMC Evol. Biol.** 10: 52.
10. Kenji Hikosaka, Yoh-ichi Watanabe, Naotoshi Tsuji, Kiyoshi Kita, Hiroe Kishine, Nobuko Arisue, Nirianne Marie Q. Palacpac, Shin-ichiro Kawazu, Hiromi Sawai, Toshihiro Horii, Ikuo Igarashi, Kazuyuki Tanabe. (2010) Divergence of mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. **Mol. Biol. Evol.** 27: 1107-1116.
11. Hideya Mitsui, Nobuko Arisue, Naoko Sakihama, Yuji Inagaki, Toshihiro Horii, Masami Hasegawa, Kazuyuki Tanabe, and Tetsuo Hashimoto. (2010) Phylogeny of Asian primate malaria parasites inferred from apicoplast genome-encoded genes with special emphasis on the positions of *Plasmodium vivax* and *P. fragile*. **Gene** 450: 32-38.
12. Toshiyuki Hayakawa, Nobuko Arisue, Toshifumi Udono, Hirohisa Hirai, Jetsumon Sattabongkot, Tomoko Toyama, Takafumi Tsuboi, Toshihiro Horii, and Kazuyuki Tanabe. (2009) Identification of *Plasmodium malariae*, a human malaria parasite, in imported chimpanzees. **PLoS One** 4 (10): e7412.
13. Richard Culleton, Mathieu Ndounga, Fadile Yildiz Zeyrek, Cevayir Coban, Prisca Nadine

- Casimiro, Satoru Takeo, Takafumi Tsuboi, Anjali Yadava, Richard Carter, Kazuyuki Tanabe (2009) Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of Congo, West Central Africa. **J. Infect. Dis.** 200 (9): 1465-1469.
14. Satoru Kawai, Makoto Hirai, Kosuke Haruki, Kazuyuki Tanabe, Yuichi Chigusa. (2009) Cross-reactivity in rapid diagnostic tests between human malaria and zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi* infections. **Parasitol. Int.** 58: 300-302.
15. 田邊和祐, 美田敏宏. 集団遺伝学的アプローチが明かす新しいマラリア感染像 (2009) 医学のあゆみ, 229: 247-251.
16. Toshihiro Mita, Kazuyuki Tanabe, Kiyoshi Kita. (2009) Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. **Parasitol. Int.** 58: 201-209.
17. Moritoshi Iwagami, Pilarita T. Rivera, Elena A Villacorte, Aleyla S Escueta, Toshimitsu Hatabu, Shin-ichiro Kawazu, Toshiyuki Hayakawa, Kazuyuki Tanabe, Shigeyuki Kano. (2009) Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* in the Philippines. **Malaria J.** 8: 96.
18. S. Cheesman, K. Tanabe, H. Sawai, E. O'Mahony, and R. Carter (2009) Strain-specific immunity may drive adaptive polymorphism in the Merozoite Surface Protein 1 of the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi*. **Infect. Genet. Evol.** 9: 248-255.
19. T. Mita, K. Tanabe, N. Takahashi, R. Culleton, M. Ndounga, M. Dzodzomenyo, W. S. Akhwale, A. Kaneko, and T. Kobayakawa (2009) Indigenous evolution of *Plasmodium falciparum* pyrimethamine resistance multiple times in Africa. **J. Antimicrob. Chemoth.** 63: 252-255.
20. R. Culleton, T. Mita, M. Ndounga, H. Unger, P. Cravo, G. Paganotti, N. Takahashi, A. Kaneko, H. Eto, H. Tinto, C. Karema, U. D'Alessandro, V. do Rosário, T. Kobayakawa, F. Ntoumi, R. Carter, and K. Tanabe. (2008) Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. **Malaria J.** 7:174.
21. T. Hayakawa, R. Culleton, H. Otani, T. Horii, and K. Tanabe (2008) Big bang in the evolution of extant malaria parasites. **Mol. Biol. Evol.** 25 (10): 2233-2239.
22. Saito-Nakano, Y., K. Tanabe, K. Kamei, M. Iwagami, K. Komaki-Yasuda, S. Kawazu, S. Kano, H. Ohmae, T. Endo. (2008) Genetic evidence for *Plasmodium falciparum* resistance to chloroquine and pyrimethamine in Indochina and the Western Pacific between 1984 and 1998. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 79 (4): 613-619.
23. Y. Nishimoto, N. Arisue, S. Kawai, A. A Escalante, T. Horii, K. Tanabe, and T. Hashimoto. (2008) Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*. **Mol. Phylogenet. Evol.** 47 (1): 45-53.
- 学会発表
1. Kazuyuki Tanabe, Toshihiro Mita and Francois Balloux. Ancient out-of-Africa migration of *Plasmodium falciparum* along

- with modern humans. Parasites to Prevention. (Edinburgh) 2010.10.21.
2. K. Tanabe and T. Mita. Intimate association of evolutionary history of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with ancient demography of modern humans. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2010.9.10
 3. 田邊和祐, 美田敏宏, Nirianne Palacpac, 金子明, 堀部舜, 澤井裕美, 先濱直子, 大前比呂思, 中村正聡, 平山謙二, 堀井俊宏, 岸野洋久, 熱帯熱マラリア原虫の遺伝的多様性は東アフリカからの地理的距離によって決定される, 第79回日本寄生虫学会大会, 2010.5.20.
 4. 美田 敏宏, 塚原 高広, 高橋 延之, 遠藤 弘良, 田邊 和祐, 熱帯熱マラリア原虫はどのような順番でdhps遺伝子に変異を蓄積していくか, 第79回日本寄生虫学会大会2010.5.20.
 5. 中野 由美子, 美田 敏宏, 中曾根 英子, 田邊 和祐, アーカイブ標本による熱帯熱マラリア原虫における薬剤耐性遺伝子型の同定, 第79回日本寄生虫学会大会, 2010.5.20.
 6. 美田敏宏, 田邊和祐, 遠藤弘良, アフリカにおける独立起源ピリメタミン耐性熱帯熱マラリア原虫, 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 2009.10.10
 7. K. Tanabe. Evolutionary genetic approach to antigen polymorphism of malaria parasites. 16th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases, Goettingen, Germany, 2008.9.26.
 8. 堀部 舜, 岸野 洋久, 田邊 和祐, マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)大陸間の集団分化と遺伝的交流, 集団履歴の推定 第11回日本進化学会大会(札幌) 2009.9.3
 9. 堀部舜, 岸野洋久, 田邊和祐, アレル頻度分布に基づくマラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 集団履歴の推定, 2008年度日本計量生物学会, 2008.6.4.

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク」
平成20-22年度 総合分担研究報告書

マラリア流行の血清疫学指標の開発

分担研究者 坪井敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授

研究要旨

研究要旨 コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、コドンを何ら改変することなくゲノムワイドに熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質約1700種を含むプロテインアレイの作製に成功した。我々が確立したハイスループット抗原スクリーニング法（アルファスクリーン法）により、その内374種類の組換えタンパク質とタイから得られた19人分のマラリア免疫血清によりスクリーニングを試行した。その結果、少なくとも一人の血清と反応する抗原タンパク質は161種存在することが明らかとなった。さらにマリ共和国のマラリア流行地から得た10名の免疫血清との反応性を検討した結果、10名全員の血清と反応した抗原8種類、半数（5名）以上の血清と反応した抗原が47種同定された。以上の結果より、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイのハイスループット抗原スクリーニングシステムが樹立され、ゲノムワイドな熱帯熱マラリア原虫新規抗原探索が可能となったと考えられた。

A. 研究目的

アジア地域におけるマラリア流行の解析に有用な新規の血清疫学指標の開発を行うため、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドに組換えタンパク質を発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に本研究を実施した。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タンパク質の内、

マラリアゲノム情報データベース

(PlasmoDB) より、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている抗原ステージ特異的遺伝子を選択した。これらに特異的なPCRプライマーを用いて約400種類のcDNAを増幅し、プラスミドベクターにクローン化した。また、cDNAクローン数を増加させるため、赤血球期原虫から完全長cDNAライブラリを作製し、約1300種類の独立したcDNAクローンを得た。これらのcDNAクローンからPCRによって転写用の鋳型DNAを作製し、それらとコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質を合成した。最終的に得られた組換えタンパク質を用いて、以下のスクリーニング

を実施した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行

これらのタンパク質とマラリア感染者血清との抗原抗体反応を検出するために、これまでに確立したアルファスクリーン法を応用した。この方法の利点は、ELISA法の10分の1の血清量と、微量の未精製組換えタンパク質を用いて、迅速に多検体のアッセイが可能で、検出感度もELISA法より優れている点にある。

3) タイ国及びマリ共和国において入手したマラリア流行地からの感染者血清の使用

タイ国カンチャナブリ県のマラリア流行地コン・モン・ター村において、共同研究者のJetsumon Prachumsri博士、及びJeeraphat Sirichaisinthop博士の協力の下、同村全体をコホートとする追跡研究の中で得られたマラリア免疫血清を昨年度同様使用した。また、マリ共和国のマラリア流行地において、研究協力者の米国国立衛生研究所三浦憲豊博士の協力の下、成人マラリア免疫血清を入手した。

(倫理面への配慮)

タイ国におけるマラリア患者血液の採取に当たってはタイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。また、マリ共和国におけるマラリア患者血液の採取に当たっては同国保健省および米国国立衛生研究所の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施されたものである。また、本血清試料の利用は坪井が愛媛大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の許可を得ている。

C. 研究結果および考察

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

約1700種の熱帯熱マラリア原虫赤血球期ピオチン化プロテインアレイを作製した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイの試行

上記の組換えタンパク質の内374種類を用いて、タイのコンモンタ村から得られたマラリア免疫ヒト血清19人分との反応性をアルファスクリーン法を用いて検討した。その結果、少なくとも一人以上の血清と反応した抗原分子が161種類選択された。また、約1700種の熱帯熱マラリア原虫赤血球期プロテインアレイを用いて、マリ共和国のマラリア流行地から得た10名の免疫血清との反応性を検討した結果、10名全員の血清と反応した抗原8種類、半数(5名)以上の血清と反応した抗原が47種同定された。以上の結果から、本法のハイスループット免疫スクリーニング系としての有用性が確認された。

3) 今後の課題

上記プロテインアレイを用いて、血清疫学指標となりうる抗原の網羅的探索をおこなう。まず、これまでに入手したタイ、マリ共和国のマラリア免疫血清を用いて実施する。その後、本年度本研究班員の大前博士から入手した太平洋島嶼部等のマラリア流行地から入手した免疫血清を用いて、同様のスクリーニングを行うことにより、地域間の原虫抗原に対する反応性の違いが検討できる。これらの結果が系統的に得られれば、マラリアの感染動向と、各種の原虫抗原に対する抗体価の変動を、大規模に追跡することが出来、将来の流行予知等に有用な血清疫学研究に用いることの出来る新

規抗原タンパク質の同定が可能となる。さらに、三日熱マラリアはアジア地域で熱帯熱マラリアと共に広範に流行し、ベクターコントロールや薬剤治療を中心とする対策が実施されているにもかかわらず、熱帯熱マラリアと比較して減少傾向は認められていない。世界的にマラリア撲滅が長期目標として設定された現在、今後は三日熱マラリア原虫にも研究対象を広げる必要がある。そのため、三日熱マラリア赤血球期原虫のプロテインアレイを作製し、新規抗原の網羅的探索を実施する。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたハイスループット抗原抗体反応スクリーニングにより、マラリア流行の血清疫学指標となりうる新規抗原タンパク質のスクリーニングがゲノムワイドに可能となると考えられた。

E. 健康危機情報

本研究により、マラリアの感染動向と各種の原虫抗原に対する抗体価の変動を、ゲノムワイドかつ大規模に追跡することが出来、将来の流行予知等に有用な血清疫学研究に用いる抗原タンパク質セットが準備できる。これにより海外渡航者に向けたマラリア感染危険度の情報を提供できる技術的基盤となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Su XZ, Tanabe K, Torii M.
Diversity and evolution of the rhoph1/clag

multigene family of *Plasmodium falciparum*.

Mol Biochem Parasitol. 2008, 158:11-21.

- 2) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y.

Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates.

Infect Immun. 2008, 76:1702-1708.

- 3) Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Kano S, Kawazu S.

Disruption of the *Plasmodium berghei* 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene hinders the sporozoite development in the vector mosquito.

Mol Biochem Parasitol. 2008, 159:142-145.

- 4) Takeo S, Arumugam TU, Torii M, Tsuboi T. Wheat germ cell-free technology for accelerating the malaria vaccine research. Expert Opin Drug Discov. 2009, 4:1191-1199.

- 5) Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K. Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, west central Africa. J Infect Dis. 2009, 200:1465-1469.

- 6) Takeo S, Hisamori D, Matsuda S, Vinetz J, Sattabongkot J, Tsuboi T. Enzymatic characterization of the *Plasmodium vivax* chitinase, a potential malaria transmission-blocking target. Parasitol Int. 2009, 58:243-248.

- 7) Otsuki H, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M. Single amino acid substitution in *Plasmodium yoelii* erythrocyte ligand determines its localization and controls parasite virulence. Proc Natl Acad Sci USA. 2009, 106:7167-7172.
- 8) Iriko H, Jin L, Kaneko O, Takeo S, Han ET, Tachibana M, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. A small-scale systematic analysis of alternative splicing in *Plasmodium falciparum*. Parasitol Int. 2009, 58:196-199.
- 9) Cao J, Kaneko O, Thongkuiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M. Rhoptry neck protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites. Parasitol Int. 2009, 58:29-35.
- 10) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. Acta Trop. 2010, 114: 171-176.
- 11) Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Kohama H, Tachibana M, Matsuzaki G, Torii M, Arakawa T. *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization. Infect Immun. 2010, 78: 3773-3782.
- 12) Blagborough AM, Yoshida S, Sattabongkot J, Tsuboi T, Sinden RE. Intranasal and intramuscular immunization with baculovirus dual expression system-based Pvs25 vaccine substantially blocks *Plasmodium vivax* transmission. Vaccine. 2010, 28: 6014-6020.
2. 学会発表
- 1) Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Sattabongkot J, Endo Y, Tsuboi T. Functional production of malaria proteins with wheat germ cell-free system. Keystone Symposia, Structural Genomics and its Applications to Chemistry, Biology and Medicine, Steamboat Springs, USA, January 6 - 11, 2008.
- 2) Tsuboi T, Takeo S. Wheat germ cell-free system: A breakthrough in malaria vaccine research. Forty-second annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Davis, USA, January 16-18, 2008.
- 3) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. Expression of malaria vaccine candidates using a wheat germ cell-free protein synthesis system without codon optimization. Third molecular Approaches to Malaria Meeting, Lorne, Australia, February 3-7, 2008.
- 4) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Torii M. Genome-wide malaria vaccine candidate discovery using wheat germ cell-free system. JSPS presents Sweden-Japan joint Seminar,

- Malaria Research – Diversity & Control, Stockholm, Sweden, June 11, 2008.
- 5) Tsuboi T.
Wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery.
Symposium on Capacity Building for Malaria Vaccine Development, Pune, India, June 21, 2008.
- 6) Tsuboi T, Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Otsuki H, Torii M.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 8-11, 2008.
- 7) Hitoshi Otsuki, Osamu Kaneko, Thongkukiattkul Amporn, Mayumi Tachibana, Hideyuki Iriko, Satoru Takeo, Takafumi Tsuboi, Motomi Torii
Erythrocyte- Binding-Like molecule and Virulence of *Plasmodium yoelii*.
19th Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA, September, 2008.
- 8) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Torii M.
Wheat germ cell-free system: A breakthrough in malaria vaccine candidate discovery.
17th International Congress for Tropical medicine and Malaria, Jeju Island, Korea, September 29 – October 3, 2008.
- 9) Tachibana M, Wu Y, Iriko H, Otsuki H, Sattabongkot J, Takeo S, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with recombinant proteins of a gametocyte protein Pfs230 expressed using wheat germ cell-free system successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 10) Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Torii M, Tsuboi T.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 11) Cao J, Kaneko O, Thongkukiattkul A, Tachibana M, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M.
A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 57th annual meeting, New Orleans, USA, December 7-11, 2008.
- 12) 大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、Thongkukiattkul Amporn、鳥居本美
ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子相 同体 EBL の局在と病原性
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 13) 曹俊、金子修、Thongkukiattkul Amporn、橘真由美、大槻均、坪井敬文、鳥居本美
A complex formation of rhoptry neck protein 2 with a microneme protein, AMA1, in *Plasmodium falciparum*.
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 14) Palacipac NQ, Arisue N, Culleton R, Tanabe K, Zeyrek FY, Coban C, Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Hotii

- T
- Diversity in geographically distinct *Plasmodium vivax* populations.
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 15) 竹尾暁、坂本寛和、平林直己、鳥居本美、坪井敬文
熱帯熱マラリア原虫赤血球期発病阻止ワクチン：新規候補抗原分子の探索
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 16) 橘真由美、永徳千穂、大槻均、Sattabongkot Jetsumon、鳥居本美、坪井敬文
生殖母体抗原 Pvs230 を標的とする新規三日熱マラリア伝搬阻止ワクチン
第 77 回日本寄生虫学会大会、長崎市、4/3-4、2008。
- 17) 坪井敬文、竹尾 暁
マラリアワクチンの歴史
第 16 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/3-6、2008。
- 18) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上弘恵、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、坪井敬文
新規マラリアワクチン候補抗原探索へ向けたハイスループットスクリーニング法の開発
第 16 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/3-6、2008。
- 19) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上弘恵、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、Jetsumon Sattabongkot、鳥居本美、坪井敬文
熱帯熱マラリア原虫感染におけるヒトの抗体応答プロファイリング
第 7 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、松山、10/10-11、2008。
- 20) 横内ゆき、韓銀澤、大槻均、伊与久菜摘、竹尾暁、坪井敬文、鳥居本美
LDH 活性測定によるネズミマラリア原虫増殖率の迅速簡便測定法の確立
第 49 回日本熱帯医学会大会、東京都、10/25-26、2008。
- 21) Otsuki H, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Iriko H, Takeo S, Tsuboi T, Torii M.
Erythrocyte-binding-like molecule and virulence of *Plasmodium yoelii*.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 22) Takeo S, Sakamoto H, Hirabayashi N, Torii M, Tsuboi T.
Novel antigens at *Plasmodium falciparum* schizont-merozoite stages as potential vaccine candidates.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 23) Kawazu S, Yano K, Otsuki H, Arai M, Komaki-Yasuda K, Tsuboi T, Torii M, Igarashi I, Kano S.
Disruption of 2-Cys peroxiredoxin TPx-1 gene in *Plasmodium berghei* hinders the sporozoite development.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 24) Suktawonjaroenpon W, Watanabe R, Han ET, Buates S, Krasaesub S, Takeo S, Sirichaisinthop J, Tsuboi T, Sattabongkot J.

- Update on field evaluation of LAMP for malaria diagnosis in Thailand.
Forty-third annual U.S.- Japan Parasitic Diseases Panel Meeting, Tokyo, Japan, January 7-8, 2009.
- 25) Tsuboi T, Wu Y.
Pfs230: Prefertilization
Transmission-blocking Vaccine Candidate.
Malaria Transmission Blocking Strategies.
Bangkok, Thailand, March 12-13, 2009.
- 26) Tsuboi T, Takeo S, Otsuki H, Tachibana M, Sattabongkot J, Torii M.
Wheat germ cell-free protein synthesis system: a breakthrough for the post-genome malaria vaccine candidate discovery.
Vivax malaria research III: 2009 and beyond,
Gamboa, Panama, May 24-28, 2009.
- 27) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G, Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan.
September 8-11, 2009.
- 28) Tachibana M, Iriko H, Muratova O, Song G, Wu Y, Sattabongkot J, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T.
Immunization with N-terminal region of a gametocyte protein Pfs230 successfully induce transmission-blocking antibodies against *Plasmodium falciparum*.
ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 29) Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Tachibana M, Miura K, Varma S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.
Identification of novel blood-stage vaccine candidates against *Plasmodium falciparum* by high-throughput immunoscreening.
ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 30) Aguiar JC, Bolton J, Wanga J, Urquhart A, Sacci JB, Limbach K, Tsuboi T, Ockenhouse C, Richie TL.
Discovering novel pre-erythrocytic antigens for malaria vaccines.
ASTMH 58th annual meeting, Washington DC, USA, November 18-22, 2009.
- 31) 宮田 健、小濱秀泰、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川 武
マラリアワクチン開発のための三部構成五価免疫賦活複合体
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 32) Sungkapong Tippawan, Culleton Richard, 矢幡一英、坪井敬文、鳥居本美、Sattabongkot Jetsumon、金子 修、Chotivanch Kesinee
Characterization of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein (PvSTP), a homolog of *P. falciparum* SURFIN.
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、3/27-28、2009。
- 33) 横内ゆき、大槻 均、橘 真由美、伊与久菜摘、韓 銀澤、竹尾 暁、坪井敬文、鳥居本美
LDH 活性測定によるネズミマラリア原

- 虫感染率の迅速簡便測定法の確立
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、
3/27-28、2009。
- 34) 坂本寛和、竹尾 暁、金子隆昌、谷上
弘恵、松岡和弘、橘真由美、澤崎達也、
Sattabongkot Jetsumon、鳥居本美、坪井敬
文
高速免疫スクリーニングによる新規熱
帯熱マラリア赤血球期ワクチン候補抗
原の探索
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、
3/27-28、2009。
- 35) 橘真由美、Wu Yimin、入子英幸、大槻
均、Sattabongkot Jetsumon、竹尾 暁、鳥
居本美、坪井敬文
コムギ無細胞系を用いた抗体誘導可能
な熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候
補抗原 Pfs230 の作製
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、
3/27-28、2009。
- 36) Kangwanransan Niwat、Jenwithisuk
Rachaneeporn、橘真由美、坪井敬文、鳥
居本美
A novel ookinete surface protein with high
potential of transmission-blocking vaccine
candidate.
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、
3/27-28、2009。
- 37) 小濱秀泰、宮田 健、原國哲也、坪井
敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、
鳥居本美、松崎吾朗、新川 武
酵母 *Pichia pastoris* 発現三日熱マラリア
伝搬阻止ワクチン Pvs25 の感染防御効果
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、
3/27-28、2009。
- 38) 高橋優三、奥祐三郎、青木 孝、赤尾
信明、嶋田淳子、鈴木 守、松岡裕之、
有園直樹、坪井敬文、金澤 保、由井克
之、竹内 勤
日本における寄生虫学・医動物学教育の
現況調査報告
第 78 回日本寄生虫学会大会、東京都、
3/27-28、2009。
- 39) 加藤 晶、竹尾 暁、坪井 敬文
マラリア原虫メロゾイトにおける新規
Inner Membrane Complex 関連分子の探索
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009。
- 40) 竹尾 暁、坪井 敬文
網羅と決め打ち：コムギ胚芽無細胞系組
換えタンパク質合成法を用いた、マラリ
ア原虫赤血球期発現分子の解析
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009。
- 41) 金子 隆昌、坂本 寛和、竹尾 暁、坪井
敬文
マラリア原虫に対する増殖阻害率を測
定済みの抗体を用いた新規ワクチン候
補抗原の探索
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009。
- 42) 埜本 竜宏、竹尾 暁、坪井 敬文
熱帯熱マラリア原虫メロゾイトにおけ
る新規抗原タンパク質の性状解析
第 17 回分子寄生虫学ワークショップ、
草津町、8/6-9、2009。
- 43) 北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum K、三
田村俊秀、坪井敬文、朝日博子、太田伸
生
熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium
falciparum* におけるオートファジーの役
割