

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14942

研究課題名(和文)サルはどこでマラリア原虫をもらうのか?：飛行型樹上トラップで樹上蚊に迫る

研究課題名(英文)Where Do Monkeys Get Malaria Parasites? Flying Traps for Tree-top Mosquitoes

研究代表者

益田 岳(MASUDA, GAKU)

京都大学・東南アジア地域研究研究所・連携助教

研究者番号：00455916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：東南アジアの森林型マラリアを媒介する主要な蚊に最適化したトラップを開発した。ゴールドスタンダードであるCDCライトトラップと互角の性能でありながら、より長時間動作し、軽量で、安価であり、かつニーズにあわせた改良が簡単にできるよう3Dプリンタで出力できる設計データを公開可能な形式で整備した。実地試験等で改良を重ね、マラリア蚊に最適化したトラップが完成した。また、これらをドローンに搭載して樹冠部の吸血蚊をサンプルするために必要な諸技術も開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルスに限らず世界の多くの感染症が初期においては人畜共通感染症の形であられる。しかしその感染の仕組みは、野生動物のサンプル採取が困難なことからよくわかっていない。本研究では樹冠部で睡眠する野生動物を吸血する蚊を採取する技術セットを開発した。これにより、夜間の樹冠部での危険な作業を直接行わずにドローンをもちいて安全に遠隔から実施できるため、アクセスが困難のため研究上のミッシングリンクとなっていた部分をうめるデータを容易に得ることができるようになる。この成果を派生させ、野生生物の知られざる姿に近づく研究の充実が可能となり、それらをもとにした感染症対策・政策実施が今後増えてくることが期待できる。

研究成果の概要(英文)： We have developed a trap optimized for the major mosquitoes that carry forest-type malaria in Southeast Asia. It is comparable in performance to the golden standard CDC light trap, but for a longer period of time it works, lightweight, inexpensive, and can be easily modified with a 3D printer to meet your needs. The design data was prepared in a format that can be released to the public. After repeated improvements in field tests, we completed a trap optimized for malaria mosquitoes. In addition, we have developed the technology necessary to sample blood-sucking mosquitoes in the canopy area using these traps.

研究分野：文化人類学、熱帯医学

キーワード：東南アジア ハマダラカ 森林型マラリア ドローンに機能付加 飛翔昆虫捕虫装置 3Dプリント 人畜共通感染症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

近年、東南アジアにおいてヒトのサルマラリア原虫 *P.knowlesi* 感染例が多数報告され、ハマダラカがサルからヒトへマラリアを伝播していることが確実となった(Nakazawa et al., 2009, IJP)。サルマラリアのヒトへの伝播コントロールには伝播実態の解明が重要である。マラリア伝播の分野で研究をリードしているオランダのワーニンゲン大学では、人工飼育蚊を用いて吸血血液が消化された後、窒素の安定同位体比を測定する(Helinski et al., 2008 Parasit Vectors)など、蚊の研究に汎用技術を応用している。しかし、自然界での伝播阻止に必要な蚊の行動研究では、なによりも野外の蚊の行動研究と採取とが必須である。

近年、小型電動モーターと高性能充電電池を搭載し GPS や各種センサで自動姿勢制御したドローンが市販されるようになった。小型、安全かつ操作が比較的容易なことから一部の研究者に利用されはじめ、地形、植生の観察に使われ成果をあげている。人獣マラリア研究への応用としては、野生サルの休息、睡眠場所である樹上に、ドローンは上空から安全に接近することができる(未発表:携帯電話型低価格サーモグラフィによるサルの樹上睡眠場所可視化)。このように独自に改良したドローンを用いることで、従来人間には危険がともなう夜間のトラップ設置回収も実際に可能となってきた。

2. 研究の目的

マラリア原虫 *p.knowlesi* が、自然宿主のサル間で感染していることを、ドローンにより樹上に設置・回収した吸い込みライトトラップでとらえる媒介蚊を使って、分子生物学的に明らかにする。

3. 研究の方法

上記目的のために、マカクザル(カニクイザル、アカゲザル)が樹上で休憩・睡眠する近傍に、吸い込み式飛翔昆虫ライト・トラップを、設置・回収する。蚊は中腸と唾液腺に分け、LAMP 法でスクリーニングした後、PCR にて該当部を増幅し、増幅産物をサンガー法でシーケンスして原虫種別および宿主を確定する。このために以下のハードルをクリアする必要がある。

I ドローン技術開発：積載力の高い防水機体にクレーン付きロボットハンドとサーモグラフィ、赤外線暗視カメラ(ここまで既存、実現済み) 夜間低空飛行安定装置と、自動航法機能を実装し、国内のサル山で試験飛行を重ねサルの位置特定とサル判別の技術開発を行う。
II ハマダラカ *An. Dirus* の採取：特定種ハマダラカに最適化するため、飼育蚊を使って波長への反応試験を行いライトトラップの照明波長を決定する(これは他の昆虫混入を少なくするためである)。ドローン懸架のライトトラップは独 AG Biogents 社のマラリア蚊用臭トラップを改造し照明と暗転自動起動機能、バッテリーを付加したものを複数製作する。採れたアノフェレス蚊は唾液腺と中腸を分離し、LAMP 法でスクリーニングした後それぞれスポロゾイトとガメトサイトを PCR で増幅・検出しその産物をサンガー法シーケンスで確定する。

4. 研究成果

2016 年

1 照明波長決定について:*An. Dirus* 蚊で行動観察と生体電気測定にて反応試験を行い、最適な照明波長を決定する件については、共同研究先の国内大学での *An. Dirus* 飼育が継続できない状態が起きたため、この蚊の卵を譲り受けていたベトナム国立マラリア学等研究所での実験に切り替え、H29 年 5 月に実施予定である。

2 クレーン付きロボットハンドについてはロボットハンド部分とクレーン部分を作成した。夜間低空飛行安定装置についてはレーザーメッシュビームによる障害物距離検知を実験した。gps 支援による自動航法機能については実装先の実機を製作している。

3 京都大学霊長類研究所マイク・ハフマン准教授(研究協力者)の協力のもと、共同研究として犬山のサル放飼群について、ドローンにつんだサーモグラフィによるサルの位置情報付き睡眠場所調査方法の実験を行い、良好な結果を得た。

4 本技術の調査への実地投入については：調査に協力を得ているベトナム・カンフー省が調査協力先研究所が整理統合で消滅したため、代わりにビンフック省国立公園の山間部で雨季(11月)の調査に投入しようとして現地航空局および軍、保健省出先機関などと調整した。結果、現地は国境地帯のため国軍が駐屯しており安全保障上の理由からドローンの飛行が認められないことが判明したため、ベトナムでは新型トラップの地上試験により種最適化をすすめることにした。飛行型トラップについてはかわりに国内で開発をすすめることにした。西表島での実験を行い、引き網式飛行型トラップを製作し飛行試験を行い良好な結果と知見を得た。

5 ベトナム調査中に得られた蚊サンプルの分析は研究協力者の分析のもと、原虫保有や殺虫剤耐性の有無等を検討した。これは論文となし、IF=3 の国際英語ジャーナルにアクセプトされた。

6 研究成果発表については、上記論文アクセプトのほか、国立マラリア学研究所にて本研究課題の新型トラップの製作方法などについて講演し、現地研究者・ラボ担当者・マラリア対策実務担当者らと意見交換を行った。

本トラップには誘引方法のひとつとして照明を用いている。従来の研究では光源の消費エネルギーとスペクトルに考慮した改良がなされていないため、この点の追求を研究の特徴のひとつとしている。ハマダラカ誘引に適した照明の波長を決定する試験を行った。まずは予備実験において、休息時の蚊にさまざまな光源により刺激をあたえた。休息時のハマダラカは、刺激に対しての反応が鈍いことから、刺激を照明だけに限らずターゲット蚊の生理でもっとも反応が強い（吸血行動に結びつく）二酸化炭素を含むガスの濃度勾配反応などその他の誘引方法にもついても比較試験ができるよう、個体の刺激反応試験装置を整えた。具体的には、レコードプレイヤーのピックアップ部分（筐体固定されたコイルと、細い金属管に永久磁石がついた可動式レバー部分からなる）をセンサーとして、可動レバー部分に麻酔をかけた蚊を瞬間接着剤で固定し、目がさめたところで刺激をあたえて反応を電圧信号として得るという装置である。得られた微小電圧はミリボルトオーダーだが、OP アンプをつかって増幅し、コンピューターに取り込んで分析しやすいようにした。生物個体を物理固定し、動きを計測する方法にした理由は、マイクロフォンによる空気を媒介した計測方法では周辺雑音（下水管を流れる水音）などにかき消されるほど蚊の動きが小さかったためである。マイクロフォンをセンサーに用いる場合、蚊の動きが音として観察できるのは至近距離を動いた瞬間だけである。実際には総観察時間にしめるデータ取得可能時間が極端に短く、効率的な実験が行えない。これを解決するために、マイクロフォン近傍をつねに飛び回るように、蚊を閉じ込めるチャンバーを小さくするとすぐ壁にぶつかるため蚊の反応が途切れてしまう。マイクロフォン式のアプローチは刺激反応試験には適していないため、物理的に振動をピックアップする上記センサー方式に変更した。なお、今日ではレーザー光などを投射し、反射光の時間変化をフォトトランジスタなどをセンサーとして用いて増幅する手法がとられる。この方法のメリットは蚊に光源と受光部を向け続けていることができる間には必ずしも蚊の胴体部分をどこかに固定していなくても刺激反応のデータが取得可能であるという点であり、休息時の胴体のわずかな動きなど、より自然環境にちかいデータが得られるというメリットがある。本研究ではこちらも検討したが、目的データは休息時のみではないため、上記の方法を主に用いた。

2017 年

1 ベトナム・カンボジア国境近くの森林内にて採取調査を行った。現場にて 3D ペンを使って立体物を製作し、モーターやリチウムイオンバッテリー、直流昇圧回路、明暗センサーなどをつかってトラップの試作を重ねた。

当初計画ではベトナム・カンフーの山間部の森林で調査を行う予定だったが、カウンターパート組織が資金不足に陥り、当該施設へのアクセス拠点となる研究所が閉鎖となったため、ここではできなくなった。代替地として、雨季直後の蚊の増える時期である 12 月にカンボジア国境近くの国立公園森林と村との境界地帯にて採取調査を行った。

現地で 3D ペンを用いてトラップを 10 数個製作し、それを毎晩の試験の結果をみながら修正するという集中的アプローチで開発をすすめた。最適化した蚊トラップを毎日改良しつづけた結果、当初の予定をこえるペースで、フィールドテストにて好成績を出すことができるようになった。具体的には、過去半世紀以上つねに媒介蚊成虫トラップのゴールデンスタンダードである CDC 型（ミニチュア）ライトトラップとのフィールドでの簡易対照試験において、特定種の捕獲数において、毎トラップ・毎夜あたりの性能がコンスタントに同等以上となった。休憩中の蚊の採取や吸血にきた蚊の人数もあわせ採取したアノフェレス族の蚊は過去最高記録の 400 以上となり、十分なサンプル数を得られたと考える。

2 今年度の成果でトラップの基本構造についてはコンセプトモデルが完成したため、プロダクションレベルの堅牢性と確実性をねらって 3D プリントによる製作を日本国内ですすめた。具体的には、低電圧での長時間駆動のための回路最適化、ベンチュリー効果をねらった特殊構造による流速の高速化、折りたたみ式の超軽量簡易トラップとしての派生モデルの製作、静粛性と長時間の安定動作をめざした PC ファン各種を検討して最適なファンの選択、ファンの翼デザインを鳥類の羽の生体模倣による静粛化の試み、DVD ドライブに使われている安価で超省電力モーターを流用した高効率ファンの製作などである。

3 国内での集中的開発・実験のため、非常に蚊が多く発生（3分で45匹程度）する千葉県内のとある丘陵の竹やぶに隣接する民間駐車場を借り上げ、近くに寝泊まりしながら昼夜6台ほどの試作トラップで連日テストと改良を繰り返した。

4 海外フィールドでの屋外試験と開発および国内での集中的屋外試験と開発の結果、2種類のトラップを製作した。1つは電源効率が高く、かつ材料も少なく軽量でありながら、従来の CDC トラップと同等の捕獲性能を得られるモデル、もうひとつは1ミリほどの薄いパネルの組み合わせで組み立て式とすることで、収納時のスペースを最小限にし、従来の1/5ほどのサイズと重さで同等の性能を発揮する省スペース・折りたたみ型トラップである。

5 ドローンの付加機能においては、水たまりの表面からボウフラを吸い取るための液体サンプリング装置、および、水たまりへのボウフラ対策の薬剤散布のための液体滴下装置を国内で製作し、屋内での飛行試験を完了した。

空中のマイクロダストのリアルタイムカウンター機能についても機能実装を完了した。さらにこの機能ももちいて地上付近の空中の水蒸気を間接的に測定し、空気中水分量を安価で高精度かつリアルタイムに、定量的に知ることができるようになった。この機能は数キロ程度と広範囲な調査候補地において、空中水分量から地上の環境を間接的に推定し、数百メートルの範囲にまでトラップの候補地をしぼるためのものである。

空中での物資落下装置を製作し、飛行試験を完了した。

成果報告として論文を2件発表した(1件は審査中)。関連して、医学部でのハンズオン形式の演習・講義を1件行った。

6 試作素材の物理特性の問題について：樹上トラップには直射日光が直接あたることになる。安価で操作もしやすく高温多湿環境でも安定した出力が得られる3Dプリンタによるトラップ製作にはこれが問題点のひとつとなる。3Dトラップには素材としてリール状態に巻き取った細長いPLA素材を用いる。このPLAフィラメントは試作が容易な反面、直射太陽による70度への昇温でガラス転移温度を超えてしまうため、変形する。3Dプリンタによる試作・製作強化、高温環境でも耐えられる素材による出力、電源まわりの接続の簡便さとロバストネスの追求、これらの技術を統合し、トラップの完成を目指す。

成果報告として論文を1件、学会発表を2件行った。関連して、順天堂大学医学部での講義を1件、教養学部での講義を1件行った。

得られた蚊サンプルの分析は研究協力者らの指導の元、実施し、ベトナムのカウンターパートと結果を共有し、論文執筆の準備をすすめている。

2018年

1 ドローンのフィールド活用研究会、マレーシア・サバ州立大学等にて研究成果を発表し、講評を得た。

2 継続研究のためマレーシア・サバ州立大学医学部と共同研究を行うことで合意し、調査候補地の選定を行った。現在、共同研究者らとともに研究計画を作成し、本研究計画の成果にもとづいた森林マラリアの感染制御を目指す研究デザインに発展させようとしている。

2019年 (2018年後半の延長実施)

1 前年までに実施したベトナム調査地で定点調査を継続実施した。

2 得られた蚊サンプルの分析は共同研究者らの指導の元、実施し、ベトナムのカウンターパートと結果を共有し、論文執筆の準備をすすめている。

3 ドローンのフィールド活用研究会、マレーシア・サバ州立大学等にて研究成果を発表し、講評を得た。

4 継続研究のためマレーシア・サバ州立大学医学部と共同研究を行うことで合意し、調査候補地の選定を行った。現在、共同研究者らとともに研究計画を作成し、本研究計画の成果にもとづいた森林マラリアの感染制御を目指す研究デザインに発展させようとしている。SATREPS、および科研、民間の研究助成金等にエントリーした。

5 派生成果：本科研成果を発展的に応用、活用するべく長崎大学熱帯医学研究所より共同研究の依頼があった。2019年8月の国内での技術予備試験をへて2019年12月からマラウィ共和国にて数次の共同研究を開始した。

6 本科研成果を発展的に応用、活用するべく共同応募した科研が採用され、マレーシアおよびベトナムにて2020年から開始となった。本研究では実際のフィールドである海外の調査地において、飛行トラップの試験ができなかったが、国内開発をすすめてきた。このトラップは構造において地上試験をおこなったハマダラカ最適化トラップに飛行に適した付加装置をくわえてドローンに搭載するものだが、これの実地試験を2020年度よりマレーシアの山間部においてすすめる準備がととのった。

まとめ：野望的な研究課題に対して実現の足かせとなる技術課題を個別に検討・克服できた。最終年度は(別予算であるが)派生成果のなかで、上空から広範囲に数センチの小さな水たまりを発見する技術開発も完了し、海外での実踏をふまえたマラリア蚊対策のモデル化研究をすすめるなど大きな進展があった。得られた蚊サンプルからは、サルやヒト、ウシから吸血した蚊もみつきり、p. knowlesi ぶくめさまざまなサルのマラリア原虫を検出して論文として発表した。

今後は、本科研成果物を応用して、東南アジアの森林型マラリアが問題となる場所において、樹冠部付近で直接採取したサンプルにより樹冠部でサルのマラリアの感染が起きていることを証明するフィールド研究を引き続きすすめたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Vu Duc Chinh , Gaku Masuda , Vu Viet Hung , Hidekazu Takagi , Satoru Kawai , Takeshi Annoura , Yoshimasa Maeno	4. 巻 47.9
2. 論文標題 Prevalence of human and non-human primate Plasmodium parasites in anopheline mosquitoes: A cross-sectional epidemiological study in southern Vietnam	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trop Med Health.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-019-0139-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Maeno Y, Quang NT, Culleton R, Kawai S, Masuda G, Hori K, Nakazawa S, Marchand RP	4. 巻 10-308
2. 論文標題 Detection of the Plasmodium falciparum Kelch-13 gene P553L mutation in sporozoites isolated from mosquito salivary glands in Southcentral Vietnam	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 1,5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1186/s13071-017-2247-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshimasa Maeno, Ph.D.; Nguyen Tuyen Quang, Ph.D; Richard Culleton, Ph.D.; Satoru Kawai, DVM, Ph.D.; Gaku Masuda, MS; Kaoru Hori; Shusuke Nakazawa, MD, Ph.D.; Ron P Marchand	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of the Plasmodium falciparum Kelch-13 gene P553L mutation in sporozoites isolated from mosquito salivary glands in Southcentral Vietnam	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） PARV-D-16-01314R3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomonori Hoshi, Victor A. Brugman, Shigeharu Sato, Thomas Ant, Bumpei Tojo, Gaku Masuda, Satoshi Kaneko, Kazuhiko Moji, Jolyon M. Medlock & James G. Logan	4. 巻 9
2. 論文標題 Field testing of a lightweight, inexpensive, and customisable 3D-printed mosquito light trap in the UK.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47511-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 益田岳
2. 発表標題 樹上の感染者を追う 蚊媒介性感染症研究へのドローンの活用
3. 学会等名 フィールドサイエンスのためのドローン活用研究会、京都府京都市
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 益田岳
2. 発表標題 液体を垂らすドローン
3. 学会等名 フィールドサイエンスのためのドローン活用研究会、広島県三原市
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Gaku MASUDA
2. 発表標題 Design your own traps for future entomology
3. 学会等名 Dang cong san viet nam quang vinh muon nam, NIMPE, Vietnam (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Gaku MASUDA
2. 発表標題 Vector Borne Disease Control and Survey
3. 学会等名 Dang cong san viet nam quang vinh muon nam, NIMPE, Vietnam (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Tomonori Hoshi, Victor A. Brugman, Shigeharu Sato, Thomas Ant, Bumpei Tojo, Gaku Masuda, Satoshi Kaneko, Kazuhiko Moji, Jolyon M. Medlock & James G. Logan
2. 発表標題 Field testing of a lightweight, low-cost, modifiable light trap for mosquitoes made with 3D printers in UK
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Tropical Medicine, Ginowan City, Okinawa Prefecture (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 益田岳
2. 発表標題 小型ドローンによる安価な熱赤外画像遠隔モニター
3. 学会等名 フィールドサイエンスのためのドローン活用研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 益田岳
2. 発表標題 見るから攻めるへ ドローンによるセンシング+環境変化アプローチ
3. 学会等名 フィールドサイエンスのためのドローン活用研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 益田岳
2. 発表標題 動物媒介性感染症対策のためのドローン活用
3. 学会等名 フィールドサイエンスのためのドローン活用研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Gaku MASUDA
2. 発表標題 Zoonotic Malaria: How can we approach to fill the missing link?
3. 学会等名 Seminar ,Borneo Medical and Health Research Centre (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 捕虫器	発明者 星 友矩、門司 和彦、金子 聡、佐藤 恵春、東城 文柄、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-175672	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

フィールドサイエンスのためのドローン活用研究会を主催している。会員は1,246名(2020年7月現在)。新しいアイデアの検討などが日常的に活発に行われ、それをもとに研究のプロトタイプが作成されたり、製品化が行われている。また関連市販製品やサービスの技術評価や精度評価など専門家たちの意見交換の場となっている。
<https://www.facebook.com/groups/458393260990199/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	前野 芳正 (MAENO YOSHIMASA)		
研究協力者	高木 秀和 (TAKAGI HIDEKAZU)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	チン ヴ (Chinh Vu)		
研究協力者	フン ヴ ヴィエト (Hung Vu Viet)		