

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2019～2023

課題番号：19KK0205

研究課題名（和文）野生由来マカク類のサルマリアの網羅的解析と宿主特異性を規程する宿主因子の探索

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of monkey malaria in wild macaques and search for host factors that regulate host specificity

研究代表者

岡本 宗裕（Okamoto, Munehiro）

京都大学・ヒト行動進化研究センター・教授

研究者番号：70177096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：タイ国立霊長類センターがこれまで実施した調査で、ある寺院周辺のカニクイザルが *Plasmodium cynomolgi* に高率に感染している事が判明していた。そこで、同センターの定期健康診断の際、この寺院周辺に由来するサルを中心にサンプルを採取した。サンプルはMinIONを用いてタイで分析する予定であったが、コロナウイルス流行により十分な実験が実施できなかったため、タイの共同研究者に分析を依頼し現在分析中である。また、同寺院周辺で採集したハマダラカについて遺伝子検査によるマラリア感染の有無を調べたところ、通常のPCR法では検出できなかったが、ddPCRによって感染蚊を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、ヒトのマラリアは4種とされていたが、近年サルマリア原虫によるヒトの発症例が多数報告されており、野生ザルのサルマリア原虫の感染状況の把握は喫緊の課題である。本研究では、野生由来マカク類に寄生しているサルマリア原虫を網羅的に調べるとともに、宿主特異性を規定する宿主側の遺伝的要因を特定する。また、検出された各種サルマリア原虫を分離・凍結保存することにより、モデル作出を含めた今後の実験に利用できる資源を確保する。さらに本研究を通して、我が国の研究者がマラリアに限らず医学・薬学分野のサル類を用いた共同研究を、同霊長類センターにおいて実施できる研究環境を構築することができる。

研究成果の概要（英文）：Previous surveys conducted by the National Primate Center of Thailand had revealed that cynomolgus monkeys living in the vicinity of a certain temple were highly infected with *Plasmodium cynomolgi*. Therefore, samples were collected from monkeys originating from this temple area during regular health checkups at the center. The samples were to be analyzed in Thailand using MinION, but due to the coronavirus outbreak, sufficient experiments could not be conducted, so we asked a collaborator in Thailand to analyze the samples, and the analysis is now underway. In addition, the presence or absence of malaria infection was examined by genetic testing of hamadara mosquitoes collected in the vicinity of the temple. Although the presence of malaria infection could not be detected by the usual PCR method, it was possible to confirm infected mosquitoes by ddPCR.

研究分野：Molecular Parasitology

キーワード：サルマリア タイ カニクイザル ハマダラカ タイ国立霊長類研究所 ナノポアシーケンシング ddPCR 宿主特異性

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯・亜熱帯を中心とした地域に分布するハマダラカによって媒介される疾患であり、いままなお年間 3 億～5 億人の有病者と、44 万人以上の死亡者を数える重要感染症のひとつである。これまでクロロキンをはじめとするさまざまな抗マラリア薬が開発されてきたが、そのたびに薬剤耐性マラリアが出現し、抗生物質と同様、新規薬剤開発と耐性株出現のいたちごっこが続いている。マラリアの感染を阻止するもう一つの方法として古くからワクチン開発が試みられているが、いまだ有効な感染防御ワクチンは開発されていない。新規薬剤やワクチンの開発にはヒトマラリアの実験モデルが不可欠だが、ヒトのマラリア原虫は他の動物には感染しないため、ネズミマラリア原虫やサルマラリア原虫を用いたモデル系が作出されている。しかし、有用なモデル系は絶対的に不足している。

従来ヒトのマラリア原虫は 4 種とされていたが、近年カニクイザルを宿主とする *Plasmodium knowlesi* が第 5 のヒトマラリアとして注目を集めている。サルマラリアは、東南アジアのマカク類を中心に 30 種ほどが報告されている。1960 年代の実験室内の偶発事故やボランティアへの感染実験から 10 種ほどがヒトへも感染するとされていたが、自然感染の報告はごく限られていた。ところが、2004 年ボルネオ島でマラリア患者のマラリア原虫 DNA を調べたところ、58%が *P. knowlesi* であった。これ以降、東南アジアの広い地域からヒトの *P. knowlesi* 自然感染例が見つかっている (Pongvongsa, Kawai et al, 2018)。これらの報告は感染サルを吸血したハマダラカが、次にヒトを吸血することを示唆しているが、ハマダラカ種の種特異性や吸血対象の嗜好性など詳細は不明な点が多い。ヒトに感染するサルマラリア原虫の赤血球内ステージは、ヒトマラリア原虫と形態的に類似しており、血液塗抹による鑑別は困難なため、マカク類のサルマラリアの感染状況の把握と遺伝子検査法の確立は重要な研究課題となっている。

タイ国立霊長類センター (以下 NPRCT-CU) は、研究用サルの繁殖・育成、サルを用いた研究と検査、アジア地域のサルの情報収集を目的として 2012 年に設立された東南アジア唯一の霊長類研究所である。繁殖母群を構築するため、2015 年度よりタイ国内の様々な地域からカニクイザルを導入している。これらのサルは導入母群ごとに飼育されており、また今後も導入が継続されることから、同センターのサルを調べることにより多地域の野生サルにおけるサルマラリアの感染状況を把握できる。導入時あるいは飼育中のサルを調べるには捕獲や採血等の作業が必要だが、研究代表者らは NPRCT-CU の Director, 獣医師をはじめとしたスタッフとは良好な協力体制を築いており、全面的な助力が期待できる。

2. 研究の目的

ハマダラカが保有しているマラリア原虫についてのこれまでの調査では、1 個体の蚊から数種のマラリア原虫が検出されている。一方、実際に野生のサルに寄生しているマラリア原虫の種類を調べた論文はごく限られており、タイにおける調査報告は南部のカニクイザルからの 2 報のみである。タイには、6 種のマカクが棲息しているが、それらに実際に寄生しているサルマラリア原虫種についての情報は、ほとんど無いに等しい。当然、それらの媒介蚊に関する情報もない。そこで本研究では、野生由来のマカクと生息地のハマダラカに寄生しているマラリア原虫種を網羅的に調べる。本研究では、ナノポアシーケンサーを用いて、感染しているマラリア原虫種を網羅的に調べる。ナノポアシーケンシングは、短時間で実施が可能で、しかもタグをつけることにより複数サンプルの同時解析ができるため、1 回の訪問期間中に多くの情報を得ることができる。

タイのマカク類では種間交雑が起こっていることが知られており、NPRCT-CU に導入しているサルも、形態から判断すると一部はカニクイザルとアカゲザルの交雑由来の個体と思われる。そこで、特徴のある感染様式を示したサルを含む個体群について、ナノポアシーケンシングによるゲノム解析を実施し、宿主の遺伝的バックグラウンドとサルマラリアの感染状況の関連を調べる。このような宿主要因の研究はこれまで実施されておらず、これらの成果は感染防御機構の解明や新しいモデル動物の確立に貢献できる。

3. 研究の方法

(1) マカクに寄生しているマラリア原虫の網羅的検索

NPRCT-CU では、飼育サルの定期健康診断時 (写真) および新規導入時に、種々の検査のための採血を実施している。そこで、日本側の研究者が健康診断に合わせて同センターに滞在し、センターの作業をサポートしながら、血液の一部 (1ml 程度) を採取する。また、同センターでは母群確保のために野生のサルを捕獲する事がある。そこで、その捕獲に参加し、血液サンプルを採取する。研究代表者らは京大大学ヒト行動進化研究センターで同様の作業を定期的に行っており、また 2015 年の同センター



への初めてのサル導入時に検疫を行っているので作業に支障はない。採取した血液は、白血球分離後凍結保存するか FTA カードを用いて保存する。

保存したサンプルから DNA を抽出する。その後、マラリア原虫に対するユニバーサルプライマーを用いた PCR、ナノポアシーケンシングのためのサンプル処理を実施し、MinION を使用したシーケンスを実施する。シーケンスの結果から、それぞれのマカク個体に寄生していたマラリア原虫種を特定し、個体別・個体群別の感染状況を把握する。

また、多量のマラリア原虫が分離できた場合、MinION を用いたゲノム解析を実施する。

(2) ハマダラカに寄生しているマラリア原虫の網羅的検索

野生ザルの生息地において、CDC トラップ（写真）を用いて蚊を採取する。採集した蚊は形態をもとにソーティングし、ハマダラカのみを分離する。さらに、形態学的な特徴から種を同定する。蚊から DNA を抽出し、遺伝学的分析から種を確定する。また、吸血した動物種の確定を試みる。ユニバーサルプライマーを用いた PCR、さらに nestedPCR を実施し、蚊に感染しているマラリア種を決定する。マラリア原虫は、媒介蚊の中で一万倍程度に増殖する。そこで、各種ハマダラカから得られたマラリア種について PCR による増幅の程度を調べ、それぞれのマラリア原虫種の媒介ハマダラカを特定する。



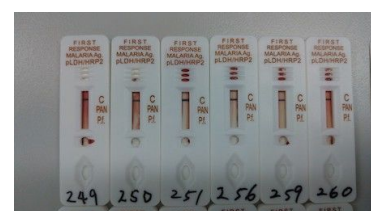
(3) 宿主特異性を規定する宿主因子の探索

各個体群における各種サルマラリアの感染状況を把握し、そのサル個体だけが感染していないなど特徴的な感染様式を示している個体がないか確認する。感受性の差が交雑に由来するならば、関連個体について次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施することにより、原因遺伝子を特定できる可能性が高い。そこで、特徴的な感染様式がみられた個体群のサルに対し、ナノポアシーケンシングによる全ゲノム解析を実施し、遺伝子浸透の程度を確認するとともに原因遺伝子特定を試みる。

4. 研究成果

(1) マカクに寄生しているマラリア原虫の網羅的検索

本研究は、2019 年度後半から開始しており、2020 年 1 月に NPRCT-CU を訪問し、研究打合せとサンプリングを実施した。しかし、新型コロナウイルスの影響で、2019 年度に予定していた再度の調査とサンプルの分析は実施できず、また 2020 年度と 2021 年度は、渡航することも実施できなかった。2022 年度も年度当初は渡航できなかったが、2023 年 1 月と 2 月にタイでの調査を実施した。1 月は、カニクイザルの定期健康診断にあわせて、血液サンプルを採取した。また、野生のカニクイザルを捕獲し（写真）血液を採取した。2 月は、NPRCT-CU のこれまでの調査でカニクイザルが *Plasmodium cynomolgi* に高率に感染している事が判明している寺院 Phra Phothisat Temple（以下 PPT）の周辺で捕獲し、NPRCT-CU とその子孫について、全ての個体からサンプリングを行った。このうち、導入時に PCR 検査により *P. cynomolgi* に感染していたことがわかってきた 30 個体について、イムノクロマトによる抗原検査を実施したが、全て陰性であった（写真）。



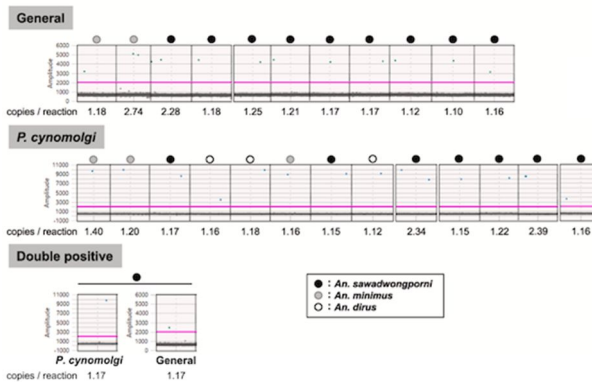
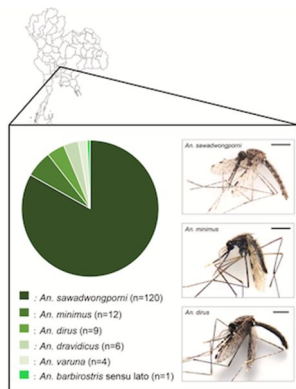
タイでナノポアシーケンシングを実施するため、2019 年度から 2020 年度にかけて、MinION、MinIT、MacBook Pro を用いたシーケンシングのシステムを構築した。しかし、新型コロナウイルスの流行により、タイへの渡航が困難であったことから、サンプルの分析や新規サンプルの採取は実施できなかった。2023 年度には渡航しサンプルを入手することができたが、ナノポア社が MinI および Mac を使ったシーケンシングのサポートを終了しており、タイでシーケンスすることができなかった。

そこで、サンプルを日本に導入しようと考えたが、コロナの流行が終息して以降、タイ国内における CITES の手続きが集中しており、研究機関内に許可をとることができなかった。そのため、マカク由来のサンプルについては、タイ・マヒドン大学の共同研究者に分析を依頼して、2024 年 5 月現在、分析を進めている。

(2) ハマダラカに寄生しているマラリア原虫の網羅的検索

2023 年 2 月と 7 月に、PPT で CDC トラップによるハマダラカの採集を行った。その結果、6 種類のハマダラカを採取することができ、そのうちの大部分が *Anopheles sawadwongpomi* であった（図）。これらのマダラカについて、遺伝子検査によるマラリア感染の有無を調べたところ、通常の PCR 法や nested PCR 法では感染蚊はまったく検出できなかった。そこで、非常に高感度であることが報告されている ddPCR によってマラリア遺伝子の検出を試みたところ、*P. cynomolgi*

感染蚊を確認することができた(図)。これらの結果は、論文として報告した。



(3) 宿主特異性を規定する宿主因子の探索

宿主サンプルは、NPRCT-CU にて保存しているが、(1)の分析が終了していないため、対象とするサル個体が特定できていない。(1)の分析結果から、宿主因子の関与が示唆された場合、CITES 関連による制約でサンプルの輸入に時間がかかるためタイの共同研究者に分析を依頼する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamasa Araki, Akihide Koyama, Hiro Yoshimura, Ayako Arai, Satoru Kawai, Shuto Sekizawa, Yuko Umeki, Yumiko Saito-Nakano, Takashi Imai, Munehiro Okamoto, Megumi Sato, Wipaporn Thabthimthong, Taratorn Kemthong, Hajime Hisaeda, Suchinda Malaivijitnond, Takeshi Annoura	4. 巻 101
2. 論文標題 Ultrasensitive malaria detection system for Anopheles mosquito field surveillance using droplet digital PCR	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2024.102891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木、川合、梅木、立石、中野、岡本、保富、久枝、案浦
2. 発表標題 マラリア原虫・肝臓内ステージの解析を目的とした可視化原虫株の開発（1）
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会、金沢
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川合、荒木、梅木、立石、中野、岡本、保富、久枝、案浦
2. 発表標題 マラリア原虫・肝臓内ステージの解析を目的とした可視化原虫株の開発（2）
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会、金沢
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	桂 有加子 (Katsura Yukako) (00624727)	京都大学・霊長類研究所・助教 (14301)	
研究分担者	川合 寛 (Kawai Satoru) (70275733)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	
研究分担者	案浦 健 (Annoura Takeshi) (90407239)	国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官 (82603)	

	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	兼子 明久 (Kaneko Akihisa)	京都大学・ヒト行動進化研究センター・技術専門職員 (14301)	
研究協力者	夏目 尊好 (Takayoshi Natsume)	京都大学・ヒト行動進化研究センター・技術職員 (14301)	
研究協力者	宮部 貴子 (Miyabe Takako) (10437288)	京都大学・ヒト行動進化研究センター・助教 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

タイ	タイ国立霊長類研究センター	チュラロンコン大学	カセサート大学	
タイ	タイ国立霊長類センター	チュラロンコン大学	マヒドン大学	
タイ	タイ国立霊長類センター	タイ国立遺伝子生命工学研究センター	チュラロンコン大学	