

東京大学医科学研究所
国際共同利用・共同研究拠点事業

国内共同研究報告書（研究完了）2022年度版

提出年月2023年 5月 10日

申請者 (研究代表者)	所属・職名：獨協医科大学・教授
	氏名：川合 覚
採択課題名	ポリビアリスザルを用いた熱帯熱マラリアワクチンの <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> 実験系の確立
申請研究期間	2022年 4月 1日 ~ 2023年 3月 31日
研究組織 ※医科研究所のメンバーも記入ください。	
所属機関・職名	氏名
東大医科研・教授	真下知士
東大医科研・特任助教	横田伸一
東大医科研・教授	Coban Cevayir
東大医科研・博士課程	立石祐樹
国立感染症研究所・室長	案浦 健
国立感染症研究所・研究員	荒木球沙
長崎大学・教授	北 潔
長崎大学・准教授	水上修作
長崎大学・准教授	稲岡健ダニエル
京都大学・教授	岡本宗裕
ライデン大学・グループ長	Chris J. Janese
長崎大学・特任研究員	Jiun-Yu Jian
研究完了報告書 ※全研究期間を通じて共同研究で得られた成果について記入ください。	
背景と目的 熱帯熱マラリア原虫 (<i>Plasmodium falciparum</i> , 以下、Pf と略) は、長期の継代培養法が確立されており、これまで様々な <i>in vitro</i> 実験が行われてきた。その一方で Pf は、齧歯類やマカク属のサル類には感染せず、ポリビアリスザル (<i>Saimiri boliviensis</i> , 以下、リスザル) を含む一部の新世界ザルのみに感染性を示すことから、 <i>in vivo</i> 実験にはこれらのサル類を利用する以外に代替手段はない。我々の研究グループでは、かねてより東大医科研附属・奄美病害動物研究施設 (以下、奄美施設) で系統維持されているリスザルの繁殖コロニーを活用し、ひとつの施設内で <i>in vitro</i> 実験、 <i>in vivo</i> 実験、さらには媒介蚊の介在実験を含めた、熱帯熱マラリアを総合的に検討できる研究拠点の構築に取り組んできた。今年度は Pf, IC1 株および NF54 株のリスザルに対する感染性と感染後の経過を明らかにした。	

材料および方法

① **供試動物**：奄美施設内で繁殖されたリスザル3頭を用いた（表1）。No. 22SM-1 および No. 22SM-2 については Pf の感染感受性を高めるために感染の約4か月前に脾臓摘出を施した。

表1、供試動物の概要

動物番号	年齢・性別・体重	脾臓摘出	感染株
22SM-1(51905)	3歳・雌・642g	実施	<i>P. falciparum</i> , IC1株
22SM-2(51906)	3歳・雌・630g	実施	<i>P. falciparum</i> , NF54株, IC1株
22SM-3(20303)	9歳・雌・655g	なし	<i>P. falciparum</i> , IC1株

② **供試原虫株**：熱帯熱マalaria原虫 (Pf) には数多くの分離株が存在し、それらの一部がリスザルに感染性を有する。また、供試するリスザルの系統によっても Pf 感染後の経過が異なることが報告されている。そこで今年度は、IC1株（新世界ザルに感染性を示す株）と、これまで実験報告の無い NF54 株（継代培養で生殖母体が出現する株）の感染性と、奄美コロニーのリスザルにおける感染経過を明らかにした。

③ **リスザルに対する Pf 感染血液の接種**：奄美施設 BSL2 実験室において、IC1株および NF54 株の培養をおこなった。培養には日本赤十字社より有償譲渡されたヒト O 型赤血球を用いた。両株は12日間培養し、IC1株は感染赤血球数 7×10^7 個を No. 22SM-1 へ、NF54 株は 1×10^8 個を No. 22SM-2 へ静脈内接種した。No. 22SM-2 においては NF54 株の接種後30日間観察したが、感染が成立しなかったため、NF54 株感染実験終了後、No. 22SM-1 から採取した IC1 株感染血液 1ml（寄生率 0.02%）を静脈内接種した。また、No. 22SM-3 についても、同様の IC1 株感染血液 1ml を静脈内接種した。

④ **感染経過の観察**：いずれの供試動物も、接種4日後からマalaria迅速診断キット (FIRST RESPONSE®, Malaria Ag. pLDH/HRP2 Combo Card Test, Premier Medical Corporation Private Limited 社) で診断するとともに、定期的に血算、血液生化学検査を行った。また、接種4日後以降は末梢血液の薄層塗抹標本を作製し、寄生率の推移を観察した。寄生率は鏡検上の赤血球 2×10^4 個当たりの感染赤血球数をカウントし、算出した。

結果

No. 22SM-1 の感染経過：No. 22SM-1 は IC1 株接種後61日間の観察を行った（図1）。感染4日後より診断キットおよび血液塗抹ともに陽性を示し、感染10日後まで0.01%以下の寄生率を推移した（図1）。感染12日～35日後の間は寄生率0.01～0.1%を推移し、38日後には一旦0.01%以下に減少したが、感染49日以降増加に転じ、感染61日後には0.99%の最高値に達した。

No. 22SM-2 の感染経過：22SM-2 は NF54 株を接種し、30日間の観察を行った。その結果、観察期間中、診断キットおよび血液塗抹ともに全て陰性であった。30日間の観察終了に引き続き、No. 22SM-1 から採取した IC1 株感染血液（寄生率 0.02%）1ml を静脈内接種し、18日間の観察を行った（図2）。IC1 株の接種4日後より診断キットおよび血液塗抹ともに陽性を示し、寄生率は感染7日後以降、急激な増加傾向がみられた。その後、感染14日後0.73%、感染17日後1.33%、感染18日後0.97%を推移した（図2）。

No. 22SM-3 の感染経過 : 22SM-3 は No. 22SM-1 から採取した IC1 株感染血液 (寄生率 0.02%) 1ml を静脈内接種し、18 日間の観察を行った (図 3)。IC1 株の接種 4 日後より診断キットおよび血液塗抹ともに陽性を示し、寄生率は感染 7 日後以降、徐々に増加する傾向がみられた。その後、寄生率は感染 14 日後 0.05%、感染 17 日後 0.12%、感染 18 日後 0.25%を推移した (図 3)。感染 14 日以降には、食欲の減退、元気沈衰が観察された。

考 察

① Pf, IC1 株の感染性について : IC1 株を接種した 3 頭のリズガルでは、いずれも感染が成立した。ただし培養 IC1 株を接種した No. 22SM-1 は、感染から 49 日後以降に原虫の増殖が認められたのに対し、新鮮感染血液を接種した No. 22SM-2 と No. 22SM-3 では、感染 7 日～14 日程度で寄生率の急増がみられた。これは、IC1 株の培養にヒト赤血球を用いていたため、培養 IC1 株ではリスガルの赤血球内で増殖する特性を得るために約 40～50 日の期間を要したことが考えられた。

② Pf, NF54 株の感染性について : NF54 株を接種した No. 22SM-2 では、感染は不成立であった。しかし、引き続き同じ個体で行った IC1 株の感染実験では感染が成立し、末梢血液内での増殖も認められた。これらの所見より、NF54 株の感染不成立は、宿主側の要因ではなく、NF54 株がリスガルに対して感染性を持たない株であることが判明した。

③ 脾臓摘出の影響について : IC1 株は脾臓を摘出した No. 22SM-1, No. 22SM-2 だけでなく、脾臓摘出を施さなかった No. 22SM-3 でも感染が成立した。No. 22SM-3 の寄生率は、No. 22SM-2 (脾臓摘出) に比較して緩やかな増殖傾向を示し、感染 18 日後の寄生率は No. 22SM-2 の 1/4 程度 (0.25%) であった。ただし No. 22SM-3 は感染 14 日以降に食欲の減退や、明らかな元気の沈衰がみられた。これらの症状は、脾臓による感染赤血球の貪食能が活性化する一方で、過度の免疫反応や貧血の発生が影響したものと思われる

図 1、No. 22SM-1 における寄生率の推移 (%)

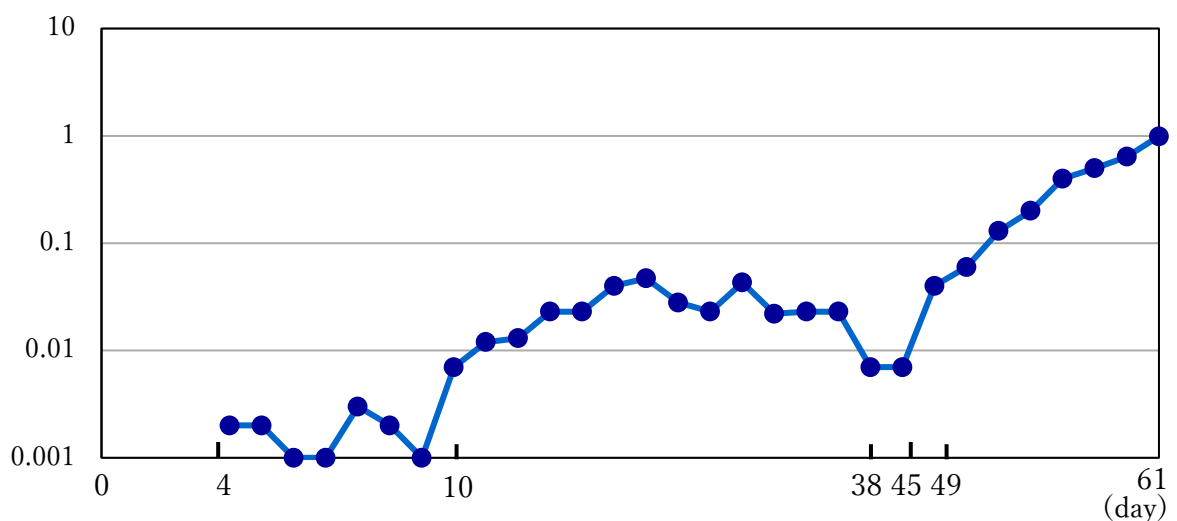


図 2、No. 22SM-2 における寄生率の推移 (%)

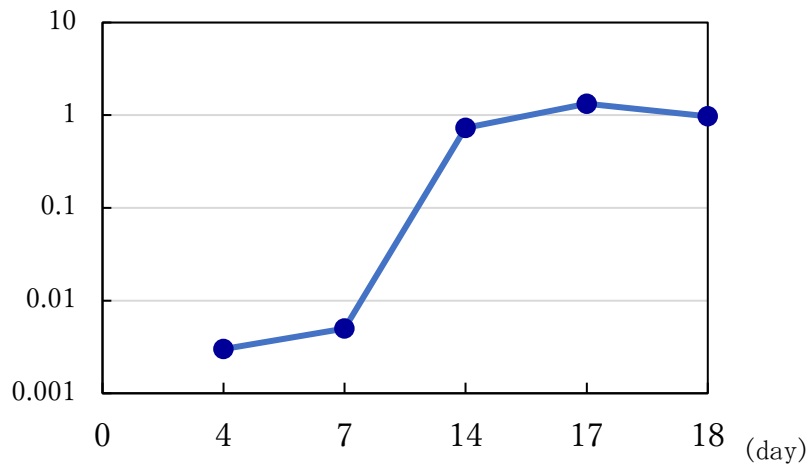
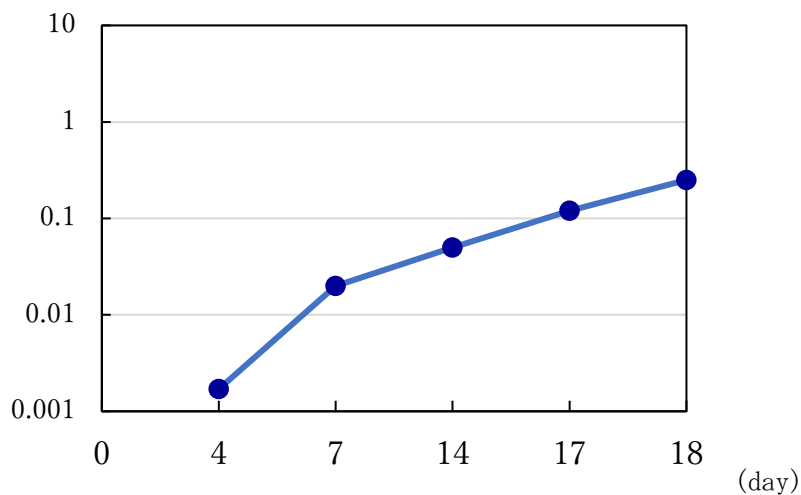


図 3、No. 22SM-3 における寄生率の推移 (%)



まとめ

今年度の実験により、奄美施設コロニーのリスザルでは脾臓の有無にかかわらず IC1 株が感染し、寄生率約 1%程度に増殖することが明らかとなった。しかしながら、*in vitro* 培養で生殖母体が出現する NF54 株はリスザルに対して感染性がないことが判明した。今後、媒介蚊の介在実験を視野に入れた研究を展開するためには、リスザルに感染性があり、*in vitro* および *in vivo* で生殖母体が出現する原虫株の探索が必要と考えられた。

成果発表 ※2022 年度内に共同研究で得られた成果について記入ください。

<論文・研究書等、共同研究で得られた成果>

該当なし。

<特許出願>

該当なし。

東京大学医科学研究所へ来所した回数

※2022 年度内の実績をご報告ください。

※旅費支給を必要としない来所も回数に含みます。

※今年度に限り、新型コロナウイルスの影響で来所できなかった場合は、Web 会議の開催状況やメールやコミュニケーションツール（Slack 等）での研究打ち合わせの合計日数もご記入ください。

※年齢は年度末年齢で選択してください。

氏名	所属機関・職名	性別	年齢	来所日数 (日)
川合 覚	獨協医科大学・教授	男性	40 歳以上	14 日
案浦 健	国立感染症研究所・室長	男性	40 歳以上	20 日
荒木球沙	国立感染症研究所・研究員	女性	35 歳以下	8 日
水上修作	長崎大学・准教授	男性	40 歳以上	5 日
Jiun-Yu Jian	長崎大学・特任研究員	男性	35 歳以下	14 日
岡本宗裕	京都大学・教授	男性	40 歳以上	5 日
氏名	所属機関・職名	性別	年齢	Web 会議開催 日数 (日)
川合 覚	獨協医科大学・教授	男性	40 歳以上	3 日
案浦 健	国立感染症研究所・室長	男性	40 歳以上	10 日以上
横田伸一	特任助教	男性	40 歳以上	10 日以上
荒木球沙	国立感染症研究所・研究員	女性	35 歳以下	10 日以上
水上修作	長崎大学・准教授	男性	40 歳以上	5 日
Jiun-Yu Jian	長崎大学・特任研究員	男性	35 歳以下	5 日
岡本宗裕	京都大学・教授	男性	40 歳以上	3 日
Chris J. Janese	ライデン大学・グループ長	男性	40 歳以上	3 日
氏名	所属機関・職名	性別	年齢	メール、slack 等の 打ち合わせ日数 (日)
川合 覚	獨協医科大学・教授	男性	40 歳以上	30 日以上

真下知士	東大医科研・教授	男性	40歳以上	10日
横田伸一	東大医科研・特任助教	男性	40歳以上	30日以上
Coban Cevayir	東大医科研・教授	女性	40歳以上	10日
立石祐樹	東大医科研・博士課程	男性	35歳以下	10日
案浦 健	国立感染症研究所・室長	男性	40歳以上	30日以上
荒木球沙	国立感染症研究所・研究員	女性	35歳以下	30日以上
北 潔	長崎大学・教授	男性	40歳以上	5日
水上修作	長崎大学・准教授	男性	40歳以上	10日
稲岡健ダニエル	長崎大学・准教授	男性	40歳以上	5日
岡本宗裕	京都大学・教授	男性	40歳以上	10日
Chris J. Janese	ライデン大学・グループ長	男性	40歳以上	5日
Jiun-Yu Jian	長崎大学・特任研究員	男性	35歳以下	10日

施設・設備の利用状況

※2022年度内の実績をご報告ください。

※利用がない場合は、0または「なし」とご記入ください。

※新型コロナウイルス感染症の影響で来所できなかった場合は、医科研側の研究者が利用を代行した分もご記入ください。

施設名	機器等	利用回数 (回)	利用時間 (時間)
FACS コアラボラトリー	FACS Aria (BD)等	なし	
疾患プロテオミクスラボラトリー	質量分析計 Orbitrap QSTAR Elite 等	なし	
顕微鏡コアラボラトリー	Zeiss 社製多光子共焦点顕微鏡 (LSM710NLO) 等	なし	
発生工学研究支援室	遺伝子改変マウスの作成・胚凍結保存	なし	
ヒトゲノム解析センター	スーパーコンピューター	なし	
奄美病害動物研究施設	感染実験棟 (◎P2 実験室、◎P2A 実験室、P3 実験室、P3A 実験室)	80回	約160時間
その他	奄美病害動物研究施設 動物用手術施設	1回	約3時間

学術資料の利用状況 ※利用がない場合は、0または「なし」とご記入ください。

資料名	利用件数 (件)
血清 (バイオバンクジャパン)	なし
DNA (バイオバンクジャパン)	なし

遺伝子改変マウス	なし
病原細菌	なし
その他	なし
データベースの利用状況 ※利用がない場合は、「なし」とご記入ください。	
データベース名	利用回数（回）
なし	なし