

8. 分野等の研究活動

節足動物衛生工学分野

◆-----准教授 福本晋也
(Shinya Fukumoto)

1. 研究テーマの概要

節足動物によって媒介される感染症には、マラリア・眠り病・日本脳炎・フィラリアなどがあります。これらの感染症の原因となる寄生虫・ウイルス・細菌の伝播には媒介節足動物、すなわち“ベクター”が必須となります。言い換えれば、病原体のベクターステージを断ち切ることによって、動物やヒトへの感染を防ぐことができます。このコンセプトに基づき、病原体がベクターの中でどのように振る舞っているのか？ベクターと病原体の間にはどのような相互作用があるのか？はたしてベクターにとって病原体とは何物なのか？このような事象について、病原体とベクター昆虫がおりなす特有の生命現象を、実験室レベルでの基礎的実験データから、感染症アウトブレイク地域での国内外フィールド調査までを有機的に統合し、そして徹底的に解析することで、ベクターステージコントロールによる原虫病の制御を実現するため研究を行っています。また、近年問題となっているエゾシカなどの野生動物について、人獣共通感染症や家畜感染症のレゼルボアとしての意義を明らかにするため、地元根ざした調査研究を実施しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ 媒介蚊における病原体感染分子機構
- ・ ブルキナファソにおけるマラリア媒介蚊の疫学調査
- ・ 西表島における蚊媒介性寄生虫感染症の包括的調査
- ・ エゾシカ保有病原体叢の網羅的解析

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ マラリア原虫は昆虫と哺乳動物の生物学的に異なる 2 宿主間を渡り歩き、感染を成立させます。マラリア原虫の宿主転換に関連因子を同定するため、原虫変異体ライブラリーの表現型スクリーニングを行った。その結果、**ハマダラカ・マウス間の双方向の宿主転換に障害を持つ原虫クローンの分離に成功**しました。このクローンの遺伝子座の解析の結果、責任遺伝子が同定されました。より詳細な検証のため、本遺伝子の欠損原虫を作製し表現型の解析を行いました。その結果、マウスでは野生型と同様に増殖可能であるが、ハマダラカへの伝播に障害を持つことが観察されました。つぎに、ハマダラカでの感染表現型の解析を行いました。常法では感染が成立しないため、ベクターへの伝播ステージであるガメトサイトへの過剰誘導処理により、ハマダラカへ感染させることに成功しました。ベクターサイクルは野生型と同様に進行しましたが、哺乳動物伝播ステージであるスポロゾイトはマウスへの感染性を欠如することが確認されました。また、この欠損原虫に本遺伝子を強制発現させると、双方向

の宿主転換能が復帰することを確認した。本遺伝子の宿主間移動における役割の詳細をあきらかにしていくことで、マラリア原虫の感染メカニズムを明らかにしていきたいと考えています。

- ・ 近年の野生鳥獣被害と捕獲必要性の増加を受け、野生鳥獣肉の食利用への期待が高まっています。しかしながら、その安全性の担保については理想的状態とは言えず、公衆衛生上のリスク要因であると懸念されています。そこで、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を調査モデル地域として研究を実施しました。エゾシカサンプルの収集・微生物叢について次世代シーケンサーを用いた解析を実施しデータの集積を行いました。その結果、肝蛭、腸管出血性大腸菌、クリプトスポリジウム、住肉胞子虫、住血原虫など、多用な食中毒に関連する病原体をエゾシカが保有していることが明らかになりました。現在、これらの病原体について詳細な疫学調査を実施することで、エゾシカの様々な病気体のレゼルポアとしての意義を明らかにしていきたいと考えています（論文リスト2）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本衛生動物学会
- ・ 日本分子生物学会
- ・ 日本寄生虫学会
- ・ 日本獣医学会

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 平成 28 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Mizutani M, **Fukumoto S**, Soubeiga AP, Soga A, Iyori M, Yoshida S. Development of a *Plasmodium berghei* transgenic parasite expressing the full-length *Plasmodium vivax* circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model. **Malar J.** 2016; 15: 251. PMID: 27129682
2. Watanabe Y, **Fukumoto S**, Harasawa R. Prevalence of tick-borne hemolytic microbes in free-living sika deer (*Cervus nippon*) captured in deer-overcrowded area. **Jpn J Zoo Wildl Med.** 2016; 21: 17-27.

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 平成 28 年度 食品の安全確保推進事業（厚生労働省）、野生鳥獣保有微生物種の網羅的解析による喫食リスク低減下に関する研究（H28-食品-若手-012）、代表、平成 28 年度～平成 29 年度
2. 平成 28 年度 基盤研究（B）（一般）（文部科学省）ベクター媒介性病原体における宿主トランジション応答機構（16H05026）、代表、平成 28 年度～平成 30 年度
3. 平成 28 年度 挑戦的萌芽研究（文部科学省）原虫ヴェノムデリバリーシステムを用いたベクター媒介性感染症制御法の開発（16H05026）、代表、平成 28 年度～平成 29 年度
4. 平成 27 年度 基盤研究（B）（一般）（文部科学省）多機能性ハイブリッド型ワクチンプラットフォームを基盤としたマラリアワクチンの開発（15H04723）、分担、平成 27 年度～平成 29 年度
5. 平成 26 年度 基盤研究（B）（海外学術調査）（文部科学省）ベクター病原体媒介能におけるピオティック・アピオティック因子の相関に関する研究（26304038）、代表、平成 26 年度～平成 29 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Antoine Sanon, University of Ouagadougou, MEMORANDUM OF AGREEMENT, BETWEEN UFR LIFE AND EARTH SCIENCE, UNIVERSITE OUAGA I PR JOSEPH KI-ZERBO, BURKINA FASO AND NATIONAL RESEARCH CENTER FOR PROTOZOAN DISEASES, OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE, JAPAN、2016年6月～2021年5月、学術協定
2. 吉田栄人：金沢大学薬学系、多機能性ハイブリッド型ワクチンプラットフォームを基盤としたマラリアワクチンの開発、平成26年度～平成29年度、科学研究費補助金

1. 研究テーマの概要

当研究室では、種々のバベシア症における宿主免疫機構の解明と新規予防・治療法の開発に関する研究を行っています。1) バベシアに感染し、回復した動物は同じ種のバベシア或いは近縁種のバベシアの再感染に抵抗性を示すが、その抵抗性免疫獲得の機構はまだよく分かっていません。この感染防御免疫機構が解明できれば、新規組換えワクチン開発につながります。2) バベシア症における溶血性貧血の原因には、赤血球内における原虫増殖による直接的破壊によるものと、未感染赤血球に対する自己抗体による間接的破壊（自己免疫性）によりものがあります。自己免疫性溶血性貧血機構の解明は、新規治療法の開発につながります。3) バベシアのゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析などによるゲノムワイドなワクチン候補分子・薬剤標的分子の探索を行っています。4) 宿主の感染防御免疫担当細胞を有効に刺激しうる組換えワクチンの開発と自己免疫性溶血性貧血を抑制しうる新規治療法の開発を目指しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ バベシア原虫感染に対する宿主感染防御免疫機構の解明
- ・ バベシア症における自己免疫生貧血の分子機構の解明
- ・ バベシア原虫のゲノム解析
- ・ バベシア症に対する組換えワクチンの開発
- ・ バベシア症に対する治療法の開発
- ・ マダニ媒介原虫感染症の分子疫学調査

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ(DHODH)は、原虫のピリミジンの *de novo* 生成を司る第 4 番目の酵素であり、マラリア、トキソプラズマ、リーシュマニア原虫感染症に対する新規治療法の標的として注目されています。しかしながら、バベシア原虫における DHODH の研究はまだされていないのが現状であります。本研究では、ウマバベシア原虫の DHODH 分子を特定し、その性状解析を行いました。また、DHODH の酵素抑制剤である ATV、Breq、LFN はウマバベシア原虫の増殖を著しく抑制しました。これらの結果により、DHODH はウマバベシア症に対する治療薬の標的にもなりうることを示唆されました。（論文リスト 1）
- ・ マウスのバベシア症モデルを用いてバベシア感染に対する宿主防御免疫機構の解明を試みました。マウスに *Babesia rodhini* 初感染させた後に、薬で治療を施し感染耐過状態にしました。その後、同じ *Babesia rodhini* と他種の *Babesia microti* で再感染させると、完全な

感染防御免疫が成立していることを証明しました。この感染防御免疫は初感染後一週間で成立することと、死んだ原虫で頻回免疫しても成立しないことから、細胞生免疫によるものと推定されました。（論文リスト 10）

- ・ イヌバベシア症を引き起こす病原原虫 *Babesia canis canis* の cDNA ライブラリーを構築し、実験感染犬血清を用いてイムノスクリーニングを行うことにより、主要抗原 BccSA1 と BccP33 遺伝子を特定できました。組換え BccSA1 タンパク質を抗原とした ELISA 法は、実験感染犬の慢性感染期において特に強い抗体反応が認められました。一方で、組換え BccP33 タンパク質を抗原とした ELISA 法では、感染初期から後期に渡って強い抗体反応が認められました。これらの結果から、この両 ELISA 法をセットで用いることにより、急性感染と慢性感染を区別できることが示唆されました。（論文リスト 15）
- ・ タイの北部、北東部、西部および中央部の 9 つの州の肉牛から採集した 608 検体の血液 DNA サンプルについて PCR および nested PCR によって解析を行ったところ、54.3%が *B. bovis*、*B. bigemina* もしくは *T. orientalis* に感染していることが明らかとなりました。最も高率に検出されたのは北東部のエリアで、北部、西部、中央部と続きました。本研究でバベシア原虫と *T. orientalis* の共感染も明らかとなりました。3 原虫に感染しているものが 2.0%であったが、2 原虫の感染では *B. bigemina* および *T. orientalis* の共感染が最多でありました (8.2%)。マダニ制御プログラムがないことが肉牛農家におけるバベシア症とタイレリア症の発生の一般的なリスク要因でありました。（論文リスト 19）

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議員
- ・ 日本寄生虫学会評議員
- ・ 日本熱帯医学会評議員
- ・ 日独原虫病協会評議員

② 主催した学会、研究会等

- ・ 中国における原虫病研究センター元 JICA 研修員・大学院生らによる研究集会（平成 28 年 8 月 23 日～24 日、延辺大学獣医学部）
- ・ 帯広畜産大学国際獣疫対策に関する本邦招へいプログラム（JICA 事業）（平成 29 年 3 月 6 日～3 月 10 日、帯広畜産大学原虫病研究センター）

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 平成 28 年度馬防疫強化対策事業推進委員会委員（（財）日本生物科学研究所）

6. 平成 28 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Kamiyingkird K, Cao S, Tuvshintulga B, Salama A, Mousa AA, Efstratiou A, Nishikawa Y, Yokoyama N, Igarashi I, Xuan X*. Effects of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors on the growth of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in vitro. **Exp Parasitol.** 2017; 176: 59-65. PMID: 28286324
2. Jirapattharasate C, Adjou Moumouni PF, Cao S, Iguchi A, Liu M, Wang G, Zhou M, Vudriko P, Efstratiou A, Changbunjiong T, Sungpradit S, Ratanakorn P, Moonarmart W, Sedwisai P, Weluwanarak T, Wongsawang W, Suzuki H, Xuan X*. Molecular detection and genetic diversity of bovine *Babesia* spp., *Theileria orientalis*, and *Anaplasma marginale* in beef cattle in Thailand. **Parasitol Res.** 2017; 116: 751-762. PMID: 28028631
3. Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Ekici S, Jirapattharasate C, Moumouni PF, Liu M, Wang G, Iguchi A, Vudriko P, Suzuki H, Xuan X*. Molecular detection and genetic characterization of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* amongst apparently healthy sheep and goats in the central region of Turkey. **Ticks Tick Borne Dis.** 2017; 8: 246-252. PMID: 27908771
4. Zheng W, Liu M, Moumouni PF, Liu X, Efstratiou A, Liu Z, Liu Y, Tao H, Guo H, Wang G, Gao Y, Li Z, Ringo AE, Jirapattharasate C, Chen H, Xuan X*. First molecular detection of tick-borne pathogens in dogs from Jiangxi, China. **J Vet Med Sci.** 2017; 79: 248-254. PMID: 27890889
5. Wang G, Efstratiou A, Adjou Moumouni PF, Liu M, Jirapattharasate C, Guo H, Gao Y, Cao S, Mo Zhou, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X*. Expression of truncated *Babesia microti* apical membrane protein 1 and rhoptry neck protein 2 and evaluation of their protective efficacy. **Exp Parasitol.** 2017; 172: 5-11. PMID: 27876473
6. Ybañez AP, Ybañez RH, Talle MG, Liu M, Moumouni PF, Xuan X*. First report on *Babesia vogeli* infection in dogs in the Philippines. **Parasitol Int.** 2017; 66: 813-815. PMID: 27713098
7. Musinguzi SP, Sukanuma K, Asada M, Laohasinnarong D, Sivakumar T, Yokoyama N, Namangala B, Sugimoto C, Suzuki Y, Xuan X, Inoue N. A PCR-based survey of animal African trypanosomosis and selected piroplasm parasites of cattle and goats in Zambia. **J Vet Med Sci.** 2017; 78: 1819-1824. PMID: 27616437
8. Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Horimoto T, Xuan X, Akashi H, Kato K. Pull-down method to access the cell surface receptor for *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Int.** 2016; 65: 514-515. PMID: 27591002
9. Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Liu M, Wang G, Moumouni PF, Jirapattharasate C, Suzuki H, Nishikawa Y, Xuan X*. Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant TgSAG2 and NcSAG1 to detect *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*-specific antibodies

- in domestic animals in Turkey. **J Vet Med Sci.** 2016; 78: 1877-1881. PMID: 27523504
10. Wang G, Efstratiou A, Adjou Moumouni PF, Liu M, Jirapattharasate C, Guo H, Gao Y, Cao S, Zhou M, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X*. Primary *Babesia rodhaini* infection followed by recovery confers protective immunity against *B. rodhaini* reinfection and *Babesia microti* challenge infection in mice. **Exp Parasitol.** 2016; 169: 6-12. PMID: 27423972
 11. Liu M, Ruttayaporn N, Saechan V, Jirapattharasate C, Vudriko P, Moumouni PF, Cao S, Inpankaew T, Ybañez AP, Suzuki H, Xuan X*. Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. **Parasitol Int.** 2016; 65: 357-361. PMID: 27143604
 12. Liu M, Cao S, Vudriko P, Suzuki H, Soma T, Xuan X*. *Babesia gibsoni* internal transcribed spacer 1 region is highly conserved amongst isolates from dogs across Japan. **J Vet Med Sci.** 2016; 78: 863-865. PMID: 26806537
 13. Kawase O, Ohno O, Suenaga K, Xuan X*. Immunological adjuvant activity of pectinoside A, the steroidal saponin from the starfish patiria pectinifera. **Nat Prod Commun.** 2016; 11: 605-606. PMID: 27319128
 14. Adjou Moumouni PF, Terkawi MA, Jirapattharasate C, Cao S, Liu M, Nakao R, Umemiya-Shirafuji R, Yokoyama N, Sugimoto C, Fujisaki K, Suzuki H, Xuan X*. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in *Amblyomma variegatum* ticks from Benin. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016; 7: 828-833. PMID: 27150592
 15. Zhou M, Cao S, Luo Y, Liu M, Wang G, Moumouni PF, Jirapattharasate C, Iguchi A, Vudriko P, Terkawi MA, Löwenstein M, Kern A, Nishikawa Y, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X*. Molecular identification and antigenic characterization of a merozoite surface antigen and a secreted antigen of *Babesia canis* (BcMSA1 and BcSA1). **Parasit Vector.** 2016; 9: 257. PMID: 27141812
 16. Masatani T, Asada M, Hakimi H, Hayashi K, Yamagishi J, Kawazu S, Xuan X*. Identification and functional analysis of a novel mitochondria-localized 2-Cys peroxiredoxin, BbTPx-2, from *Babesia bovis*. **Parasitol Int.** 2016; 115: 3139-3145. PMID: 27095567
 17. Liu M, Cao S, Zhou M, Wang G, Jirapattharasate C, Adjou Moumouni PF, Iguchi A, Vudriko P, Suzuki H, Soma T, Xuan X*. Genetic variation of four immunodominant antigens of *Babesia gibsoni* isolated from dogs in southwest Japan. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016; 7: 298-305. PMID: 26615873
 18. Iguchi A, Soma T, Suzuki H, Xuan X*. The epidemiological survey for atovaquone resistant related gene of *Babesia gibsoni* in Japan. **J Vet Med Sci.** 2016; 78: 489-491. PMID: 26549436
 19. Jirapattharasate C, Adjou Moumouni PF, Cao S, Iguchi I, Liu M, Wang G, Zhou M, Vudriko P, Changbunjong T, Sungpradit S, Ratanakorn P, Moonarmart W, Sedwisai P, Weluwanarak T, Wongsawang W, Suzuki H, Xuan X*. Molecular epidemiology of bovine *Babesia* spp. and *Theileria orientalis* parasites in beef cattle from northern and northeastern Thailand. **Parasitol Int.** 2016; 65: 62-9. PMID: 26475202

20. Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Adjou Moumouni PF, Jirapattharasate C, Liu M, Wang G, Iguchi A, Vudriko P, Suzuki H, Xuan X*. Molecular detection and genetic identification of bovine *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis* and *Anaplasma marginale* in Turkey. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016; 7: 126-34. PMID: 26492823
21. Vudriko P, Okwee-Acai J, Tayebwa DS, Byaruhanga J, Kakooza S, Wampande E, Omara R, Muhindo JB, Tweyongyere R, Owiny DO, Hatta T, Tsuji N, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Kanameda M, Fujisaki K, Suzuki H. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. **Parasit Vectors.** 2016; 9:4. PMID: 26727991

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

帯広畜産大学原虫病研究センターにおける国際共同研究プロジェクトの紹介、日本大学シンポジウム：感染症へ挑戦する若手研究者達（日本大学生物資源科学部）、平成 28 年 12 月 2 日

9. 獲得研究費

1. 平成 28 年度 マッチングプランナープログラム「企業ニーズ解決試験」（JST）、トキソプラズマ症診断法の開発、代表、平成 28 年度
2. 平成 28 年度 伊藤記念財団研究助成、食肉により媒介されるトキソプラズマ原虫感染症に対する新規血清診断法の確立、代表、平成 28 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 山岸潤也：北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、ヒツジバベシア原虫 *Babesia ovis* のトランスクリプトーム解析、2016年4月1日～2017年3月31日、平成28年度原虫病研究センター共同研究
2. 正谷達膳：鹿児島大学共同獣医学部、トキソプラズマ潜伏感染が活性化する抗ウイルス自然免疫シグナルのパスウェイ解析、2016年4月1日～2017年3月31日、平成28年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

医学分野で重要なマラリア原虫は、世界で年間 3~5 億人が罹患、年間 200 万人もの命を奪っています。わが国にも存在するトキソプラズマはその感染による流産や新生児の先天性トキソプラズマ症を引き起こし、少子化が進む現代社会には無視できない問題です。また畜産業界では、家畜原虫感染症による家畜の生産性の低下が問題視され、ネオスポラの感染による牛の流産例が全国的に見つかっており、被害の拡大が懸念されています。我々の研究室では、原虫感染による脳神経系の機能異常や宿主動物の行動変化、流産や垂直感染のメカニズムに関する研究を行っています。また、炎症反応や免疫抑制を制御する原虫因子の同定と解析を進めています。これら科学的な知見を基盤に、多機能性リポソームを利用することでワクチン抗原を効率よくリンパ系組織へ輸送し、免疫担当細胞を効果的に刺激できる新型次世代ワクチンの開発を行っています。さらに、マウス感染モデルと自然宿主を対象にした感染実験により、ワクチンの実用化を目指しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トキソプラズマ感染による宿主動物の異常行動の解析と中枢神経系の機能破綻メカニズムの解明
- ・ トキソプラズマ、ネオスポラ由来因子による宿主免疫攪乱メカニズムの解明
- ・ マラリア原虫による貧血、トキソプラズマ及びネオスポラによる流産の病態発症メカニズムの解明
- ・ 多機能性リポソームによる病原性原虫に対するワクチン開発
- ・ 天然物からの抗原虫薬の探索
- ・ ウシの下痢症に起因する腸内細菌叢の解析

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ 細胞内寄生原虫のトキソプラズマの感染は、ヒトにおける精神疾患の発症に関与することが考えられています。我々の研究室では、トキソプラズマ感染がうつ様症状の発症を引き起こすことをマウス実験モデルで明らかにしています。今回の研究では、トキソプラズマに対する免疫応答がうつ様症状の発症を誘導することを明らかにしました。トキソプラズマに対する防御免疫反応には、炎症性サイトカインのインターフェロン・ガンマ (IFN- γ) が必要です。トキソプラズマ感染により、IFN- γ が細胞に作用することでインドールアミン酸素添加酵素 (Indoleamine 2,3-dioxygenase: IDO) が活性化され、トリプトファンの代謝が亢進してキヌレニンが産生されることを確認しました。キヌレニンはうつ病をはじめ様々な精神疾患全般の原因として考えられています。トキソプラズマ感染は上記の経路を誘導し、宿主

動物にうつ様症状が発症すると示唆されました。さらに、このうつ様症状は抗炎症剤やIDO阻害薬で抑えることができました。宿主免疫応答は病原体の排除に重要ですが、その副反応の一つとして精神疾患の発症に関与することに注意しなければならないと考えられます。

(論文リスト1)

- ・ 細胞内寄生原虫ネオスポラは世界中に蔓延しており、特にウシに流産を引き起こすことから畜産業に多大な経済損失が生じます。未だにネオスポラに対する治療薬は開発されておらず、効果的で安全性の高い創薬が必要とされています。天然生物資源は創薬に高い可能性を秘めていることから、今回はタイ産コショウ科植物の抗ネオスポラ効果を検証しました。3種の植物 (*Piper betle*, *Piper nigrum*, *Piper sarmentosum*) のエタノール抽出物における効果を比較したところ、*Piper betle* で *in vitro* のネオスポラ増殖を抑制しました (IC50: 22.1µg/ml)。次にネオスポラ感染マウスを用いて検証したところ、コントロール群では致死率100%に対し、*Piper betle* の投与で生存率の上昇が認められました (400mg/kg 投与: 83.3%、100mg/kg 投与: 33.3%)。以上より、*Piper betle* には抗ネオスポラ活性を有する成分が含まれており、将来的な創薬の可能性が示されました。本論文発表は、タイ・マヒドン大学との共同研究の成果です。(論文リスト2)
- ・ トキソプラズマ症はヒトや家畜動物に重篤な疾病であり、細胞内寄生原虫トキソプラズマの感染により引き起こされます。トキソプラズマ感染を予防するためにはワクチンの開発が必要とされています。最近の研究では、ワクチン抗原の候補分子として原虫由来酵素の有効性が示されています。本研究では抗酸化作用をもつペルオキシレドキシシン (Peroxi-redoxin) に着目し、免疫活性化能とワクチンとしての可能性を検証しました。トキソプラズマ由来 Peroxi-redoxin 3 (TgPrx3) の組換えタンパク質を作製し、マクロファージへ作用させたところ、免疫活性化に重要なインターロイキン12の産生を誘導しました。この結果は、TgPrx3の単独接種により、効果的な免疫反応を誘導できる可能性を示唆しています。そこでマウス感染モデルによるワクチン評価試験を実施したところ、TgPrx3接種マウスはTgPrx3特異的な抗体産生と細胞性免疫を誘導し、トキソプラズマ感染に対してマウスの生存率を増加させる結果を得ることができました。今回の結果により、TgPrx3が新規のワクチン抗原になる可能性が示されました。(論文リスト4)
- ・ ウシに重篤な病気を引き起こし、節足動物(ダニやハエなど)により媒介される病原体にバベシア (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*)、トリパノソーマ (*Trypanosoma evansi*)、アナプラズマ (*Anaplasma marginale*) が挙げられます。近年、エジプト北部で上記病原体の高い感染率が明らかにされていますが、エジプト北部での実態は明らかではありません。そこで本研究では、エジプト北部のウシを対象に血清学診断法による抗体調査を行いました。301検体中、*B. bovis* 陽性が27検体(9.0%)、*B. bigemina* 陽性が100検体(33.2%)、*T. evansi* 陽性が127検体(42.2%)検出されました。また、*A. marginale* 陽性は90検体

中 25 検体 (28%) が陽性でした。解析した検体には各種病原体が共感染しているもの多く、*B. bigemina* と *T. evansi* の共感染が 10.6% (32/301) 認められました。感染リスク要因を解析したところ、3 歳以下のウシは *B. bovis* に感染しやすく、*B. bigemina* 感染には地理的要因が関与することが明らかとなりました。以上の結果より、これら感染症はエジプト北部の畜産業に大きな損害を与えることが示唆されます。本論文発表は、エジプトの South Valley 大学などとの共同研究の成果です。(論文リスト 3)

- ・ トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) は世界人口の 3 分の 1 のヒト、及びほ乳類・鳥類に感染している細胞内寄生性原虫(単細胞の寄生虫)です。免疫機能が正常な成人に感染した場合は無症状ですが、脳や筋肉に潜伏感染を続けることが知られています。さらに、トキソプラズマ感染が統合失調症、うつ病、アルツハイマー症などの発症リスクとなる可能性が推測されています。またトキソプラズマの慢性感染が、ヒトの行動や性格に影響を及ぼすことも報告されています。マウスを用いた実験では天敵であるネコの匂いに対する嫌悪感が減少することが知られており、感染による宿主動物の行動変化が示唆されています。しかし、トキソプラズマ感染が脳神経系に与える影響は不明であり、神経・精神疾患の発症や行動異常に至るメカニズムも解明されていません。そこで本研究では実験マウスの行動変化、脳組織、神経機能を解析し、トキソプラズマが宿主動物の行動を操作するしくみを明らかにすることを目的としました。行動測定の結果、トキソプラズマ感染によりマウスの恐怖記憶が障害されることが明らかとなりました。恐怖記憶の形成に重要な脳領域に大脳皮質と扁桃体があります。感染マウスの大脳皮質には組織障害が認められ、記憶に不可欠な神経伝達物質であるドパミンの消費が増加していました。また感染マウスの扁桃体では、精神安定の維持に必要とされるセロトニンが減少していました。このような神経伝達物質のバランスが崩れることで神経機能の低下が起こり、感染マウスの記憶能力が低下したものと考えられます。本研究によって、トキソプラズマ感染による宿主動物の行動変化の新たなしくみが明らかとなりました。今回の研究で見出された大脳皮質の機能低下や神経伝達物質のバランス異常は、統合失調症やうつ病などのヒトの精神疾患とも類似した病態です。今後の研究により、トキソプラズマ感染とヒトの神経・精神疾患との関連性を明らかにしていくことが重要であると考えます。(論文リスト 8)
- ・ ネオスポラ (*Neospora caninum*) はウシの流産、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) は子牛の下痢症を引き起こし、それらの感染による畜産業への経済的な損失は世界規模となっています。今回、エジプトの South Valley 大学などと共同研究を行い、エジプト南部を対象とした家畜のネオスポラおよびクリプトスポリジウムの感染状況を調査しました。ネオスポラ感染率は 18.9%、ネオスポラ感染率は 35.9% に達し、ウシの流産や子牛の下痢症の潜在的なリスクが推測されました。(論文リスト 9)
- ・ 天然ハーブには様々な薬効が含まれていることが歴史上分かっています。今回、タイ産の胡

椒科植物に着目し、抗原虫効果の有無を解析しました。興味深いことに、Piper betle のエタノール抽出物には細胞内寄生原虫トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) を殺滅する効果があり、マウスを用いた動物実験でもその効果を確認することができました。本論文発表は、タイ・マヒドン大学との共同研究の成果です。(論文リスト 12)

- ・ 細胞内寄生原虫トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はヒトを含めた様々なほ乳類と鳥類に感染し、世界レベルでの感染拡大が危惧されています。今回、エジプトの South Valley 大学などと共同研究を行い、エジプト全土を対象とした家畜のトキソプラズマ感染状況を調査しました。トキソプラズマ感染率は 2~4 割に達し、潜在的な食肉からヒトへの感染が推測されました。(論文リスト 13)

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議委員
- ・ 日本寄生虫学会評議委員

② 主催した学会、研究会等

- ・ 第 24 回分子寄生虫学ワークショップ (平成 28 年 8 月 30 日~9 月 2 日、帯広畜産大学原虫病研究センター)

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 分子寄生虫学ワークショップ世話人
- ・ 日本獣医寄生虫学会誌編集委員
- ・ The Journal of Protozoology Research 編集委員長

6. 平成 28 年度研究成果発表等 (原著論文、総説・著書)

原著論文 (*責任著者)

1. Mahmoud ME, Fereig R, Nishikawa Y*. Involvement of host defense mechanisms against *Toxoplasma gondii* infection in anhedonic and despair-like behaviors in mice. **Infect Immun.** 2017; 85: pii: e00007-17. PMID: 28138019
2. Leesombun A, Boonmasawai S, Nishikawa Y*. Effects of Thai piperaceae plant extracts on *Neospora caninum* infection. **Parasitol Int.** 2017; 66: 219-226. PMID: 28137670
3. Fereig RM, Mohamed SG, Mahmoud HY, AbouLaila MR, Guswanto A, Nguyen TT, Ahmed Mohamed AE, Inoue N, Igarashi I, Nishikawa Y*. Seroprevalence of *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Trypanosoma evansi*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle in southern Egypt. **Ticks Tick Borne Dis.** 2017; 8: 125-131. PMID: 27789159

4. Fereig RM, **Nishikawa Y***. Peroxiredoxin 3 promotes IL-12 production from macrophages and partially protects mice against infection with *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Int.** 2016; 65: 741-748. PMID: 27644889
5. Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Liu M, Wang G, Adjou Moumouni PF, Jirapattharasate C, Suzuki H, **Nishikawa Y**, Xuan X. Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant TgSAG2 and NcSAG1 to detect *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*-specific antibodies in domestic animals in Turkey. **J Vet Med Sci.** 2017; 78: 1877-1881. PMID: 27523504
6. Ibrahim HM, **Nishikawa Y***. The impact of the host CCR5, TLR2 and TLR11 on production of nitric oxide, IL-6, IL-12 and growth of *Toxoplasma gondii*. **J. Protozool. Res.** 2016; 26: 18-29.
7. Kumagai A, Zhang G, Jia H, Nakamura C, Zhang H, Goo Y-K, Aboje GA, Terkawi MA, Zhou J, **Nishikawa Y**, Xuan X. Expression of *Babesia gibsoni* thrombospondin-related adhesive protein in *Toxoplasma gondii* and evaluation of its antigenicity and immunogenicity. **J. Protozool. Res.** 2016; 26: 30-39.
8. Ihara F, Nishimura M, Muroi Y, Mahmoud ME, Yokoyama N, Nagamune K, **Nishikawa Y***. *Toxoplasma gondii* Infection in Mice Impairs Long-Term Fear Memory Consolidation Through Dysfunction of the Cortex and Amygdala. **Infect Immun.** 2016; 84: 2861-2870. PMID: 27456832
9. Fereig RM, AbouLaila MR, Mohamed SG, Mahmoud HY, Ali AO, Ali AF, Hilali M, Zaid A, Mohamed AE, **Nishikawa Y***. Serological detection and epidemiology of *Neospora caninum* and *Cryptosporidium parvum* antibodies in cattle in southern Egypt. **Acta Trop.** 2016; 162: 206-211. PMID: 27377768
10. Ibrahim HM, Abdel-Ghaffar F, Osman GY, El-Shourbagy SH, **Nishikawa Y**, Khattab RA. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in Chicken samples from delta of Egypt using ELISA, histopathology and immunohistochemistry. **J Parasit Dis.** 2016; 40: 485-490. PMID: 27413325
11. Hayashi K, Ichikawa-Seki M, Allamanda P, Wibowo PE, Mohanta UK, Sodorun, Guswanto A, **Nishikawa Y**. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola gigantica* from western Java, Indonesia. **Parasitol Int.** 2016; 65: 424-427. PMID: 27266482
12. Leesombun A, Boonmasawai S, Shimoda N, **Nishikawa Y***. Effects of Extracts from Thai Piperaceae Plants Against Infection with *Toxoplasma gondii*. **PLoS One.** 2016; 11: e0156116. PMID: 27213575
13. Fereig RM, Mahmoud HYAH, Mohamed SGA, AbouLaila MR, Abdel-Wahab A, Osman SA, Zidan SA, El-Khodary SA, Mohamed AEA, **Nishikawa Y***. Seroprevalence and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in farm animals in different regions of Egypt. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.** 2016; 3–4: 1–6.
14. Zhou M, Cao S, Luo Y, Liu M, Wang G, Moumouni PF, Jirapattharasate C, Iguchi A, Vudriko P, Terkawi MA, Löwenstein M, Kern A, **Nishikawa Y**, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. Molecular

identification and antigenic characterization of a merozoite surface antigen and a secreted antigen of *Babesia canis* (BcMSA1 and BcSA1). **Parasit Vectors**. 2016; 9: 257. PMID: 27141812

総説

1. 西川義文、猪原史成：総説「グローバル感染症トキソプラズマトキソプラズマ感染が環境と人間活動に及ぼす影響は？」、グローバル感染症最前線—NTDsの先へー、医学のあゆみ、2016年11月26日号、259(9)、952-960
2. 西川義文：クリプトスポリジウム感染による病態発症メカニズム、消化管感染症の発症メカニズム、「化学療法の領域」、2016年9月号特集, 32(9), 108-115

著書

1. 西川義文：18. 遺伝情報の発現とタンパク質合成、分布、分解。「改訂獣生化学」、朝倉書店、2016年4月1日 初版第1刷発行、P197-209
2. Fereig RM, Nishikawa Y. Towards a Preventive Strategy for Toxoplasmosis: Current Trends, Challenges, and Future Perspectives for Vaccine Development. *Methods Mol Biol*. 2016; 1404: 153-64. PMID: 27076296
3. 西川義文：第2章・原虫 2-3 原虫各論 II (アピコンプレクサ類) 2. コクシジウム II (1) トキソプラズマ、(2) ネオスポラ、(3) サルコシステイス。「寄生虫病学」、緑書房、2017年3月10日 改訂版第1刷発行、P51-56

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 原虫病研究センター施設見学および寄生虫の標本展示、平成28年度帯広畜産大学オープンキャンパス、帯広畜産大学・原虫病研究センターPKホール、2016年7月30日
2. 寄生虫の観察の体験実習、第6回畜大ふれあいフェスティバル、北海道帯広市とかちプラザ、2016年12月17日

8. 招待講演等

1. Brain manipulation by intracellular parasite, *Toxoplasma gondii*, The annual Joint International Tropical Medicine Meeting (JITMM2016)、2016年12月9日

9. 獲得研究費

1. 平成26年度 基盤研究(B) (海外学術調査) (文部科学省)、インドネシアにおける人獣共通原虫病の疫学調査と社会実装可能な診断方法の開発 (26304037)、代表、平成26年度～平成28年度
2. 平成27年度 挑戦的萌芽研究 (文部科学省)、宿主中枢神経系を支配するトキソプラズマ由来ブレインマニピュレーター の 解 明 (15K15118)、代表、平成27年度～平成28年度

3. 平成 27 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、ネオスポラ病原性因子の同定とワクチン開発への応用 (15H04589)、代表、平成 27 年度～平成 29 年度
4. 平成 28 年度 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業、日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の開発、分担、平成 28 年度～平成 30 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

受賞名：2016-2017 年度日本獣医学会賞 (日本獣医学会) 第 120 号

受賞テーマ：ネオスポラ症の病態発生機序と防御法に関する研究

受賞年：平成 28 年 9 月 7 日

12. 報道等

1. トキソプラズマ感染による宿主動物の行動変化のしくみを解明、帯広畜産大学プレスリリース (2016 年 8 月 8 日)、新聞各社電子版掲載 (共同通信社、日本経済新聞、北海道新聞、中日新聞、高知新聞、西日本新聞、長崎新聞、福島民友新聞社、秋田魁新報社、北日本新聞、デイリースポーツ等、2016 年 8 月 8 日)、十勝毎日新聞記事掲載 (2016 年 8 月 28 日)

13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. Charles L Kaunang : Animal Sciences Faculty, Sam Ratulangi University、RESEARCH AND ACADEMIC COLLABORATION BETWEEN ANIMAL SCIENCES FACULTY, SAM RATULANGI UNIVERSITY, INDONESIA AND NATIONAL RESEARCH CENTER FOR PROTOZOAN DISEASES, OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE, JAPAN、2015 年 2 月～2019 年 2 月、学術協定
2. Ellen Joan Kumaat : SAM RATULANGI UNIVERSITY、Memorandum of Understanding BETWEEN SAM RATULANGI UNIVERSITY and OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE、2015 年 10 月～2019 年 10 月、学術協定
3. ATTY. LIZA D. CORRO、UNIVERSITY OF THE PHILIPPINES CEBU、MEMORANDUM OF AGREEMENT BETWEEN UNIVERSITY OF THE PHILIPPINES CEBU AND OBIHIRO UNIVERSITY、2016 年 3 月～2020 年 3 月、学術協定
4. 二瓶 浩一：(公財) 微生物化学研究会・微生物化学研究所、抗原虫薬開発に適した化合物ライブラリーと評価システムの構築、2016 年 4 月 1 日～2017 年 3 月 31 日、平成 28 年度原虫病研究センター共同研究
5. 秋田 英万：千葉大学大学院薬学研究院・薬物学研究室、トキソプラズマ感染予防を可能と

する DNA ワクチン製剤の開発、2016 年 4 月 1 日～2017 年 3 月 31 日、平成 28 年度原虫
病研究センター共同研究

6. 関 まどか：岩手大学・農学部共同獣医学科、クリプトスポリジウム症に対する初乳中の抗
体による予防効果の検討、2016 年 4 月 1 日～2017 年 3 月 31 日、平成 28 年度原虫病研
究センター共同研究
7. 高橋 良和：（公財）微生物化学研究会・微生物化学研究所、病原性原虫に対する薬剤候補
化合物および新規治療標的の探索、2016 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、共同研究契約

1. 研究テーマの概要

発生工学的応用による原虫感染機構の解明

発生工学とは、バイオテクノロジーの一分野で、動物の発生過程を人工的に制御して新しい動物を作り出すことを目指すものです。医学・薬学あるいは獣医学領域におけるこの発生工学の魅力は、興味ある遺伝子の機能を動物の個体レベルで解析可能にすることにあります。例えば、培養細胞を用いて血圧の制御にかかわる遺伝子の機能を観察することは不可能ですが、発生工学は生体の高次機構の中で遺伝子機能を直接的に解析可能な検定系を提供できますので、その解析結果の臨床研究への応用展開も容易にさせるといえます。これまでに発生工学から生み出されたたくさんの遺伝子改変マウスが、生活習慣病、癌あるいは感染症などの理解のために活用されています。これには、原虫関連疾患も例外ではありません。当研究分野では、宿主の生理機能を修飾することによる原虫感染症の予防・治療の可能性を探索しています。

これまでのビタミンE転送タンパク欠損マウスを用いた解析から、宿主のビタミンE欠乏が原虫感染症に効果的に働くことがわかってきました。循環中のビタミンE濃度を規定するビタミン転送タンパクの機能不全は、脂溶性の抗酸化物質であるビタミンE欠乏を招きますが、宿主の循環中のビタミンE欠乏は、寄生マラリア原虫のDNA障害を惹起し増殖を抑制させる効果が認められました。この効果は、マラリア原虫のみならずトリパノソーマ原虫感染においても観察されたことから、広く宿主の循環中に寄生する原虫の増殖抑制に働くことが期待されます。この効果を発揮する化合物を探したところ、最近になって、すでに上市されている高脂血症薬がビタミンEレベルの抑制、抗原虫効果を有することを発見しました。現在、臨床応用へ向けての研究を進めています。

加えて、マラリア感染が雌雄の生殖能力に及ぼす影響についても研究しています。妊娠時にマラリアに感染すると、非妊娠時に感染した場合と比べて、症状が重篤になることが知られています。そこで、マウスモデルを使って、妊娠のどの時期に感染が成立すると重篤化が進むのか？その理由は？を検討しています。併せて、マラリア感染と雄の精子形成能力、妊孕能との関係についても研究課題としています。

発生・生殖工学の技術開発研究

バイオサイエンスの解析系を充実するためには、発生工学とそれを支える体外受精、胚移植、配偶子の凍結保存、凍結乾燥保存などの生殖工学の技術開発が不可欠です。当研究分野では、マウスを対象とした発生・生殖工学技術の深耕を図るとともに、この一連の技術を盲導犬をはじめとする補助犬の育成にも応用して、社会貢献を果たしています。我々は、世界で初めて凍結受精卵由来のイヌ産仔を得ることに成功しており、今後、盲導犬の普及への貢献が期待されています。

2. 主な研究テーマ

- ・ ビタミン E 欠乏誘導による抗原虫効果の検討
- ・ 妊娠を伴うマラリアの病態メカニズムの解析
- ・ マラリア感染が雄の生殖能力に及ぼす影響の解析
- ・ イヌの生殖工学技術の開発、特に精子、胚、卵巣の凍結保存技術の開発
- ・ バベシア受容体欠損ウシの樹立

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ プロブコールは、既に上市されている高脂血症薬ですが、この薬物が循環中のビタミン E 濃度を低下させ、その作用によって抗マラリア薬として機能することがマウスモデルを用いた研究で発見しました（論文リスト 1）。さらに、このプロブコールと既存の抗マラリア薬である DHA (dihydroartemisinin)の併用効果は顕著であったことから、プロブコールの利用は薬剤耐性原虫の出現抑制にも寄与することが期待されます（論文リスト 14）。
- ・ 一般にイヌ卵巣内の卵胞は不均一に分布していることから、卵巣組織片を用いた卵巣移植実験の結果の解釈には注意が必要です。本研究では、卵胞の密度、分布を迅速に計測する系を開発し、卵胞密度の均一なサンプルを用いた卵巣移植実験系を開発しました。このシステムは、精度の高い実験系の確保に貢献することが期待されます（論文リスト 16）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本卵子学会常任理事
- ・ 日本熱帯医学会評議員
- ・ 日本繁殖生物学会評議員
- ・ 日本寄生虫学会評議員
- ・ 日本実験動物学会
- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本生殖医学会
- ・ 日本分子生物学会
- ・ 日本ゲノム編集学会
- ・ 日本身体障害者補助犬学会
- ・ Society for the Study of Reproduction (米国・正会員)

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 日本卵子学会 生殖補助医療胚培養士資格認定委員
- ・ 日本学術振興会 特別研究員等審査会専門委員

6. 平成 28 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Kume A, Herbas MS, Shichiri M, Ishida N, Suzuki H*. Effect of anti-hyperlipidemia drugs on the alpha-tocopherol concentration and their potential for murine malaria infection. **Parasitol Res.** 2016; 115: 69-75. PMID: 26358099
2. Iguchi A, Soma T, Suzuki H, Xuan X. The epidemiological survey for atovaquone resistant related gene of *Babesia gibsoni* in Japan. **J Vet Med Sci.** 2016; 78: 489-491. PMID: 26549436
3. Vudriko P, Acai-Okwee J, Tayebwa SD, Byaruhanga J, Kakooza S, Wapande E, Omara R, Muhindo BJ, Tweyongyere R, Owiny OD, Hatta T, Tsuji N, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Kanameda M, Fujisaki K, Suzuki H*. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. **Parasit Vectors.** 2016; 9: 4. PMID: 26727991
4. Jirapattharasate C, Moumouni PF, Cao S, Iguchi A, Liu M, Wang G, Zhou M, Vudriko P, Changbunjong T, Sungpradit S, Ratanakorn P, Moonarmart W, Sedwisai P, Weluwanarak T, Wongsawang W, Suzuki H, Xuan X. Molecular epidemiology of bovine *Babesia* spp. and *Theileria orientalis* parasites in beef cattle from northern and northeastern Thailand. **Parasitol Int.** 2016; 65: 62-69. doi: 10.1016/j.parint.2015.10.005. PMID: 26475202
5. Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Moumouni PF, jirapattharasate C, Liu M, Wang G, Iguchi A, Vudriko P, Suzuki H, Xuan X. Molecular detection and genetic identification of *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis* and *Anaplasma marginale* in Turkey. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016; 7: 126-134. doi:10.1016/j.ttbdis. 2015.09.008. PMID: 26492823
6. Hariya M, Suzuki H*. Incidence of apoptotic cells after vitrification in canine ovarian tissues. **J Mamm Ova Res.** 2016; 33: 69-75.
7. Liu M, Cao S, Zhou M, Wang G, Jirapattharasate C, Moumouni PF, Iguchi A, Vudriko P, Suzuki H, Soma T, Xuan X. Genetic variations of four immunodominant antigens of *Babesia gibsoni* isolated from dogs in southwest Japan. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016; 7: 298-305. PMID: 26615873
8. Liu M, Cao S, Vudriko P, Suzuki H, Soma T, Xuan X. *Babesia gibsoni* internal transcribed spacer 1 region is highly conserved amongst isolates from dogs across Japan. **J Vet Med Sci.** 2016; 78: 863-865. PMID: 26806537
9. Zhou M, Cao S, Luo Y, Liu M, Wang G, Moumouni PF, Jirapattharasate C, Iguchi A, Vudriko P, Terkawi MA, Lowenstein M, Kern A, Nishikawa Y, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. Molecular identification and antigenic characterization of a merozoite surface antigen and a secreted

- antigen of *Babesia canis* (BcMSA1 and BcSA1). **Parasit Vectors**. 2016; 9: 257. doi:10.1186/s13071-016-1518-1. PMID: 27141812
10. Liu M, Ruttayaporn N, Saechan V, Jirapattharasate C, Vudriko P, Moumouni PF, Cao S, Inpankaew T, Ybanez AP, **Suzuki H**, Xuan X. Molecular survey of canine vector-borne diseases in stray dogs in Thailand. **Parasitol Int**. 2016; 65: 357-361. PMID: 27143604
11. Moumouni PF, Terkawi MA, Jirapattharasate C, Cao S, Liu M, Nakao R, Umemiya-Shirafuji R, Yokoyama N, Sugimoto C, Fujisaki K, **Suzuki H**, Xuan X. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in *Amblyomma variegatum* ticks from Benin. **Ticks Tick Borne Dis**. 2016; 7: 828-833. PMID: 27150592
12. Wang G, Efstratiou A, Moumouni PF, Liu M, Jirapattharasate C, Guo H, Gao Y, Cao S, Zhou M, **Suzuki H**, Igarashi I, Xuan X. Primary *Babesia rodhaini* infection followed by recovery confers protective immunity against *B. rodhaini* reinfection and *Babesia microti* challenge infection in mice. **Exp Parasitol**. 2016; 169: 6-12. PMID: 27423972
13. Zhou M, Cao S, Sevinc M, Ceylan O, Liu M, Wnag G, Moumouni PF, Jirapattharasate C, **Suzuki H**, Nishikawa Y, Xuan X. Enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant TgSAG2 and NcSAG1 to detect *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*-specific antibodies in domestic animals in Turkey. **J Vet Med Sci**. 2016; 7: 126-134. PMID: 27523504
14. Kume A, Dang-Trinh M, Shichiri M, Ishida N, **Suzuki H***. Probucol dramatically enhances dihydroartemisinin effect in murine malaria. **Malaria J**. 2016; 15: 472. doi: 10.1186/s12936-016-1532-y. PMID: 27634686
15. **鈴木宏志**, 横澤幸美, 橋本友樹, 伊藤美咲, 水上言, 高柳友子, 諏訪義典, 加藤淳一, 古橋博昭, 和田孝文. 我が国の身体障害者補助犬の繁殖コロニーにおけるダイナミン1遺伝子の突然変異頻度について. **日本補助犬学会誌**. 2016; 10: 24-27.
16. Wakasa I, Hayashi M, Abe Y, **Suzuki H***. Distribution of follicles in canine ovarian tissues and xenotransplantation of cryopreserved ovarian tissues with even distribution of follicles. **Reprod Domest Anim**. 2016; 51: 1-5. PMID: 27892637

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 科研（基盤研究 B（海外学術））日本学術振興会 アフリカ大陸におけるマダニ媒介性動物原虫感染症の流行実態の解明と予防対策の確立 2,300,000
2. 共同研究 エーザイ株式会社 トコフェロール誘導体の抗原虫効果について 1,000,000
3. 論文博士取得希望者に対する支援事業 日本学術振興会 1,200,000
4. 共同研究 Bloom Technology 株式会社 Erythropoietin の基礎データに関する研究 500,000

10. 特許申請・取得

1. マラリアの予防または治療薬及びそのスクリーニング方法、2017年2月3日、第6083534号
2. 吠えるイヌ、吠えないイヌの選別方法、2017年2月10日、第6087095号

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

該当なし

1. 研究テーマの概要

マダニは原虫、リケッチア、ウイルスといった様々な病原体を家畜や人に媒介する吸血性節足動物です。マダニは、卵、幼ダニ、若ダニ、成ダニ（雌・雄）と発育し、1世代を終えるまでに数か月～数年を要します。吸血行動は幼・若・成ダニ期に1回ずつ、計3回行われるだけであり、マダニは生活史の大半を未吸血・飢餓状態で過ごします。その一方で、成ダニ（雌）が吸血を終えて満腹状態（飽血）に達すると、その体重は吸血前の約100倍も増加し、獲得した栄養分のほとんどすべてを数千個におよぶ卵の発育に利用します。当研究室では、マダニの「栄養代謝（飢餓と飽血）」および「卵形成」に着目し、それらの分子機構に関する研究を推進しています。また、マダニ体内における媒介原虫の動態やマダニの栄養代謝関連分子・卵形成必須分子が原虫伝播に果たす役割、マダニ自身が保有する共生細菌の存在意義についての解析を進めています。多角的な視点でマダニという生物を理解し、新規のマダニ対策法開発に繋げることを目指しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ マダニの飢餓耐性メカニズムの解明
- ・ マダニの栄養代謝に関与する分子機構の解明
- ・ マダニにおける原虫の伝播機構の解明
- ・ マダニにおける共生細菌の存在意義の解明

3. 平成28年度研究の総括

- ・ マダニは偏性吸血性節足動物で、遊離鉄を含む脊椎動物血液を濃縮しながら摂取します。そのため、マダニの吸血時には、体内の遊離鉄濃度が上昇し、酸素との反応により大量の過酸化水素が産生されると考えられます。過酸化水素は生体に対して酸化ストレスを引き起こすことが知られていますが、マダニはこの酸化ストレスにうまく対抗しながら吸血していると推測されます。これらの仮説を検証するため、過酸化水素消去分子であるペルオキシレドキシニンに着目し、マダニ吸血に対する酸化ストレス応答や吸血後の雌成ダニの繁殖におけるペルオキシレドキシニンの役割を調べました。RNA干渉法によりペルオキシレドキシニン遺伝子ノックダウン雌ダニを作出し、ウサギで吸血させたところ、吸血完了（飽血）後の体重、産下卵の総重量、卵からの幼ダニへの孵化率が、対照群の雌ダニと比べて有意に減少しました。また、ペルオキシレドキシニン遺伝子ノックダウン雌ダニでは、体内の過酸化水素濃度が対照群の雌ダニよりも高いことが明らかになりました。以上のことから、マダニのペルオキシレドキシニンは、吸血時に体内で産生される過酸化水素濃度を調節することによって、吸血を円滑に進めていることが示唆されました。本研究は、帯広畜産大学原虫病研究センター共同研

究 (27-共同-11) の成果を論文発表したものです。(論文リスト4)

- ・ マダニの卵母細胞発育は吸血後に誘導され、その発育は非同期的であることが知られていますが、フタトゲチマダニ(単為生殖系)雌ダニにおける卵母細胞の発育過程についての詳細な観察はこれまで行われていないことから、我々は、卵母細胞の発育ステージ分類基準を新たに設定することを試みました。雌ダニの未吸血から産卵期における卵巣を組織学的に観察し、卵母細胞の発育ステージをⅠ～Ⅴに分類可能であることを示しました。確立した分類基準に基づき、未吸血および緩慢吸血期の雌ダニ卵巣ではステージⅠが、急速吸血期ではステージⅠおよびⅡの卵母細胞が存在することが明らかになりました。さらに、飽血後4日目以降では、ステージⅠ～Ⅴの卵母細胞が観察されました。これらの知見は、卵形成だけでなく、病原体の介卵伝播を解析する上での重要な基礎情報になると期待されます。(論文投稿中)
- ・ バベシア *Babesia ovata* (*in vitro* 培養株) を感染させた牛赤血球をフタトゲチマダニ(単為生殖系)雌ダニに吸血させ、実験室内でバベシア感染フタトゲチマダニを作出することに成功しました。*B. ovata* 感染雌ダニより抽出したDNAをテンプレートとして、PCRおよびリアルタイムPCRにより標的遺伝子を検出し、マダニ体内におけるバベシアの動態を検証しました。その結果、吸血によってマダニ体内に入った *B. ovata* は、約24時間以内に消化管(中腸)を突破し、卵巣などの臓器に侵入し増殖することが示唆されました。(論文リスト6)
さらに、感染雌ダニの産下卵を経日的に回収し、nested PCRにより *B. ovata* 遺伝子の検出を試みました。その結果、産卵開始後1～3日目の産下卵において *B. ovata* 遺伝子の増幅が認められました。このことから、*B. ovata* に感染した卵は、約3週間という長い産卵期間のうち、より早い時期において産下されることが示唆されました。(論文投稿中)
- ・ マウスで吸血させたフタトゲチマダニ雌ダニ(単為生殖系)の中腸内容物を抽出し、バベシア *Babesia ovata* (*in vitro* 培養株) 感染牛赤血球と共に培養し、経時的に血液塗抹標本作製して *B. ovata* の形態を観察しました。その結果、培養開始数時間以内に、通常の *in vitro* 培養系と異なる形態の原虫が観察され、培養開始5時間後までの間に、赤血球内外にやや大きなリング状虫体が観察されました。これらのことから、先行研究の結果と併せると、吸血によってマダニ中腸内に到達した *B. ovata* は、中腸内腔において遅くとも24時間以内に形態変化(ステージシフト)を起こし、中腸を突破して他臓器へ伝播すると考えられました。(論文リスト7)

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本獣医寄生虫学会

- ・ 日本寄生虫学会
- ・ 日本衛生動物学会
- ・ 日本ダニ学会 文献目録委員

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 平成 28 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Maeda H, Miyata T, Kusakisako K, Galay RL, Talactac MR, **Umemiya-Shirafuji R**, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T. A novel C-type lectin with triple carbohydrate recognition domains has critical roles for the hard tick *Haemaphysalis longicornis* against Gram-negative bacteria. **Dev Comp Immunol.** 2016; 57: 38-47. PMID: 26724379
2. Galay RL, Hernandez EP, Talactac MR, Maeda H, Kusakisako K, **Umemiya-Shirafuji R**, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T. Induction of gene silencing in *Haemaphysalis longicornis* ticks through immersion in double-stranded RNA. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016; 7: 813-816. PMID: 27062446
3. Adjou Moumouni PF, Terkawi MA, Jirapattharasate C, Cao S, Liu M, Nakao R, **Umemiya-Shirafuji R**, Yokoyama N, Sugimoto C, Fujisaki K, Suzuki H, Xuan X. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in *Amblyomma variegatum* ticks from Benin. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016; 7: 828-833. PMID: 27150592
4. Kusakisako K, Galay RL, **Umemiya-Shirafuji R**, Hernandez EP, Maeda H, Talactac MR, Tsuji N, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T. 2-Cys peroxiredoxin is required in successful blood-feeding, reproduction, and antioxidant response in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. **Parasit Vectors.** 2016; 9: 457. PMID: 27542835
5. Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Matsubayashi M, Miyoshi T, **Umemiya-Shirafuji R**, Kawazu S, Igarashi I, Mochizuki M, Tsuji N, Tanaka T. Establishment of a novel tick-*Babesia* experimental infection model. **Sci Rep.** 2016; 6: 37039. PMID: 27841321
6. Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Kusakisako K, Matsubayashi M, **Umemiya-Shirafuji R**, Tsuji N, Tanaka T. Initial development of *Babesia ovata* in the tick midgut. **Vet Parasitol.** 2017; 233: 39-42. PMID: 28043386.

総説

該当なし

著書

1. Galay RL, Miyata T, Umemiya-Shirafuji R, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T. Host immunization with recombinant proteins to screen antigens for tick control. Methods Mol Biol. 2016; 1404: 261-273. PMID: 27076304

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 原虫病研究センター施設見学および寄生虫の標本展示、平成28年度帯広畜産大学オープンキャンパス、帯広畜産大学・原虫病研究センターPKホール、2016年7月30日
2. 寄生虫の観察の体験実習、第6回畜大ふれあいフェスティバル、北海道帯広市とかちプラザ、2016年12月17日

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 平成28年度 基盤研究(B) (海外学術調査) (文部科学省)、アフリカ大陸におけるマダニ媒介性動物原虫感染症の流行実態の解明と予防対策の確立(26304036)、分担、平成26年度～平成29年度
2. 平成28年度 若手研究(B) (文部科学省)、栄養代謝に着目したマダニ-原虫間の相互作用の解明(16K18794)、代表、平成28年度～平成30年度
3. 2016年度 研究助成(奨励) (公益財団法人 秋山記念生命科学振興財団)、マダニ卵母細胞の成熟過程における原虫感染メカニズムの解明

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究(共同研究契約締結分)

該当なし

1. 研究テーマの概要

ピロプラズマ病は、バベシアおよびタイレリアがマダニによって媒介され、動物（牛、馬、犬、ネズミなど）の赤血球に寄生し、発熱、貧血、血色素尿症を引き起こす難治性の原虫病である。ピロプラズマ病は世界的に分布し、その経済的被害は毎年約数千億円に上り、獣医学領域で最も重要な感染症のひとつである。しかし、ピロプラズマ病を完全に治療・予防可能な薬剤やワクチンは未だ開発されていない。現在使用されている抗ピロプラズマ薬は副作用が強く安全性に大きな課題を抱えている。また、治療を受けた動物でも再発することが多い。そのため、原虫を殺滅する効果と安全性が高い薬剤の開発が喫緊の課題である。さらに、牛バベシア病や馬ピロプラズマ病は家畜法定伝染病に指定されており、最新の診断法の導入による検疫体制の強化を図り、これらのピロプラズマ病が日本へ侵入する事を阻止する事が急務である。我々の研究グループは、4種類の家畜のピロプラズマ原虫の培養系を日本で初めて確立し、これらを使って血清診断法、遺伝子診断法の開発に取り組み、2008年に世界で初めて牛バベシア病と馬ピロプラズマ病の国際獣疫事務局(OIE)のレファレンスラボラトリーに認定されている。また、多数の薬剤候補による増殖効果を短期間で測定可能な *in vitro* ハイスループットスクリーニング法の開発に成功し、新たな薬剤治療の開発に取り組んでいる。さらに、ピロプラズマが赤血球への寄生、分裂・増殖等の分子機構の解明に関する研究も進めている。

2. 主な研究テーマ

- ・ ピロプラズマ病に対する血清並びに遺伝子診断法の開発と国際的な評価
- ・ ピロプラズマ病に対する新規の薬剤スクリーニングと治療法の確立
- ・ ピロプラズマの赤血球への寄生、分裂・増殖の分子機構の解明

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ *B. microti*のメチオニンアミノペプチダーゼの遺伝子解析を行い、得られた組換えたんぱく質を用いてその局在、生化学的性状の解析を行った。その結果、メチオニンアミノペプチダーゼは分子量が66.8kDaで原虫の細胞質に局在していた。メチオニンアミノペプチダーゼの酵素活性が確認されたが、その酵素活性はamastatin, bestatinにより阻害された。さらに、メチオニンアミノペプチダーゼでマウスを免疫すると、IFN- γ の産生が増加し、攻撃感染に対しワクチン効果を示した。以上の結果より、アミノペプチダーゼはの人バベシア症のワクチン候補として有望であることが示唆された。（論文リスト6）
- ・ ウシバベシア *Babesia divergens* に対する新規薬剤の開発のため、サイバーグリーンを用いたハイスループットスクリーニング法について検討を行った。その結果、培養液に対する赤

血球の割合（HCT）が5%で毎日培養液の交換が不要な条件を確立した。この方法で、actinonin と chloroquine diphosphate が最も増殖抑制効果が強いことが明らかとなった。（論文リスト8）

- *B. bovis*、*B. bigemina* および *B. microti* のプロフィリン遺伝子の解析を行い、その組換えたんぱく質の感染防御効果について検討を行った。その結果、*B. bovis*、*B. bigemina* および *B. microti* 組換えたんぱく質で免疫したマウスで、高レベルのサイトカイン、IgG 抗体の産生が認められ、*B. microti* に対する防御効果が認められた。また、*B. microti* のメチオニンアミノペプチダーゼで免疫したマウスで、IFN- γ と IL-12 の産生が認められ、*B. microti* の攻撃感染に対してワクチン効果が認められた。（論文リスト10）
- 多数の薬剤候補を短期間で検討可能なハイスループットスクリーニング法を用いて、400種類の薬剤候補（open malaria box）を短期間でスクリーニングした。その結果、4種類のピロプラズマ原虫に対して、7~39種類の薬剤候補がnMの濃度で増殖抑制効果を示した。今後のマウスバベシア実験により新規薬剤の開発が期待される。（論文リスト12）
- *B. bovis* のメチオニンアミノペプチダーゼの遺伝子解析を行い、得られた組換えたんぱく質を用いてその局在、生化学的性状の解析を行った。その結果、アミノペプチダーゼの分子量は 66.8kDa で原虫の細胞質に局在していた。メチオニンアミノペプチダーゼの酵素活性の至適 pH は 7.5 で、マグネシウムイオンで促進され、EDTA および amastatin, bestatin で阻害された。また、*B. microti* 感染マウスに amastatin, bestatin を 10mg/kg で投与すると、IgG and IgG2a、IFN- γ and IL-12 の産生が増加し、*B. microti* の増殖抑制効果が認められ、薬剤候補として有望であることが示唆された。（論文リスト14）
- ライ病の治療に使用されているclofazimineが培養した牛および馬のピロプラズマ原虫に対してnM濃度で優れた増殖抑制効果を示すことを発見した。また、*B. microti*感染マウスを用いた治療実験により、今までにない極めて高い治療効果を確認した。（論文リスト15）

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- 日本熱帯医学会理事・副理事長
- 日本獣医寄生虫学会理事
- 日本獣医学会評議員
- 日本寄生虫学会評議員
- 世界寄生虫学者連盟・理事
- Veterinary Parasitology・Editor-in-Chief

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 国際獣疫事務局（OIE）牛バベシア病、馬ピロプラズマ病専門家

6. 平成 28 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Wang G, Efstratiou A, Adjou Moumouni PF, Liu M, Jirapattharasate C, Guo H, Gao Y, Cao S, Mo Zhou, Suzuki H, **Igarashi I**, Xuan X*. Expression of truncated *Babesia microti* apical membrane protein 1 and rhoptry neck protein 2 and evaluation of their protective efficacy. **Exp Parasitol**. 2017; 172: 5-11. PMID: 27876473
2. Fereig RM, Mohamed SG, Mahmoud HY, AbouLaila MR, Guswanto A, Nguyen TT, Ahmed Mohamed AE, Inoue N, **Igarashi I**, Nishikawa Y*. Seroprevalence of *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Trypanosoma evansi*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle in southern Egypt. **Ticks Tick Borne Dis**. 2017; 8: 125-131. PMID: 27789159
3. Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Matsubayashi M, Miyoshi T, Umemiya-Shirafuji R, Kawazu S, **Igarashi I**, Mochizuki M, Tsuji N, Tanaka T*. Establishment of a novel tick-*Babesia* experimental infection model. **Sci Rep**. 2016; 6: 37039. PMID: 27841321
4. Sivakumar T, **Igarashi I**, Yokoyama N*. *Babesia ovata*: Taxonomy, phylogeny and epidemiology. **Vet Parasitol**. 2016; 229: 99-106. PMID: 27809988
5. Wang G, Efstratiou A, Adjou Moumouni PF, Liu M, Jirapattharasate C, Guo H, Gao Y, Cao S, Zhou M, Suzuki H, **Igarashi I**, Xuan X*. Primary *Babesia rodhaini* infection followed by recovery confers protective immunity against *B. rodhaini* reinfection and *B. microti* challenge infection in mice. **Exp Parasitol**. 2016; 169: 6-12. PMID: 27423972
6. Munkhjargal T, Yokoyama N, **Igarashi I***. Recombinant methionine aminopeptidase protein of *Babesia microti*: immunobiochemical characterization as a vaccine candidate against human babesiosis. **Parasitol Res**. 2016; 15(9): 3669-3676. PMID: 27306898
7. Weerasooriya G, Sivakumar T, Lan DT, Long PT, Takemae H, **Igarashi I**, Inoue N, Yokoyama N*. Epidemiology of bovine hemoprotozoa parasites in cattle and water buffalo in Vietnam. **J Vet Med Sci**. 2016; 78(8): 1361-7. PMID: 27149894
8. Rizk MA, El-Sayed SA, AbouLaila M, Tuvshintulga B, Yokoyama N, **Igarashi I***. Large-scale drug screening against *Babesia divergens* parasite using a fluorescence-based high-throughput screening assay. **Vet Parasitol**. 2016; 227: 93-97. PMID: 27523944
9. Tattiyapong M, Sivakumar T, Takemae H, Simking P, Jittapalapong S, **Igarashi I**, Yokoyama N*. Genetic diversity and antigenicity variation of *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1

- (MSA-1) in Thailand. **Infect Genet Evol.** 2016; 41: 255-261. PMID: 27101782
10. Munkhjargal T, Aboge GO, Ueno A, Aboulaila M, Yokoyama N, **Igarashi I***. Identification and characterization of profilin antigen among *Babesia* species as a common vaccine candidate against babesiosis. **Exp Parasitol.** 2016; 166: 29-36. PMID: 27003460
11. Ishizaki T, Sivakumar T, Hayashida K, Tuvshintulga B, **Igarashi I**, Yokoyama N*. RBC invasion and invasion-inhibition assays using free merozoites isolated after cold treatment of *Babesia bovis* in vitro culture. **Exp Parasitol.** 2016; 166: 10-15. PMID: 26965399
12. Van Voorhis WC*, Adams JH, Adelfio R, Ahyong V, **Igarashi I**, et al. Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound Collection for Neglected Diseases and Beyond. **PLoS Pathog.** 2016; 12(7): e1005763. PMID: 27467575
13. Zhou M, Cao S, Luo Y, Liu M, Wang G, Moumouni PF, Jirapattharasate C, Iguchi A, Vudriko P, Terkawi MA, Löwenstein M, Kern A, Nishikawa Y, Suzuki H, **Igarashi I**, Xuan X*. Molecular identification and antigenic characterization of a merozoite surface antigen and a secreted antigen of *Babesia canis* (BcMSA1 and BcSA1). **Parasit Vectors.** 2016; 9: 257. PMID: 27141812
14. Munkhjargal T, Ishizaki T, Guswanto A, Takemae H, Yokoyama N, **Igarashi I***. Molecular and biochemical characterization of methionine aminopeptidase of *Babesia bovis* as a potent drug target. **Vet Parasitol.** 2016; 221: 14-23. PMID: 27084466
15. Tuvshintulga B, AbouLaila M, Davaasuren B, Ishiyama A, Sivakumar T, Yokoyama N, Iwatsuki M, Ootoguro K, Ōmura S, **Igarashi I***. Clofazimine Inhibits the Growth of *Babesia* and *Theileria* Parasites In Vitro and In Vivo. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016; 60(5): 2739-2746. PMID: 26883713

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 平成 28 年度 基盤研究 (A) (海外学術調査) (文部科学省)、ピロプラズマ病診断法の

世界的規模のリングトライアルによる国際標準法の確立 (16H02768)、代表、平成 28 年度
～平成 30 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Mohamed Abdo Rizk : Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, COOPERATION AGREEMENT BETWEEN FACULTY OF VERINARY MEDICINE, MANSOURA UNIVERSITY, EGYPT AND NATIONAL RESEARCH CENTER FOR PROTOZOAN DISEASES, OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE, JAPAN、2017 年 2 月～2022 年 2 月、学術協定
2. 石山 亜紀 : 北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター、抗生物質など天然由来化合物の抗バベシア活性評価と新規治療・予防薬への応用、2016 年 4 月 1 日～2017 年 3 月 31 日、平成 28 年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

牛ピロプラズマ（タイレリアおよびバベシア）病は、家畜動物に発熱や貧血などの消耗性疾患を引き起こし、世界で深刻な経済的被害をもたらしています。しかしながら、いずれの牛ピロプラズマ病に対しても有効な対策が確立されていません。そこで、その牛ピロプラズマ病に対する制圧法を確立するために、1) 国内外の牛ピロプラズマに関する分子疫学調査による実態把握、2) タイレリア媒介マダニの同定とマダニ対策の考案、3) タイレリア感染に伴う牛免疫応答の解明とワクチンの開発、4) バベシアの赤血球侵入機序の解明とワクチンの開発、5) ワクチン候補分子の遺伝子多型とその簡易検出系の確立、6) 汚染国に適したオーダーメイド型サブユニットワクチンの確立などを実施しています。また、牛ピロプラズマ病の問題を抱える海外汚染国から若手研究者を受け入れて、研修と人材育成に努めるとともに、牛ピロプラズマ病の制圧に関する国際的共同研究ネットワークの構築にも取り組んでいます。

2. 主な研究テーマ

- ・ 牛ピロプラズマの赤血球侵入機序に関する基礎研究
- ・ 牛ピロプラズマの媒介マダニに関する疫学研究
- ・ 国内に蔓延する牛ピロプラズマの分子疫学および臨床病理学的研究
- ・ 野生シカが保有するピロプラズマの分子疫学的研究
- ・ 牛ピロプラズマ病に関する国際疫学調査
- ・ 牛ピロプラズマ病のワクチン開発に関する応用研究

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ 牛小型ピロプラズマ病が発生している北海道東部の 2 共同牧野において、マダニの活動時期に合わせたマダニ対策プログラムを構築し 4 年間実施してきました。その結果、入牧中の牛小型ピロプラズマ (*Theileria orientalis*) の陽転率が低下する一方で、放牧育成牛の授精率と受胎率が高い水準で維持されました。次に、放牧育成牛の牛小型ピロプラズマ感染歴の違いにより陰性群、陽転群、および陽性群の 3 群に分類し、入牧中の繁殖成績を比較しました。陽性群では入牧時軽度の貧血が見られ、陰性群と比較して授精率と受胎率の低下が認められました。また、陽転群は入牧後 2 ヶ月目に貧血が見られ、初回授精までの期間の延長と授精率の低下が認められました。当該牧野では、牛小型ピロプラズマ感染が放牧育成牛の繁殖成績を低下させる要因の 1 つと考えられ、マダニ対策プログラムの実施は放牧育成牛の繁殖成績に好影響を与えることが示唆されました。本論文発表は、北海道ひがし農業共済組合と帯広畜産大学・臨床獣医学部門との共同研究の成果です（論文リスト 1、2）。

- 牛バベシア原虫 (*Babesia bovis*) は、病原性の高い牛の赤血球内寄生性原虫です。MSA-1 などの *B. bovis* メロゾイト表面抗原 (MSA) がコードする遺伝子の多型は、宿主動物における免疫の成立やその回避に重要な役割を果たすと考えられています。本研究では、アジアの *msa-1* 遺伝子型に対する遺伝子型特異的 PCR 法を確立し、スリランカ、モンゴル、ベトナムにおける *msa-1* の遺伝的多型を再解析しました。まず、既知の *msa-1* 遺伝子配列を用いて構築された系統樹から、9 つのアジア *msa-1* 遺伝子型について、PCR 用の特異的プライマーを設計しました。それぞれの PCR 法の特異性を確認した後、スリランカ(44 匹の牛)、モンゴル (26 匹の牛)、およびベトナム (23 匹の牛および 16 匹の水牛) 由来の計 109 個の *B. bovis* 陽性牛血液 DNA サンプルを、タイプ特異的 PCR 法によって再スクリーニングし、遺伝子解析を行いました。その結果、以前の研究と一致して、スリランカおよびベトナムからは、それぞれ 5 つおよび 4 つの異なる遺伝子型が検出されました。一方、3 つの新規な遺伝子型を含む 4 つの遺伝子型がモンゴルから検出されました。これらの成果は、確立した遺伝子型特異的 PCR 法が、アジアにおける *B. bovis* の遺伝子型別分布を明らかにする上で極めて有用な手法であることが示されました。本論文は、スリランカ国・獣医学研究所、モンゴル国・獣医学研究所、ベトナム国・フエ大学との共同研究の成果です (論文リスト 3)。
- 牛バベシア原虫 (*Babesia bovis*) は、牛赤血球に侵入して増殖する原虫です。その *B. bovis* の赤血球侵入メカニズムを理解し、かつその侵入を阻害する薬物や抗体を同定するためには、効果的な *B. bovis* メロゾイトによる赤血球侵入評価系の確立が不可欠です。現在、感染赤血球からメロゾイトを単離するために高電圧パルス (高電圧エレクトロポレーション) 法が活用されていますが、この手法では回収メロゾイトが著しく損傷を受けます。最近、*B. bovis* 試験管内培養物を低温処理することにより、感染赤血球からメロゾイトが効率的に放出されることが見出されました。本研究では、*B. bovis* の試験管内培養液を氷浴でインキュベートし、感染赤血球からメロゾイトを遊離させた後、単離・精製されたメロゾイトを用いて新たな赤血球侵入および侵入阻害評価系の確立を試みました。低温処理で精製したメロゾイト (72.4%) の生存率は、高電圧エレクトロポレーション (48.5%) で単離したメロゾイトの生存率よりも有意に高い値を示しました。また、低温処理で調製した生存メロゾイトは、高電圧エレクトロポレーション (0.251%) で調製したメロゾイトよりも高い率 (0.572%) で牛赤血球に侵入しました。さらに、本メロゾイトを用いた赤血球侵入阻害評価系において、各種原虫特異抗体やヘパリンによる侵入阻止効果も実証されました。これらの成果は、低温処理が侵入能力のある *B. bovis* メロゾイトの単離に有用であること、またその技術を応用してバベシアによる赤血球侵入および侵入阻害評価系が確立できることが示されました (論文リスト 5)。
- 牛バベシア原虫 (*Babesia bovis*) は、牛に重篤な臨床的疾患 (発熱、貧血) を引き起こす赤血球内寄生性原虫です。その原虫の抗原多型はワクチン開発の大きな妨げになっています。本研究では、タイで飼育されていた牛由来の計 162 個の *B. bovis* 陽性血液 DNA サンプル

を用いてメロゾイト表面抗原遺伝子 (msa-1) の多型を解析しました。PCR により単離された 93 個の msa-1 遺伝子配列間の同一性スコアは 43.5-100% であり、翻訳されたアミノ酸配列間の類似性値は 42.8-100% でした。我々の系統樹解析で検出された合計 23 個のクレードのうち、18 個のクレードでタイの msa-1 遺伝子配列が検出されました。そのうち 7 個はタイ由来の遺伝子のみで構成されていました。MSA-1 の抗原交差性を調べるために、*B. bovis* Texas (T2Bo) 株由来の rMSA-1 と、これに対応する 7 種のタイ由来 rMSA-1 を含む計 8 種の組換え MSA-1 をウェスタンブロット解析したところ、抗 T2Bo 牛血清は、T2Bo 由来の rMSA-1 と、T2Bo MSA-1 と 54.9-68.4% の配列類似性を共有する 3 種の他の rMSA-1 と強く反応しました。対照的に、T2Bo MSA-1 と低い配列類似性 (35.0~39.7%) を共有する残りの rMSA-1 については、反応性がないか、または弱いことが観察されました。タイにおける *B. bovis* msa-1 遺伝子の高い遺伝的多型が実証された一方で、この遺伝的多型がタイの *B. bovis* の MSA-1 の抗原多型をもたらしていることも示唆されました。本論文は、タイ国・国立畜産生産局およびカセサート大学との共同研究の成果です (論文リスト 10)。

- ベトナムにおいて家畜住血性原虫に関する分子疫学調査を行った結果、ベトナムの牛と水牛から *Babesia bigemina*、*Theileria orientalis*、および *Trypanosoma theileri* が検出されました。また、*Babesia ovata* と近縁の新しい *Babesia* 種が牛から検出されました。一方で、*Theileria annulata* および *Trypanosoma evansi* は、牛と水牛のどちらからも検出されませんでした。系統樹解析では牛から *T. orientalis* MPSP 遺伝子型 3、5、7、および N3 が、また水牛から遺伝子型 5、7、N1、および N2 が検出されました。さらに、水牛由来の *T. theileri* CATL 配列は、以前に報告したベトナム牛由来の配列クレードに収まりました。本研究は、ベトナムにおける新しい *Babesia* 種、および水牛における *T. orientalis* MPSP 遺伝子型 7 並びに *T. theileri* の最初の検出に関する報告となりました。本論文は、ベトナム国・フエ大学との共同研究の成果です (論文リスト 11)。
- Babesia* および *Theileria* による牛の感染症は、世界中でしばしば重要な経済的被害をもたらしています。本研究では、スリランカの Polonnaruwa (dry zone) および Nuwara Eliya (wet zone) の牛の *Babesia* および *Theileria* 感染に関する縦断的調査を行いました。2014 年 6 月、9 月、12 月、および 2015 年 3 月に採取した血液サンプルの DNA から、PCR を用いて *Babesia bovis*、*Babesia bigemina*、*Theileria annulata*、および *Theileria orientalis* のスクリーニングを行いました。さらに、回収した血清試料を用いて、ELISA により *B. bovis* および *B. bigemina* 特異的抗体の検出も試みました。Polonnaruwa で調査した動物のすべてと Nuwara Eliya で調査した動物のうち 93.2% で、調査期間中少なくとも 1 回は *Babesia* および/または *Theileria* に対して PCR が陽性でした。さらに Polonnaruwa では、*T. annulata* および *T. orientalis* の感染率は、*B. bovis* または *B. bigemina* のそれよりも高い値を示しました。また、*T. orientalis* は、Nuwara Eliya において最も高い感染率を示しま

した。さらに、両エリアにおいて、*B. bigemina* は *B. bovis* よりも多くの牛が血清陽性を示しました。*B. bigemina*、*T. annulata*、および *T. orientalis* による新たな感染の割合はいずれの区域でも差がなく、これらの場所で一定の割合で牛が原虫に暴露されていることが示唆されました。一方、Polonnaruwa では、*T. annulata* の新たな感染率は *T. orientalis* の新しい感染率よりも高い値を示し、また Nuwara Eliya では、*T. orientalis* の新しい感染率は *T. annulata* よりも高い値を示しました。これらの差異は、地区内および地区間の媒介マダニの密度およびその活性の変動に起因する可能性が考えられました。我々の調査結果は、スリランカにおける牛の *Babesia* および *Theileria* 感染に対する、年間通しての防除措置の必要性を示唆しています。異なる地域における媒介マダニ種の同定とその密度を決定するためのさらなる研究が必要となるでしょう。本論文は、スリランカ国・獣医学研究所との共同研究の成果です（論文リスト 19）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会・評議委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会・評議委員
- ・ 日本寄生虫学会・評議委員
- ・ 日本熱帯医学会・評議委員

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター 共同利用・共同研究拠点 共同研究委員会委員

6. 平成 28 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. 前野和利, 松井伸一, 河合孝弘, 鈴木真生, 千葉友行, **横山直明**, 猪熊 壽. 牛小型ピロプラズマ病対策を目的としたマダニ対策プログラムが北海道共同牧野の放牧育成牛の繁殖成績に与えた影響. **産業動物臨床医誌**. 2016; 第 7 巻: p169-174.
2. 猪熊 壽, **横山直明**, 鈴木真生, 河合孝弘, 千葉友行, 松井伸一, 前野和利. 北方系マダニの生態を基盤とした小型ピロプラズマ病予防対策の実施例. **牛臨床寄生虫研究会誌**. 2017; 第 7 巻, 第 1 号: p7-11.
3. Liyanagunawardena N, Sivakumar T, Kothalawala H, Silva SS, Battsetseg B, Lan DT, Inoue N, Igarashi I, **Yokoyama N***. Type-specific PCR assays for *Babesia bovis* msa-1 genotypes in Asia: Revisiting the genetic diversity in Sri Lanka, Mongolia, and Vietnam. **Infect, Genet Evol.**

- 2016; 37: 64-69. PMID: 26520797
4. Tuvshintulga B, AbouLaila M, Davaasuren B, Ishiyama A, Sivakumar T, **Yokoyama N**, Iwatsuki M, Otoguro K, Ōmura S, Igarashi I. Clofazimine inhibits the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016; 60: 2739-46. PMID: 26883713
 5. Ishizaki T, Sivakumar T, Hayashida K, Tuvshintulga B, Igarashi I, **Yokoyama N***. RBC Invasion and invasion-inhibition assays using free merozoites isolated after cold treatment of *Babesia bovis in vitro* culture. **Exp Parasitol.** 2016; 166: 10-15. PMID: 26965399
 6. Ihara F, Nishimura M, Muroi Y, Furuoka H, **Yokoyama N**, Nishikawa Y. Changes in neurotransmitter levels and expression of immediate early genes in brain of mice infected with *Neospora caninum*. **Sci Rep.** 2016; 6: 23052. PMID: 26971577
 7. Templeton TJ, Asada M, Jiratanh M, Ishikawa SA, Tiawsirisup S, Sivakumar T, Namangala B, Takeda M, Mohkaew K, Ngamjituea S, Inoue N, Sugimoto C, Inagaki Y, Suzuki Y, **Yokoyama N**, Kaewthamasorn M, Kaneko O. Ungulate malaria parasites. **Sci Rep.** 2016; 6: 23230. PMID: 26996979
 8. Munkhjargal T, Aboge GO, Ueno A, Aboulaila M, **Yokoyama N**, Igarashi I. Identification and characterization of profilin antigen among *Babesia* species as a common vaccine candidate against babesiosis. **Exp Parasitol.** 2016; 166: 29-36. PMID: 27003460
 9. Munkhjargal T, Ishizaki T, Guswanto A, Takemae H, **Yokoyama N**, Igarashi I. Molecular and biochemical characterization of methionine aminopeptidase of *Babesia bovis* as a potent drug target. **Vet Parasitol.** 2016; 221: 14-23. PMID: 27084466
 10. Tattiyapong M, Sivakumar T, Takemae H, Simking P, Jittapalapong S, Igarashi I, **Yokoyama N.*** Genetic diversity and antigenicity variation of *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1 (MSA-1) in Thailand. **Infect, Genet Evol.** 2016; 41: 255-261. PMID: 27101782
 11. Weerasooriya G, Sivakumar T, Lan DT, Long PT, Takemae H, Igarashi I, Inoue N, **Yokoyama N***. Epidemiology of bovine hemoprotozoa parasites in cattle and water buffalo in Vietnam. **J Vet Med Sci.** 2016; 78: 1361-1367. PMID: 27149894
 12. Adjou Moumouni PF, Terkawi MA, Jirapattharasate C, Cao S, Liu M, Nakao R, Umemiya-Shirafuji R, **Yokoyama N**, Sugimoto C, Fujisaki K, Suzuki H, Xuan X. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in *Amblyomma variegatum* ticks from Benin. **Ticks Tick Borne Dis.** 2016; 7: 828-33. PMID: 27150592
 13. Yamasaki S, Suganuma K, Yamagishi J, Asada M, **Yokoyama N**, Kawazu S, Inoue N. Characterization of an epimastigote-stage-specific hemoglobin receptor of *Trypanosoma congolense*. **Parasit Vectors.** 2016; 9: 299. PMID: 27216446
 14. Munkhjargal T, **Yokoyama N**, Igarashi I. Recombinant methionine aminopeptidase protein of *Babesia microti*: immunobiochemical characterization as a vaccine candidate against human babesiosis. **Parasitol Res.** 2016; 115: 3669-76. PMID: 27306898

15. Ihara F, Nishimura M, Muroi Y, Mahmoud ME, **Yokoyama N**, Nagamune K, Nishikawa Y. Toxoplasma gondii Infection in Mice Impairs Long-Term Fear Memory Consolidation Through Dysfunction of the Cortex and Amygdala. **Infect Immun.** 2016; 84: 2861-70. PMID: 27456832
16. Van Voorhis WC, Adams JH, Adelfio R, Ah Yong V, Akabas MH, Alano P, Alday A, Alemán Resto Y, Alsibae A, Alzualde A, Andrews KT, Avery SV, Avery VM, Ayong L, Baker M, Baker S, Ben Mamoun C, Bhatia S, Bickle Q, Bounaadja L, Bowling T, Bosch J, Boucher LE, Boyom FF, Brea J, Brennan M, Burton A, Caffrey CR, Camarda G, Carrasquilla M, Carter D, Belen Cassera M, Chih-Chien Cheng K, Chindaudomsate W, Chubb A, Colon BL, Colón-López DD, Corbett Y, Crowther GJ, Cowan N, D'Alessandro S, Le Dang N, Delves M, DeRisi JL, Du AY, Duffy S, Abd El-Salam El-Sayed S, Ferdig MT, Fernández Robledo JA, Fidock DA, Florent I, Fokou PV, Galstian A, Gamo FJ, Gokool S, Gold B, Golub T, Goldgof GM, Guha R, Guiguemde WA, Gural N, Guy RK, Hansen MA, Hanson KK, Hemphill A, Hoof van Huijsduijnen R, Horii T, Horrocks P, Hughes TB, Huston C, Igarashi I, Ingram-Sieber K, Itoe MA, Jadhav A, Naranuntarat Jensen A, Jensen LT, Jiang RH, Kaiser A, Keiser J, Ketas T, Kicka S, Kim S, Kirk K, Kumar VP, Kyle DE, Lafuente MJ, Landfear S, Lee N, Lee S, Lehane AM, Li F, Little D, Liu L, Llinás M, Loza MI, Lubar A, Lucantoni L, Lucet I, Maes L, Mancama D, Mansour NR, March S, McGowan S, Medina Vera I, Meister S, Mercer L, Mestres J, Mfopa AN, Misra RN, Moon S, Moore JP, Morais Rodrigues da Costa F, Müller J, Muriana A, Nakazawa Hewitt S, Nare B, Nathan C, Narraido N, Nawaratna S, Ojo KK, Ortiz D, Panic G, Papadatos G, Parapini S, Patra K, Pham N, Prats S, Plouffe DM, Poulsen SA, Pradhan A, Quevedo C, Quinn RJ, Rice CA, Abdo Rizk M, Ruecker A, St Onge R, Salgado Ferreira R, Samra J, Robinett NG, Schlecht U, Schmitt M, Silva Villela F, Silvestrini F, Sinden R, Smith DA, Soldati T, Spitzmüller A, Stamm SM, Sullivan DJ, Sullivan W, Suresh S, Suzuki BM, Suzuki Y, Swamidass SJ, Taramelli D, Tchokouaha LR, Theron A, Thomas D, Tonissen KF, Townson S, Tripathi AK, Trofimov V, Udenze KO, Ullah I, Vallieres C, Vigil E, Vinetz JM, Voong Vinh P, Vu H, Watanabe NA, Weatherby K, White PM, Wilks AF, Winzeler EA, Wojcik E, Wree M, Wu W, **Yokoyama N**, Zollo PH, Abla N, Blasco B, Burrows J, Laleu B, Leroy D, Spangenberg T, Wells T, Willis PA. Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound Collection for Neglected Diseases and Beyond. **PLoS Pathog.** 2016; 12: e1005763. PMID: 27467575
17. Rizk MA, El-Sayed SA, AbouLaila M, Tuvshintulga B, **Yokoyama N**, Igarashi I. Large-scale drug screening against *Babesia divergens* parasite using a fluorescence-based high-throughput screening assay. **Vet Parasitol.** 2016; 227: 93-7. PMID: 27523944
18. AbouLaila M, **Yokoyama N**, Igarashi I. RNA interference (RNAi) for some genes from *Babesia bovis*. **Research Journal of Applied Biotechnology.** 2016; 2: 81-92.
19. Sivakumar T, Kothalawala H, Weerasooriya G, Silva SSP, Puvanendiran S, Munkhjargal T, Igarashi I, **Yokoyama, N***. A longitudinal study of *Babesia* and *Theileria* infections in cattle in

- Sri Lanka. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2016; 6: 20-27.
20. Tuvshintulga B, Sivakumar T, Yokoyama N, Igarashi I. Evaluation of inhibitory effects of dipyrnidamole against bovine and equine piroplasmosis. **J Protozool Res**. 2016; 26: 40-46.
21. Ybanez AP, Ybanez RHD, Yokoyama N, Inokuma H. Multiple infections of Anaplasma platys variants in Philippine dogs. **Veterinary World**. 2016; 9: 1456-1460. PMID: 28096621
22. Musinguzi SP, Sukanuma K, Asada M, Laohasinnarong D, Sivakumar T, Yokoyama N, Namangala B, Sugimoto C, Suzuki Y, Xuan X, Inoue N. A PCR-based survey of animal African trypanosomosis and selected piroplasm parasites of cattle and goats in Zambia. **J Vet Med Sci**. 2017; 78: 1819-1824. PMID: 27616437
23. Kamyngkird K, Cao S, Tuvshintulga B, Salama A, Mousa AA, Efstratiou A, Nishikawa Y, Yokoyama N, Igarashi I, Xuan X. Effects of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors on the growth of *Theileria equi* and *Babesia caballi* *in vitro*. **Exp Parasitol**. 2017; 176: 59-65. PMID: 28286324

総説

1. Sivakumar T, Igarashi I, Yokoyama N*. *Babesia ovata*: Taxonomy, phylogeny and epidemiology (Review). **Vet Parasitol**. 2016; 229: 99-106. PMID: 27809988

著書

1. 横山直明 (分担執筆) : 犬・猫のバベシア症 (P161)、犬のネオスポラ症 (P164)、犬・猫のクリプトスポリジウム症 (P164)、犬・猫のトキソプラズマ症 (P169)。獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠「動物感染症学」、福土秀人ら編集、近代出版、2016年
2. 横山直明 (分担執筆) : タイレリア、バベシア、p56-62。獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠「寄生虫病学」改訂版、日本獣医寄生虫学会 監修、緑書房、2017年

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 出前講義<ジョイントセミナー2016>、「人獣共通感染症について～北海道に潜む人獣共通感染症の病原体とは～」、苫小牧東高校、2016年12月9日

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 平成 25 年度: 地球規模課題対応国際科学技術協カプログラム(AMED/JICA)、モンゴルにおける家畜原虫病の疫学調査と社会実装可能な診断法の開発 (代表: 井上 昇)、分担、平成 25 年度～平成 30 年度
2. 平成 26 年度: 基盤研究 (A) (海外) (文部科学省)、スリランカにおける牛ピロプラズ

- マ症の制圧に向けた実践研究（26257417）、代表、平成 26 年度～平成 29 年度
3. 平成 26 年度：レギュラトリーサイエンス新技術開発事業委託事業（農林水産省）、馬の伝染性疾患の迅速検査法の開発、代表、平成 26 年度～平成 28 年度
 4. 平成 26 年度：医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業（厚生労働省）、血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の維持のための新興・再興感染症に関する総合的研究（倉根一郎）、分担、平成 26 年度～平成 28 年度
 5. 平成 27 年度：挑戦的萌芽研究（文部科学省）、ウシバベシアによる赤血球侵入評価系の確立（15K14862）、代表、平成 27 年度～平成 28 年度
 6. 平成 27 年度：新学術領域研究（研究領域提案型）（公募研究）（文部科学省）、プラズマ照射の効果に基づく住血性原虫の新制御法の確立（15H00891）、代表、平成 27 年度～平成 28 年度
 7. 平成 27 年度：二国間交流事業オープンパートナーシップ共同研究（日本学術振興会）、*Babesia bovis* の遺伝子多型に基づく牛バベシア症のワクチン戦略の確立、代表、平成 27 年度～平成 29 年度
 8. 平成 28 年度：基盤研究（B）（一般）（文部科学省）、牛バベシア病に対するオーダーメイド型サブユニットカクテルワクチンの開発研究（16H05033）、代表、平成 28 年度～平成 30 年度
 9. 平成 28 年度：革新的技術開発・緊急展開事業（地域戦略プロジェクト、農業・食品産業技術総合研究機構）、牛の放牧管理の効率化・生産性向上のための小型ピロプラズマ病ワクチンの実証研究（16789617）、代表、平成 28 年度～平成 30 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Dr. Seekkuge Susil Priyantha Silva: Veterinary Sesech Institute, Sri Lanka, Reserch and Academic Collaboration between Veterinary Sesech Institute, Sri Lanka and National Research Center for Protozoan Disease, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medice, Japan、2014 年 4 月～2018 年 3 月、学術協定
2. 猪熊 壽 教授：帯広畜産大学・臨床獣医学研究部門、北方系マダニの生態を基盤とした小型ピロプラズマ病防除対策の確立、2016 年 4 月 1 日～2017 年 3 月 31 日、平成 28 年度

原虫病研究センター共同研究

3. Dr. Dinh Lan Thi Bich : Institute of Biotechnology, Hue University, Establishment and field evaluation of sero-diagnostic tools applicable to survey the bovine babesiosis in Vietnam、2016年4月1日～2017年3月31日、平成28年度原虫病研究センター共同研究
4. 山根 芳多郎 様 : 共立製薬株式会社 先端技術開発センター、牛の小型ピロプラズマ病ワクチンの開発に関する試験研究、平成25年3月1日～平成30年3月31日、共同研究契約

1. 研究テーマの概要

原虫細胞での、酸化ストレス応答とレドックス（酸化・還元）シグナル、カルシウムシグナルに着目しています。生物は細胞内の酸化・還元バランスやカルシウム振動を利用して、様々な生理機能を調節しています。マラリア原虫およびバベシア原虫で、この仕組みやそこに働く分子の役割を「細胞を観ること」「イメージング実験」に重点を置いて調べています。一連の研究から、これら原虫病の対策に繋がる生命の仕組みや分子が見つかることを期待しています。

フィリピンでの日本住血吸虫症の排除（elimination）に向けて、この寄生虫病を現場で即時に正しく診断するポイント・オブ・ケア・テスト（POCT）を開発する研究（R&D）および、国内各流行地に分布する寄生虫の集団遺伝学的特性をマイクロサテライトマーカーを利用して解析する疫学研究を、日比米間の国際共同としておこなっています。

2. 主な研究テーマ

- ・ バベシア原虫での遺伝子改変技術の開発と、それを応用したライブイメージング研究
- ・ 日本住血吸虫症を診断する POCT の開発研究
- ・ フィリピンに分布する日本住血吸虫の集団遺伝学研究

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ ヒトで問題となっているマラリアや睡眠病などの病原原虫では、生物学的特性の解明および原虫病の治療・予防に有効な遺伝子探索を目的としたポストゲノム研究が進展し、遺伝子改変技術を駆使したゲノム機能解析および従来のワクチンより有用性が期待される次世代原虫ワクチン＝遺伝子改変原虫（Genetically-attenuated parasite: GAP）を用いた弱毒生ワクチンの開発等が精力的に進められています。一方、家畜の小型および大型ピロプラズマ原虫（タイレリア オリエンタリス及びバベシア・オバタ）における遺伝子操作技術は、国内外を通じて実用的なレベルにはほど遠く、次世代治療・予防技術開発のための基盤技術が未整備のままです。そこで私達は、ピロプラズマ原虫における「家畜病害原虫のゲノム改変技術」の基盤を確立することを目的として研究をおこなっています。今年度は、大型ピロプラズマ原虫（バベシア・オバタ *Babesia ovata*）においてレポーター遺伝子（ルシフェラーゼおよび緑色蛍光タンパク質：GFP）を一過性ないし安定発現する原虫の作製に成功いたしました（論文リスト6）。また、バベシア・オバタのドラフトゲノムを完成して、DB-AT（東大データベース）にデポジットいたしました。このデータベースでは、ドラフトゲノムに RNA-seq のデータと融合することで、高精度アノテーションの取得を達成いたしました（論文作成中）。

- ・ フィリピンでは国内 28 州に日本住血吸虫症の流行地があり、住民 500 万人が感染の危険に曝されています。私達の研究室では、国内の各流行地に分布する寄生虫の DNA を用いて分子疫学調査をおこない、各感染症流行地での寄生虫症の特性と寄生虫株の関係を解析した成績を、感染症対策の現場に還元しようとしています。今年度は、フィリピン中部ビサヤ地域および南部ミンダナオ島（ボホール州タリボン市、北サーマル州カタルマン市、レイテ州タクロバン市、および北ダバオデ州ニューコレラ市）由来の寄生虫 DNA を対象とした 10 種類のマイクロサテライトマーカーによる多座位の遺伝子型（multi-locus genotype: MLG）解析を実施しました。比較解析の結果、これら地域に分布する寄生虫集団は特定のクラスターに分離しないことがわかり、フィリピン中部ビサヤ地域および南部ミンダナオ島における寄生虫集団間での遺伝子流動が示唆されました。遺伝子流動の背後には、これらフィリピン国内の寄生虫病流行地間で患者と保虫宿主が頻繁に移動している実態が推測できます。実際に現地での聞き取り調査においても、患者の移動（他島嶼への移住）および食肉用スイギュウの移動（他島嶼への出荷）の情報を確認することができました。このような患者および保虫宿主の移動情報を、保健省および農業省が積極的に入手して共有することも、日本住血吸虫症のフィリピン国内での振興・再興を予測する上での重要な取り組みになると考えます。また、今回のマイクロサテライト解析から得られた成績は、各島嶼に分布する寄生虫が一定の遺伝的背景を有する固有の集団へと収斂していないことを示唆しています。これは、現在これら地域でおこなわれている住民を対象とした集団駆虫（Mass Drug Administration: MDA）を中心とする寄生虫症の制御対策が巧く機能していないことを意味しています。更に有効な寄生虫病対策を実践し、またその効果を正確に評価するため、今後も、これら地域での寄生虫を対象とした集団遺伝学解析を継続しておこなってゆく必要があると考えます（論文投稿中）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本寄生虫学会・理事（学術担当）
- ・ 日本熱帯医学会・監事
- ・ 日本獣医寄生虫学会・理事（渉外広報担当）
- ・ 日本獣医学会・評議委員

② 主催した学会、研究会等

- ・ 第 24 回分子寄生虫学ワークショップ・第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会（平成 28 年 8 月 30 日～9 月 2 日、帯広畜産大学原虫病研究センター）

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム世話人代表
- ・ 長崎大学熱帯医学研究所・熱帯医学研究拠点運営協議会委員

- ・ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程教育リーディングプログラム・学術委員
- ・ The Journal of Veterinary Medical Science 編集委員 (寄生虫学担当)

6. 平成 28 年度研究成果発表等 (原著論文、総説・著書)

原著論文 (*責任著者)

1. Pumidonming W, Salman D, Gronsang D, Abdelbaset AE, Sangkaeo K, **Kawazu S**, Igarashi M*. Prevalence of gastrointestinal helminth parasites of zoonotic significance in dogs and cats in lower Northern Thailand. **J Vet Med Sci**. 2017; 78(12): 1779-1784. PMID: 27570099
2. Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Matsubayashi M, Miyoshi T, Umemiya-Shirafuji R, **Kawazu S**, Igarashi I, Mochizuki M, Tsuji N, Tanaka T*. Establishment of a novel tick-babesia experimental infection model. **Sci Rep**. 2016; 6: 37039. PMID: 27841321
3. Sugi T, Ma YF, Tomita T, Murakoshi F, Eaton MS, Yakubu R, Han B, Tu V, Kato K, **Kawazu S**, Gupta N, Suvorova ES, White MW, Kim K, Weiss LM*. *Toxoplasma gondii* cyclic AMP-dependent protein kinase subunit 3 is involved in the switch from tachyzoite to bradyzoite development. **MBio**. 2016; 5(4): 369-374. PMID: 27247232
4. Yamasaki S, Suganuma K, Yamagishi J, Asada M, Yokoyama N, **Kawazu S**, Inoue N*. Characterization of an epimastigote-stage-specific hemoglobin receptor of *Trypanosoma congolense*. **Parasit Vectors**. 2016; 9 (1): 299. PMID: 27216446
5. Masatani T*, Asada M, Hakimi H, Hayashi K, Yamagishi J, **Kawazu S**, Xuan X. Identification and functional analysis of a novel mitochondria-localized 2-Cys peroxiredoxin, BbTPx-2, from *Babesia bovis*. **Parasitol Res**. 2016; 115(8): 3139-3145. PMID: 27095567
6. Hakimi H, Yamagishi J, Kegawa Y, Kaneko O, **Kawazu S**, Asada M*. Establishment of transient and stable transfection systems for *Babesia ovata*. **Parasit Vectors**. 2016; 9: 171. PMID: 27008652
7. Leonardo LR*, Chigusa Y, Kikuchi M, Kato-Hayashi N, **Kawazu S**, Angeles JM, Fontanilla IK, Tabios IK, Moendeg K, Goto Y, Fornillos RJ, Tamayo PG, Chua JC. Schistosomiasis in the Philippines: challenges and some successes in control. **South East Asian J Trop Med Pub Health**. 2016; 47(4): 651-666.

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

1. バベシア原虫メロゾイト滑走運動のバイオイメージング研究, 大阪大学微生物病研究所 アドバンストセミナーシリーズ 2016, 2016年10月6日
2. *Plasmodium vivax* and *P.knowlesi*: cloning, expression and functional analysis of peroxiredoxins, Moon-Shan biomedical research forum, Taipei Medical School (台北医科大学 拇山生物醫學研究講座), 2016年10月27日

9. 獲得研究費

1. GHIT-RFP-2014-002 (グローバルヘルス技術振興基金)、Development of a sensitive and specific point-of-care diagnostics for Asian zoonotic schistosomiasis (G2014-201R1)、代表、平成27年度～平成28年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

台北医科大学客員教授号 (Employment Number: 10545008)

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. Prof. Romeo R. Quizon and Prof. Dr. Manuel B. Agulto (University of Philippines, Manila) : MEMORANDUM OF UNDERSTANDING FOR ACADEMIC COOPERATION AND EXCHANGE BETWEEN COLLEGE OF PUBLIC HEALTH, UNIVERSITY OF THE PHILIPPINES MANILA, PHILIPPINES AND NATIONAL RESEARCH CENTER FOR PROTOZOAN DISEASES, OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE, JAPAN、2014年1月～2019年12月、学術交流協定
2. Prof. Lidia R. Leonardo, (University of Philippines, Manila) , Prof. Yasuyuki Goto (University of Tokyo) and Dr. Raymond Houghton (Inbios international Inc.) : Development of a sensitive and specific point-of-care diagnostics for Asian zoonotic schistosomiasis、グローバルヘルス技術振興基金, 2015年4月1日～2017年3月31日
3. 麻田正仁 : 長崎大学熱帯医学研究所、*Babesia bovis* 感染赤血球における宿主血管内皮細胞接着機構の解明、2016年4月1日～2017年3月31日、平成28年度原虫病研究センタ

ー共同研究

4. 河津信一郎：帯広畜産大学原虫病研究センター、バベシア原虫マダニステージでのライブイメージング実験系の開発、2016年4月1日～2017年3月31日、平成28年度熱帯医学研究拠点一般共同研究

1. 研究テーマの概要

世界人口の 2~3 割が不顕性感染し、妊婦の初感染、HIV 感染、加齢などによる免疫力の低下で症状が悪化することが大きな問題となっているトキソプラズマに着目し、宿主防御機構の解明や病原性発現機序の解明等の基礎研究を推進しています。

人間に身近にいるペットに着目し、公衆衛生上問題になる寄生虫の感染状況調査を行なっています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トキソプラズマ症に対するワクチン開発
- ・ トキソプラズマ原虫の急性感染から慢性感染への移行過程の解析
- ・ ウサギエンセファリトゾーン症の病態解析
- ・ 腸管感染寄生虫の疫学調査

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ トキソプラズマは世界人口の 2~3 割が不顕性感染し、妊婦の初感染、HIV 感染、加齢などによる免疫力の低下で症状が悪化することが大きな問題となっています。家畜においても流産を引き起こす等により、経済的損失の大きな感染症として認識されています。このことからワクチンの開発が望まれています。今のところ効果的なワクチンは開発されていません。一般的にワクチンは弱毒生ワクチンと不活化ワクチンに大別されます。生ワクチンは効果が高い反面、強毒化への復帰など安全性に問題があります。トキソプラズマは感染後筋肉内にシストを形成し、食肉として利用した場合に感染源となる可能性があります。このことから安全な生ワクチンの条件として、強毒復帰をしないこととともにシストを形成しないことが重要になります。我々はトキソプラズマの乳酸脱水素酵素に着目し、遺伝子を欠損させることにより弱毒化および低シスト形成性を獲得したトキソプラズマ原虫の作出に成功しました。この株はマウスモデルにおいて致死的なトキソプラズマ症を強く防御したことから、生ワクチンとして有望であることを示しました（論文リスト 1）。
- ・ 猫はトキソプラズマの唯一の終宿主であり、猫より排出されるオーシストによる環境の汚染は感染源として重要です。猫の血清中のトキソプラズマ抗体価を正確に測定する目的で、現在一般的に使用されている組み換え抗原の最適な組み合わせの検討を行ないました（論文リスト 2）。
- ・ 犬・猫は人間に最も身近な動物であり、寄生虫感染状況を知っておくことは公衆衛生上重要です。タイ北部における腸管内寄生虫の調査を行ない、約半数の犬・猫において何らかの寄

生虫に感染していることを明らかにしました（論文リスト3）。

- ・ ウサギエンセファリトゾーン症の感染モデルの病態解析を行い、新たな診断法の開発を探る研究を行ないました（論文リスト4）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議委員
- ・ 日本寄生虫学会評議委員

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 平成28年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Abdelbaset AE, Fox BA, Karram MH, Abd Ellah MR, Bzik DJ, **Igarashi M***. Lactate dehydrogenase in *Toxoplasma gondii* controls virulence, bradyzoite differentiation, and chronic infection. **PLoS One**. 2017; 12: e0173745. PMID: 28323833
2. Abdelbaset AE, Alhasan H, Salman D, Karram MH, Ellah Rushdi MA, Xuan X, **Igarashi M***. Evaluation of recombinant antigens in combination and single formula for diagnosis of feline toxoplasmosis. **Exp Parasitol**. 2017; 172: 1-4. PMID: 27876472
3. Pumidonming W, Salman D, Gronsang D, Abdelbaset AE, Sangkaeo K, Kawazu S, **Igarashi M***. Prevalence of gastrointestinal helminth parasites of zoonotic significance in dogs and cats in lower Northern Thailand. **J Vet Med Sci**. 2017; 78: 1779–1784. PMID: 27570099
4. Oda M, Ueno A, Adilbish A, Li Z, Hernandez HO, Okada T, Furuya K, **Igarashi M***. Kinetic analysis of specific antibodies in serum and urine of experimentally *Encephalitozoon cuniculi*-infected rabbits. **J Protozool Res**. 2016; 26: 11-17.
5. Bawm S, Maung WY, Win MY, Thu MJ, Chel HM, Khaing TA, Wai SS, Htun LL, Myaing TT, Tiwananthagorn S, **Igarashi M**, Katakura K. Serological Survey and Factors Associated with *Toxoplasma gondii* Infection in Domestic Goats in Myanmar. **Scientifica**. 2016; Article ID 4794318. PMID: 26904362

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

該当なし

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

該当なし

1. 研究テーマの概要

マラリアは、結核、HIV と並んで世界三大感染症の一つに数えられ、本感染症に毎年約 2 億人が罹患し、40 万人以上の死亡が報告されています。トキソプラズマ症はネコを終宿主とする人獣共通感染症です。感染動物由来の食肉の生食やネコの糞中の虫卵から経口感染します。日本では成人の 20~30%が感染していますが、臨床上問題となるのは妊婦の初感染であり、妊婦が感染すると、胎児に経胎盤感染することにより流産や胎児の脳症等を引き起こします。クリプトスポリジウム症は、腹痛を伴う激しい下痢症状を起こし、水系感染による集団下痢事件の原因となります。老人や乳幼児では、死に至ることがあります。当研究分野では、マラリア（熱帯熱マラリア、ローデントマラリア）と人獣共通感染症として地球規模で問題となっているトキソプラズマ症、クリプトスポリジウム症を研究対象とし、「如何にして病原微生物は宿主細胞に感染し、増殖するのか」という命題について、主に分子生物学、ウイルス学の手法をもってアプローチしています。さらに、ここで得られた知見を基にした新しい抗原虫薬、原虫ワクチンの開発等の実用的な研究課題にも取り組んでいます。

2. 主な研究テーマ

- ・ 原虫による宿主細胞侵入、宿主細胞内増殖、潜伏感染、重症化の各機構の解明
- ・ 原虫の感染レセプターの同定と抗原虫薬としての糖鎖薬の実用化研究
- ・ 免疫制御細胞による原虫破壊機構の解明とペプチド、ナノ粒子を用いた抗原虫薬の開発
- ・ 原虫及び共生ウイルスを用いた分子疫学解析と分子診断系の開発
- ・ 原虫のエピジェネティック機構の解明
- ・ 既存薬、生薬を用いた抗原虫薬のスクリーニング

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ ナノテクノロジーの発展により同技術の医療への利用の可能性が期待され、様々な疾患に対する将来的な治療方法の 1 つとして研究が進められています。粒子の大きさ、その他の特性を変化させることで医学応用が図られ、特に活性酸素種の生成を促進することで感染性微生物の殺傷に効果がある可能性があります。さらに、小さいサイズのナノ粒子は細胞膜を通過することが可能であり、より強い反応を起こすことが期待できます。このように金属ナノ粒子の用途の多様性を鑑み、抗原虫薬としての将来的な利用の可能性も考えられます。本研究ではトキソプラズマ感染細胞を用いて、金属ナノ粒子の新規の抗トキソプラズマ作用について解析を行いました。その結果、金、銀、白金の各々の金属ナノ粒子が各々、宿主細胞への細胞毒性が発現する 1/20 以下の濃度でトキソプラズマの増殖阻止に働くことを明らかとしました。また、この作用は原虫の酸化還元シグナルに関与し、ミトコンドリアの膜電位に影響

響を与えることで、原虫の宿主細胞侵入、増殖、感染性に影響を与えることがわかりました。本研究成果は、金属ナノ粒子の抗トキソプラズマ薬のシーズとしての可能性、抗原虫作用の分子メカニズムの解明に向けた新たな知見を提供するものです。（論文リスト1）

- ・ 熱帯熱マラリア原虫は、ハマダラ蚊の吸血によってヒトに感染し、ヒトの血液中の赤血球に感染して増殖します。現在までに有効なワクチンが開発できていない一方で、多くの種類のマラリア治療薬が臨床応用されています。しかし、現在使われている主な予防薬、治療薬に対して、薬剤耐性マラリア原虫の出現が報告されており、さらなる予防薬、治療薬の開発が求められています。このためには、赤血球に感染したマラリア原虫への生体防御システムの理解が必要です。一方で、マクロファージは病原体を素早く認識し、貪食することで、感染に対する自然免疫系において重要な役割を果たしています。認識された病原体はマクロファージの内部に取り込まれ、ファゴソームに貪食されます。ファゴソームは成熟して、ファゴリソームとなり、貪食した病原体に抗微生物活性分子を浴びせます。また、マクロファージは、細菌、真菌、ウイルスに対する防御に重要となる数多くの蛋白質分解酵素、加水分解酵素、抗微生物ペプチドを産生します。そこで、本研究ではマラリアに対する新しい予防、治療法を確立するため、抗マラリア作用のあるペプチドの同定を試みました。マクロファージがマラリア感染赤血球を貪食した際と赤血球のみを貪食した際の転写物の比較解析を行いました。その結果、抗マラリア効果を持つペプチド分子として、 β -ディフェンシンの同定に成功しました。本研究の成果は、マラリアの予防薬、治療薬の開発を進めるうえでの免疫学的な知見を提供するとともに、 β -ディフェンシンやこれと同様の活性を持つ化合物を人工的に合成することができれば、有効な治療薬のシーズとなることが期待されます。（論文リスト2）
- ・ 我々の研究グループでは、熱帯熱マラリア原虫のカルシウム・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ（CaMK）が、宿主細胞である赤血球への侵入過程に重要な役割を果たしていることを報告してきました。原虫の宿主細胞侵入過程は抗原虫薬の標的として重要であると考えられます。本研究では、トキソプラズマの宿主細胞侵入の抑制をもたらす薬剤標的を同定することを目的として、トキソプラズマの遺伝子の中から CaMK 相同遺伝子を同定し、原虫のライフサイクルにおける役割について解析を行いました。その結果、新規に同定したトキソプラズマの CaMK 様キナーゼ（TgCaMKrk）によるリン酸化は、カルモジュリン依存的ではなく、トキソプラズマ感染細胞での局在については虫体の吻側部にありました。さらに、*in vitro* で原虫の宿主細胞侵入動力装置の一翼を担う TgGAP45 をリン酸化することがわかりました。本研究の成果は、トキソプラズマの宿主細胞侵入動力装置の動作原理の理解や抗原虫薬の薬剤ターゲットの解析に新たな知見を与えるものです。（論文リスト7）
- ・ トキソプラズマは感染した家畜の食肉からヒトへと経口感染します。従って、ブタにおけるトキソプラズマ症の制御は公衆衛生上重要です。本研究では、糖鎖薬に注目し、糖鎖の一種

であるデキストラン硫酸について、トキソプラズマ感染培養細胞及びマウス、ブタに投与することで原虫増殖阻害効果を調べました。この結果、ブタにおいてトキソプラズマの感染実験系と原虫感染に対する薬剤評価系の確立に成功しました。ブタでの感染実験の病理学的解析、免疫学的解析の結果、デキストラン硫酸は抗トキソプラズマ薬として効果が認められました。本研究の成果は、トキソプラズマに対する新しい薬剤開発とその感染制御に有効な知見を与えるものです。（論文リスト 10）

- ・ コウモリは人獣共通感染症の原因となる病原体に感染し、寄生虫感染症においても潜在的な媒介動物となっています。本研究では、フィリピンのコウモリについて、クリプトスポリジウムとアイメリアについて種と遺伝子型の分布の解析を行いました。その結果、45 匹のクリプトスポリジウム陽性個体と 7 匹のアイメリア陽性個体を得ました。クリプトスポリジウムとアイメリアの各々について系統樹解析を行った結果、クリプトスポリジウムについてはコウモリに感染する新しい遺伝子型を得、ヒトへの感染の可能性のある遺伝子型も得られた。本研究の結果から、フィリピンではコウモリがクリプトスポリジウムやアイメリアの媒介動物となっていることを示唆されました。（論文リスト 14）

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会 評議委員
- ・ 日本ウイルス学会
- ・ 日本寄生虫学会 評議員
- ・ 日本獣医寄生虫学会 渉外・広報委員
- ・ 日本熱帯医学会

② 主催した学会、研究会等

- ・ 帯広畜産大学テニユアトラック研究成果発表会（2016 年 7 月 20 日、帯広畜産大学原虫病研究センター）

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 農林水産省 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 研究課題評価分科会委員

6. 平成 28 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Adeyemi OS, Murata Y, Sugi T, **Kato K***. Inorganic nanoparticles kill *Toxoplasma gondii* via changes in redox status and mitochondrial membrane potential. **Int J Nanomedicine** 2017; 12: 1647–1661. PMID: 28280332
2. Terkawi MA, Takano R, Furukawa A, Murakoshi F, **Kato K***. Involvement of β -defensin 130

- (DEFB130) in the macrophage microbicidal mechanisms for killing *Plasmodium falciparum*. **Sci Rep. (Nature Publishing Group)** 2017; 7: 41772. PMID: 28181499
3. Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Horimoto T, Xuan X, Akashi H, **Kato K***. Pull-down method to access the cell surface receptor for *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Int.** 2016; 65: 514-515. PMID: 27591002
 4. **Kato K***. Evaluation of the enzyme activity of protozoan protein kinases by using an *in vitro* kinase assay. **Parasitol Int.** 2016; 65: 510-513. PMID: 27425601
 5. Ishihara Y, Shioda C, Bangphoomi N, Sugiura K, Saeki K, Tsuda S, Iwanaga T, Takenaka-Uema A, **Kato K**, Murakami S, Uchida K, Akashi H, Horimoto T. Akabane virus nonstructural protein NSm regulates viral growth and pathogenicity in a mouse model. **J Vet Med Sci.** 2016; 78: 1391-1397. PMID: 27181086
 6. Sugi T, Ma Y, Tomita T, Murakoshi F, Eaton M, Yakubu R, Hang B, Tu V, **Kato K**, Kawazu S, Gupta N, Suvorova E, White M, Kim K, Weiss L. *Toxoplasma gondii* cAMP dependent protein kinase subunit 3 is involved in the switch from tachyzoite to bradyzoite development. **mBio.** 2016; 7: e00755-16. PMID: 27247232
 7. **Kato K***, Sugi T, Takemae H, Takano R, Gong H, Ishiwa A, Horimoto T, Akashi H. Characterization of a *Toxoplasma gondii* calcium calmodulin-dependent protein kinase homolog. **Parasit Vectors.** 2016; 9: 405. PMID: 27444499
 8. Sugi T, **Kato K**, Weiss LM. An improved method for introducing site-directed point mutation into the *Toxoplasma gondii* genome using CRISPR/Cas9. **Parasitol Int.** 2016; 65: 558-562. PMID: 27167504
 9. Terkawi MA, Takano R, **Kato K***. Isolation and co-cultivation of human macrophages and neutrophils with *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: an optimized system to study the phagocytic activity to malarial parasites. **Parasitol Int.** 2016; 65: 545-548. PMID: 26979627
 10. **Kato K**, Murata Y, Horiuchi N, Inomata A, Terkawi MA, Ishiwa A, Ogawa Y, Fukumoto S, Matsuhisa F, Koyama K. Dextran sulfate inhibits acute *Toxoplasma gondii* infection in pigs. **Parasit Vectors.** 2016; 9: 134. PMID: 26956033
 11. Takenaka-Uema A, Sugiura K, Bangphoomi N, Shioda C, Uchida K, **Kato K**, Haga T, Murakami S, Akashi H, Horimoto T. Development of an improved reverse genetics system for Akabane bunyavirus. **J Virol Methods.** 2016; 232: 16-20. PMID: 26927704
 12. Kobayashi K, **Kato K***. Evaluating the use of heparin for synchronization of *in vitro* culture of *Plasmodium falciparum*. **Parasitol Int.** 2016; 65: 549-551. PMID: 27600143
 13. Takenaka-Uema A, Bangphoomi N, Shioda C, Uchida K, Gen F, **Kato K**, Haga T, Murakami S, Akashi H, Horimoto T. Characterization of a recombinant Akabane mutant virus with knockout of a nonstructural protein NSs in a pregnant goat model. **Virol Sin.** 2016; 31: 274-277. PMID: 27068656
 14. Murakoshi F, Recuenco FC, Omatsu T, Sano K, Taniguchi S, Masangkay JS, Alviola P, Eres E,

Cosico E, Alvarez J, Une Y, Kyuwa S, Sugiura Y, **Kato K***. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Eimeria* species in Philippine bats. **Parasitol Res.** 2016; 115: 1863-1869. PMID: 26833326

総説

該当なし

著書

1. 村越ふみ、加藤健太郎：「医学のあゆみ」、クリプトスポリジウム原虫の新規分子マーカーと感染の分子機構 Vol.259, No. 4, p.325-326 医歯薬出版株式会社、2016年

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 平成 27 年度 新学術領域研究「運動超分子が織りなす調和と多様」（公募研究）（文部科学省）、原生動物の宿主細胞侵入マシナリーの作動原理の解明と構造解析（15H01306）、代表、平成 27 年度～平成 28 年度
2. 平成 28 年度 基盤研究（C）（特設分野研究）（文部科学省）、食物循環の効率的維持のための家畜と感染性微生物の生態学（16KT0141）、代表、平成 28 年度～平成 30 年度

10. 特許申請・取得

1. 加藤健太郎、村田優穂、杉達紀:抗トキソプラズマ剤、2016年8月30日、特願2016-167695
2. 加藤健太郎、村田優穂、杉達紀:抗トキソプラズマ剤、2016年8月29日、特願2016-166525

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

1. マクロファージによる抗マラリア機構の解明、帯広畜産大学プレスリリース（2017年2月3日）、十勝毎日新聞記事掲載（2017年2月11日23面）、北海道新聞記事掲載（2017年3月15日朝刊20面）
2. 金属ナノ粒子の抗原虫効果、帯広畜産大学プレスリリース（2017年3月2日）、十勝毎日新聞記事掲載（2017年3月7日20面）

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 田之倉 優：東京大学大学院農学生命科学研究科、原虫の宿主細胞侵入機構の構造生物学的理解と抗原虫薬の開発、2016年4月1日～2017年3月31日、平成28年度 原虫病研究センター 共同研究

1. 研究テーマの概要

動物トリパノソーマ症は国際獣疫事務局（OIE）が定める国際重要家畜疾患であり、またヒトアフリカトリパノソーマ症は世界保健機関（WHO）が定める「顧みられない熱帯病」であり、それぞれ対策が強く求められている原虫病です。我々の研究室では、トリパノソーマ症流行国での疫学調査を通じてその感染状況を明らかにするとともに、実際に流行国で被害をもたらしている“野外流行型トリパノソーマ”を感染動物から分離、実験室で実験を行えるように培養馴化させた株を独自に確立し、野外流行型トリパノソーマのゲノム解析、病原性解析、薬剤感受性試験などの基礎的研究を行っています。また、このようにして得られた野外流行型トリパノソーマの基礎研究成果をもとに、迅速かつ簡便にトリパノソーマ感染状態を把握可能な簡易診断技術の確立と社会実装に向けた研究及び新規トリパノソーマ症治療薬の探索と実用化に向けた研究を進めています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トリパノソーマ症の疫学調査
- ・ 野外流行型トリパノソーマの分離培養法の確立および分離株の性状解析
- ・ トリパノソーマ症の迅速診断法の開発および社会実装に向けた研究
- ・ 既存薬及び天然物からの抗トリパノソーマ活性物質の探索

3. 平成 28 年度研究の総括

- ・ 媾疫（こうえき）トリパノソーマ（*Trypanosoma equiperdum*）はウマのトリパノソーマ症の一種で、主に血流中に寄生する他種トリパノソーマとは異なり主に生殖器粘膜に寄生し交尾によって感染が拡大します。媾疫は OIE の定める国際重要家畜疾患であるにもかかわらず、近年媾疫として報告された症例がほとんどなく、また研究を進める上で必須な培養馴化株がほとんど確立されていないため、その研究は非常に遅れていました。我々は地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（JICA/AMED SATREPS）を通じてモンゴル国の原虫病及び媒介節足動物の分布状況を明らかにする過程で、同国のウマで媾疫が蔓延していることを明らかにしました。本研究では効率的に媾疫トリパノソーマを分離・培養馴化可能な軟寒天培地を開発し、モンゴル国で媾疫と診断されたオスウマの生殖器から、媾疫トリパノソーマ新規培養馴化株を確立しました（論文リスト 5）（モンゴル国立生命科学大学 獣医学研究所との共同研究）。
- ・ 既存のトリパノソーマ症治療薬は毒性が強く、また限られた少数の薬剤を長く使用しているため、薬剤耐性トリパノソーマ症及び薬剤耐性トリパノソーマが多く報告されています。そ

のため新規トリパノソーマ症治療薬の開発が強く望まれています。我々は新規トリパノソーマ症治療薬の候補となりうる化合物を探索するために、既存薬としてすでに活用されている化合物の抗トリパノソーマ活性評価(ドラックリポジショニング)を行いました。その結果、ミコフェノール酸とその誘導体が、トリパノソーマの核酸合成経路を阻害することで比較的強い抗トリパノソーマ活性 (IC_{50} (50%発育阻害濃度) = 0.1 ~ 0.6 μ M) を有することを報告しました(論文リスト 8) (北海道大学農学部 木質生命科学研究室との共同研究)。また、天然物から新規トリパノソーマ症治療薬のシーズと成り得る化合物を探索するために、海産真菌抽出物及びモンゴル国産薬用植物抽出物の抗トリパノソーマ活性を評価しました。その結果、海産真菌培養液から抽出された化合物 (Malformin A1) に強い抗トリパノソーマ活性 (IC_{50} = 15.08 ng/mL) があることがわかりました(論文リスト 1, 2) (早稲田大学先進理工学部 ケミカルバイオロジー研究室との共同研究)。さらに様々な家畜感染症に対する薬用伝承を有するモンゴル産薬草 (*Oxtropis lanata*) 抽出物から、比較的強い抗トリパノソーマ活性を有するオキサゾール関連化合物 (IC_{50} = 1 μ M) を単離、構造を決定し報告しました(論文リスト 3) (東北医科薬科大学薬学部 生薬学教室との共同研究)。

- ・ ザンビア国は農業が国の経済基盤であり、家畜原虫病の蔓延により畜産業に大きな経済被害が出ていると考えられています。そこでザンビア国の3地点から家畜血液をサンプリングし、家畜原虫病(トリパノソーマ症及びピロプラズマ症)の分子疫学調査を実施しました。その結果 *Trypanosoma vivax* 及び *Babesia bigemina* が蔓延していることが明らかになりました。さらに多くのヤギがトリパノソーマに感染していることが明らかになりましたが、トリパノソーマ感染ヤギではトリパノソーマ症の特徴である貧血が認められなかったことから、ヤギが動物トリパノソーマのレゼルポアである可能性が示唆されました(論文リスト 4)。
- ・ ヘムは多くの機能タンパク質に関連している物質であり、ヘムの生合成系は多くの真核生物で広く保存されています。一方、トリパノソーマはヘム生合成系が欠損している非常に珍しい真核生物です。そのためトリパノソーマは生存に必要なヘム源を、細胞外からの取り込みに完全に依存しています。すなわちヘム源とその取り込み機構を理解することは、トリパノソーマ症の新規制御法開発につながると考えられます。そこで我々はアフリカトリパノソーマの一種である *Trypanosoma congolense* の昆虫体内型ステージ(エピマスティゴート型虫体: EMF) のヘム源取り込みレセプター及びヘム源の同定を試みました。その結果、新規ヘム源取り込みレセプターとして *T. congolense* EMF-specific Hemoglobin receptor (TcEpHbR) を同定しました。また、TcEpHbR のリガンドとして遊離型ヘモグロビン(Hb) を同定しました。以上の結果から、TcEpHbR は既知のヘム源取り込みレセプターと異なり Hb 特異的に結合し、*T. congolense* EMF は Hb を主たるヘム源として利用していることが明らかとなりました(論文リスト 6)。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本獣医寄生虫学会
- ・ 日本寄生虫学会

② 主催した学会、研究会等

1. The 2nd International Conference on the Control Measure of Neglected Tropical Diseases

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 平成28年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Notarte KI, Nakao Y, Yaguchi T, Bungihan M, Suganuma K, dela Cruz TE. Trypanocidal activity, cytotoxicity and histone modifications induced by malformin A1 isolated from the marine-derived fungus *Aspergillus tubingensis* IFM 63452. **Mycosphere**. 2017; 8: 111–120.
2. Notarte KI, Nakao Y, Yaguchi T, Suganuma K, dela Cruz TE. Anti-infective and cytotoxic activities of marine fungi derived from Philippine macroalgae and seagrasses. **Planta Med**. 2016; 81: S1-S381. PMID: 27976354
3. Banzragchgarav O, Murata T, Odontuya G, Buyankhishig B, Suganuma K, Davaasuren BO, Inoue N, Batkhuu J, Sasaki K. Trypanocidal activity of 2,5-diphenyloxazoles isolated from the roots of *Oxytropis lanata*. **J Nat Prod**. 2016; 79: 2933-2940. PMID: 27797518
4. Musinguzi SP, Suganuma K, Asada M, Laohasinnarong D, Sivakumar T, Yokoyama N, Namangala B, Sugimoto C, Suzuki Y, Xuan X, Inoue N. A PCR-based survey of animal African trypanosomosis and selected piroplasm parasites of cattle and goats in Zambia. **J Vet Med Sci**. 2016; 78: 1819-1824. PMID: 27616437
5. Suganuma K, Narantsatsral S, Battur B, Yamasaki S, Otgonsuren D, Musinguzi SP, Davaasuren B, Battsetseg B, Inoue N. The isolation, cultivation and molecular characterization of a new *Trypanosoma equiperdum* strain in Mongolia. **Parasit Vectors**. 2016; 9: 481. PMID: 27580944
6. Yamsakai S, Suganuma K, Yamagishi J, Asada M, Yokoyama N, Kawazu S, Inoue N. Characterization of an epimastigote-stage-specific hemoglobin receptor of *Trypanosoma congolense*. **Parasit Vectors**. 2016; 9: 299. PMID: 27216446
7. Shoriki T, Ichikawa-Seki M, Suganuma K, Naito I, Hayashi K, Nakao M, Aita J, Mohanta UK, Inoue N, Murakami K, Itagaki T. Novel methods for the molecular discrimination of *Fasciola* spp. on the basis of nuclear protein-coding genes. **Parasitol Int**. 2016; 65: 180 – 183. PMID:

26680160

8. **Suganuma K**, Sarwono AEY, Mitshuhashi S, Jąkalski M, Okada T, Nthatisi M, Yamagishi J, Ubukata M, Inoue N. Mycophenolic acid and its derivatives as potential chemotherapeutic agents targeting inosine monophosphate dehydrogenase in *Trypanosoma congolense*. **Antimicrobial Agents Chemother.** 2016; 60: 4391-4393. PMID: 27139487

総説

1. **菅沼啓輔**、北潔：「ツェツェバエ：アフリカ睡眠病（アフリカトリパノソーマ症）」、公衆衛生、2017年2月、81（2）、129-134

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 平成 28 年度 若手研究 (B) (文部科学省)、抗トリパノソーマ作用機序評価系の確立と新規創薬への応用 (16K18793)、代表、平成 28 年度～平成 31 年度
2. 平成 28 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、EMF 特異的ヘモグロビンレセプターから迫る転写翻訳制御機構解明と規制適応基盤 (16H05025)、分担、平成 28 年度～平成 31 年度
3. 平成 28 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、ベクター媒介性病原体における宿主トランジション応答機構 (16H05026)、分担、平成 28 年度～平成 30 年度
4. 平成 27 年度 アフリカにおける顧みられない熱帯病 (NTDs) 対策のための国際共同研究プログラム (国立研究開発法人 日本医療研究開発機構)、迅速診断法の開発とリスク分析に基づいた顧みられない熱帯病対策モデルの創成、分担、平成 27 年度～平成 31 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

1. モンゴル国における矯疫トリパノソーマ新規培養株の確立、帯広畜産大学・AMEDプレスリリース（2016年9月12日）、科学新聞記事掲載（2016年9月23日）、十勝毎日新聞記事掲載（2016年11月4日）、Academist Journal（URL: <https://academist-cf.com/journal/?p=2315>）記事掲載（2016年10月19日）

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 村田 敏拓：東北医科薬科大学・生薬学教室、モンゴル国伝統薬用植物成分の抗トリパノソーマ活性評価による現地原虫病対策への応用、2016年4月1日～2017年3月31日、平成28年度原虫病研究センター共同研究