

9. 共同研究成果報告書

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 31, 2016

Project no: 28-1

1. Principal investigator

Name: Dinh Lan Thi Bich

Position: Associate Professor

Affiliation: Institute of Biotechnology, Hue University

2. Project title:

Establishment and field evaluation of sero-diagnostic tools applicable to survey the bovine babesiosis in Vietnam

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Naoaki Yokoyama

Position: Professor

4. Research period (in mm/dd/yyyy, and total number of years)

April 1, 2016 – March 31, 2017

5. Purposes and objectives

Babesia bovis and *Babesia bigemina* are two economically significant hemoprotozoan parasites of cattle in tropical and subtropical regions of world. Control strategies against these parasite species should essentially be designed based on the rate of exposure, which can be determined by surveying cattle populations using sero-diagnostic tools. Vietnam is an agriculturally rich tropical country. However, the cattle populations in Vietnam were not analyzed to determine the sero-prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina*. The objectives of the present study were to 1) detect the and genetically characterize the hemoprotozoan parasites infecting cattle and

water buffaloes in Vietnam using PCR assays, 2) isolate *B. bovis* and *B. bigemina* rhoptry-associated protein 1 (*rap-1*) gene sequences from parasite-infected Vietnamese cattle and water buffaloes, and 3) develop and evaluate *B. bovis*- and *B. bigemina*-specific ELISA systems using recombinant RAP-1 antigens (rRAP-1) expressed based on gene sequences sourced from Vietnamese cattle.

6. Outline of research process

- A PCR-based epidemiological study was conducted to detect and genetically characterize several bovine hemoprotozoan parasites (*B. bigemina*, *B. ovata*, *Theileria annulata*, *T. orientalis*, *Trypanosoma evansi*, and *Tr. theileri*) in cattle and water buffalo bred in Vietnam.
- Type-specific PCR assays were established for *B. bovis msa-1* genotypes prevalent in Asia. The performances of these type-specific PCR assays were then evaluated using *B. bovis*-positive DNA samples that had been previously characterized for *msa* genetic diversity in Asian countries, including Vietnam.
- The *rap-1* gene sequences were isolated from the *B. bovis*- and *B. bigemina*-infected Vietnamese cattle and water buffaloes. The conserved and specific region of these gene sequences were then used to produce *B. bovis* and *B. bigemina* rRAP-1 antigens. Subsequently, rRAP-1 proteins were used as sero-diagnostic antigens to develop ELISAs for detecting *B. bovis*- and *B. bigemina*-specific antibodies from serum samples collected from Vietnamese cattle.

7. Outline of research achievements

1. A PCR-based survey detected *B. bigemina*, *T. orientalis*, and *Tr. theileri* among cattle and water buffalo in Vietnam, and a new *Babesia* sp. closely related to *B. ovata* was detected in cattle only. In addition, *T. annulata* and *Tr. evansi* were not detected in both cattle and water buffalo. Phylogenetic analysis detected *T. orientalis mpsp* genotypes 3, 5, 7, and N3 in cattle and 5, 7, N1, and N2 in water buffalo. Additionally, water buffalo-derived *Tr. theileri*

catl sequences clustered together with a previously reported cattle-derived sequence from Vietnam. This is the first report of a new *Babesia* sp. in cattle, and *T. orientalis* *mpsp* genotype 7 and *Tr. theileri* in water buffalo in Vietnam [1].

2. The genetic diversity of *B. bovis* merozoite surface antigens (MSAs), such as MSA-1, MSA-2b, and MSA-2c, might be linked to altered immune profiles in the host animals. We developed type-specific PCR assays for Asian *msa-1* genotypes, and re-analyzed the genetic diversity of *msa-1* in Sri Lanka, Mongolia, and Vietnam. Specific primers were designed for nine Asian *msa-1* genotypes, which had been detected based on the phylogeny constructed using *msa-1* gene sequences retrieved from the GenBank database. Specificity of the type-specific PCR assays was confirmed using plasmids containing the inserts of *msa-1* gene fragments that represent Asian genotypes. Furthermore, no amplicons were observed by these PCR assays when DNA samples of *B. bigemina*, *B. ovata*, *T. annulata*, *T. orientalis*, *Tr. evansi*, *Tr. theileri*, *Anaplasma marginale*, and *A. bovis*, and non-infected bovine blood were analyzed. In total, 109 *B. bovis*-positive blood DNA samples sourced from Sri Lanka (44 cattle), Mongolia (26 cattle), and Vietnam (23 cattle and 16 water buffaloes) were then screened by the type-specific PCR assays. The sequences derived from all of the PCR amplicons were phylogenetically analyzed. Out of 109 DNA samples, 23 (20 from cattle and 3 from water buffaloes) were positive for at least one genotype. The findings demonstrated that four genotypes, including three novel genotypes, were detected from Mongolia. On the other hand, In agreement with previous studies, five and four different genotypes were detected among the DNA samples from Sri Lanka and Vietnam, respectively. The type-specific PCR assays were also effective in detecting multiple genotypes in co-infected animals. The sequences of the PCR amplicons clustered phylogenetically within the corresponding clades. These findings indicated that the type-specific PCR assays are useful for the determination of genotypic diversity of the *B. bovis* *msa-1* gene in Asia, including Vietnam [2].
3. The *rap-1* gene sequences were isolated from cattle and water buffalo infected with *B. bovis* (n=8) and *B. bigemina* (n=19). The percent similarity among the translated amino acid sequences of *rap-1* gene sequences were 96.7 – 100% and 96.5 – 100%, respectively. Based on the conserved and

specific regions of these gene sequences, *B. bovis* and *B. bigemina* rRAP-1 antigens were produced in *Escherichia coli*. The rRAP-1 antigens were then successfully used as sero-diagnostic antigens in *B. bovis*- and *B. bigemina*-specific ELISA systems. The subsequent sero-surveys conducted in Vietnam using the newly developed ELISAs demonstrated that 71.9 and 78.1% of Vietnamese cattle in the surveyed area were exposed to *B. bovis* and *B. bigemina*, respectively. The findings indicated that the ELISAs that we developed are useful to determine the sero-prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina* in Vietnam [Manuscript in preparation].

8. Publication of research achievements

1. Weerasooriya, G., Sivakumar, T., Lan, D.T., Long, P.T., Takemae, H., Igarashi, I., Inoue, N., and Yokoyama, N.: Epidemiology of bovine hemoprotozoa parasites in cattle and water buffalo in Vietnam. J. Vet. Med. Sci., 78: 1361-1367, 2016.
2. Liyanagunawardena, N., Sivakumar, T., Kothalawala, H., Silva, S.S., Battsetseg, B., Lan, D.T., Inoue, N., Igarashi, I., and 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., 37:64-69, 2016.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 3 月 31 日

採択番号			
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	横山直明
研究課題名	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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いのくま ひさし 猪 熊 壽	臨床獣医学研究部門・教授	
研究分担者			
	横 山 直 明	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 2 月 28 日		
目的・趣旨	小型ピロプラズマ病は日本の放牧牛の重要なマダニ媒介性原虫症であり、発症牛は貧血・流産・死亡を呈し生産性に大きな損害を与えているが、確実な治療薬がなく、防除法確立が課題となっている。本病媒介者はフタトゲチマダニとされてきたが、申請者らの最近の研究により北海道では北方系マダニ（シュルツェマダニとヤマトマダニ）が媒介者であり、その生態はフタトゲチマダニと異なることが明らかとなった。しかし、現状の本病防除法は北方系マダニの生態を考慮しない全国一律のものであり、北海道では費用対効果が低い欠点がある。そこで、本研究では北方系マダニの生活環と季節消長を考慮して申請者らが考案した防除法の効果を検証することにより、現場に普及できる新技術としての防除法を確立することを目的とした。		
研究経過の概要	2010 年まで小型ピロプラズマ病の発生がみられた北海道標茶町の 2 カ所の公共育成牧場を対象とし、2011 年以降、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プログラムを実践し、その効果を検証した。北方系マダニ対策として、放牧初期である 5～6 月に重点を置いた 2 週間毎の殺マダニ剤適用を継続した。モニター項目として、放牧開始時（6 月上旬）、放牧 1 カ月後（7 月）、2 カ月後（8 月）および終牧時（10～11 月）に牛の小型ピロプラズマ感染率、血液検査、疾病記録、繁殖記録、増体重を検査するとともに、放牧開始時のマダニの小型ピロプラズマ保有率を明らかにし、その経緯を調べた。その結果、牧野内の感染マダニと入牧牛の新規感染率が著しく減少し、発症牛も激減した。北方系マダニの生態に基づき、5～6 月のマダニ最盛期に集中的に牛体マダニ対策を実施することで効率的に小型ピロプラズマ病が予防できることが実証された。		

研究成果の
概要

【予備調査】鹿追町におけるシュルツェマダニおよびヤマトマダニの季節消長を調べたところ、4月下旬は調査地点に積雪がありマダニは採取されなかったが、雪解け後に気温が上昇する5～6月に両マダニの採取数のピークがあり、7月以降は急激に活動性が落ちた。9月にごく少数の成ダニが採取されたが、10月には再び採取されなくなった。フタトゲチマダニ等の本州のマダニは春と秋の2回動物への寄生ピークがあり、1～2年で1サイクル（成ダニから成ダニまで）が完了する。いっぽう、シュルツェマダニを代表とする北方系マダニでは、活動のピークは雪解け後の5月中旬から6月下旬までに集中していることが明らかとなった。

【北方系マダニの生態に基づいた戦略】北方系マダニ活動最盛期に合わせて殺マダニ剤を利用するため、入牧後から6月下旬までに2週間毎に薬剤投与を集中させるプログラムを構築した。

【マダニのタイレリア（T0）保有率】両放牧地において入牧直後に採取されたマダニはシュルツェマダニ、ヤマトマダニ、ダグラスチマダニの3種であった。T0特異的PCRを用いてT0保有の有無を検索したところ、いずれのマダニ種からもT0が検出された。マダニT0保有率は2011年A牧野6.6%とB牧野6.0%であったが、2015年にはそれぞれ0.9%と0.0%に漸減した。マダニ活動がピークを迎える時期に集中して殺マダニ剤を牛体塗布して牛へのマダニ寄生を完全にブロックすることにより、感染牛の血液を吸血するマダニが減少することで、汚染マダニ率が漸減したと思われる。A牧野ではシュルツェマダニは調査期間中T0陽性を示さず、ダグラスチマダニは2014年にはT0保有率が0%となった。ヤマトマダニの陽性率も減少したものの0%にはならず、全調査期間を通じてA牧野のマダニのT0陽性率全体に影響を及ぼした。B牧野ではいずれのマダニのT0陽性率も漸減し、2015年には0%となり、牧野のマダニコントロールが成功した。

【牛のT0感染率】入牧2カ月後T0陽性率（新規感染率）は、2011年A牧野94%とB牧野28%であったが、2012年以降は急激に減少し、2015年にはそれぞれ11%と0%にまで漸減した。また、対策初年（2011年）のデータから、小型ピロプラズマ病は入牧後8週目までに急激な感染拡大がみられることが明らかとなった。貧血発症牛は2011年にA・B牧野でそれぞれ27頭と7頭であったが、2015年はそれぞれ2頭と0頭であり、発症数も減少がみられた。また、入牧時に無作為に抽出した約100頭のT0陽性率の推移について、A牧野では17.5～28.0%、B牧野では5.6～38.5%と、毎年入牧前からT0陽性牛が存在することが明らかとなった。牧野に放牧されるものは、ほとんどが初放牧の育成牛であるため、陽性牛は入牧前に畜舎で飼育されている時点で感染したものと考えられた。T0の感染経路としては通常はマダニ媒介であるが、垂直感染例も報告されており、T0感染率が高い牛群においては子牛が生時よりT0感染している可能性も十分考えられる。

入牧前の農家周辺放牧地またはパドックにおけるマダニのT0感染率は、2015年5月上旬において、A牧野周辺1農家では0%（0/9マダニ）、B牧野周辺6農家では0.8%（3/377マダニ）であった。放牧前であっても気温が高い日には、牛は農家周辺の放牧地やパドックに出されることが多い。農家周辺の放牧地やパドックにおいてT0感染マダニに寄生されることも放牧前から牛がT0感染している原因のひとつだと考えられた。道東では4月になると平均気温がプラスとなり、最高気温が10度を超えることもある。場所によっては雪

	解けが進み、マダニが活動を始める可能性もあることから、T0 感染が重度な農家では、周辺の放牧地やパドックに牛を放す前にもマダニ対策を行うことが望ましいと考えられる。 【結論】北方系マダニ最盛期における集中的な牛体マダニ対策（入牧前及び入牧直後 2 週間毎最低 3 回の殺マダニ剤適用）を行うことが、牧野内の感染マダニと牛の新規感染を減少させる効率的な方法であることが証明された。いっぽう、課題としては、マダニ対策が手薄になる秋季のマダニ対策および入牧時の T0 陽性牛対策が新たな課題として浮かび上がっており、今後これらを解決するための対策を考える必要があると思われた。
研究成果の 発表	<u>猪熊 壽</u>，<u>横山直明</u>，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．7(1)7-11（2017） 前野和利，松井伸一，河合孝弘，鈴木真生，千葉友行，<u>横山直明</u>，<u>猪熊 壽</u>． 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ホルスタイン種放牧育成牛の繁殖成績に与えた影響．産業動物臨床医学雑誌．7(4)：169-174（2016） <u>猪熊 壽</u>，<u>横山直明</u>，鈴木真生，千葉友行，河合孝弘，松井伸一，前野和利． 北方系マダニの生態を基礎とした小型ピロプラズマ予防対策の効果． 2016.9.7. 第159回 日本獣医学会講演要旨集．p.439. 藤沢市．

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成29年 5月 15日

採択番号	28-共同-3		
研究部門	生体防御学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名 にへい こういち 二瓶 浩一	所属部局等・職名 公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所・分子構造解析部上級研究員	
研究分担者	たかはし よしかず 高橋 良和	公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所・知的財産情報部室長	
研究期間	平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日		
目的・趣旨	マラリアは、世界三大感染症の一つであり、世界で年間3～5億人が罹患し、その内約200万人の命を奪っている医学分野で重要な疾患の一つである。その病原体であるマラリア原虫と同じアピコンプレクサ類のトキソプラズマは、世界人口の約1/3が感染していることが推定されている。その感染により、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おいて無視できない大きな問題となっている。さらに畜産業界において、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、トキソプラズマと同じアピコンプレクサ類である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る。ネオスポラ症による経済的損失は極めて大きく、地球規模での被害額は年間約数千億円にのぼるとの試算もある(Reichel et al., 2012. Int. J. Parasitol.)。我々は、有効な抗原虫薬を開発するために、これまでに当研究所で採取された放線菌由来の天然物を中心に抗菌(細菌, 真菌), 抗マラリア, 抗ガンおよび免疫抑制活性を指標とする生物活性と化合物の立体構造を基に整備し、ライブラリー化を進めてきた。 本研究において、妊娠期の原虫感染による繁殖障害問題を解決するために、トキソプラズマまたはネオスポラに対する抗原虫活性を示す化合物のスクリーニングおよび作用機序解析等を行い、妊娠期原虫感染症に対する有効な治療法および予防法の開発をする。本研究から原虫薬剤開発に適した有用性の高い化合物ライブラリーを構築することを目的とする。		

受理年月日	受理番号

研究経過の概要	我々は、西川義文准教授が開発してきた薬物候補化合物に対する抗トキソプラズマおよびネオスポラ活性の多検体スクリーニング系(Nishikawa et al. Int J Parasitol, 2003)を用いて微生物化学研究所(微化研)が開発した化合物ライブラリーの評価を行っており、順調に推移している。これまでに化合物ライブラリー約2000種類について蛍光タンパク質発現トキソプラズマ原虫を用いた一次スクリーニングを行った結果、15種類の化合物が既存薬(sulfonamide)より高い抗原虫活性を示し、内訳は11種類が微化研で発見されたオリジナルの天然物、4種類が市販されている他の研究グループによって採取された天然物であった。これらの化合物はネオスポラに対しても同様に抗原虫活性を示した。11種類の微化研化合物の中から生産性および動物に対する毒性試験等の知見を踏まえ、薬剤開発に適した化合物を3種類選定し、西川義文准教授が開発したトキソプラズマ感染マウスモデルを用いて二次スクリーニングを行った。その結果、2種類の化合物が既存薬よりトキソプラズマ感染マウスに対し高い治癒効果を示した。本研究成果は、妊娠期感染症問題の克服に向けた創薬基盤として大きく寄与するものである。
研究成果の概要	トキソプラズマ感染マウスに対して高い治癒効果を示した2種類の化合物の構造は異なった種類に属するものであり、一方は他の生物活性で発見された化合物(X)であったのに対し、もう一方は抗菌活性に加え、他の原虫に対する抗原虫活性が示された化合物(Y)であった。Xについて、マウスを用いた薬物動態解析において、経口投与で吸収され、血中濃度を保持した上でマウスに対する毒性が殆ど無い結果を昨年度までに得ていた。 トキソプラズマ感染マウスを用いてXの薬物動態解析を行った結果、静注よりも経口投与でより効率的に抗トキソプラズマ作用を示すことが明らかになった。Xは感染マウスに対する毒性が殆ど無く、トキソプラズマの脳内伝播または脳内における増殖を抑制した。このXに対する誘導体を化学合成し、抗トキソプラズマ活性における構造活性相関解析を行った。その結果、基の構造よりも高い活性を示す誘導体は存在しなかった。従って、天然物そのもののXの構造が抗トキソプラズマ活性に重要であることが明らかとなった。 化合物XとYについて原虫に対するスペクトラム解析を行ったところ、Xは特定の原虫種に対する抗原虫活性を示すのに対し、Yは比較的広い原虫に対する抗原虫活性を示す可能性が示された。Yにおけるトキソプラズマに対する作用機作はミトコンドリアやゴルジ体等のオルガネラが標的となることが示唆された。一方、Xはトキソプラズマに特徴的なオルガネラや代謝系に作用する可能性が示された。Xは創薬に進展する可能性が十分であると判断し、特許申請準備を行っている。学術的に高く進展することが考えられるYについては原虫に対する作用機序解析および標的分子探索を行い、論文化を進めている。
研究成果の発表	該当なし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 5 月 30 日

採択番号	28-共同-4		
研究部門	高度診断学研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	五十嵐 郁男
研究課題名	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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いしやま あき 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・特任助教	
研究分担者	いわつき まさと 岩 月 正 人	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・准教授	
	ほかり れい 穂 苅 玲	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・研究員	
	きよはら ひろあき 清 原 寛 章	北里大学北里生命科学研究所 大学院感染制御科学府 和漢薬物学 研究室・教授	
	おとぐろ かずひこ 乙 黒 一 彦	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・研究員	
	いがらし いくお 五 十 嵐 郁 男	帯広畜産大学原虫病研究センター・高度診断学部門・教授	
研究期間	平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日		
目的・趣旨	北里大学 北里生命科学研究所 熱帯病研究センター(以下、北里大)では微生物代謝産物などの天然物を創薬資源として <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>で有効な抗マラリアおよび抗トリパノソーマ原虫活性物質を取得し、一部は創薬リード化合物として種々の合成展開を進めて創薬研究を行っている。抗原虫活性物質ライブラリーはこれらの化合物群から構成されており、随時更新している。 動物の neglected disease の一つとしてバベシア症が畜産領域で注目されてきている。バベシアもマラリア原虫やトリパノソーマ原虫と同様に住血原虫であり、一部の抗マラリア剤および抗トリパノソーマ剤が抗バベシア効果を示すことが明らかになっている。 このような背景のもと、北里大の保有する抗原虫活性物質ライブラリーからバベシア治療薬のシード化合物を見出すことを目的に <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>マウス実験系での抗バベシア活性評価を本助成により継続してきた。H28年度は(1)北里大の保有する抗原虫活性物質ライブラリーを用いた抗バベシア活性物質のスクリーニングを継続するとともに、(2)特許を出願した化合物(CLF)及び、北里大で見出されたclofazimine(CLF)関連化合物(<i>in vitro</i>抗バベシア活性評価済)について小型動物(マウス、犬など)を用いた検討を実施することで有用性および安全性を確認する。また、(3)相乗相加効果を目的とした他薬剤(有効成分)との併用実験も検討する。		

研究経過の 概要	本共同研究はH23年度より北里大で見出された抗原虫活性物質ライブラリーについて、帯広畜産大学（五十嵐教授）の下、以下の原虫種で抗バベシア活性評価を行うことで新たな治療薬シードの発見を目指すために開始した。 ・ <i>in vitro</i> 培養牛バベシア（<i>Babesia bovis</i> および <i>B. bigemina</i>） ・ <i>in vitro</i> 培養馬バベシア（<i>T. equi</i> および <i>B. caballi</i>） ・ <i>in vivo</i> マウスバベシア（<i>B. microti</i>）感染モデル (1) <i>In vitro</i> 培養原虫での評価の継続 これまでに数種類の先行評価化合物の <i>in vitro</i> 抗バベシア活性評価がなされており、H28年度も抗原虫活性物質ライブラリーの抗バベシア活性評価は継続して行っている。 今年度は北里大の保有する天然物ライブラリーのスクリーニングにより見出された抗マラリア活性物質（NP-023）が新たに抗原虫活性物質ライブラリーに追加され、NP-023について抗バベシア活性の評価を行った。 抗原虫活性物質ライブラリーの拡充は継続して行っており、先のNP-023の合成展開を進め、種々の誘導体を作成し、抗マラリア活性評価、一部抗トリパノソーマ活性評価を終えライブラリーに追加した。また、微生物培養液から抗マラリア活性物質等のスクリーニングを継続し、活性物質生産菌の大量培養、溶媒抽出、各種クロマトグラフィー、HPLCなどによる精製を行い化合物の取得を進めている。取得した化合物の構造決定（NMR、MSなど）、各種生物活性などの評価を行い構造および活性プロファイルを明らかとした後、抗バベシア活性評価に進む予定である。 (2) CLF および類縁体の検討 先行評価化合物のうちCLFが20mg/kg（経口）で標準薬Ganazeg（25mg/kg、皮下）と同等の <i>in vivo</i> 抗バベシア活性を示すことを見出した（共同出願：国内特許13-138824、PCT出願）。本化合物はバベシアに対して高い原虫特異性を有する可能性が示唆されたが、<i>in vivo</i> マウス感染実験においてはバベシアを完全に排除できないことが明らかとなった。このため、本化合物単剤ではなく他の抗バベシア活性物質との組み合わせによる検討が必要である、としてまとめた論文を Antimicrob. Agents Chemother. (AAC) に投稿し論文が掲載された*。 CLFの類縁化合物の一つであるBF90477（<i>B. caballi</i>、<i>B. bigemina</i>、<i>B. gibsoni</i>** に対する <i>in vitro</i> 抗バベシア活性：IC₅₀ = 6.4 μM、1.7 μM、0.07 μM）についてマウスバベシア（<i>B. microti</i>）感染モデル系を用いての評価を計画中である。 (3) 相乗相加効果を目的とした他薬剤（有効成分）との併用実験 昨年度までに得られた結果から、今年度は、CLFと標準薬ganazegを組み合わせることにより、<i>in vitro</i>における相乗効果、相加効果、<i>in vivo</i>において治療効果（バベシアの完全排除に至るか）を検討した。 * AAC 60:2739-2746(2016). **北里大獣医学部にて評価（筏井博士）
---------------------	---

研究成果の概要	プロジェクト毎にH28年度の成果と今後の予定を以下に示す。 (1) <i>In vitro</i> 培養原虫での評価の継続 抗原虫活性物質ライブラリーの抗バベシア活性評価は継続して行っている。 次候補化合物を選択するために抗原虫活性物質ライブラリーの拡充をすべく抗マラリア活性を中心に北里大の天然物ライブラリーについてスクリーニングを行ない、新たに <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>で効果を示す化合物を数種得ることができた。このなかで、抗マラリア活性物質 (NP-023) が <i>in vitro</i>、<i>in vivo</i>経口投与で優れた抗マラリア活性を示すことを明らかとした ($IC_{50}=20-25$ nM、ED_{50} ca. 30mg/kg 経口)。NP-023について抗バベシア活性の評価を行ったところ、<i>in vitro</i>で抗バベシア活性は認められなかった (> 50 μM) が、NP-023の創薬過程においては新たな知見が得られた。 抗原虫活性物質ライブラリーの拡充は継続して行っており、先のNP-023を原料に合成展開を進め、種々の誘導体を作成 (19化合物) しライブラリーに追加した。また、微生物培養液のスクリーニングで選択された一系状菌の培養液について発酵、精製を行った結果、抗マラリア活性物質 (IC_{50} ca. 15 nM) を取得した。化合物の構造決定 (NMR, MSなど)、各種生物活性などの評価を行い構造および活性プロファイルを明らかとした後、抗バベシア活性評価に進む予定である。 (2) CLF および類縁体の検討 CLFに良好な抗バベシア活性が認められたことから同様のphenazine 骨格を有する化合物として北里大で購入もしくは発酵法による調製した 3 化合物については帯広畜産大学において引き続き <i>in vitro</i> 評価を進めている。 CLFの類縁体の一つであるBF90477は、<i>B. caballi</i>、<i>B. bigemina</i>、<i>B. gibsoni</i> に対しては $IC_{50} = 0.07- 6.4$ μMであったが、<i>B. bovis</i>、<i>T. equi</i>に対してはそれぞれ $IC_{50} = 17.8$ μM、52.7 μMであり、活性スペクトルが狭いため他の関連化合物の活性を確認した後に <i>in vivo</i>実験の優先順位を決めることとした。 (3) CLFと他剤の併用効果 CLFと標準薬ganazegの併用により、単剤よりも低濃度で <i>in vitro</i>における相乗あるいは相加効果が確認され、<i>in vivo</i>においても同様に 2 剤併用により原虫の完全排除 (再燃無し、PCR(-)) に至る結果が得られた。作用機序解析としてmRNA、DNAに対する影響を検討したところ、CLFとganazegがDNAに結合することで、上記の活性を発現したと推定された。本成果について論文を投稿中である。
研究成果の発表	CLF と Ganazeg の併用効果について論文を投稿中。 Chemotherapeutic efficacies of clofazimine and diminazene aceturate combination against piroplasm parasites as AT-rich DNA-binding drugs Author(s): Tuvshintulga, Bumduuren; AbouLaila, Mahmoud; Sivakumar, Thillaiampalam ; Tayebwa, Dickson; Gantuya, Sambuu; Naranbaatar, Khandsuren; Ishiyama, Aki; Iwatsuki, Masato; Otoguro, Kazuhiko; Ōmura, Satoshi; Terkawi, Mohamad ; Guswanto, Azirwan; Rizk, Mohamed ; Yokoyama, Naoaki; Igarashi, Ikuo

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 5 月 31 日

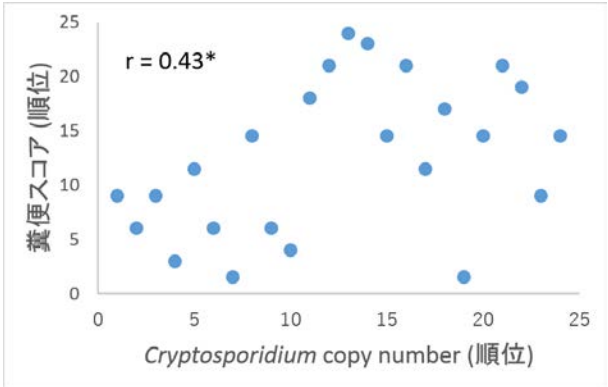
採択番号	6		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川義文
研究課題名	環境応答性脂質様物質からなる DNA 搭載ナノ粒子の 原虫予防ワクチンへの応用		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名 あきた ひでたか 秋田 英万	所属部局等・職名 千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室・教授	
研究分担者	にしかわ よしふみ 西川 義文		
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	DNA ワクチンは、抗原をコードする DNA を用いて、抗原特異的免疫を誘導するワクチン技術である。本技術では、抗原が細胞質に発現する事から、MHC Class-I 分子による抗原提示を介した、細胞性免疫の誘導に優れる。細胞性免疫は従来の不活化ワクチンでは誘導が困難であり、ウイルス・原虫感染やがん等に有効な免疫である事から、DNA ワクチンは従来ワクチンでは予防・治療が困難な疾病に対する次世代ワクチンとして期待されている。一方、DNA はその高い水溶性から、細胞膜等の生体膜を突破する事が困難であることから、DNA ワクチンの開発には、効率的に DNA を導入可能なキャリアが必要不可欠である。本研究では、当研究室で独自に開発された、環境応答性脂質様物質 (ss-cleavable Proton-Activated Lipid-like Material: ssPalm) を用いた、効率的な DNA ワクチンキャリアを創製し、原虫 (トキソプラズマ) に対するワクチンへの応用を試みた。		
研究経過の概要	ssPalm は親水性ユニットと疎水性ユニットからなる分子であり、疎水性ユニットの種類に応じて、体内動態や送達可能な核酸の種類が異なる事が明らかとなっていた。そのため、初めに皮下投与型 DNA キャリアとして有用な ssPalm を、In Vivo Imaging System (IVIS) を用いたルシフェラーゼ遺伝子導入能、及びモデル抗原であるオボアルブミン (OVA) を用いた抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocyte: CTL) 活性により評価した。その後、DNA ワクチンキャリアとして最も有効であった ssPalm を用いて、予防的抗腫瘍効果を評価すると同時に、トキソプラズマに対する予防的効果の検証をおこなった。トキソプラズマ (<i>Toxoplasma gondii</i>) は、様々な哺乳類や鳥類に感染しトキソプラズマ症を引き起こす細胞内寄生虫である。分担研究者である西川准教授により同定されたトキソプラズマ感染に対するワクチン抗原である TgPF を用いて、本抗原をコードする pDNA を ssPalm からなるナノ粒子により導入した際の、抗原虫感染の評価を、生存率を指標に評価をおこなった。		

研究成果の 概要	ssPalm には、脂溶性足場としてミリスチン酸を持つ ssPalmM、ビタミン A（レチノイン酸）骨格を持つ ssPalmA、ビタミン E（α-トコフェロール）骨格を持つ ssPalmE が開発されてきた。これらから構成される pDNA 内封脂質ナノ粒子（Lipid Nano Particle: LNP）の中で、最も効率的な DNA ワクチンキャリアとなる LNP を明らかとするため、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼを用いて評価をおこなった。ルシフェラーゼ遺伝子をコードする pDNA を各種 ssPalm からなる LNP に封入し、マウス皮下へ投与後、24 時間後に基質であるルシフェリンを投与した際の、発光強度を指標にルシフェラーゼ活性を評価した。その結果、ビタミン E 骨格を持つ ssPalmE-LNP において、最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。本活性は pDNA の単体投与、及び市販の遺伝子導入試薬である Lipofectamine2000 との複合体として投与した場合と比較しても高かった。 次に、in vivo における細胞性免疫誘導能を評価するため、モデル抗原である OVA をコードする pDNA（pDNA-OVA）を各種 ssPalm からなる LNP に封入し、マウス皮下へ投与した。投与から 7 日後に、OVA 特異的細胞傷害性 T 細胞（Cytotoxic T Lymphocyte: CTL）活性を、in vivo CTL assay により評価した。本評価法は、OVA 抗原ペプチドを人為的に提示させた脾臓細胞を、マウスへ投与した際の減少率を元に算出する方法である。その結果、ルシフェラーゼ活性と同様に、ssPalmE-LNP により pDNA-OVA を導入されたマウスにおいて、最も高い CTL 活性が認められた。以上の結果より、ssPalmE-LNP は、生体内における抗原タンパク質の発現を伴う、強力な CTL 活性が誘起することが明らかとなった。 ssPalmE-LNP の DNA ワクチンとしての有用性を評価するため、腫瘍に対する予防的効果、及び原虫感染に対する予防効果の検証を行った。腫瘍に対する評価は、OVA を発現するリンパ腫である E.G7-OVA を用いておこなった。OVA-pDNA を ssPalmE-LNP によりマウスへ免疫し、その 7 日後に E.G7-OVA をマウス脇腹へと皮下移植し、その後の腫瘍体積を経時的に測定した。その結果、OVA-pDNA 単体投与群では腫瘍の成長が抑制されなかった一方で、ssPalmE-LNP 投与群においては腫瘍移植後 12 日目まで有意に腫瘍成長が抑制されることが明らかとなった。また、ssPalmE-LNP 投与群のマウス 5 匹中 4 匹において、腫瘍移植から 24 日の時点まで腫瘍の成長が完全に抑制された。 次にトキソプラズマ（PLK 株）感染に対する予防効果の検証をおこなった。トキソプラズマ由来の抗原である TgPF をコードした pDNA（TgPF-pDNA）を ssPalmE-LNP によりマウスへ免疫した。免疫は 2 週間毎に 3 回行った。3 回目の ssPalmE-LNP の投与から 2 週間後、トキソプラズマ（PLK 株）をマウスへ皮下投与することで感染させ、感染後 30 日までの生存率を評価した。その結果、DDW 投与群では生存率が 12.5 %、トキソプラズマ由来の遺伝子を含まない non-coding-pDNA を内封した ssPalmE-LNP 投与群では 30%であったのに対し、TgPF-pDNA を内封した ssPalmE-LNP 投与群では 87.5%であった。この結果から、TgPF-pDNA 内封 ssPalmE-LNP の投与によりトキソプラズマ感染後の生存率が有意に上昇することが明らかとなった。以上の結果より、ssPalmE-LNP は、腫瘍や原虫感染を予防可能な DNA ワクチンキャリアである事が明らかとなった。
研究成果の 発表	現時点で研究成果の発表は行っていないが、論文投稿前の必要な最終データを取得している。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 5 月 30 日

採択番号			
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	(せき まどか) 関 まどか	岩手大学・農学部共同獣医学科・助教 研究材料の入手および糞便検査	
研究分担者	(にしかわ よしふみ) 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授 <i>C. parvum</i> 抗体価の測定	
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<i>Cryptosporidium parvum</i> は新生子牛の下痢症の原因として最も重要であり、畜産業に甚大な経済被害を与えている。獣医臨床現場では、十分な初乳の給与が発症の予防に有効であることが経験的に知られてきたが、それを支持する科学的根拠は明確でない。そこで本研究では、初乳により付与された新生子牛血清中の <i>C. parvum</i> 抗体とクリプトスポリジウム症の症状との相関を解析することで、初乳中の抗体による予防効果の有無を明らかにする。		
研究経過の概要	H28 年度はクリプトスポリジウム陽性農家から、(1) 新生子牛 25 頭分の糞便サンプルと血清を収集した。糞便については糞便スコアを用いて、臨床症状に基づく下痢症の重篤度の指標とした。また、(2) 分子学的な重篤度の指標として、qPCR により糞便中の原虫量を定量し、(3) 臨床的・分子学的指標の相関について検討した。 今後、提供を受けた血清を ELISA に供し、初乳中から移行した抗クリプトスポリジウム抗体を定量して、臨床的・分子学的指標との相関を検討する予定である。 (1) 新生子牛 25 頭分の糞便サンプルの収集と糞便スコアによる下痢症の重篤度の評価 これまでに共同研究チームはクリプトスポリジウム症の症例数が非常に多い大規模農場と協力関係を築くことに成功した。本年度は当該農場から、新生		

研究成果の概要	子牛 25 頭分の糞便サンプルと血清の提供を受けた。出生後から 20 日齢まで毎日糞便スコア（1:固形便 2:軟便 3:泥状便 4:水様便）を記録し、記録期間の平均値を算出して、臨床的な観点から下痢症の重篤度を評価した。 (2) qPCR による糞便中の <i>C. parvum</i> オーシスト量の定量 クリプトスポリジウム症の症状の指標として、糞便 1g あたりのオーシスト数（oocyst per gram : OPG）が用いられる。しかしながら、一般的な OPG 算出法は手技が煩雑で、多検体の検査には適用しにくい。そこで本研究では、分子学的なクリプトスポリジウム症の重篤度の指標として、昨年度の本共同研究で確立した qPCR により新生子牛の糞便中に排泄された <i>C. parvum</i> のオーシスト量を定量した。 予備試験により、調査対象農場では生後 8 日から 10 日齢の間に糞便中に排泄される <i>C. parvum</i> のオーシスト量がピークに達することが明らかになった。そこで本研究で採材対象とした新生子牛 25 頭については、生後 8 日から 10 日齢の糞便をそれぞれ採取した。各個体の糞便から DNA を抽出し、qPCR に供した。qPCR では、プライマーのターゲット領域を組み込んだ pUC118 をスタンダードとする絶対定量法により <i>C. parvum</i> オーシストの DNA コピー数を定量した。各個体について、8 日から 10 日齢の間で最もコピー数が多かった日齢を選択し、その日齢の <i>C. parvum</i> オーシストの DNA コピー数をクリプトスポリジウム症の分子学的な指標とした。 (3) 臨床的・分子学的指標の相関の検討 (1)と(2)で得られた臨床的、分子学的指標の相関をスピアマンの順位相関係数を用いて検討したところ、中位の正の相関が認められたため、オーシスト排泄数が多い個体ほど下痢が重篤である傾向が明らかになった。  今後、追加で採材した新生子牛 25 頭分のサンプルについて、同様の解析を実施する。さらに、提供された血清を昨年度の本共同研究で確立したリコンビナント抗原（CpP23-GST、CpP2-GST、CpGP15-GST、CpGP40-GST）を用いた ELISA に供し、移行抗体により付与された抗クリプトスポリジウム抗体の量を定量する。得られた抗体量と臨床的・分子学的なクリプトスポリジウム症の重篤度の指標を比較することにより、初乳中の移行抗体によるクリプトスポリジウム症の防除効果を検討する予定である。
研究成果の発表	現時点で研究成果の発表は行っていないが、昨年度確立した抗クリプトスポリジウム抗体を測定するための ELISA に関して論文投稿の準備が完了し、投稿前の最終確認をしている段階である。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 6 月 2 日

採択番号			
研究部門	生体防御学	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名 まさたに たつのり 正谷 達瞻	所属部局等・職名 鹿児島大学共同獣医学部 附属越境性動物疾病制御研究センター 特任助教	
研究分担者			
	玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 宿主シグナル分子のクローニング、発現ベクター構築	
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トキソプラズマは、ヒトを含めた多くの哺乳類に感染する人獣共通感染原虫である。同原虫は宿主体内で急性感染期のタキゾイトから潜伏感染期のブラディゾイトへとステージ変換し、休眠状態となって終生寄生する。これまでに、ブラディゾイト潜伏感染時におけるヒト線維芽細胞の遺伝子発現を次世代シーケンスにより網羅的に解析したところ、ブラディゾイト潜伏感染細胞では強い抗ウイルス活性を持つ種々の自然免疫関連蛋白質遺伝子（OAS1およびISG15など、I型インターフェロン(IFN)に誘導されるもの）が強く発現していることを見いだしている。さらに我々は、トキソプラズマを潜伏感染させたマウスは日本脳炎ウイルス及び単純ヘルペスウイルスの感染に対し抵抗性を有しており、その脳内では抗ウイルス自然免疫関連遺伝子の発現が亢進していることも示している。しかしながら、宿主側の網羅的遺伝子発現解析の結果、興味深い事に原虫潜伏感染時にはI型IFN遺伝子の発現は亢進しておらず、トキソプラズマはIFN非依存的に抗ウイルス応答を惹起していることが示唆される。しかし、トキソプラズマが宿主自然免疫シグナル経路のどの因子を標的としているのかについては分かっていない。 本研究では、トキソプラズマ潜伏感染によって刺激される宿主パスウェイを特定し、原虫潜伏感染がもたらす宿主自然免疫シグナル亢進の全容解明を目指した。		

研究成果の 概要	ゲノム編集を培養細胞に適用し、さまざまな自然免疫シグナル分子ノックアウト細胞を作出する目的で、哺乳類用 CRISPR/Cas9 システムベクターの一つである pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 を入手し、種々のシグナル関連転写因子の遺伝子配列をもとに設計したガイド RNA 配列をこれに導入した。 作出したベクターと、薬剤耐性マーカープラスミドのヒト線維芽細胞へのリポフェクション法での共導入を試みたが、導入効率が著しく低かった。そのため、作出したベクターが動作するかどうか確認するため、293 細胞へ同様に導入し、薬剤選択を行った。その結果、いくつかの遺伝子（PKR、Mx1）で欠損を確認することができた。しかし、293 細胞にトキソプラズマを感染させ、培養液の pH をアルカリ性のものに置換したところ、細胞が死滅してしまった。そのため、本実験はヒト線維芽細胞で実施するか、別のブラディゾイト誘導法で実施する必要があると考えられた。現在、ゲノム編集法をヒト線維芽細胞に適用すべく検討を行っている。
研究成果の 発表	なし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成29年5月29日

採択番号	28 共同-8		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	鈴木 宏志
研究課題名	マラリア原虫感染症に対する高脂血症治療薬プロブコール等の 血中ビタミン E 濃度に影響する薬物の効果に関する研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	しちり もとただ 七里 元督	バイオメディカル研究部門 次世代メディカルデバイス研究グループ 主任研究員 ビタミン E 減少作用薬の細胞実験でのスクリーニング	
研究分担者	あかざわ ようこ 赤澤 陽子	バイオメディカル研究部門 次世代メディカルデバイス研究グループ 研究員 脂質酸化生成物、ビタミン E の測定	
	くめ あいこ 久米 愛子	帯広畜産大学原虫病研究センター スクリーニングで有用性を認めた薬剤の動物実験での検証	
	鈴木 宏志	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 スクリーニングで有用性を認めた薬剤の動物実験での検証	
研究期間	平成 2 8 年 4 月 1 日 ～ 平成 2 9 年 3 月 3 1 日		
目的・趣旨	現在までの帯広畜産大学原虫病研究センター感染免疫研究部門との共同研究の成果によって、高脂血症治療薬として臨床で使用されているプロブコールは血中ビタミン E 減少作用を介してマラリア感染赤血球減少作用・感染後のマウスの生存率改善作用を発揮できることを見出し報告した。しかしながら、体表面積比率で換算した場合、プロブコールの使用量が一般的に臨床で 사용되는投与量に比べ多いこと、他の脂質も減少することが問題点であった。そこで本共同研究では、既に構築したスクリーニング系を用いてビタミン E 減少効果を有する化合物の探索を実施する。		
研究経過の概要	血中のビタミン E が枯渇するビタミン E 結合蛋白質欠損マウスでは、マラリア原虫感染症に対する耐性を獲得することを鈴木、Herbas らが報告している (Am. J. Clin. Nutr. 2010;91:200-7.)。一方、研究代表者は、高脂血症治療薬プロブコールは脂質トランスポーター (ABCA1) の不活性化を介し肝細胞からのビタミン E 放出を抑えることを明らかにし、マウス血中ビタミン E 減少効果があることを報告している (J. Nutr. Biochem 2010;21:451-6.)。以上の研究成果を融合し、プロブコールをマウスに投与した場合、マラリア感染に対して顕著な抑制効果を示すことを 2015 年度に報告した (PLoS One. 2015;10(8):e0136014.)。しかしながら、目的・趣旨に記載のようにプロブコールを抗マラリア薬として使用するには問題点がある。そこで、本研究計画では本問題解決を目標として、ビタミン E 減少効果を有しマラリア感染に対して有効な薬剤の探索を行うこととした。		

研究成果の概要	平成 27 年度にビタミン E 減少効果を有する化合物のスクリーニングを目的とした培養細胞を用いたビタミン E 放出アッセイの構築を行った。具体的には、α-トコフェロール（ビタミン E）にアセチル基の付加された酢酸 α-トコフェロールを培地中に添加すると、細胞内に取り込まれた後、加水分解を受けアセチル基が解離し、α-トコフェロールとなる。細胞内で生成された α-トコフェロールは ABCA1 を介して培地中に放出される。培地中の α-トコフェロール濃度を既報に従い抽出し、電気化学検出器 HPLC-ECD にて測定することで、培地中に添加された酢酸 α-トコフェロールと細胞から放出された α-トコフェロール（ビタミン E）の量を個別に解析することができる。このアッセイ系を用いてプロブコールの効果を検証したところ、従来実施していたラジオアイソトープを用いたアッセイ系（J. Nutr. Biochem 2010;21:451-6.）と同様のプロブコールによる細胞外へのビタミン E 放出抑制効果を解析できることを確認している。 平成 28 年度は上述のビタミン E 放出アッセイ系を用いて、ビタミン E 減少効果を有する化合物の探索を行った。本年度 99 種類の化合物のスクリーニングを実施し、培地中のビタミン E 濃度（細胞からのビタミン E の放出量）を 50% 以下に抑制し、かつ細胞生存率を 90% 以上に維持した化合物を 7 種類同定することができた。 本研究計画申請時には、同定した化合物をマウスに投与し、血中ビタミン E 減少効果を検証、また最終的にはマラリア感染実験を行うことを予定していたが、マウスへ試験的に投与できるだけの化合物の生体への毒性・安全性の評価が実施できなかったため、マウスへの投与実験の実施には至らなかった。マウスへの投与実験を行うためには、スクリーニングにて得られた化合物の生体への毒性、安全性を、多種類の細胞を用いた実験等で確認していく必要があり、今後の課題といえる。
研究成果の発表	・平成 25 年 1 月 29 日に共同出願を行った特許「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」は平成 29 年 2 月 3 日付けで特許登録となった（特許第 6083534 号）。 ・本研究計画研究分担者の久米は平成 28 年度に抗マラリア薬として使用されているアルテミシニンとプロブコールの併用で顕著なマラリア感染抑制効果が得られることを Malaria Journal 誌にて発表した（Probucol dramatically enhances dihydroartemisinin effect in murine malaria. Malaria Journal 2016;15:472）。 ・本研究に関する今までの経過および成果を総説として化学と生物誌にて発表した（化学と生物 2016 年 54 巻 5 号 304 - 307 ページ）。 ・カニクイザルへのプロブコール投与によるビタミン E 減少効果に関して日本ビタミン学会第 68 回大会（2016 年 6 月 17 日 富山県）にて口頭発表を行った。また、同内容に関しては論文化し、現在海外誌への投稿を行っている（未受理）。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 5 月 30 日

採択番号			
研究部門	国際連携協力部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	加藤 健太郎
研究課題名	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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	たのくら まさる 田之倉 優	東京大学大学院農学生命科学研究科・教授	
研究分担者	みやかわ たくや 宮川 拓也	東京大学大学院農学生命科学研究科・助教	
	かとう けんたろう 加藤 健太郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・特任准教授	
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	宿主侵入時の初期段階において、原虫は複数の表在タンパク質を使って宿主細胞の標的因子に結合することが知られている。この表在タンパク質と宿主細胞因子の相互作用に関する理解が深まれば、原虫の宿主侵入を抑制する薬剤等の開発につながる可能性がある。本研究は、トキソプラズマ原虫の宿主細胞への侵入初期において重要な表在タンパク質に着目し、それらが宿主細胞因子に結合するための作用機序を構造生物学的アプローチにより解明することを目的とする。		
研究経過の概要	昨年度にトキソプラズマ原虫の表在タンパク質と宿主細胞因子が相互作用することが見出されたため、X 線結晶構造解析に向けて、両者の複合体を調製し、タンパク質結晶化を進めた。また、複合体の構造を安定化させるために、新たな相互作用因子に着目して解析し、複合体の重合度を均一化することに成功した。さらに、複合体タンパク質から結晶形成の分子間接触を妨げるような非構造形成領域をプロテアーゼ処理により削除する工夫をし、トキソプラズマ原虫の宿主細胞認識におけるタンパク質複合体の構造解析を進展させた。		
研究成果の発表	未定		

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 4 月 14 日

採択番号											
研究部門	感染免疫部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄学南								
研究課題名	ヒツジバベシア原虫 <i>Babesia ovis</i> のトランスクリプトーム解析										
研究代表者	(ふりがな) 氏 名 やまぎしじゅんや 山岸潤也	所属部局等・職名・役割分担 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・准教授									
研究分担者	<table border="1"> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr><td></td><td></td></tr> <tr> <td>(原虫研共同研究担当教員名) 玄学南</td><td>帯広畜産大学原虫病研究センター (役割分担) 原虫 RNA の取得・精製</td></tr> </table>									(原虫研共同研究担当教員名) 玄学南	帯広畜産大学原虫病研究センター (役割分担) 原虫 RNA の取得・精製
(原虫研共同研究担当教員名) 玄学南	帯広畜産大学原虫病研究センター (役割分担) 原虫 RNA の取得・精製										
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日										
目的・趣旨	<i>Babesia ovis</i> が引き起こすヒツジバベシア症は、発熱、溶血性貧血、ヘモグロビン尿症、黄疸等の症状を引き起こし、養羊業に多大な経済的被害をもたらす。その分布域は、ベクターである <i>Rhipicephalus</i> 属のマダニが生息する熱帯・亜熱帯のヨーロッパ、アフリカ、アジアと広大である。トルコにおいても当該疾病の被害は甚大であり、抗体陽性率は 32-80%、原虫検出率も 2.6-8.25% と非常に高い。治療にはイミドカルブの有用性が指摘されているが、薬剤耐性原虫の出現が懸念される。有効なワクチンもない。 これまで申請者は、<i>B. gibsoni</i> や <i>B. ovata</i> 等、各種原虫病における、診断、薬剤標的、薬剤耐性出現メカニズム、ワクチン開発の基盤となるゲノム情報の収集・解析・公開を継続的に行ってきた。さらに、平成 27 年度原虫病研究センター共同研究により、<i>Babesia ovis</i> のドラフトゲノム配列を明らかにした。そこで今回、当該原虫の転写産物を RNA-seq 法で解析することで、転写領域および転写量に関する情報の蓄積、および、その利用によるゲノムアノテーションの精緻化を行い、診断、薬剤標的、薬剤耐性出現メカニズム、ワクチン開発に資する情報基盤の提供を試みた。										
研究経過の概要	トルコ共和国国立セルジューク大学の Ferda Sevinc 教授の協力を得て、<i>Babesia ovis</i> 感染ヒツジ末梢血の PAXgene RNA 溶解サンプルを入手した。当該検体から total RNA を精製し、Agilent 社 BioAnalyzer で Quality check を行い、RNAseq 解析に供試するに十分な質を保っていることを確認した。その後、ライブラリーを構築し、イルミナプラットフォーム (Miseq 300 bp paired-end) でシーケンスを行った。 得られた配列を、H27 年度帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究採択課題「ヒツジバベシア原虫 <i>Babesia ovis</i> のゲノム解析」の成果である <i>B. ovis</i> ドラフトゲノム配列に TopHat2 を用いてアライメントした。この結果に基づき、高頻度発現遺伝子とその機能を抽出した。さらに、ゲノム配列と転写産物を比較することで高精度な遺伝子モデルの推定を可能とする tool である AUGUSTUS を用いて遺伝子モデルの更新を行い、新旧の比較を行った。										

受理年月日	受理番号

研究成果の概要	発現量解析の結果、高頻度で発現していた遺伝子を表 1 に示す。機能不明遺伝子の他、ribosomal protein、surface protein D (BoSPD)の高発現が認められた。BoSPD は <i>B. ovis</i> cDNA library から cloning された遺伝子でワクチン標的としての利用が期待されている (Erster O et al., Vet Parasitol. 2015) <table><tr><th>gene</th><th>AA length</th><th>FPKM</th><th>annotation</th></tr><tr><td>Bovis_v01_017_124767.path1.gene4</td><td>139</td><td>48408.8</td><td>hypothetical protein, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_021_100515.path1.gene10</td><td>134</td><td>33510.4</td><td>hypothetical protein, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_003_339620.path1.gene133</td><td>157</td><td>20873.5</td><td>ribosomal protein S27a family protein, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_058_26426.path1.gene1</td><td>265</td><td>20394.6</td><td>hypothetical protein, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_009_214136.path1.gene9</td><td>160</td><td>18025.1</td><td>translation initiation factor 5A, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_038_59623.path1.gene13</td><td>124</td><td>15489.6</td><td>ribosomal protein L35, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_002_340349.path1.gene5</td><td>305</td><td>14706.0</td><td>hypothetical protein, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_020_100570.path1.gene24</td><td>132</td><td>13600.9</td><td>ubiquitin / ribosomal protein CEP52, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_000_530468.path1.gene227</td><td>133</td><td>13307.5</td><td>hypothetical protein, B. bovis</td></tr><tr><td>Bovis_v01_029_75841.path1.gene7</td><td>156</td><td>12209.0</td><td>surface protein D, B. ovis</td></tr></table> 表 1 一方、AUGSUTUS により遺伝子モデル精緻化を図った結果、遺伝子数は 3756 個から 3156 個へ 16%減少したものの、各遺伝子がコードするアミノ酸の平均長が 14%伸び、延べアミノ酸数の減少は 4%にとどまったことから、分断されて推定されていた遺伝子が、AUGSUTUS により統合され、より蓋然性の高い遺伝子モデルが得られた (表 2)。また、新旧アミノ酸配列の比較を行った結果、完全一致が 54%、部分一致が 30%、新たに予想された遺伝子が 16%存在しており、AUGSUTUS による遺伝子モデルの改善効果が示唆された (表 3)。 現在、投稿論文準備中のため、結果の公開は行っていないが、論文受理と合わせて、DDBJ および、研究代表者らが運営する転写特化型のデータベース DataBase of Apicomplexa Transcriptomes (DB-AT) にて、得られた配列および遺伝子アノテーションを公開する予定である。 <table><tr><th></th><th>original</th><th>AUGUSTUS</th></tr><tr><td># of genes</td><td>3756</td><td>3156</td></tr><tr><td>Ave AA length</td><td>464.8</td><td>530.9</td></tr><tr><td>Total AA</td><td>1745916</td><td>1675513</td></tr></table> 表 2 <table><tr><th></th><th># of AUGSTUS genes</th></tr><tr><td>Perfect match</td><td>1709</td></tr><tr><td>Partial match</td><td>954</td></tr><tr><td>Newly identified</td><td>493</td></tr></table> 表 3	gene	AA length	FPKM	annotation	Bovis_v01_017_124767.path1.gene4	139	48408.8	hypothetical protein, B. bovis	Bovis_v01_021_100515.path1.gene10	134	33510.4	hypothetical protein, B. bovis	Bovis_v01_003_339620.path1.gene133	157	20873.5	ribosomal protein S27a family protein, B. bovis	Bovis_v01_058_26426.path1.gene1	265	20394.6	hypothetical protein, B. bovis	Bovis_v01_009_214136.path1.gene9	160	18025.1	translation initiation factor 5A, B. bovis	Bovis_v01_038_59623.path1.gene13	124	15489.6	ribosomal protein L35, B. bovis	Bovis_v01_002_340349.path1.gene5	305	14706.0	hypothetical protein, B. bovis	Bovis_v01_020_100570.path1.gene24	132	13600.9	ubiquitin / ribosomal protein CEP52, B. bovis	Bovis_v01_000_530468.path1.gene227	133	13307.5	hypothetical protein, B. bovis	Bovis_v01_029_75841.path1.gene7	156	12209.0	surface protein D, B. ovis		original	AUGUSTUS	# of genes	3756	3156	Ave AA length	464.8	530.9	Total AA	1745916	1675513		# of AUGSTUS genes	Perfect match	1709	Partial match	954	Newly identified	493
	gene	AA length	FPKM	annotation																																																													
	Bovis_v01_017_124767.path1.gene4	139	48408.8	hypothetical protein, B. bovis																																																													
	Bovis_v01_021_100515.path1.gene10	134	33510.4	hypothetical protein, B. bovis																																																													
	Bovis_v01_003_339620.path1.gene133	157	20873.5	ribosomal protein S27a family protein, B. bovis																																																													
	Bovis_v01_058_26426.path1.gene1	265	20394.6	hypothetical protein, B. bovis																																																													
	Bovis_v01_009_214136.path1.gene9	160	18025.1	translation initiation factor 5A, B. bovis																																																													
	Bovis_v01_038_59623.path1.gene13	124	15489.6	ribosomal protein L35, B. bovis																																																													
	Bovis_v01_002_340349.path1.gene5	305	14706.0	hypothetical protein, B. bovis																																																													
	Bovis_v01_020_100570.path1.gene24	132	13600.9	ubiquitin / ribosomal protein CEP52, B. bovis																																																													
Bovis_v01_000_530468.path1.gene227	133	13307.5	hypothetical protein, B. bovis																																																														
Bovis_v01_029_75841.path1.gene7	156	12209.0	surface protein D, B. ovis																																																														
	original	AUGUSTUS																																																															
# of genes	3756	3156																																																															
Ave AA length	464.8	530.9																																																															
Total AA	1745916	1675513																																																															
	# of AUGSTUS genes																																																																
Perfect match	1709																																																																
Partial match	954																																																																
Newly identified	493																																																																
研究成果の発表	該当事項なし																																																																

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 5 月 23 日

採択番号	28 共同-11		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津信一郎
研究課題名	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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	あさだ まさひと 麻田 正仁	長崎大学熱帯医学研究所・助教・研究の総括、遺伝子組換え原虫作製	
研究分担者	かねこ おさむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・教授・脳性マラリアとの比較考察	
	やはた かずひで 矢幡 一英	長崎大学熱帯医学研究所・助教・細胞接着実験支援	
	はきみ はっさん ハキミ ハッサン	長崎大学熱帯医学研究所・JSPS 外国人特別研究員・遺伝子組換え原虫作製支援	
	河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授・血管内皮細胞接着分子候補の同定及び遺伝子組換え原虫の表現型解析	
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	バベシアはアピコンプレクサ門に属する原虫であり、ウシなど家畜の赤血球内に寄生することで、発熱、貧血、黄疸や血色素尿等の症状を引き起し、時に宿主を死に至らしめる。この中でバベシア・ボビス (Babesia bovis) によって引き起こされるウシのバベシア症では、原虫感染赤血球が毛細血管内皮細胞に接着することで脳毛細血管を栓塞し、神経症状を引き起こす「脳性バベシア症」という特徴的な病態が知られている。このように B. bovis は他のバベシアより高い病原性を示すが、その脳性バベシア症関連分子については ves 遺伝子と呼ばれる多重遺伝子(約 60 個の ves-1α 及び約 30 個の ves-1β が存在)が関わるという報告を除き不明である。我々は B. bovis の脳バベシア症関連分子の比較解析に応用する実験系を確立する目的で、ウシ脳毛細血管内皮細胞に接着する B. bovis 感染赤血球の選抜を試みた。その結果、同細胞に接着性と非接着性の原虫集団が選抜できた。そこで、本研究は脳性バベシア症における原虫感染赤血球接着機構の解明を目的として、比較トランスクリプトーム・プロテオーム解析を行い、細胞接着候補分子を探索し、それらを発現しない、または過剰発現する遺伝子組換え原虫株を作出することで、血管内皮細胞接着に関わる原虫分子を同定することを目的としている。		
研究経過の概要	比較解析に用いるクローンを得るため、ウシ脳毛細血管内皮細胞に接着する B. bovis 株のクローニングを行い、血管内皮細胞接着性の 2 クローン及び、非接着性の 2 クローンを得た。各クローンについて感染赤血球表面分子のプロテオーム解析、RNA-seq におけるトランスクリプトーム解析、電子顕微鏡による観察を行った。一連の解析により、血管内皮細胞接着株において特異的に発現している ves-1α 配列が同定されたため、同分子の過剰発現株の作製に着手した。		

研究成果の
概要

① 血管内皮細胞接着株/非接着株のクローニング

H27 年度に得たウシ脳毛細血管内皮細胞に接着する原虫株についてクローニングを行い、細胞接着性の原虫 2 クローン (C1、C3) 及び血管内皮細胞にほとんど接着しない原虫 2 クローン (C2、C5、以降非接着クローンと呼ぶ) を得た。

② 感染赤血球表面分子のプロテオーム解析

ハキミ博士の外国人特別研究員奨励費にて細胞接着クローン/非接着クローンの感染した赤血球表面をビオチンで標識後に精製して質量分析に供することで、細胞接着クローン特異的に感染赤血球表面に発現している原虫由来タンパク質の同定を行った。細胞接着クローン/非接着株クローンの比較の結果、細胞接着クローンのみで検出されるタンパク質が約 50 種同定された。

③ トランスクリプトーム解析

北海道大学の山岸博士との共同研究にて細胞接着及び非接着原虫各 2 クローンについて RNA-seq 解析を行った。各クローンの *in vitro* 培養原虫から抽出した mRNA を MiSeq にて解析し、各々のサンプルについて約 20 Gb のリード長を得た。細胞接着クローン/非接着クローン間で有意に発現差が見られる遺伝子を検索した結果、約 10 種の遺伝子が同定されたが、いずれも発現差は 2 倍以下と小さかった。一方、*ves* 遺伝子の発現について比較解析したところ、*ves-1β* については 4 クローンともほぼ同じ配列の発現が確認されたのに対し、*ves-1α* については 4 クローンとも異なる配列の発現が確認された。また、*ves* 遺伝子の発現はこれまでの報告の通り、相互排他的であることが示唆された。RNA-seq データの確認のため、それぞれのクローンで発現する *ves-1α* 遺伝子に特異的な配列を基に定量 PCR 用プライマーを設計し逆転写 qPCR を行ったところ、予想通り各クローンで、それぞれに特異的な *ves-1α* 配列が排他的に発現していることが確認された。

④ 電子顕微鏡による観察

細胞接着クローン/非接着クローンの感染する赤血球について熱帯医学研究所の坂口博士の協力を得て、透過型及び走査型電子顕微鏡による観察を行った。観察から、感染赤血球表面に存在し、細胞接着効率に関与すると考えられている Ridge と呼ばれるノブ (Knob) 様の構造の形態と数に、細胞接着クローン/非接着クローン間で明瞭な差は認められなかった。

①～④の解析から、血管内皮細胞接着性には *ves-1α* が関わっていることが示唆されたため、細胞接着クローンで発現している *ves-1α* 配列の過剰発現株の作製に着手した。また、プロテオーム解析とトランスクリプトーム解析の両者において細胞接着クローンのみで発現が亢進している *ves-1α* 以外の分子が無いか精査中である。

研究成果の 発表	国際学会発表 [1] <u>Hakimi H</u>, Miyazaki S, Sakaguchi M, <u>Kaneko O</u>, <u>Asada M</u>. Identification of <i>Babesia bovis</i> proteins expressed on the surface of infected erythrocytes. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2016 年 9 月、兵庫県・淡路市 国内学会発表 [1] 麻田正仁、<u>ハキミ ハッサン</u>、山岸潤也、坂口美亜子、<u>矢幡一英</u>、<u>河津信一郎</u>、<u>金子修</u> <i>Babesia bovis</i>感染赤血球の宿主血管内皮細胞接着機構の解明. 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 2016 年 8 月、北海道・帯広市 [2] <u>Hakimi H</u>, Miyazaki S, Sakaguchi M, <u>Kaneko O</u>, <u>Asada M</u>. Identification of <i>Babesia bovis</i> proteins expressed on the surface of infected erythrocytes. 第 5 回感染症若手フォーラム 2016 年 9 月、兵庫県・淡路市
---------------------	---

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 5 月 10 日

採択番号	28-joint-12		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	井上 昇
研究課題名	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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	むらた としひろ 村田 敏拓	東北薬科大学生薬学教室・助教	
研究分担者	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センタ ー・特任助教	
	いのうえ のぼる 井上 昇	帯広畜産大学 理事・副学長	
	バンズラガチガル Banzragchgarav O.	東北薬科大学生薬学教室・博士課程（後期）大学院生	
	オドンバヤール Odonbayar B.	東北薬科大学生薬学教室・博士課程（後期）大学院生	
研究期間	平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日		
目的・趣旨	モンゴル国では原虫による家畜感染症が基幹産業である畜産に大きな打撃 を与えることから深刻な問題として認識されている。一方でモンゴル国には多 くの薬用植物が自生しており、そのうちのいくつかはヒトばかりでは無く、ウ マやヒツジ、ヤギなどの家畜を対象としたユニークな薬効や原虫病に効果があ ると考えられる内容の伝承を持つことが知られている。モンゴル国に自生する 植物から抗原虫活性物質を見出すことができれば現地の薬用植物資源により 現地の原虫病対策を行うことができると考え、原虫病における予防薬・治療薬 として効果が期待できる化合物を見出すことを目的に本共同研究を進めた。		
研究経過の 概要	特にモンゴル国で感染性疾患や家畜の寄生虫対策などに利用される有用植 物を選定し、エキス化並びに成分探索を行った。各植物について初期分画エキ スや単離した化合物について抗トリパノソーマ (<i>Trypanosoma congolense</i>) 活性並びに抗ピロプラズマ (<i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>B. caballi</i> , <i>Theileria equi</i>) 活性試験による評価を帯広畜産大学原虫病研究センター共同 研究者による活性試験系にて行った。 含有成分の単離・構造決定については本共同研究費によりカラム充填剤や NMR 測定溶媒を購入し、段階的に進めた。またモンゴル国の研究者 (モンゴ ル国立獣医学研究所・モンゴル国立大学)とも応用展開に向けた協議を重ねる ことにより、実地での応用を視野に入れながら研究を進めることができ、次の 成果の概要に挙げる結果を得た。		

研究成果の概要	1. 抗トリパノソーマ (<i>Trypanosoma congolense</i>) 活性を示す <i>Oxytropis lanata</i> 根由来新規オキサゾールアルカロイドを見出した。化学構造と活性との相関を検討したところ、各フェニル基における水酸基の数が鍵となるようであった。(業績：原著論文 1、学会発表 1) 2. 抗トリパノソーマ (<i>Trypanosoma congolense</i>) 活性を示す <i>Brachanthemum gobicum</i> 由来アシル化リグナンを見出した。 3. 抗ピロプラズマ (<i>Babesia bovis</i>, <i>B. bigemina</i>, <i>B. caballi</i>, <i>Theileria equi</i>) 活性を示す <i>Saxifraga spinulosa</i> 由来フラボノイド類を見出した。 平成 28 年度原虫病研究センター共同研究にてご支援いただいたおかげで具体的に論文発表やその準備に至ったほか、今後の研究を進めるにあたり指針となるトリパノソーマやピロプラズマに対して阻害活性を示す薬剤候補物質の化学構造的な特徴が明らかになるなど継続発展的に研究を進める下地が整った。 更に、モンゴル国の問題をモンゴル国資源によって解決することを目指として、これまでも共同研究を進めているモンゴル国立大学バトフー教授 (JICA、M-JEED プロジェクト)、また帯広畜産大学井上理事、菅沼特任助教より紹介いただいたモンゴル国立獣医学研究所のバツェツェグ所長、バツール教授も含め、複数機関による共同研究へと発展を遂げた。このことから現地専門家のサポートと協力を十分に得ながら、実際にモンゴル国薬用植物から原虫対策を行うまでの全体をカバーした強力な共同研究体制となった。
研究成果の発表	<原著論文> 1. Trypanocidal activity of 2,5-diphenyloxazoles isolated from the roots of <i>Oxytropis lanata</i> Banzragchgarav O, Murata T*, Odontuya G, Buyankhishig B, Suganuma K, Davaapurev B, Inoue N, Batkhoo J, Sasaki K, <i>Journal of Natural Products</i>, 79, 2933-2940 (2016) <学会発表> 1. 日本生薬学会第 63 回年会、富山市、2016 年 9 月、要旨集 p.265 演題: <i>Oxytropis lanata</i> 根に含まれる 2,5-diphenyloxazole 類と抗トリパノソーマ活性、発表者: Orkhon Banzragchgarav, ○村田敏拓, Gendarum Odontuya, Buyanbmandakh Buyankhishig, 菅沼啓輔, Bekh-Ochir Davaapurev, 井上昇, Javzan Batkhoo, 佐々木健郎。