

NRCPD2016

原虫病研究センター 年報

平成28年度



帯広畜産大学
Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine



目 次

1. センターの概要	1
①沿革	1
②設置目的等	2
2. 組織等	3
①教員数	3
②技術系職員数	3
③事務系職員数	3
④組織図	4
3. 予算、決算、外部資金等	5
①歳出決算額	5
②研究費総額、研究者 1 人当たりの研究費	5
③科学研究費等の採択状況	6
④その他の外部資金獲得状況	7
4. 研究活動	9
①共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む）	9
②共同研究課題採択一覧	9
③共同利用・共同研究の参加状況	10
④学会誌、学術雑誌、国際会議等に掲載された論文数	11
⑤出版物の発行部数	11
⑥受賞状況	11
⑦研究者を対象とした研究会、シンポジウム等の実施状況	11
5. 国際交流状況	12
①国際シンポジウム等の主催・参加状況	12
②学術国際交流協定の状況	13
③国際的な研究プロジェクトへの参加状況	14
④研究者の海外派遣状況・外国人研究者の招へい状況（延べ人数）	16
⑤その他・国際研究協力活動の状況	16
6. 教育活動・人材養成	17
①大学院生等の受入状況	17
②留学生の受入状況	17
③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数	17
④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧	18

7. 情報発信・広報活動等	20
①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）	20
②定期刊行物やホームページ等による一般社会に対する情報発信の取組	21
8. 分野等の研究活動	22
節足動物衛生工学分野	22
生体防御学分野	26
ゲノム機能学分野	40
高度診断学分野	49
先端予防治療学分野	63
感染病理学分野	68
地球規模感染症学分野	71
国際監視学分野（学内協力教員：グローバルアグロメディシン研究センター）	77
9. 共同研究成果報告書	82
Establishment and field evaluation of sero-diagnostic tools applicable to survey the bovine babesiosis in Vietnam	83
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	87
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	90
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	92
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	95
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	97
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	99
マラリア原虫感染症に関する高脂血症治療薬プロト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	101
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	103
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	104
<i>Babesia bovis</i> 感染赤血球における宿主血管内皮細胞接着機構の解明	106
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	109

1. センターの概要

①沿革

I. 原虫病細胞免疫研究室（1983-1990）

1984 年 4 月 特別施設として「原虫病細胞免疫研究室」が家畜生理学講座（鈴木直義教授）内に新設（原虫病研究センターの前身）

II. 原虫病分子免疫研究センター（1990-2000）

1990 年 6 月 文部省令による学内共同教育研究施設（2000 年 3 月 31 日までの時限施設）として原虫病分子免疫研究センター設置、分子免疫学分野新設

1992 年 4 月 細胞病態生理学分野（客員研究分野）新設

1993 年 6 月 研究棟新設（462 m²）、特殊実験動物室（P1～P3 安全基準完備室）、原虫病原株大量保存室設置

1995 年 4 月 耐病性遺伝子工学分野新設

1997 年 4 月 節足動物衛生工学分野新設

1997 年 11 月 研究棟増設（970 m²）

III. 原虫病研究センター（2000～現在）

2000 年 4 月 全国共同利用施設として原虫病研究センター設立、先端予防治療学分野と高度診断学分野の新設

2002 年 3 月 研究棟増設（1,730 m²）

2002 年 10 月 「21 世紀 COE プログラム」に選定

2003 年 4 月 特定疾病分野、食品有害微生物分野、大動物巡回臨床分野の新設

2005 年 4 月 進化生物学分野、遺伝生化学分野、国際獣医疫学分野の新設

2006 年 3 月 研究棟増設（1,520 m²）

2007 年 6 月 OIE（国際獣疫事務局）リファレンスラボラトリー（ウシバベシア病およびウマピロプラズマ病：五十嵐 郁男、スーラ病：井上 昇）に認定

2008 年 5 月 OIE コラボレーティングセンターに認定（原虫病分野では世界初）

2009 年 6 月 共同利用・共同研究拠点「原虫病制圧に向けた国際的共同研究拠点」に選定

2012 年 11 月 寄付講座「生命平衡科学講座（白寿）」を開設

2013 年 3 月 テニユアトラック普及・定着事業による地球規模感染症学分野の新設

2016 年 4 月 共同利用・共同研究拠点「原虫病制圧に向けた国際的共同研究拠点」に再認定

2017 年 3 月 OIE リファレンスラボラトリーにて、国際規格 ISO/IEC 17025 : 2005 認定を取得

②設置目的等

大 学 名	帯広畜産大学
研 究 所 等 名	原虫病研究センター
所 在 地	北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地
設 置 目 的	我が国の獣医・畜産系大学で唯一の家畜原虫病に関する研究拠点として、大学、OIE などの国際機関ならびに関連省庁との研究連携により、人獣共通感染症としての原虫病の制圧と、動物生産性向上によるタンパク質資源の確保に努め、我が国は勿論、世界人類の健康福祉に学術的貢献をなし得る原虫病に関する総合的研究を推進する事。
研 究 内 容	原虫感染症は、世界的規模でヒトおよび動物に大きな被害を与えているが、細菌やウイルスに比べて、有効な治療薬やワクチンが少なく、その制圧は困難を極めている。本研究センターは、原虫ゲノムの解析や原虫感染に対する免疫反応、および原虫を媒介するダニや蚊等のベクターの生物学的解析を行うことにより、新たな診断、治療、予防法の開発を推進する。
責 任 者	センター長 玄 学 南
共同利用・共同研究拠点施設名	原虫病研究センター
拠 点 の 名 称	原虫病制圧に向けた国際的共同研究拠点

2. 組織等

①教員数

	教 員 数 (単位：人)					
	平成 28 年度 (H28.5.1 現在)					
	現 員 数	女 性 数	外 国 人 数	任期制導入状況		
				任 期 付 教 員 数	女 性 数	外 国 人 数
教 授	6	0	1	0	0	0
准教授	3	0	0	1	0	0
講 師	0	0	0	0	0	0
助 教	1	1	0	1	1	0
助 手	0	0	0	0	0	0
合 計	10	1	1	2	1	0

②技術系職員数

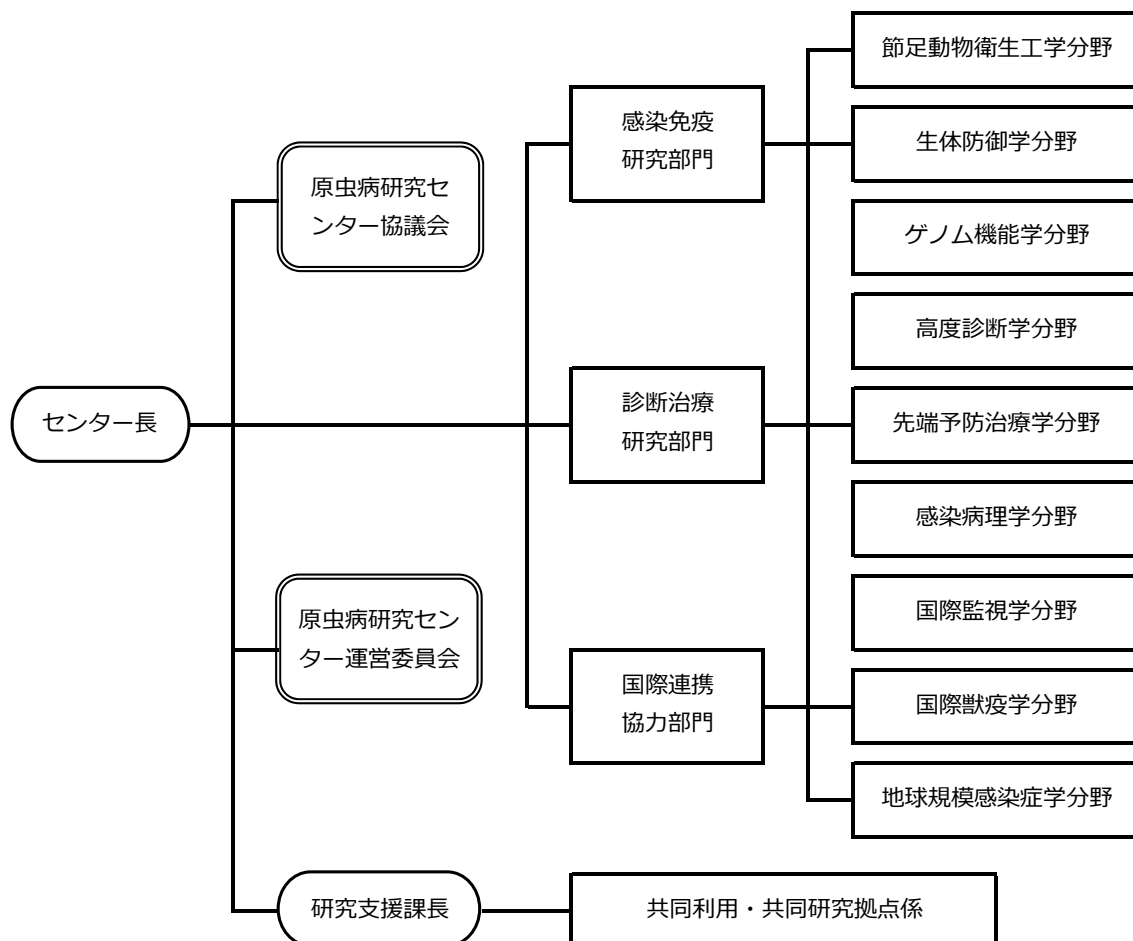
区 分		平成 28 年度 (人)	
技術系職員数		13	
	うち常勤	1	
	うち非常勤	12	

③事務系職員数

区 分		平成 28 年度 (人)	
事務系職員数		6	
	うち常勤	1	
	うち非常勤	5	

④組織図

【平成 28 年度】



3. 予算、決算、外部資金等

①歳出決算額

区 分	平成 28 年度（単位：百万円）	
	決算額	うち運営費交付金
人 件 費	202	153
物 件 費	207	20
計	409	173

②研究費総額、研究者 1 人当たりの研究費

	教員数 (a)	研究費総 額(外部資 金を含む) (b)	研究費総 額(外部資 金を除く) (c)	教員 1 人当 たりの研究 費(外部資金 を含む) (b)/(a)	教員 1 人当 たりの研究 費(外部資金 を除く) (c)/(a)
平成 28 年度 (単位：百万円)	10	364	137	36	14

③科学研究費等の採択状況

研 究 種 目	研究課題番号	新規 継続	職名・代表者	金 額 (直接経費) (単位：千円)
基盤研究 A (海外)	26257417	継続	教授・横山 直明	7,000
基盤研究 B (海外)	26304036	継続	教授・鈴木 宏志	2,700
基盤研究 B (海外)	26304037	継続	准教授・西川 義文	3,100
基盤研究 B (海外)	26304038	継続	准教授・福本 晋也	3,100
新学術領域	15H00891	継続	教授・横山 直明	2,800
新学術領域	15H01306	継続	特任准教授・ 加藤 健太郎	2,300
基盤研究 B (一般)	15H04589	継続	准教授・西川 義文	4,400
挑戦的萌芽研究	15K14862	継続	教授・横山 直明	1,500
挑戦的萌芽研究	15K15118	継続	准教授・西川 義文	1,200
基盤研究 A (海外)	16H02768	新規	教授・五十嵐 郁男	9,600
基盤研究 B (一般)	16H05025	新規	教授・井上 昇	3,000
基盤研究 B (一般)	16H05026	新規	准教授・福本 晋也	6,000
基盤研究 B (一般)	16H05033	新規	教授・横山 直明	5,500
基盤研究 C (特設)	16KT0141	新規	特任准教授・ 加藤 健太郎	1,200
挑戦的萌芽研究	16K15035	新規	准教授・福本 晋也	1,500
若手研究 B	16K18793	新規	特任助教・菅沼 啓輔	1,200
若手研究 B	16K18794	新規	助教・白藤 梨可	1,300

④その他の外部資金獲得状況

予 算 種 目	番 号	新規 継続	職名 ・ 代表者	金 額 (直接経費) (単位：千円)
文部科学省	科学技術人材育成費補助金	継続	原虫病研究センター	16,000
国立研究開発法人 科学技術振興機構	マッチングプランナープログラム	新規	教授・玄 学南	1,310
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構	医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業	継続	特任助教・菅沼 啓輔	3,540
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構	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	新規	准教授・西川 義文	769
国立研究開発法人 日本医療研究開発機構	SATREPS	継続	原虫病研究センター	24,380
農業・食品産業技術総合研究機構	革 新 的 技 術 開 発・緊急展開事業	新規	教授・横山 直明	4,767
農林水産省 農林水産技術会議事務局	レギュラトリーサイエンス新技術開発事業	継続	教授・横山 直明	4,153
独立行政法人 日本学術振興会	二国間交流事業共同研究	継続	教授・河津 信一郎	1,280
独立行政法人 日本学術振興会	二国間交流事業共同研究	継続	教授・横山 直明	2,000
独立行政法人 国際協力機構	ABE イニシアティブ	新規	教授・玄 学南	493
独立行政法人 日本学術振興会	論文博士取得希望者に対する支援事業	新規	教授・鈴木 宏志	1,200
国立大学法人 北海道大学	One Health に貢献する獣医科学グローバルリーダー育成プログラム	新規	教授・横山 直明	500

その他の外部資金獲得状況・続き

予 算 種 目	番 号	新規 継続	職名・代表者	金 額 (直接経費) (単位：千円)
企業 A	共同研究	継続	教授・鈴木 宏志	500
企業 B	共同研究	継続	教授・鈴木 宏志	1,000
企業 C	共同研究	継続	教授・五十嵐 郁男	4,287
GHIT Fund	GHIT Fund	継続	教授・河津 信一郎	39,002
秋山記念生命科学振興財団	秋山記念生命科学振興財団研究助成	新規	助教・白藤 梨可	500
伊藤記念財団	伊藤記念財団研究助成	新規	教授・玄 学南	1,000

4. 研究活動

①共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む）

共同利用・共同研究数（単位：件）	12
うち国際的な共同利用・共同研究数	1
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	1
うち国内での共同利用・共同研究数	11
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	11

②共同研究課題採択一覧

研究代表者	研 究 課 題 名（12件）	センター内 共同研究者
Dinh Thi Bich Lan	Establishment and field evaluation of sero-diagnostic tools applicable to survey the bovine babesiosis in Vietnam	横山 直明
猪熊 壽	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	横山 直明
二瓶 浩一	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	西川 義文
石山 亜紀	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	五十嵐 郁男
秋田 英万	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	西川 義文
関 まどか	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	西川 義文
正谷 達膳	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	玄 学南
七里 元督	マラリア原虫感染症に関する高脂血症治療薬プロト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	鈴木 宏志
田之倉 優	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	加藤 健太郎
山岸 潤也	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	玄 学南
麻田 正仁	<i>Babesia bovis</i> 感染赤血球における宿主血管内皮細胞接着機構の解明	河津 信一郎
村田 敏拓	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	井上 昇

③共同利用・共同研究の参加状況

区 分	平成 28 年度（単位：人）								
	機関数	受入人数				延べ人数			
			外国人	若手研究者(35 歳以下)	大学院生		外国人	若手研究者(35 歳以下)	大学院生
学 内 (法人内)	7	61 (26)	30 (10)	55 (22)	23 (9)	1499 (688)	524 (198)	1290 (651)	653 (314)
国立大学	15	42 (8)	5 (1)	19 (5)	1 (0)	88 (16)	9 (4)	60 (13)	12 (0)
公立大学	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
私立大学	4	9 (3)	1 (1)	6 (2)	1 (1)	57 (26)	24 (24)	51 (25)	24 (24)
大学共同利 用機関法人	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
独立行政法 人等公的研 究機関	26	66 (15)	1 (1)	6 (3)	0 (0)	84 (16)	1 (1)	8 (4)	0 (0)
民間機関	16	36 (5)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	38 (5)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
外国機関	31	54 (25)	54 (25)	19 (9)	0 (0)	668 (363)	668 (363)	472 (239)	0 (0)
その他	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	99	268 (82)	91 (38)	106 (42)	25 (10)	2434 (1114)	1226 (590)	1882 (933)	689 (338)

※下段には女性研究者数（内数）

④学会誌、学術雑誌、国際会議等に掲載された論文数

区 分		平成 28 年度	
論 文 数		77	
うち国際学術誌に掲載された論文数		77	

⑤出版物の発行部数

出 版 物 の 名 称	発 行 部 数
The Journal of Protozoology Research	224

⑥受賞状況

受賞者氏名	賞 名	受賞年月	受賞対象となった研究課題名等
西川 義文	2016-2017 年度日本獣医学会賞	H28 年 9 月	ネオスポラ症の病態発生機序と防御法に関する研究
猪原 史成	第 7 回 獣医寄生虫学奨励賞	H28 年 9 月	トキソプラズマ感染によるマウスの恐怖記憶固定の障害は大脳皮質および扁桃核における機能異常が引き起こす

⑦研究者を対象とした研究会、シンポジウム等の実施状況

シンポジウム		講演会 セミナー		研 究 会 ワークショップ		そ の 他		合 計	
件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数
0	0	11	226	3	120	7	298	21	644

5. 国際交流状況

①国際シンポジウム等の主催・参加状況

(1)主催状況

区 分	平成 28 年度		
主催件数	6		
主催した主な国際シンポジウム等			
	開催時期	国 際 シ ン ポ ジ ウ ム 等 名 称	参 加 人 数 (うち外国人数)
1	H28.7.20	帯広畜産大学テニユアトラック研究成果発表会	48 (17)
2	H28.8.21 ～8.24	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	58 (1)
3	H28.11.20	上海獣医学研究所との共同研究セミナー	15 (13)
4	H29.2.20	The 2nd International Conference on the Control Measure of Neglected Tropical Diseases	35 (15)
5	H29.3.1	原虫病研究センター共同研究成果報告会	14 (4)
6	H29.3.7 ～3.8	国際獣疫対策に関する本邦招へいプログラム（JICA 事業）	58 (36)

(2)参加状況

区 分	平成 28 年度		
参加件数	12		
参加した主な国際シンポジウム等			
	開催時期	国 際 シ ン ポ ジ ウ ム 等 名 称	参 加 人 数
1	H28.7.17 ～7.19	2016 SSR Annual Meeting in San Diego	2
2	H28.9.11 ～9.12	プラズマ医療科学の合同海外ワークショップ	1
3	H28.12.7 ～12.9	Joint International Tropical Medicine Meeting 2016	1
4	H28.12.15 ～12.16	1st International Conference on Non Tsetse Transmitted Animal Trypanosomosis	1
5	H29.3.19 ～3.21	Molecular helminthology conference	1

②学術国際交流協定の状況

(1)部局間学術交流協定

協定総数	3						
締結年月	終了予定年月	相手国	機 関 名	協 定 名	分 野	受入人数	派遣人数
平成 20 年 11 月	平成 30 年 11 月	フィリピン	フィリピン大学マニラ校公衆衛生学部	部局間学術交流協定	原虫病	1	7
平成 22 年 9 月	平成 32 年 9 月	中国	中国農業科学院上海獣医学研究所	部局間学術交流協定	原虫病	3	0
平成 23 年 9 月	平成 33 年 9 月	中国	延辺大学	部局間学術交流協定	原虫病	0	2
合 計						4	9

(2)合意覚書

協定総数	9						
締結年月	終了予定年月	相手国	機 関 名	協 定 名	分 野	受入人数	派遣人数
平成 26 年 5 月	平成 30 年 5 月	スリランカ	スリランカ獣医学研究所	合意覚書	原虫病	4	5
平成 26 年 5 月	平成 30 年 5 月	タイ	ラジャマンガラ大学獣医学部	合意覚書	原虫病	4	1
平成 27 年 10 月	平成 30 年 10 月	インドネシア	サムラトランギ大学	合意覚書	原虫病	3	2
平成 27 年 12 月	平成 32 年 12 月	ケニア	ナイロビ大学	合意覚書	原虫病	2	0
平成 27 年 12 月	平成 32 年 12 月	ウガンダ	マケレレ大学	合意覚書	原虫病	3	0
平成 28 年 3 月	平成 31 年 3 月	フィリピン	フィリピン大学・セブ校	合意覚書	原虫病	0	0
平成 28 年 6 月	平成 33 年 6 月	ブルキナファソ	ワガドゥーグー大学	合意覚書	原虫病	1	2
平成 29 年 2 月	平成 34 年 2 月	南アフリカ	ノースウェスト大学	合意覚書	原虫病	3	3
平成 29 年 2 月	平成 34 年 2 月	エジプト	マンスーラ大学	合意覚書	原虫病	0	0
合 計						20	13

③国際的な研究プロジェクトへの参加状況

総 数	4		
参加期間	相手国・研究機関名	研究プロジェクト等の概要	関係研究者名
H25 年から 6 年間	モンゴル・獣医学研究所	プロジェクト名：AMED/JICA SATREPS 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 プロジェクト概要：トリパノソーマ病やピロプラズマ病等、多くの家畜原虫病は持続感染して慢性的に家畜の健康状態を悪化させる。国民の多くが畜産業に従事するモンゴルでは、特に深刻な問題となっている。本研究では、トリパノソーマ、ピロプラズマ野生株とそれらを媒介するマダニの分布マップ作成、原虫野生株の抗原遺伝子解析に基づく簡便で迅速な診断キットを開発、そして今後の感染対策に備えた研究資源の確保を目標としている。 参加国：日本・モンゴル 予算見込み額・3 億円	井上 昇 横山 直明 五十嵐 慎 西川 義文 福本 晋也 加藤 健太郎 白藤 梨可 鈴木 宏志
H26 年から 4 年間	アフリカ諸国 ケニア・ナイロビ大学 ウガンダ・マケレレ大学 ブルキナファソ・公衆衛生研究所 南アフリカ・ノースウェスト大学	プロジェクト名：基盤 B 海外学術・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 アフリカ大陸は、世界中で飢餓人口が最も多い地域である。家畜の生産性の向上を図ることはこの地域における飢餓対策として重要な位置を占める。この地域における種々の感染症は、家畜の生産性向上を妨げる最も重要な要因の一つとされる。とりわけ、マダニ媒介性原虫感染症による被害は深刻とされ、その実態解明が喫緊の急務となっている。そこで本研究では、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を目指して企画した。具体的達成目標として、1) アフリカ諸国における広範囲な実地疫学調査の実施、2) 現地に適した簡易・迅速診断法の開発、3) 現地に適した予防対策の確立、4) 関連検疫機関への適切な助言の提供等を掲げている。 参加国：日本・ケニア・ウガンダ・ブルキナファソ・南アフリカ 予算見込み額・1428 万円	鈴木 宏志 玄 学南 白藤 梨可

参加期間	相手国・研究機関名	研究プロジェクト等の概要	関係研究者名
H26 年から 4 年間	スリランカ・獣医学研究所 タイ・国立動物科学研究所 ベトナム・フエ大学/ フエ農林大学 フィリピン・ビサヤス州立大学	プロジェクト名：科研費基盤 A（海外学術調査）・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 牛バベシア原虫（ <i>Babesia bovis</i> ）は、病原性の高い牛の赤血球内寄生性原虫である。MSA-1 などの <i>B. bovis</i> 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る。本研究では、アジアの msa-1 遺伝子型に対する伝子型特異的 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する。これらのデータに基づいて、牛ピロプラズマ症に対する有効な制圧方法を確立する。 参加国：日本・スリランカ・タイ・ベトナム・フィリピン 予算見込み額・4290 万円	横山 直明 井上 昇
H28 年から 3 年間	アジア、 アフリカ、 欧米諸国	プロジェクト名：基盤 A 海外学術・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 プロジェクト概要：ピロプラズマ病は、バベシアおよびタイレリアが宿主動物の赤血球に寄生して発熱、貧血、黄疸を引き起こし、世界的に家畜に大きな被害を与えている原虫症である。研究代表者らは、ピロプラズマ病に対する感度、特性、簡便性などに優れた血清診断法（ELISA, ICT）や遺伝子診断法（PCR, LAMP）を世界に先駆けて開発してきた。今回、海外の大学や研究所と連携してこれらの診断法の国際的な評価（リングトライアル）を行い、国際獣疫事務局（OIE）の標準法としての認定を目指す。更にこれらの情報を基盤に精度の高い国際的疫学データベースを構築し、ピロプラズマ病に対する日本の検疫体制の強化と国際的なピロプラズマ病対策の確立に貢献する事を目的とする。 参加国：日本・タイ、モンゴル、インド、英国、カナダ、米国、メキシコ、アルゼンチン、南アフリカ 予算見込み額・2740 万円	五十嵐郁男 横山直明

④研究者の海外派遣状況・外国人研究者の招へい状況（延べ人数）

		平成 28 年度	
		派遣状況	招へい状況
事業区分	合 計	54	50
	文部科学省事業	0	0
	日本学術振興会事業	24	7
	当該法人による事業	22	11
	その他の事業	8	32
派遣先国	①アジア	29	32
	②北米	8	0
	③中南米	2	3
	④ヨーロッパ	6	3
	⑤オセアニア	2	0
	⑥中東	0	2
	⑦アフリカ	7	15

⑤その他・国際研究協力活動の状況

事業名等	概 要	受入 人数	派遣 人数
JICA 国別研修コース	平成 28 年度原虫病及び食品媒介感染症上級専門家育成コース	1	0
SATREPS	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	5	5
合 計		6	5

6. 教育活動・人材養成

①大学院生等の受入状況

区 分	平成 28 年度	
		うち外国人
博士後期課程	13	13
うち社会人 DC	0	0
修士・博士前期課程	7	3
うち社会人 MC	0	0
学 部 生	19	0
合 計	39	16

②留学生の受入状況

区 分	平成 28 年度
①アジア	16
②北米	0
③中南米	0
④ヨーロッパ	1
⑤オセアニア	0
⑥中東	3
⑦アフリカ	4
合 計	24

③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数

区 分	平成 28 年度	
	学内	学外
博士号取得者数	4	2

④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧

1	専攻分野名	家畜環境衛生学	学位授与 年月日	28 年 9 月 30 日
	氏 名	ジラパタラセ チャルンラ JIRAPATTHARASATE Charoonluk (タイ)	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Molecular epidemiologic analysis of tick-borne protozoandiseases of beef cattle from different regions of Thailand.		
	日本語訳	タイの異なる地域における肉牛のマダニ媒介原虫感染症に対する分子疫学調査		
2	専攻分野名	家畜環境衛生学	学位授与 年月日	28 年 9 月 30 日
	氏 名	モエンデグ カリゼル ハールディン MOENDEG Kharleezelle Jardin (フィリピン)	担当教員	河津信一郎 玄 学南
	学位論文 の題名	Diagnostic and microsatellite studies of Schistosoma japonicum in humans and animal reservoir hosts.		
	日本語訳	患者及び保虫宿主を対象とした日本住血吸虫症診断法の開発と寄生虫マイクロサテライト解析に関する研究		
3	専攻分野名	家畜環境衛生学	学位授与 年月日	29 年 3 月 17 日
	氏 名	ラガブ マクロフ Ragab Makhlof Mahmoud Fereig (エジプト)	担当教員	西川義文
	学位論文 の題名	Serosurveillance and vaccine development as a strategy for control of Toxoplasma infection.		
	日本語訳	トキソプラズマ感染に対する制御方法の開発に向けた血清学的調査とワクチン開発		
4	専攻分野名	家畜環境衛生学	学位授与 年月日	29 年 3 月 17 日
	氏 名	ムシングジ サイモン ピーター Musinguzi Simon Peter (ウガンダ)	担当教員	井上 昇 玄 学南
	学位論文 の題名	Molecular epidemiological studies on trypanosomosis and piroplasmosis among livestock in southern Africa and central Asia.		
	日本語訳	南部アフリカおよび中央アジアにおけるトリパノソーマ症およびピロプラズマ症の分子疫学調査		

5	専攻分野名	岐阜大学大学院連合獣医学研究科	学位授与 年月日	29 年 3 月 13 日
	氏 名	猪原 史成	担当教員	西川義文 横山直明
	学位論文 の題名	Studies on Behavioral and Brain Pathological Changes in Mice Caused by Toxoplasma gondii and Neospora caninum Infections of the Central Nervous System.		
	日本語訳	トキソプラズマおよびネオスポラの中樞神経系への感染によるマウスの行動変化と脳病態に関する研究		
6	専攻分野名	岐阜大学大学院連合獣医学研究科	学位授与 年月日	29 年 3 月 13 日
	氏 名	山崎 詩乃	担当教員	井上 昇 横山直明
	学位論文 の題名	Study on the Developmental Stage-specific Cell Surface Protein of African Trypanosomes.		
	日本語訳	アフリカトリパノソーマ発育段階特異的細胞表面タンパク質に関する研究		

7. 情報発信・広報活動等

①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）

シンポジウム・講演会		公開講座・セミナー		そ の 他 (施設等の一般公開等)		合 計	
件 数	参加人数	件 数	参加人数	件 数	参加人数	件 数	参加人数
3	56	15	518	3	70	21	644
○主なシンポジウム、公開講演会、施設等の一般公開の開催状況							
開催期間	形態 (区分)	対象	公開講座等名称	概 要		参加 人数	
H28.6.17	講演会	国際	原虫病研究センター特別 講義（畜産衛生学） 日本の食品安全行政 （Activities of Food Safety Commission of Japan） 見上彪（元食品安全委員 会委員長）	招聘講師による学部生、大学 院、若手研究者を対象とした 講演会		20	
H28.6.20	セミナー	国際	原虫病研究センターセミ ナー Major tick-borne diseases of animals in Turkey, and veterinary education system in the country Dr. Ferda Sevinc （Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Turkey）	JSPS 短期招へい教授による 特別セミナー		20	
H28.7.8	セミナー	国際	原虫病研究センターJICA セミナー 感染症ワクチンの原理と 応用（Vaccine for infectious diseases: Principle and Application） 新川 武教授（琉球大学医 学部・熱帯生物圏研究セ ンター）	招聘講師による JICA 研修生、 学部生、大学院、若手研究者 を対象としたセミナー		29	

H28.8.24	講演会	国際	原虫病研究センター特別講義（畜産衛生学） Tropical Diseases with Global Endemicity 狩野繁之（国立国際医療研究センター研究所・熱帯医学マラリア研究部長）	招聘講師による学部生、大学院、若手研究者を対象とした講演会	20
H28.9.20	講演会	国際	畜産衛生学特別講義 Prevalence and control of vector-borne diseases of domestic anima in Thailand Dr. Saruda Tiwananthagorn (Assistant Professor, Chiang Mai University, Thailand)	招聘講師による学部生、大学院、若手研究者を対象とした講演会	16

② 定期刊行物やホームページによる一般社会に対する情報発信の取組

情報発信の手段・手法	概要およびわかりやすい情報発信のための工夫
ホームページ	定期的に更新し、国内外への情報発信に積極的に努めている。 http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html
ホームページ等	センターの Facebook を開設し、研究成果等の情報を公開するとともに、研究者コミュニティーや一般からのレスポンス把握に利用している。
パンフレットの作成	原虫病研究センター2016 年度版英文パンフレットを作成し、学内外の関係機関宛に送付した。また、すでに作成済みの 日本語版パンフレットとともにセンター来所者へ配布、帯広畜産大学本部棟正面玄関および地域の方々等の学外者も利用可能な学内施設「帯広畜産大学附属図書館」、「帯広畜産大学かしわプラザ」に設置し、自由配布している。

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、地元で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ビオティック・アビ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性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. Musunguzi 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

◆-----准教授 西 川 義 文
(Yoshifumi Nishikawa)

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ン (Peroxiredoxin) 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 Peroxiredoxin 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, Aboge 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, Sodirun, 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ー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。「改訂獣医生化学」、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 年度病原虫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, Jirapaththarasate 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, Jirapaththarasate 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, Jirapaththarasate 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, Jirapaththarasate 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

◆-----助教 白 藤 梨 可
(Rika Umemiya-Shirafuji)

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。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, Aboe 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, Ah Yong 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, 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(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

◆-----教授 横山 直明
(Naoaki Yokoyama)

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, Chindaoudomsate 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, Narraidoo 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, Abia 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 dipyridamole 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. Musunguzi 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

◆-----教授 河 津 信 一 郎
(Shin-ichiro Kawazu)

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jing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

◆-----教授 五十嵐 慎
(Makoto Igarashi)

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

◆-----特任准教授 加藤 健太郎
(Kentaro Kato)

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にしました。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

◆-----特任助教 菅 沼 啓 輔
(Keisuke Suganuma)

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ボ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, Batkhui 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, Jąkowski 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、北澤：「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嬌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

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 苺 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

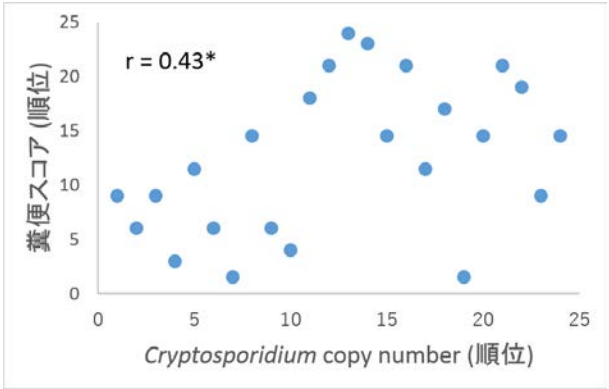
採択番号	6		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川義文
研究課題名	環境応答性脂質様物質からなる DNA 搭載ナノ粒子の 原虫予防ワクチンへの応用		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名 あきた ひでたか 秋田 英万	所属部局等・職名 千葉大学大学院薬学研究院薬物学研究室・教授	
研究分担者	にしかわ よしふみ 西川 義文		
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	DNA ワクチンは、抗原をコードする DNA を用いて、抗原特異的免疫を誘導するワクチン技術である。本技術では、抗原が細胞質に発現する事から、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 (Toxoplasma gondii) 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28年4月1日 ～ 平成29年3月31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使用される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><th></th><th># of AUGSTUS genes</th></tr><tr><td># of genes</td><td>3756</td><td>3156</td><td>Perfect match</td><td>1709</td></tr><tr><td>Ave AA length</td><td>464.8</td><td>530.9</td><td>Partial match</td><td>954</td></tr><tr><td>Total AA</td><td>1745916</td><td>1675513</td><td>Newly identified</td><td>493</td></tr></table> 表 2 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 AUGSTUS genes	# of genes	3756	3156	Perfect match	1709	Ave AA length	464.8	530.9	Partial match	954	Total AA	1745916	1675513	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 AUGSTUS genes																																																													
# of genes	3756	3156	Perfect match	1709																																																													
Ave AA length	464.8	530.9	Partial match	954																																																													
Total AA	1745916	1675513	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。