

9. 共同研究成果報告書

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 30 年 5 月 22 日

採択番号	29 共同-1		
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	白藤 梨可
研究課題名	マダニから分離した <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の微生物学的特性解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なかお りょう 中尾 亮	北海道大学大学院獣医学研究院・准教授	
研究分担者	めい じゅん つー May June Thu	北海道大学大学人獣共通感染症リサーチセンター・ 大学院生	
	かきさか けいた 柿阪 圭太	北海道大学獣医学部・学部学生	
	まつお かい 松尾 權	北海道大学獣医学部・学部学生	
	しらふじ りか 白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教	
研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マダニは様々な微生物を保有し、その一部は共生体としてマダニに持続感染することでマダニの生理活動にとって重要な役割を持つことが知られつつある。研究代表者らは、国内外のマダニが保有する共生菌の分離を進めており、これまでに複数株のマダニに共生する <i>Spiroplasma</i> 属細菌の分離培養に成功している。ショウジョウバエ等に共生する <i>Spiroplasma</i> 属細菌では、子孫の性比決定や病原体(寄生性線虫、カビなど)に対する抵抗性に関与することが知られているが、マダニに共生する <i>Spiroplasma</i> 属細菌の役割は全く解析されていない。そこで、本共同研究では <i>Spiroplasma</i> 属共生菌がマダニの生理活動において何らかの役割を持つとの仮説を立て、実験室維持フタトゲチマダニを用いて <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の微生物学的特性を明らかにすることを計画した。		
研究経過の概要	北海道で採集されたシュルツェマダニ (<i>Ixodes persulcatus</i>) からマダニ細胞を用いて分離した <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を SP-4 無細胞培地で培養した。2種類の共生菌接種群(A 群:6.3×10 ⁶ 菌体/匹接種、B 群:6.3×10 ⁸ 菌体/匹接種)と滅菌水接種群および SP-4 培地接種群を4系統の実験群を準備し、フタトゲチマダニ(原虫研累代飼育株)成ダニおよび若ダニへ、電動マイクロインジェクターを用いて接種した。接種後のマダニはウサギを用いた吸血に供し、成ダニについては飽血後体重、孵化率を算出し、若ダニでは脱皮率を観察した。さらに、卵および脱皮後の成ダニから DNA を抽出し、 <i>Spiroplasma</i> 属共生菌および、 <i>Coxiella</i> 属共生菌の感染有無をリアルタイム PCR および PCR を用いて評価した。		

研究成果の 概 要	◆ <i>Spiroplasma</i> 属共生菌のマダニへの実験的導入に初めて成功◆ <i>Ixodes</i> 属マダニから分離された <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を <i>Haemaphysalis</i> 属のフタトゲチマダニ成ダニおよび若ダニに接種した。その後、ウサギを用いたマダニ吸血試験を行い、成ダニ、卵、および孵化幼ダニを得た。Real-time PCR により検査したところ、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌がフタトゲチマダニにおいて介卵および経發育期伝播することを明らかにした。マダニにおいて、異種マダニの共生菌の人為的な導入に成功した例はこれまで報告されておらず、マダニと共生菌の関係を解析するために有用なモデルの作出に成功した。 ◆ <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の全ゲノムを解読◆ SP-4 培地で培養した菌体を材料に、ゲノム DNA を抽出し Illumina MiSeq を用いてゲノム解析を行なった。全長約 1.2 Mb の全ゲノム配列を取得し、アノテーションにより 1856 個の遺伝子コーディング領域、3 個の rRNA、32 個の tRNA を同定した。ANI 法による菌種同定の結果、米国で報告された <i>Spiroplasma mirum</i> と近縁であることを明らかにした。マダニ由来 <i>Spiroplasma</i> 属共生菌のゲノムとしては2例目の報告であり、今後比較ゲノム解析により、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌の進化および節足動物への適応過程の解明に有用な情報を得た。 ◆ <i>Coxiella</i> 属共生菌が産卵および孵化に重要であることを発見◆ SP-4 培地接種群で産卵重量の低下、幼ダニ孵化率の低下が観察された。孵化前後の卵において <i>Coxiella</i> 属共生菌の保有状況を検査したところ、滅菌水接種群では 100% の <i>Coxiella</i> 属共生菌保有率を示した。一方で、SP-4 培地接種群では、卵で 55-80% の <i>Coxiella</i> 属共生菌保有率を示し、孵化した幼ダニ(卵全体の約 10%)では 100%の保有率を示した。このことから、SP-4 培地に含まれる抗生物質により、<i>Coxiella</i> 属共生菌が死滅したことが推察される。一方で、本結果は、<i>Coxiella</i> 属共生菌が卵産生および幼ダニの孵化において重要な役割を持つことを意味している。これまで、マダニに共生する <i>Coxiella</i> 属共生菌の役割はビタミン B 類の生合成のみが知られていた。当該研究成果により、<i>Coxiella</i> 属共生菌のマダニに対する新たな役割が提示され、共生菌とマダニの関わりを理解する上で重要な知見を得た。
研究成果の 発 表	【学会発表】 柿阪圭太、中尾 亮、May June Thu、邱 永晋、杉本千尋、片倉 賢. マダニから分離されたスピロプラズマの全ゲノム解析. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 2017 年 9 月 14 日. 鹿児島大学(鹿児島市).

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 30 年 5 月 25 日

採択番号	29-共同-2		
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	
	やはた かずひで 矢幡 一英	長崎大学熱帯医学研究所・助教	
	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	
	河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	Babesia bovis によるウシのバベシア症では原虫感染赤血球が宿主の脳毛細血管に栓塞することで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が、その分子機構については殆ど分かっていない。この病態のメカニズムを解析するツールとして、私達はこれまでに、感染赤血球がウシ脳毛細血管内皮細胞に接着する原虫株と接着しない原虫株を樹立し、接着株、非接着株間でトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を行い、接着に関わる候補分子を絞り込んだ(H28 年度共同研究)。今年度の研究では得られた候補分子について遺伝子改変技術を用いて過剰発現ないしノックアウトを行う事により細胞接着に関わる表現型を解析し、原虫側のリガンドを同定する事を目的としている。		
研究経過の概要	H28 年度共同研究:比較解析に利用する実験系を確立するため、ウシ脳毛細血管内皮細胞を用いて B. bovis 感染赤血球のパンニングアッセイを行い、血管内皮細胞接着性の原虫集団を得た。これらについて RNA-seq 解析を行ったところ、ves を除く他の遺伝子の転写量差は 2 倍以下と小さいことが明らかとなった。 H29 年度共同研究:そこで、今年度は ves 遺伝子の発現について精査を行った。その結果、各クローン間で発現する ves-1α の配列に違いが見られることが明らかとなった。ves-1α 配列についてはその後プライマーウォーキング法にて配列を確認すると共に、各クローンで予想された ves-1α 配列が特異的に発現していることを定量的 RT・PCR 法で確認した。さらに高接着性クローンで発現している VESA1α を過発現する原虫株を作製し、間接蛍光抗体法にて過発現を確認した。VESA1α 過発現原虫株を用い接着試験を行ったが、高接着性クローン、VESA1α 過発現原虫株とも血管内皮細胞に接着が見られず、初代培養細胞である血管内皮細胞に問題があると考え、現在再試験中である。		

研究成果の概要	①トランスクリプトーム解析 H28年度に北海道大学の山岸博士と行った細胞高接着及び低接着原虫各2クローンについての比較トランスクリプトーム解析について精査を行った。その結果、<i>ves</i> 遺伝子以外に10の遺伝子についてクローン間で有意な転写量の差が見られた。しかしながら、これら10遺伝子の転写量の差は2倍以下と小さかった。一方、<i>ves</i> 遺伝子についてはゲノム上に複数ある<i>ves</i>遺伝子の配列が互いに組換わることで、実際に発現する遺伝子の多様性が確保されていることが知られている。そこで、RNA-seq データから各クローンで発現している<i>ves</i> 遺伝子の配列を推測したところ、4クローン間で発現する<i>ves-1α</i>配列が互いに異なる事が明らかとなった。また、この遺伝子ではクローン間で配列が異なる領域が2つあり、それらの比較から、ゲノム上の同じ遺伝子座の配列の一部領域が組換わったことが示唆された。一方、興味深いことに、これら4クローン間では<i>ves-1β</i>配列はほぼ同一の配列が発現していることが明らかとなり、<i>ves-1β</i>ではなく<i>ves-1α</i>配列の違いが細胞接着性の違いに関わる事が示唆された。 ②<i>ves-1α</i>の配列同定及び発現解析 トランスクリプトーム解析から<i>ves-1α</i>のORF領域全長配列が推定されたため、各クローンのゲノム上でVESA1αの発現に使われていると予想される<i>ves-1α</i>遺伝子座ORFの全長配列をプライマーウォーキング法にて決定した。その結果、RNA-seqのデータから推定した配列とほぼ同じ配列がゲノム上でも同定された。また、各クローンではその<i>ves-1α</i>配列が特異的に発現していることも定量的RT-PCR法で確認した。 ③<i>ves-1</i>過発現原虫の作製 細胞接着クローンで発現している<i>ves-1</i>配列を過発現させるプラスミドコンストラクトを作製し、非接着原虫クローンに導入した。トランスクリプトーム解析からは<i>ves-1α</i>のみに違いが見られたが、VESAタンパク質はVESA1αとVESA1βがヘテロダイマーを形成するため、<i>ves-1α</i>と<i>ves-1β</i>両方の過発現コンストラクトを作製した。まず、GFPタグを付加したVESA1α過発現プラスミドコンストラクトをゲノムに挿入する形で、またmCherryタグを付加したVESA1β過発現プラスミドをエピソーム型でそれぞれ遺伝子導入した。その結果、遺伝子組換え原虫株において、ライブイメージング解析ではどちらの蛍光も観察されなかったが、mCherry抗体を用いた間接蛍光抗体法にてタグ付きVESA1βの発現のみが感染赤血球細胞膜近傍で確認された。次にVESA1α過発現プラスミドコンストラクトをエピソーム型で遺伝子導入したところ、抗GFP抗体を用いた間接蛍光抗体法にて赤血球細胞膜近傍における融合タンパク質の発現が確認された。得られたVESA1α過発現原虫株を用いて血管内皮細胞接着性の変化を調べたが、血管内皮細胞への接着性が観察できずVESA1α過発現による表現型の変化を検証できなかった。一方、この実験系では、陽性対照として用いた細胞高接着性の原虫クローンにおいても細胞接着が観察できなかったことから、現在、初代培養細胞である血管内皮細胞の表現型が継代培養により変化したと考え、新たな血管内皮細胞株を導入し、再試験中である。
---------	---

研究成果の 発 表	<u>国際学会発表</u> [1] ○Hakimi H, Yamagishi J, Sakaguchi M, Kaneko O, Asada M. <i>ves1 a</i> genes expression is correlated with cytoadhesion of Babesia bovis to endothelial cell. The 28th Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory (Woods Hole, MA, USA), 2017 <u>国内学会発表</u> [1] ○麻田正仁、ハキミハッサン、山岸潤也、坂口美亜子、矢幡一英、河津信一郎、金子修, Babesia bovis 寄生赤血球のウシ脳毛細血管内皮細胞への接着性に関する <i>ves-1 α</i> 遺伝子配列, 第 25 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, 帯広畜産大学, 2017
----------------------	--

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成30年4月18日

採択番号	29-共同-3		
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	玄 学南
研究課題名	フタトゲチマダニのドラフトゲノム解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名・役割分担	
	やまぎしじゅんや 山岸 潤也	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授 (役割分担)シーケンシング、バイオインフォ解析	
研究分担者	しらふじ りか 白藤 梨可	帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教 (役割分担)フタトゲチマダニ試料提供	
	(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・教授 (役割分担)試料提供・研究助言	
研究期間	平成29年4月1日 ～ 平成30年3月31日		
目的・趣旨	マダニ類は、吸血自体による不快感・障害に加え、様々な感染症を媒介し疾病を引き起こすベクターとしても軽視することのできない衛生害虫である。しかしながら、世界的に見ても、そのゲノム解析は十分に進められていないのが実態である。ここで、帯広畜産大学・原虫病研究センターでは、国内優占種の1つであるフタトゲチマダニのコロニーが維持されている。そこで、このフタトゲチマダニのゲノム解析を試みる。これは、今後、他のマダニゲノム解析を行う際に生じるであろう種々の困難の洗い出しと解決のためのノウハウ取得を見すえたパイロット研究としての位置づけも含む。		
研究経過の概要	フタトゲチマダニのドラフトゲノムを得るために、1)研究分担者の白藤博士よりフタトゲチマダニより精製したゲノム DNA の供与を受け、2)外注(ケミカル同仁社が提供する”GeneNex”)により次世代シーケンスを行い、3)k-mer 法によりゲノムサイズを推定し、4)各種アセンブラー(ABYSS、および、platanus)により contig を得た。 しかしながら、当初 <i>Ixodes scapularis</i> と同程度(2.1 Gb)と想定していたゲノムサイズは、k-mer 法による推定では 8.3-8.8Gb と、想定を大きく超えることが示唆された。そのため、今回取得した総塩基数 142Gb では 17.2 倍のカバレッジにしかならず、十分な長さの contig の取得が難しいことが予想された。実際に、ABYSS を用いてアセンブルを試みたが、得られたゲノムは、最も良い成績でも総塩基 6.3 Gb、contig 数 20.7 M、N50 が 701bp と、向上の余地を大きく残すものであった。		

研究成果の概要	まず、研究分担者の白藤博士よりフタトゲチマダニより精製したゲノム DNA の供与を受けた。degradation が認められたものの(図1)、純度と量については問題ないことを確認した後、ケミカル同仁社が提供する次世代シーケンシング受託サービス” GeneNex”を利用し、150 塩基ペアエンド計 141.6Gb の塩基配列を得た。続いて、低クオリティのリードをフィルターし、残った 129.3Gb、891M reads を用いて、以降の解析を行った。 次に、k-mer 法によるゲノムサイズの推定を行った。k-mer の取得は Jellyfish を用いて行い、k を 20 塩基、25 塩基、30 塩基としたときの推定値は、それぞれ 8.3 Gb, 8.8 Gb, 8.7 Gb であった(図2)。 続いて、ABYSS、および、platanus を用いてゲノムアセンブルを行った(表1)。結果として得られた contig は、非常に断片化されたものであったが、これは想定以上にゲノムサイズが大きく、HiSeq により取得した配列が不足していたためと考えられる(22.5 倍のカバレッジ)。そこで、H30 年度に、改めて追加の HiSeq シークエンスを行い、少なくとも 40 倍以上のカバレッジを得ることで、より統合されたドラフトゲノムの取得を試みる。また、H29 年度に予定していた長鎖シーケンサーMinION の援用によるアセンブリーの向上、および、遺伝子領域の推定は、追加 HiSeq の結果を確認してから行う。これらの追加解析により、<i>I. scapularis</i>と同程度(N50=2,942bp)のドラフトゲノムの取得を目論んでいる。
研究成果の発表	特記事項なし。

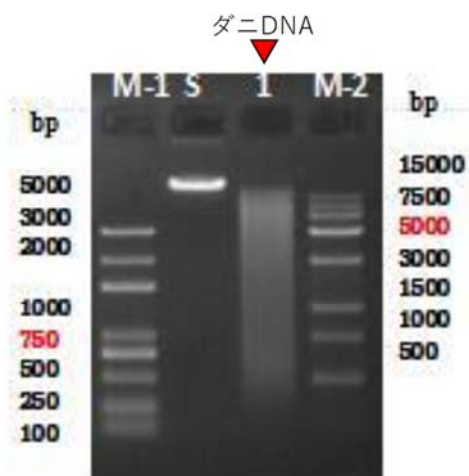


図1 精製DNAの評価

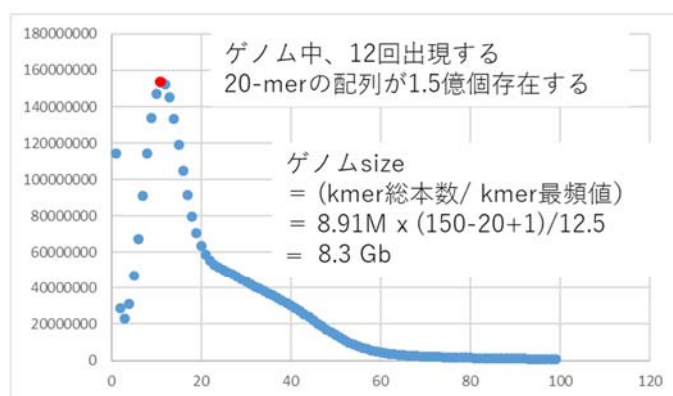


図2 k-mer法によるゲノムサイズの推定

アセンブラー	K-mer	Contig数	N50 (bp)	Max (bp)	総塩基 (Gbp)
ABYSS	90	20.7 M	701	54202	6.6
ABYSS	80	24.2 M	697	73749	6.5
ABYSS	60	35.2 M	645	42783	6.3
platanus	67	51.2 M	331	36267	7.5
<i>I. scapularis</i>		571 K	2942		2.1

表1 assembly条件の最適化

帯 広 畜 産 大 学 原 虫 病 研 究 セ ン タ ー 共 同 研 究 報 告 書

平成 30 年 5 月 日

採択番号	29-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	いわたし まさと 岩月 正人	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・ 准教授	
	ほかり れい 穂苅 玲	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・ 研究員	
	きよはら ひろあき 清原 寛章	北里大学北里生命科学研究所 大学院感染制御科学府 和漢薬 物学研究室・教授	
	おとぐろ かずひこ 乙黒 一彦	北里大学北里生命科学研究所 熱帯病研究センター・ 研究員	
	いがらし いくお 五十嵐 郁男	帯広畜産大学原虫病研究センター・高度診断学部門・教授	
研究期間	平成29年4月1日 ～ 平成30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抗マalariaおよび抗トリパノソーマ原虫活性物質を取得し、これらの一部は創薬リード化合物として研究を推進している。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alaria原虫やトリパノソーマ原虫と同様に住血原虫であり、既に一部の抗マalaria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効率的にバベシア治療薬のシード化合物が見出されることを期待し、<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。今年度までに幾つかの化合物が <i>in vitro</i> 抗バベシア活性を示すことを見出し、有望な化合物については <i>in vivo</i> マウス実験系で検証し、特許取得、論文公表してきた。平成 29 年度は (1)北里大の保有する微生物代謝産物から見出された抗原虫活性物質ライブラリーの拡充(抗原虫スペクトル拡大のため新たに抗リーシュマニア活性物質ライブラリーを追加)、(2)ライブラリーの抗バベシア活性評価の継続(CLF 関連を含む)、(3)見出された有用化合物の <i>in vivo</i> 評価の検討(CLF 関連含む)を実施することとした。		

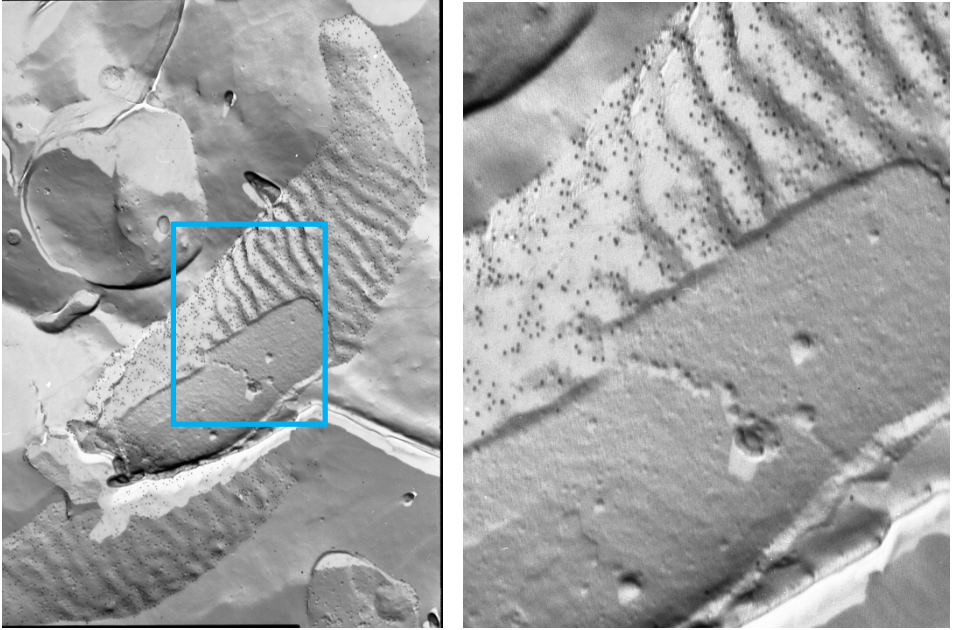
研究経過の概要	本共同研究はH23年度より北里大で見出された抗原虫活性物質ライブラリーについて、帯広畜産大学(五十嵐教授)の下、以下の原虫種で抗バベシア活性評価を行うことで新たな治療薬シードの発見を目指すために開始した。 ・ <i>in vitro</i> 培養牛バベシア(<i>Babesia bovis</i> および <i>B. bigemina</i>) ・ <i>in vitro</i> 培養馬バベシア(<i>T. equi</i> および <i>B. caballi</i>) ・ <i>in vivo</i> マウスバベシア(<i>B. microti</i>)感染モデル (1) 北里大の抗原虫活性物質ライブラリーの拡充 これまで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、H29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を継続 するために微生物培養液から抗マalaria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新規抗マalaria活性物質の取得に至った。その他、抗マalaria活性は無いが新規化合物を3種取得している。抗マalaria活性以外の各種生物活性評価を行う予定。また、抗原虫スペクトル拡大のため新たに抗リーシュマニア活性物質探索系を立ち上げスクリーニングを開始した。 (2) ライブラリーの抗バベシア活性評価の継続(CLF関連を含む) 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ことを明らかとし、論文にて公表*した。 抗マalaria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の抗マalaria創薬過程においては新たな知見が得られた。 (3) 見出された有用化合物の<i>in vivo</i>評価の検討(CLF関連含む) CLF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ことを明らかにしたことを受け、CLFと標準薬ganazegの併用による検討を行い、CLF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た。また、<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発表に至った(成果欄に記載)。 * AAC 60:2739-2746(2016).
---------	---

研究成果の 概 要	プロジェクト毎にH29年度の成果と今後の予定を以下に示す。 (1) 北里大の抗原虫活性物質ライブラリーの拡充 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alaria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、新規抗マalaria活性物質を2化合物(IC₅₀ 150-910nM)取得した。これらの物質は培養の再現や十分な量的取得が困難であったため、<i>in vivo</i>評価を目指すための全合成を進めている。その他、抗マalaria活性は見出せなかったものの2つの新規化合物を培養液より取得した。また新たな培養液も見出されており、活性物質取得を継続している。 抗原虫スペクトルを拡大するために新たに抗リーシュマニア活性物質のスクリーニング系を立ち上げた。皮膚リーシュマニア原虫種の <i>L. major</i>, <i>L. mexicana</i>, <i>L. tropica</i> を用いマクロファージ内寄生型の原虫を標的とした系を構築した。比較的安定して原虫の維持が可能な <i>L. major</i> を用いて北里大の化合物ライブラリーから順次評価を行っている。ヒット化合物が見出せた後に他2種の原虫にて活性スペクトルを確認することとした。 内臓リーシュマニア原虫種である <i>L. donovani</i> についても評価系を立ち上げている。 (2) ライブラリーの抗バベシア活性評価の継続(CLF関連を含む) 上記で見出された新規化合物類は抗マalaria活性での特許取得を想定しており、先ず量的供給の達成を進めている。抗バベシア活性評価はその後に行う予定とした。 (3) 見出された有用化合物の <i>in vivo</i> 評価の検討(CLF関連含む) 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類についても順次 <i>in vivo</i> 抗バベシア活性を評価する予定であったが、<i>B. caballi</i>, <i>B. bigemina</i>, <i>B. gibsoni</i>, <i>B. bovis</i>, <i>T. equi</i> に対し <i>in vitro</i> 活性スペクトルが狭いためペンディングとした。 CLFと他剤の併用効果について標準薬ganazegで検討し、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た。<i>In vivo</i> においても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し受理された。
研究成果の 発 表	CLF と Ganazeg の併用効果について論文発表 Chemotherapeutic efficacies of a clofazimine and diminazene aceturate combination against piroplasm parasites and their AT-rich DNA-binding activity on Babesia bovis. Scientific Reports 7: 13888 DOI:10.1038/ s41598-017-14304-0 Bumduuren Tuvshintulga, Mahmoud AbouLaila, Thillaiampalam Sivakumar, Dickson Stuart Tayebwa, Sambuu Gantuya, Khandsuren Naranbaatar, Aki Ishiyama, Masato Iwatsuki, Kazuhiko Otaguro, Satoshi Ōmura, Mohamad Alaa Terkawi, Azirwan Guswanto, Mohamed Abdo Rizk, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 30 年 5 月 10 日

採択番号	29-共同-5		
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	トキソプラズマ虫体細胞膜の生体膜マイクロドメインを ナノスケールレベルで可視化する		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	まさたに たつり 正谷 達磨	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・准教授	
研究分担者	ふじた あきかず 藤田 秋一	鹿児島大学共同獣医学部分子病態学分野・教授	
	玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	真核生物の細胞膜表面には「ラフト」や「カベオラ」と呼ばれる生体膜マイクロドメインが存在する。これらには種々の膜蛋白質が集積しており、細胞内シグナル活性化や物質輸送を司る重要な構造であることが分かってきた。しかし、原虫細胞膜の生体膜マイクロドメインに関する研究はほぼ皆無であり、その構成脂質成分も不明である。本研究ではトキソプラズマを対象とし、凍結切断レプリカ法ならびに脂質成分特異的標識法を組合せ、電子顕微鏡によるナノスケールレベルでの分子観察を行う。トキソプラズマの生体膜マイクロドメインを破壊すること無く可視化し、さらに構成する脂質成分の特定を目指す。		
研究経過の概要	①生体膜マイクロドメインであるラフト及びカベオラがトキソプラズマの膜表面に存在すかどうか注目して研究を行なった。蛍光抗体法を用いることで、ラフトマーカ分子であるガングリオシド:GM1 及び GM3 が虫体表面に存在するかどうかを検討した。トキソプラズマ RH 株を培養、回収したのちガラスプレート上に貼り付け、固定した。GM1 マーカであるコレラトキシン 1b または GM3 特異的抗体を用いて、蛍光抗体法によって可視化を試みた。その結果、トキソプラズマ虫体表面においてこれらガングリオシドの存在を確かめることはできなかった。この結果は、哺乳類細胞とは異なり、トキソプラズマ虫体表面にはラフト及びカベオラが無いこと、あるいは哺乳類細胞とは構成要素が異なることを示唆している。現在、より詳細に調べる目的で、下の②に示したように電子顕微鏡を用いて標識・解析を実施している。		

研究成果の 概 要	② トキソプラズマを材料とし、急速凍結割断レプリカ法により膜レプリカを作製できるかどうかを検証した。トキソプラズマ RH 株を培養、回収したのち、金箔及び銅板ではさみ、液体窒素によって急速凍結した。これを蒸着装置に挿入し、脂質二重膜のうち外側の膜をナイフで削り取り凍結割断を行なった。むき出しになった内側の膜へカーボン蒸着し、膜レプリカを作成した。トキソプラズマ表面抗原分子である SAG1 に対する抗体および金コロイド標識二次抗体を用いて本膜レプリカを標識したところ、原虫膜表面の広範囲にシグナルを認めた。すなわち、今回作製した膜レプリカが、金コロイド標識による分子局在解析に適用可能であることが示された(図 1)。以上より、本年度は本技術の確立と技術習得に専念し、トキソプラズマでも実施可能であることを示すことができた。  図 1 トキソプラズマ膜レプリカにおける SAG1 の分布。 左の図の青枠を拡大したものが右の図。黒いドットは金コロイドによるシグナルであり、SAG1 が細胞膜表面に存在することを示している。
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 30 年 4 月 1 日

採択番号	29-joint-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	菅沼 啓輔
研究課題名	モンゴル国伝統薬用植物による家畜原虫病対策： 伝承を活かした具体的使用法の提案		
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	東北医科薬科大学・薬学部・講師 (役割分担)モンゴル国薬用植物の成分薬効解析、現地調査	
研究分担者	オドンバヤール Odonbayar	東北医科薬科大学学生薬学教室・博士課程(後期)大学院生 (化合物の単離精製・試料調整、現地情報の調査)	
	バンズラガチガル Banzragchgarav	東北医科薬科大学学生薬学教室・博士課程(後期)大学院生 (化合物の単離精製・試料調整、現地情報の調査)	
	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 (役割分担)抗ピロプラズマ活性試験	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター (役割分担)抗トリパノソーマ活性試験、動物実験	
研究期間	平成29年 4月 1日 ～ 平成30年 3月31日		
目的・趣旨	モンゴル国は畜産業が経済の基幹を担う産業の一つであるが、年によっては深刻な雪害により広範囲の地域で家畜が死滅するなどモンゴル国に特有の問題が山積している。この状況の中で感染性原虫病が及ぼす影響も極めて大きく、原虫病に感染し体力を消耗したため冬を越せない、あるいは商品価値を失う個体が数多く存在する。 一方で同国には 1,400 種を超える薬用植物が知られており、そのユニークな点としてヒトの疾病ばかりではなく、家畜動物を対象にした様々な薬効も伝承されていることが挙げられる。また牧草としての使い方、注意点なども知られている。 申請者は一貫してそのような伝承に基づいた成分薬効解析研究によりモンゴル国植物資源の有効活用を試みており、H28 年度から帯広畜産大学井上昇理事、五十嵐郁男教授、菅沼啓輔特任助教との共同研究を展開している。 本共同研究では地域の資源と伝承を最大限に活用した即効性ある原虫病対策を、科学的根拠を明示した上で提案することを第一の目標としてモンゴル国薬用植物とその抗原虫活性化合物の応用に向けた研究に取り組んだ。		

研究経過の 概 要	平成 28 年度 (28-joint-12)からの継続課題となり、当課題でも引き続き抗トリパノソーマ活性化合物ならびに抗ピロプラズマ活性化合物の探索を実施した。またこれまでの成果を受けて、それらの実地での具体的な応用や使用方法の提案に向けた準備を進めた。 <i>Saxifraga spinulosa</i> 由来抗ピロプラズマ活性フラボノイド チベットから中国、ロシア、モンゴルにかけて広く薬用植物として知られているユキノシタ科植物の <i>Saxifraga spinulosa</i> から、複数種のピロプラズマ (<i>Babesia bovis</i>, <i>B. bigemina</i>, <i>B. caballi</i>, <i>Theileria equi</i>) に対して阻害活性を示す本植物に特徴的なフラボノール配糖体を得た (業績 1)。ここで得た活性化合物に共通する化学構造の特徴としてガロイル基を有することが挙げられ、この部分構造の活性への寄与が示唆された。本植物は首都ウランバートル近郊にも自生しており、今後は現地の協力者のサポートを受けて分布状況や家畜との関係性について調査する予定である。 <i>Fomitopsis officinalis</i> 由来抗トリパノソーマ活性トリテルペン 菌類 (キノコ) の一種である <i>Fomitopsis officinalis</i> は喘息やリウマチに用いる薬用キノコとして知られている。本キノコから新規化合物 4 種類を含む 8 種類のラノスタン型トリテルペンを単離し、これらの内 15β-hydroxy-3-oxo-24-methylenelanosta-7,9(11)-dien-21-oic acid をはじめとする 4 種類のトリテルペンが抗トリパノソーマ活性 (<i>Trypanosoma congolense</i>) を示すことを報告した (業績 2)。 <i>Oxytropis lanata</i> を使用したトリパノソーマ対策 H.28 年度共同研究の成果 (<i>J. Nat. Prod.</i> 79, 2933-2940, 2016) として、熱性感染性疾患に用いる <i>Oxytropis lanata</i> の根から <i>Trypanosoma congolense</i> に対して生育阻害活性を示すオキサゾールを見出した。そこで当年の研究では飼料に混ぜ込む場合を想定してオキサゾール類の動物細胞毒性の検討を行った。また家畜動物に摂取される可能性がより大きい地上部について成分研究を進め、地上部と根部の含有成分の違いについて調べた。
研究成果の 概 要	抗原虫活性成分の探索について 1. 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> 由来フラボノールを見出した (業績 1)。 2. 抗トリパノソーマ活性 (<i>Trypanosoma congolense</i>) を示す <i>Fomitopsis officinalis</i> 由来ラノスタン型トリテルペンを見出した。(業績 2)。 応用に向けた取り組みについて 抗原虫活性成分を含む植物について、現地協力者のもと植物分布調査や家畜動物との関係性の調査を進めた。更に活性化合物の細胞毒性の評価や実際にモンゴル国で分離・樹立された瘧疾トリパノソーマ培養馴化株を用いた抗トリパノソーマ活性評価試験の実施を予定しており、今後の応用に向けた研究に活用される予定である。

研究成果の 発 表	<原著論文> 1) Flavonoid and galloyl glycosides isolated from <i>Saxifraga spinulosa</i> and their antioxidative and inhibitory activities against species that cause piroplasmosis、Duger Badral, Batsukh Odonbayar, *Toshihiro Murata, Tserendoji Munkhjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Ikuo Igarashi, Keisuke Suganuma, Noboru Inoue, Adelheid H. Brantner, Gendaram Odontuya, Kenroh Sasaki, Javzan Batkhoo、<i>Journal of Natural Products</i>、80、2416-2423 (2017). 2) Lanostane triterpenoids from <i>Fomitopsis officinalis</i> and their trypanocidal activity、Shinen Naranmandakh, *Toshihiro Murata, Batsukh Odonbayar, Keisuke Suganuma, Javzan Batkhoo, Kenroh Sasaki、<i>Journal of Natural Medicines</i>、72、523-529 (2018). <学会発表> ・Trypanocidal activity of acylated lignans isolated from aerial parts of <i>Brachanthemum gobicum</i> Batsukh Odonbayar, Toshihiro Murata, Keisuke Suganuma, Ntatisi Innocentia Molefe, Noboru Inoue, Javzan Batkhoo, Kenroh Sasaki、日本生薬学会第 64 回年会、千葉、2017 年 9 月 ・Chemical compounds isolated from <i>Bergenia crassifolia</i> and their inhibitory activity against <i>Babesia bigemina</i> and <i>B. bovis</i> Orkhon Banzragchgarav, Toshihiro Murata, Bumduuren Tuvshintulga, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Javzan Batkhoo, Kenroh Sasaki、日本生薬学会第 64 回年会、千葉、2017 年 9 月 ・モンゴル国ユキノシタ科植物 <i>Saxifraga spinulosa</i> の抗ピロプラズマ活性フラボノイド 村田 敏拓, Duger Badral, Tserendorj Munkhjargal, Bumduuren Tuvshintulga, 五十嵐 郁男, 菅沼 啓輔, 井上 昇, Adelheid H. Brantner, Gendaram Odontuya, Batsukh Odonbayar, Javzan Batkhu, 佐々木 健郎、日本薬学会年会、金沢、2018 年 3 月 <シンポジウム> The 1st International Japan-Mongolia Joint Symposium on Protozoan Diseases Prevention, 帯広、2017 年 9 月 ・Toshihiro Murata, Education of Pharmaceutical University in Japan, and the Research Project of Mongolian Medicinal Plants ・Batsukh Odonbayar, Chemical constituents of 3 species medicinal plants of Mongolian Gobi and their biological activity ・Orkhon Banzaragchgarav, Chemical constituents and anti-parasite activity of <i>Oxytropis lanata</i> and <i>Bergenia crassifolia</i>
----------------------	---

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 16, 2018

Project no: 29-7

1. Principal investigator

Name: Phung Thang Long

Position: Vice rector (Associate Professor)

Affiliation: Hue University of Agriculture and Forestry

2. Project title:

Development of immunochromatographic (ICT) assays applicable for the field survey of 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, 2017 – March 31, 2018

5. Purposes and objectives

Bovine babesiosis is one of the economically significant infectious diseases in cattle. Among *Babesia* species that cause bovine babesiosis, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* are known to be of high virulence, as these parasite species induce severe clinical disease, characterized by high fever, hemoglobinuria, anemia, jaundice and sometimes death. Thus, control of *B. bovis* and *B. bigemina* is vital for successful cattle farming. Unlike the genetic diagnostic tools that detect only active infections, sero-diagnostic methods determine the rate of exposure with *B. bovis* and *B. bigemina*. Therefore, sero-surveys are preferred when estimating risk of *B. bovis* and *B. bigemina* infections in cattle. Immunochromatographic (ICT) assays are now widely used to investigate sero-prevalence of various infectious diseases, as they are useful on-site diagnostic tools. Vietnam, a south-east Asian country, is endemic for both *B. bovis* and *B. bigemina*. However, the cattle populations of this country were never analyzed to determine sero-prevalence of *B. bovis* and *B. bigemina*. Therefore, our aim was to develop ICT assays for the sero-diagnosis of *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle in Vietnam. Recently, we prepared *B. bovis* and *B. bigemina*-specific recombinant forms

of RAP-1 antigens for the development of ICT assays. However, the antigens should be evaluated in ELISAs before using them to develop ICT assays. Therefore, in the present study, we evaluated these antigens in ELISA systems using serum samples from cattle native to Vietnam and those imported from Thailand for the detection of animals sero-positive to *B. bovis* and *B. bigemina*.

6. Outline of research process

At a slaughter house located in Hue, blood samples were collected from 101 Vietnamese yellow cattle and 54 Brahman cattle (males) that had been imported from Thailand during September to December, 2016. The animals were apparently healthy during the sampling. The Vietnamese animals were 1 – 6 years old (98 and 3 animals were 1 – 3.5 and 4 – 6 years old, respectively), while the Thai cattle were 1.5 – 3.5 years old. Blood samples were subjected to serum separation and DNA extraction. The serum samples were analyzed by the *B. bovis*- and *B. bigemina*-specific ELISAs, while the DNA samples were subjected to *B. bovis*- and *B. bigemina*-specific PCR assays

7. Outline of research achievements

In the Vietnamese cattle, *B. bovis*- and *B. bigemina*- ELISA positivity rates (73.3 and 77.2%, respectively) were higher than those in the Thai cattle (42.6 and 55.6%, respectively). The PCR-positivity rate of *B. bigemina* was also higher in the Vietnamese cattle (30.7%) as compared to the Thai cattle (7.4%), but the *B. bovis* PCR-positive rates were comparable between the Vietnamese and Thai cattle (15.8 and 5.6%, respectively). Co-infections with *B. bovis* and *B. bigemina* were detected by ELISA and PCR in both the Vietnamese (61 and 7 animals, respectively) and Thai cattle (17 and 1 animals, respectively). Of the 16 Vietnamese cattle positive for *B. bovis* by PCR, 12 were positive by ELISA, while the remaining four PCR-positive animals were negative by ELISA. In addition, of the 31 Vietnamese cattle that were positive for *B. bigemina* by PCR, 22 were ELISA-positive, whereas the remaining PCR-positive samples were negative by ELISA. The PCR-positive but ELISA-negative results indicate that these animals were infected recently and were sampled before they developed any ELISA-detectable antibodies. On the other hand, all the Thai cattle positive for *B. bovis* and *B. bigemina* by PCR were ELISA-positive, suggesting that the imported Thai cattle did not receive the infections recently.

The importation of *B. bovis*- and *B. bigemina*-infected cattle might introduce new parasite strains, which might complicate the development of immune control strategies in Vietnam. For instance, the genetic variations of merozoite surface antigens, such as merozoite surface antigen-1 (*msa-1*), might result in altered immune profiles in infected animals. The recent investigations indicated that the genotypic distribution of *B. bovis* merozoite surface antigen-1 (*msa-1*) is different between Vietnam and Thailand. Thus, the introduction of Thai strains of *B. bovis* might be a stumbling block for designing control strategies in Vietnam. Thai cattle, which usually arrive in Hue after 1 – 3 weeks from departing from Thailand, are occasionally allowed to graze before slaughtering. Therefore,

entry of *Babesia*-infected ticks together with the imported cattle into Vietnam and transmission of *B. bovis* and *B. bigemina* from infected-Thai cattle to ticks in Vietnamese pasture cannot be ruled out. Therefore, steps should be taken to import *Babesia*-free cattle from Thailand into Vietnam. The findings of the present study also confirm that the recombinant RAP-1 proteins that we prepared are useful sero-diagnostic antigens. Therefore, we will use these RAP-1 antigens to develop ICT assays capable of detecting *B. bovis* and *B. bigemina* infections in cattle in Vietnam.

8. Publication of research achievements

Sivakumar T, Lan DTB, Long PT, Viet LQ, Weerasooriya G, Kume A, Suganuma K, Igarashi I, Yokoyama N. 2018. Serological and molecular surveys of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* among native cattle and cattle imported from Thailand in Hue, Vietnam. J. Vet. Med. Sci., 80: 333–336.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成30年5月24日

採択番号	29 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	白藤 梨可
研究課題名	Scale 法を用いたマダニ組織の透明化技術の確立と過酸化水素の可視化		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	(たなか てつや) 田仲 哲也	鹿児島大学 共同獣医学部・教授	
研究分担者	(くさきさこ こうだい) 草木迫 浩大	山口大学 大学院連合獣医学研究科・4 年	
	(しらふじ りか) 白藤 梨可	帯広畜産大学 原虫病研究センター・助教	
研究期間	平成29年4月1日 ～ 平成30年3月31日		
目的・趣旨	マダニが長期間に渡って摂取する血液には、大量の遊離鉄が含まれる。鉄分子はフェントン反応から過酸化水素を経て、酸化力の高いヒドロキシラジカルを生じる。ヒドロキシラジカルは、生体高分子に酸化障害を引き起こす。このため、ヒドロキシラジカルの発生源となる鉄分子と過酸化水素の生成・消去の厳密な制御が必須となる。マダニ体内では、鉄分子の制御にフェリチンが、過酸化水素の制御にペルオキシレドキシシンが重要な役割を果たすことが明らかになっている。しかし、マダニ体内における過酸化水素の発生と動態については不明である。そこで、血色素等を排除した透明化マダニ組織を作製し、過酸化水素の発生並びに動態を可視化することを研究目的とした。		
研究経過の概要	【背景】 我々は、これまでに、マダニ体内で、酸化ストレスを惹起する過酸化水素を制御するマダニ由来ペルオキシレドキシシン(HlPrx2)の機能を分子並びに個体レベルで明らかにした(Kusakisako et al., Insect Mol. Bol., 2016; Kusakisako et al., Parasit. Vectors, 2016)。しかし、マダニ体内における過酸化水素の発生動態については明らかになっていない。そこで、マダニ体内での過酸化水素を可視化し、その発生動態・局在を明らかにすることを本研究の目的とした。哺乳類では、組織の透明化が盛んに行われ、蛍光分子を用いることで、生体内における蛍光分子の動態を直接観察することが可能となっている。そこで、組織透明化技術である Scale 法によってマダニ組織の透明化を行うことで、蛍光プローブによる過酸化水素の特異的な検出が容易になることを予想した。本研究では、Scale 法をマダニ組織へ応用し、マダニ体内の過酸化水素の発生動態を組織内で簡便に可視化する方法を検証した。		

研究成果の概要	【実験結果】 マダニ体内の過酸化水素(H₂O₂)の発生を観察するにあたり、 H₂O₂ を中腸内へ経肛門で直接接種し、H₂O₂ 発生の指標として <i>HIPrx2</i> の遺伝子発現について、リアルタイム PCR を用いて調べた。その結果、7%H₂O₂ を接種した群において、接種後 15 並びに 30 分に <i>HIPrx2</i> 遺伝子の発現量が有意に増加した (図 1)。そこで、7%H₂O₂ 接種後 15 分の中腸並びに卵巣を用い、細胞内過酸化水素に特異的な蛍光プローブである BES-H₂O₂-Ac 並びに <i>Scale</i> 法を使用し、マダニ組織内における H₂O₂ の発生を観察した。その結果、中腸において、Milli-Q 接種群では過酸化水素の発生は確認されなかったが、7%H₂O₂ 接種群では H₂O₂ の発生が観察された (図 2, 中腸)。一方、卵巣において、Milli-Q 接種群でも H₂O₂ の存在が確認されたが、7%H₂O₂ の接種群で、卵母細胞における H₂O₂ の発生が顕著であった (図 2, 卵巣, 矢頭)。 図1. 過酸化水素接種による<i>HIPrx2</i>遺伝子発現に及ぼす影響 <table><thead><tr><th>接種後時間(分)</th><th>Milli-Q</th><th>7% H₂O₂</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>0.15</td><td>0.25</td></tr><tr><td>15</td><td>0.13</td><td>0.31</td></tr><tr><td>30</td><td>0.06</td><td>0.14</td></tr></tbody></table> ※P値は Welch's t検定により算出 図2. 過酸化水素接種によるマダニ体内での過酸化水素発生の可視化 【考察】 7% H₂O₂を中腸内へ直接接種することで、マダニ体内において H₂O₂ の発生を誘導できた。また、マダニ組織に蛍光プローブ並びに <i>Scale</i> 法を使用することで、H₂O₂ 発生の観察が可能であった。さらに、<i>Scale</i> 法による透明化処理を行った場合でも、マダニ組織の形状を保った状態で観察が可能であった。以上の結果から、本法を応用することで、マダニ体内で、蛍光標識した病原体等の動態観察が可能となることが考えられた。	接種後時間(分)	Milli-Q	7% H ₂ O ₂	0	0.15	0.25	15	0.13	0.31	30	0.06	0.14
接種後時間(分)	Milli-Q	7% H ₂ O ₂											
0	0.15	0.25											
15	0.13	0.31											
30	0.06	0.14											
研究成果の発表	【学会発表】 <u>草木迫浩太</u>, Hernandez Emmanuel Pacia, Talactac Melbourne Rio, 好井健太郎, <u>田仲哲也</u>, ペルオキシレドキシンは連携して細胞内過酸化水素濃度を制御する, 第 86 回日本寄生虫学会大会, 2017 年 5 月(北海道). <u>Kodai Kusakisako</u>, Remil Linggatong Galay, <u>Rika Umemiya-Shirafuji</u>, Emmanuel Pacia Hernandez, Hiroki Maeda, Melbourne Rio Talactac, Naotoshi Tsuji, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, <u>Tetsuya Tanaka</u>, 2-Cys peroxiredoxin has an important role in blood feeding and reproduction through the regulation of hydrogen peroxide concentrations in the hard tick <i>Haemaphysalis longicornis</i>, The 9th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia, 2018 年 2 月(韓国). 【論文発表】 <u>Kodai Kusakisako</u>, Emmanuel Pacia Hernandez, Melbourne Rio Talactac, Kentaro Yoshii, <u>Rika Umemiya-Shirafuji</u>, Kozo Fujisaki, <u>Tetsuya Tanaka</u>, Peroxiredoxins are important for the regulation of hydrogen peroxide concentrations in ticks and tick cell line, Ticks Tick Borne Dis. (2018), In press.												

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 30 年 5 月 30 日

採択番号	29 共同-9		
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	菅沼 啓輔
研究課題名	媾疫トリパノソーマ感染症における宿主免疫応答と 末梢神経病変の発生機序に関する研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	わたなべ けんいち 渡邊 謙一	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	
研究分担者	こやま けんじ 小山 憲司	帯広畜産大学家畜病理学研究室・大学院生 被験動物の病態解析・病理組織学的検討	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・特任助教	
研究期間	平成29年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	媾疫は <i>T. equiperdum</i> 感染により馬属家畜に流死産などの繁殖障害と運動機能障害等の神経症状を起こす致死的な原虫病であり、中央アジアやアフリカなどの汚染国では重大な経済的損失が生じている。申請者らはモンゴルにて媾疫罹患ウマの病理解剖を実施し、運動神経傷害の責任病変と思われる強い炎症性変化が末梢神経に生じていること、脳脊髄液中及び生殖器粘膜に多数の <i>T. equiperdum</i> が認められることを明らかにした(Horiuchi <i>et al.</i>, 論文投稿中)。一方で、虫体の寄生部位と病変部位とは一致しておらず、2つの事象の関連性や末梢神経炎発症に至る機序は不明である。末梢神経炎の組織像は免疫介在性の神経炎に類似していることから、脳脊髄液中に移行した虫体が過剰な宿主免疫応答を誘導し、免疫介在性の末梢神経炎が生じたものと考えた。そこで、本研究では宿主免疫応答と末梢神経炎との関連について実験病理学的検討を行った。		
研究経過の概要	<i>T. equiperdum</i> は宿主特異性が強く、マウスなどの小動物を用いた感染及び病態の再現は困難である。本研究では媾疫 <i>in vivo</i> モデルの作出に向けた予備的検討として、1) 実験的免疫介在性脳脊髄炎(EAE)モデル作出法を応用した末梢神経炎の再現実験、2)SCID マウスを用いた <i>T. equiperdum</i> 感染実験の2つの手法を試みた。		

研究成果の概要	1. <i>T. equiperdum</i> 虫体蛋白による末梢神経炎の誘発 瘧疾感染ウマより分離培養した <i>T. equiperdum</i> を破碎し、凍結乾燥したもの(虫体蛋白)200 μg を1単位とし、免疫介在性関節炎・血管炎を自然発症する Il-1raKO マウスの皮下/脳実質内/脳室内に投与した。皮下投与群、脳実質内投与群については、フロイント不完全アジュバントまたは TiterMax アジュバントと混合した water-in-oil エマルジョンの状態にて投与した。虫体蛋白の投与は7日おきに最大3回実施し、21日目に剖検を実施、血清、脳、脊髄、坐骨神経を含む全身臓器の病理学検査を実施した。また、虫体蛋白に対する抗体価の上昇を評価するため、0, 7, 14, 21日目に採血を実施し、<i>T. equiperdum</i> tubulin 蛋白を定量する ELISA により抗体価の評価を行った。 <結果 1> アジュバントの種類や投与経路、投与量の様々な組み合わせを試したが、瘧疾自然症例にみられるような末梢神経炎の再現には至らなかった。さらにいずれの個体についても虫体蛋白に対する抗体価の上昇は認められなかった。より強い免疫応答を誘導できるとされるフロイント完全アジュバントについては今回検討していないが、組織学的検査でも投与部位局所における炎症細胞浸潤などの反応性変化はきわめて軽微であったことから、同手法による末梢神経炎の再現は困難であると考えている。 2. <i>T. equiperdum</i> 分離培養株を用いた感染実験 <i>T. equiperdum</i> は宿主特異性が極めて高く、C57BL/6 などの通常の免疫を有するマウスには感染が困難である。そこで、重度免疫不全マウスである NOD-SCID マウスの腹腔内に <i>T. equiperdum</i> 分離培養株を 1.0×10^6 匹接種した。接種後、末梢血中の虫体数を感染の指標として経時的にモニタリングし、血中の虫体数が $1.0 \times 10^6 / \mu$l に達する時点を終点として剖検を実施し、全身臓器を精査した。 <結果 2> 接種から1-2週間で83%の個体に感染が認められた。病理学的検査の結果、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺など全身臓器の血管内に多数の虫体が観察された。また、髄膜血管並びに脈絡膜、脳実質内の毛細血管内にも虫体の寄生がみられた。一方で、これら部位においても <i>T. equiperdum</i> の明らかな組織への侵入はみとめられず、実質細胞の障害、炎症細胞浸潤や梗塞、血管内皮細胞の障害等は認められなかった。 <考察と今後の展望> いずれの実験においても末梢神経炎の再現には至らなかったが、NOD-SCID マウスを用いた感染実験ではウマ以外の動物では困難とされていた <i>T. equiperdum</i> の感染が確認できた。今後、再現実験と詳細な病態解析を行い、瘧疾の病態発生の解明や薬剤スクリーニングに利用可能な <i>in vivo</i> モデルの作出に努めたい。
研究成果の発表	一連の実験結果に関しては、追加実験を含め論文文化に向けた準備を進めている。

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 30th, 2018

Project no: 29-10

1. Principal investigator

Name: Haiyan Gong

Position: Associated Professor

Affiliation: Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences

2. Project title: RNA interference of Serpins in Soft tick *Ornithodoros moubata* to reveal the molecules associated with serpins function

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Rika Shirafuji

Position: Assistant Professor

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

April 1, 2017 – March 31, 2018, one year

5. Purposes and objectives

- (1). To obtain the serpin gene of *O. moubata*.
- (2). To investigate the role of serpins on the feeding and production of *O. moubata*.

6. Outline of research process

- (1) Isolate serpin molecule from the *O. moubata*;
- (2) Analyze the sequence;
- (3) Synthesize the dsRNA of serpin gene and controls (luciferase)
- (4) Investigate the impact of serpin silence on the tick feeding and oviposition.

7. Outline of research achievements

- (1) The serpin gene of *O. moubata* encoded a protein of 424 amino acids, containing a signal peptide of 20 amino acids and a serpin domain (73- 423 aa) (Fig.1), and the mature protein has a

molecular size of 44.5 kDa. The protein has a high homolog (65%) to that from another kind of soft tick *Argas monolakensis* [ABI52767] but a low homology to that from hard ticks (35 % to that of *Amblyomma americanum* [ABS87362]) (Fig. 2)

(2) Interference of serpin (Fig. 3) in the adult ticks affected the attachment rate (83% in control group VS 64% in tested group), but didn't affect the engorged body weight (0.25046 ± 0.02381 g in control group VS 0.26877 ± 0.02451 g in tested group, $P > 0.05$ by student's t-test) nor the oviposition (100% in both groups).

8. Publication of research achievements

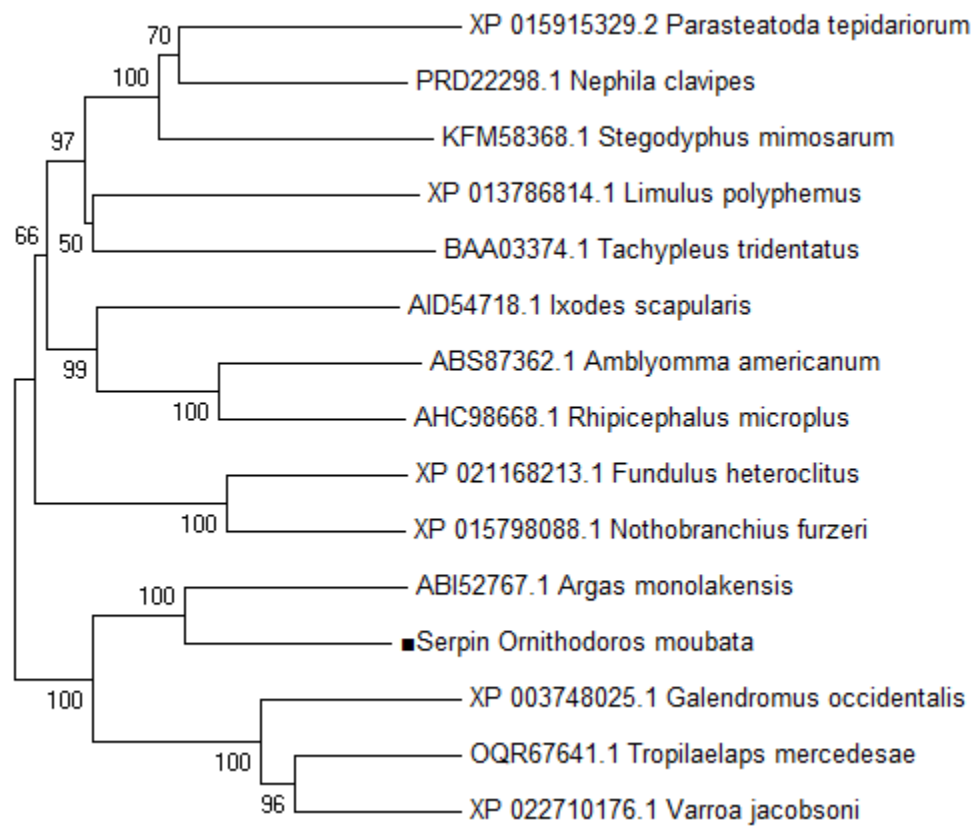
The paper is under writing for publication.

Attach reference materials as necessary.

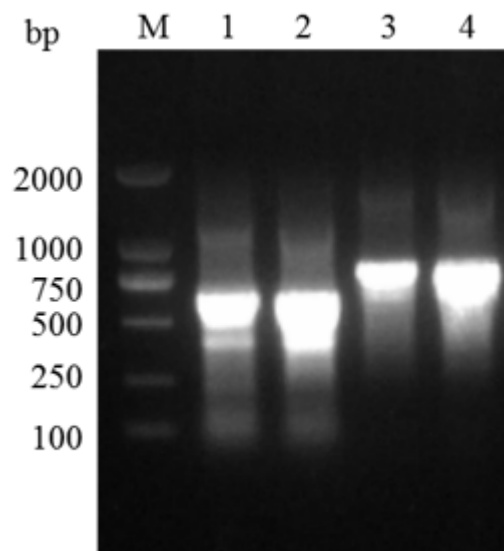
(1) Figure 1 Domain of serpin from *O. moubata*



(2) Figure 2 The phylogenetic tree of serpin from *O. moubata*



(3) Figure 3 Synthesis of dsRNA



Lines 1 and 2, dsRNA of luciferase; lines 3 and 4, dsRNA of serpin

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成30年 5月31日

採択番号	29-共同-11		
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	所属部局等・職名	
	にへい こういち 二瓶 浩一	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			
研究期間	平成29年 4月 1日 ～ 平成30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。		

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全く異なったものであり、一方は他の生物活性で発見された化合物メタサイトフィリンであったのに対し、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キジマイシンであった(双方ともに特許期限切れ)。メタサイトフィリンについて、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メタサイトフィリン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。メタサイトフィリン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。メタサイトフィリンのジケトピペラジン基本骨格の立体配座の異な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、基の立体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、天然物そのもののメタサイトフィリン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。メタサイトフィリンとキジマイシン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、メタサイトフィリンはトキソプラズマを含むアピコンプレクサ原虫に対する抗原虫活性を示すのに対し、キジマイシン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。キジマイシンにおける原虫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、さらに、エンドサイトーシス等の小胞輸送系が標的となることが示唆された。キジマイシンは、未だ膜交通システムの解っていない原虫の学術研究を進める上で、非常に強力なツールとなることが期待できる。キジマイシンは抗原虫活性が高いものの、創薬シーズとして発展させるのが現時点では難しいと判断している。しかしながら、生体内の素反応を制御する阻害剤としては非常に優れており、作用機序解析および標的分子探索を進めている。その分子機構が明らかになり次第、学術論文に投稿を行う。 一方、メタサイトフィリンはトキソプラズマ他、アピコンプレクサ類に特徴的な代謝系に作用する可能性が示された。感染動物に対する優れた治癒効果を示したメタサイトフィリンは創薬に進展する可能性が十分あると判断し、特許申請を行った。現在、PCT 出願に向けた準備、論文投稿の準備を行っている。

研究成果の 発 表	○知的財産権 「抗アピコンプレクサ類原虫剤、アピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物、および流産又は死産防止剤」特許 2017-243872 西川義文, 二瓶浩一, 飯島正富, 土井宏育他 7 名 国立大学法人帯広畜産大学, 公益財団法人微生物化学研究会共同出願 出願日 2017 年 12 月 20 日 ○学会発表 Effect of metacytofilin against <i>Toxoplasma gondii</i>: A new drug candidate for toxoplasmosis therapy Arpron Leesombun¹, Masatomi Iijima², Kousuke Umeda¹, Daisuke Kondoh³, Kunio Isshiki², Coh-ichi Nihei², Yoshifumi Nishikawa¹ 第 87 回日本寄生虫学会大会 2018 年 3 月 18 日 (国立国際医療研究センター)
----------------------	--

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 30 年 5 月 18 日

採択番号	29 共同－12		
研究部門	感染免疫研究	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本晋也
研究課題名	マラリア原虫の媒介蚊体内ステージにおけるオーシスト形成機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いかだい ひろみ 筏井 宏実	北里大学獣医学部・准教授・研究総括	
研究分担者	きたはら ゆう 北原 優	北里大学獣医学部・学部学生	
	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マラリア原虫は、宿主動物の赤血球に寄生しているガメトサイトが媒介者である蚊に吸血されると、蚊中腸内において雌雄ガメート、ザイゴートを経て運動能を有するオーカイネートに分化する。オーカイネートは、蚊中腸細胞に侵入して基底膜下に到達した後、オーシストへ形態変化を開始する。 マラリア原虫の生活環において媒介蚊体内ステージ、特にオーカイネートからオーシスト形成初期の 1-2 日間は、宿主の環境が大きく変化する事ことから原虫はその変化に対応しつつ形態も劇的に変化させる。さらに、この期間は生存する原虫数が最も減少する、原虫の生き残りにとって非常に重要なステージである。 オーシスト形成初期では、まずオーカイネートの細胞膜の構造が変化して早期オーシスト壁が形成され、徐々にオーシスト壁は殻のような特殊な構造物を構成して、成熟オーシストとなると考えられているが、その詳細については不明な点が多い。 本共同研究では、オーシストに特有な壁構成蛋白質を探索し、そのオーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析を実施することにより、オーシスト形成機構の解明を目的とした。		

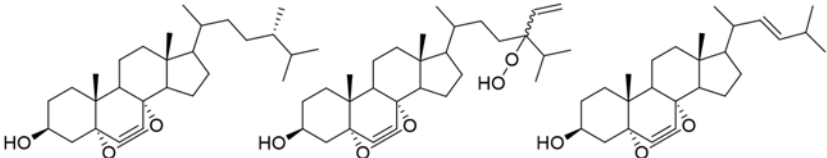
研究経過の概要	本研究手順は、オーシスト形成期における、①オーシスト壁構成蛋白質の探索、②オーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析、および、③原虫オーシスト形成期と媒介蚊中腸細胞の相互因子の解析を行なう事によって実施されている。 本年度は、壁形成に重要と思われる蛋白質を5種スクリーニングした。スクリーニングした蛋白質に対する抗体をそれぞれ作製し、抗体とマラリア原虫感染血液を媒介蚊に吸血させた所、2種類の蛋白質(PbCap184 および PbCap494)に対する抗体が吸血後のオーシスト形成数を減少させ、伝搬阻止効果があることが明らかとなった。さらに、上記2種類の蛋白質について、それぞれ遺伝子欠損(KO)原虫、過剰発現(OE)原虫および Tag 蛋白質発現組換え原虫の作製を試みた。
研究成果の概要	— PbCap184 蛋白質 — ✓ <u>新たに4種類の異なるエピトープに対する抗体の作製</u> 先に作製した伝搬阻止効果のある抗体と新たに4種類の抗体を作製した。それぞれのエピトープに対する抗体の反応性および伝搬阻止試験を実施し、エピトープによる違いを比較検討することにより PbCap184 蛋白質のオーシスト形成時における機能および役割を検討している。 ✓ <u>遺伝子欠損原虫の作製</u> PbCap184 遺伝子の KO 原虫作製を試みたが、赤内型において lethal な遺伝子であることが明らかとなった。そこで、MSP9 プロモータを用いた、コンディショナル KO 原虫の作製を試みた。その結果、コンディショナル KO 原虫の作成・クローニングに成功し、現在表現型の解析を開始している。 — PbCap494 蛋白質 — ✓ <u>PbCap494 蛋白質の KO 原虫および OE 原虫の作製</u> 野生型(WT)原虫の蚊体内ステージにおける PbCap494 の mRNA 発現動態をリアルタイム PCR にて調べたところ、吸血後 48 時間目において急激に発現を始め、その後は発現量が増加し続けていた。 WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫の赤内型ステージを比較したところ、赤血球内寄生率の増加、gametocyte 形成率、雌雄 gametocyte 比に違いはみられなかった。 WT 原虫および KO 原虫では、蚊体内ステージにおいても、exflagellation 数、ookinete 形成数、および ookinete の形態について差は見られなかった。 WT 原虫および KO 原虫を吸血した 13～14 日目のそれぞれの蚊中腸の oocyst 形成数および大きさを比較した所、oocyst 形成数が KO 原虫において明らかに減少しており、大きさは小さかった。 WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫を感染させた 28 日目以降の蚊の唾液腺から sporozoite を分離し、その運動性について解析を行ったところ、WT 原虫および KO 原虫においては旋回運動に差は見られなかったが、OE 原虫では旋回運動を示さなかった。 KO 原虫 sporozoite のマウスへの感染能を調べるために、KO 原虫吸血後 25 日目の蚊を未感染マウスへ吸血させたところ、WT 原虫と同様に吸血後 4-5 日目に赤血球内原虫が出現した。OE 原虫 sporozoite については現在検討中である。 RFP タグ付加原虫も作製し(クローニング中)、KO 原虫および OE 原虫の各種ステージにおける表現型や電子顕微鏡観察など、今後順次解析して行く予定である。

研究成果の 発 表	<国内学会発表> 北原優、杉山真言、福本晋也、筏井宏実 <i>Plasmodium berghei</i> Cap494 タンパク質は sporozoite 形成には影響をしない 第 87 回日本寄生虫学会大会 2018 年 3 月、東京都・新宿区
----------------------	---

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 30 年 3 月 7 日

採択番号	29 共同－13		
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	菅沼 啓輔
研究課題名	抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なかお よういち 中尾 洋一	早稲田大学理工学術院・教授 研究統括、活性化合物の精製・構造決定	
研究分担者			
	菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター 抗トリパノソーマ活性試験	
研究期間	平成29年4月1日 ～ 平成30年3月31日		
目的・趣旨	トリパノソーマはトリパノソーマ科に属する二宿主性の原生生物である。これらは魚類、鳥類、哺乳類など幅広い宿主に感染し、トリパノソーマ症と呼ばれる様々な病気を引き起こす。ヒトに感染するトリパノソーマ症としては <i>Trypanosoma brucei</i> によるアフリカ睡眠病や <i>T. cruzi</i> によるシャーガス病などが有名であるが、これらの他にも <i>T. congolense</i> が牛や羊に感染するナガナ病や <i>T. equiperdum</i> が馬に感染する媾疫病などが知られている。これらの病気は病状が進行すると死に至る深刻な病気であるが、既存薬は強い副作用や耐性株の出現が問題となっているため、新薬の開発が望まれている。本研究ではトリパノソーマ症治療薬の新たなリード化合物を見出すため、抗トリパノソーマ活性を有する海洋天然化合物の探索を行った。		

研究経過の 概 要	抗トリパノソーマ活性は以下の方法により行った。初めに、96 well プレートに HMI-9 培地とサンプルを添加した後に、原虫 (<i>T. congolense</i>) を播種して 72 時間培養を行い、次に生細胞測定試薬として用いられる CellTiter-Glo® 試薬を添加し、10 分間静置した。この試薬に含まれるルシフェリンとルシフェラーゼが原虫細胞由来の ATP と反応することでオキシルシフェリンが生成されるとともに光が放出されるため、この発光強度を測定することで生存原虫数を算出し、抗原虫活性を導出した。 抗トリパノソーマ活性を指標としたスクリーニングで浮かび上がった、山口県青海島産の海綿から活性本体の探索を行った。すなわち、本海綿(880 g)のメタノール抽出物を溶媒分画、シリカゲルクロマトグラフィー、逆相 HPLC により分画し、得られた活性画分をさらに逆相 HPLC によって精製することで、3 つの活性化合物を得た。得られた化合物について MS および NMR スペクトルの測定を行い、これらの構造解析を行った。
研究成果の 概 要	得られた 3 化合物はそれぞれ IC₅₀ 0.28、0.32、および 0.33 µg/mL で <i>T. congolense</i> に対する阻害活性を示した。同時に、これらの活性化合物について HeLa 細胞と P388 細胞への細胞毒性試験を行ったところ、この抗トリパノソーマ活性は細胞毒性と比較して 10 倍以上の選択性を示した。 また、活性化合物について MS および NMR スペクトルの解析を行ったところ、得られた化合物は以下に示す化合物であることが同定された。これらは、抗トリパノソーマ活性化合物として報告されている 5α,8α-epidioxy-22<i>E</i>-ergosta-6,22-dien-3β-ol の類縁体であった。先行研究によって単離された化合物も 5α,8α-epidioxy sterol 類であることから、構造-活性相関を解析したところ、5 員環の側鎖の構造の違いにより活性が変化することが分かった。  化合物1 化合物2 化合物3
研究成果の 発 表	2018 年度中に日本化学会、日本寄生虫学会関連の学会等で発表を行うとともに、論文投稿を行う予定。