

NRCPD2017

原虫病研究センター 年報

平成29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）	17
⑤その他・国際研究協力活動の状況	17
6. 教育活動・人材養成	18
①大学院生等の受入状況	18
②留学生の受入状況	18
③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数	18

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	19
7. 情報発信・広報活動等	21
①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）	21
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	22
8. 分野等の研究活動	23
節足動物衛生工学分野	23
生体防御学分野	27
ゲノム機能学分野	40
高度診断学分野	51
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
国際獣疫分野（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）	76
9. 共同研究成果報告書	82
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	83
<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	85
フタトゲチマダニのドラフトゲノム解析	88
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	90
トキソプラズマ虫体細胞膜の生体膜ミクロドメインをナノスケールレベルで 可視化する	93
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	95
Development of immunochromatographic (ICT) assays applicable for the field survey of bovine babesiosis in Vietnam	98
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	101
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	103
RNA interference of Serpins in Soft tick <i>Ornithodoros moubata</i> to reveal the molecules associated with serpins function.	105
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	108
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	111
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	114

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

2018 年 1 月 OIE/ISO 業務担当分野として、国際獣疫分野新設

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 29 年度 (H29.5.1 現在)					
	現 員 数	任期制導入状況				
		女 性 数	外 国 人 数	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	0	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	1	1	0

②技術系職員数

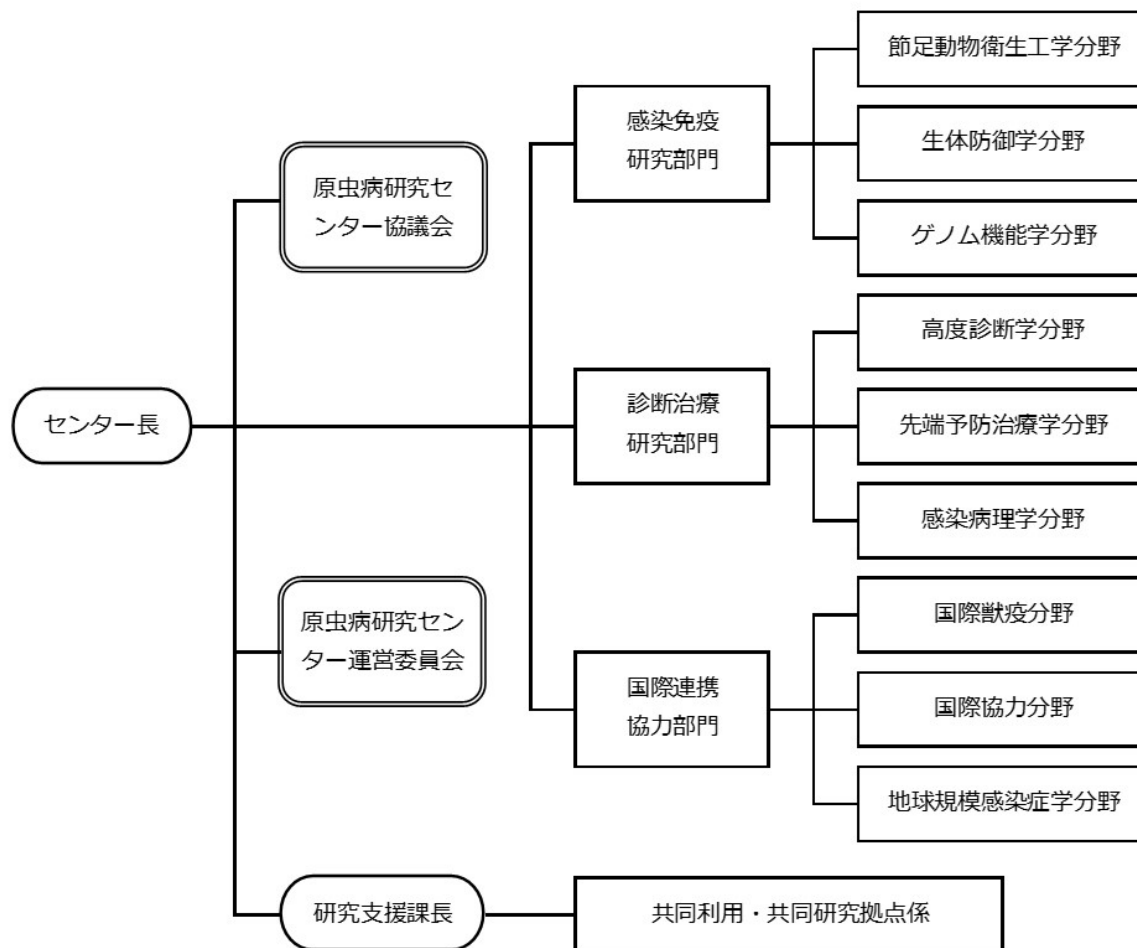
区 分		平成 29 年度 (人)	
技術系職員数		16	
	うち常勤	6	
	うち非常勤	10	

③事務系職員数

区 分		平成 29 年度 (人)	
事務系職員数		4	
	うち常勤	2	
	うち非常勤	2	

④組織図

【平成 29 年度】



3. 予算、決算、外部資金等

①歳出決算額

区 分	平成 29 年度（単位：百万円）	
	決算額	うち運営費交付金
人 件 費	182	138
物 件 費	200	35
計	382	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 29 年度 (単位：百万円)	10	356	164	35.6	16.4

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)	26304038	継 続	准教授・福本 晋也	3,100
基盤研究 B (一般)	15H04589	継 続	准教授・西川 義文	3,700
基盤研究 A (海外)	16H02768	継 続	教授・五十嵐 郁男	9,300
基盤研究 B (一般)	16H05026	継 続	准教授・福本 晋也	3,800
基盤研究 B (一般)	16H05033	継 続	教授・横山 直明	3,900
基盤研究 C (特設)	16KT0141	継 続	准教授・加藤 健太郎	1,200
挑戦的萌芽研究	16K15035	継 続	准教授・福本 晋也	1,400
若手研究 B	16K18793	継 続	特任助教・菅沼 啓輔	900
若手研究 B	16K18794	継 続	助教・白藤 梨可	1,100
基盤研究 B (一般)	17H03913	新 規	准教授・加藤 健太郎	4,200
挑戦的研究 (萌芽)	17K19538	新 規	准教授・西川 義文	2,200
若手研究 B	17K17570	新 規	特任研究員・ 梅田 剛佑	2,000
研究活動スタート支援	17H06496	新 規	特任研究員・ 白水 貴大	1,100
特別研究員奨励費 (外国人特別研究員)	17F17105	新 規	教授・玄 学南	1,200

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)
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	25,000
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	3,516
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	継 続	准教授・西川 義文	769
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	継 続	教授・横山 直明	4,917
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	5,615
国立研究開発法人日本医療研究開発機構	創薬支援推進事業	新 規	准教授・加藤 健太郎	3,741
国立研究開発法人科学技術振興機構	地域産学バリュープログラム	新 規	准教授・西川 義文	952
独立行政法人日本学術振興会	拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）	新 規	教授・玄 学南	6,400
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	1,200
独立行政法人日本学術振興会	二国間交流事業共同研究	新 規	教授・横山 直明	1,200
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・鈴木 宏志	1,440
独立行政法人国際協力機構	ABE イニシアティブ	継 続	教授・玄 学南	1,020
独立行政法人国際協力機構	ABE イニシアティブ	新 規	教授・五十嵐 郁男	500
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

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)
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	継 続	教授・横山 直明	363
A (株)	共同研究	継 続	教授・鈴木 宏志	1,000
B (株)	共同研究	継 続	教授・五十嵐 郁男	4,287
日本科学協会	笹川科学研究助 成	新 規	特任助教・ 菅沼 啓輔	740
伊藤記念財団	伊藤記念財団研 究助成	新 規	准教授・西川 義文	1,000
武田科学振興財団	武田科学振興財 団研究助成	新 規	准教授・加藤 健太郎	2,000
寿原記念財団	寿原記念財団研 究助成	新 規	准教授・西川 義文	1,500
内藤記念科学振興財 団	内藤記念科学振 興財団研究助成	新 規	特任研究員・ 久米 愛子	3,000
(株) 白寿生化学研 究所	寄付講座	継 続	教授・鈴木 宏志	20,000
C (株)	寄付金	新 規	助教・白藤 梨可	300
D (株)	寄付金	新 規	教授・玄 学南	500

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）	13
うち国際的な共同利用・共同研究数	2
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	2
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（13件）	センター内 共同研究者
中尾 亮	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	白藤 梨可
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
山岸 潤也	フタトゲチマダニのドラフトゲノム解析	玄 学南
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
正谷 達膳	トキソプラズマ虫体細胞膜の生体膜ミクロドメインをナノスケールレベルで可視化する	玄 学南
村田 敏拓	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	菅沼 啓輔
Phung Thang Long	Development of immunochromato-graphic(ICT) assays applicable for the field survey of bovine babesiosis in Vietnam	横山 直明
田仲 哲也	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	白藤 梨可
渡邊 謙一	膵臓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	菅沼 啓輔
Haiyan Gong	RNA interference of Serpins in Soft tick <i>Ornithodoros moubata</i> to reveal the molecules associated with serpins function.	白藤 梨可
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
筏井 宏実	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	福本 晋也
中尾 洋一	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	菅沼 啓輔

③共同利用・共同研究の参加状況

区 分	平成 29 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)	8	65 (26)	36 (13)	54 (22)	23 (10)	1305 (416)	674 (215)	1139 (341)	547 (200)
国立大学	24	73 (12)	3 (3)	30 (11)	10 (6)	181 (36)	7 (7)	91 (32)	35 (19)
公立大学	1	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
私立大学	9	22 (4)	2 (2)	5 (2)	3 (2)	39 (4)	2 (2)	7 (2)	4 (2)
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	25	66 (9)	4 (0)	4 (0)	0 (0)	99 (15)	4 (0)	4 (0)	0 (0)
民間機関	14	29 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	30 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
外国機関	17	43 (20)	41 (18)	8 (7)	0 (0)	436 (308)	433 (305)	282 (226)	0 (0)
その他	1	27 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	27 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	99	326 (78)	86 (36)	101 (42)	36 (18)	2119 (787)	1120 (529)	1523 (601)	586 (221)

※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 29 年度	
論 文 数		70	
うち国際学術誌に掲載された論文数		61	

⑤出版物の発行部数

出 版 物 の 名 称	発 行 部 数
The Journal of Protozoology Research	234

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
加藤 健太郎	2017-2018 年度日本獣医学会賞	H29 年 9 月	トキソプラズマ症の病態発現機構と対策技術に関する研究
Oluyomi Stephen Adeyemi	第 8 回 獣医寄生虫学奨励賞	H29 年 9 月	Exploring amino acid modification of nanoparticle surface for selective anti-parasite action and enhanced biocompatibility
五十嵐 郁男	第 65 回 桂田賞	H30 年 3 月	ピロプラズマ症の診断および治療法の開発に関する研究

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
3	93	13	327	2	71	6	271	24	762

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 29 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	H29.7.26	Strategies for the Control of Ticks and Tick-borne Diseases	50 (31)
2	H29.8.27 ～8.30	第 25 回分子寄生虫学ワークショップ／ 第 15 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会	46 (4)
3	H29.8.29	Scientific Meeting of Former JICA Participants and Collaborators of NRCPD in Sri Lanka	14 (11)
4	H29.9.11	The 1st International Japan-Mongolia Joint Symposium on Protozoan Diseases Prevention	29 (17)
5	H29.11.14	上海獣医学研究所との共同研究セミナー	21 (10)
6	H30.3.6	原虫病研究センター共同研究成果報告会	25 (2)

(2)参加状況

区 分	平成 29 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	H29.8.21 ～8.22	The 1st International Symposium on Natural Resources-based Drug Development にて研究成果の発表 (招待講演)	1
2	H29.8.27 ～9.1	第 9 回国際マダニとマダニ媒介感染症学会（招待講演）	1
3	H29.9.4 ～9.8	第 26 回世界獣医寄生虫学会（組織運営・招待講演）	8
4	H29.11.6 ～11.8	第 66 回アメリカ熱帯医学会への出席、成果発表	1
5	H29.12.18 ～12.20	2nd International Conference on Non Tsetse Transmitted Animal Trypanosomosis での発表	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	2	3
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	8	4
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	2	4
合 計						12	11

(2)合意覚書

協定総数	10						
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	3	11
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	3
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	0	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	0	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	1
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	2	2
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	0	1
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	2	0
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	2
平成 29 年 11 月	平成 34 年 11 月	中国	中国青海獣医学研究所	合意覚書	原虫病	0	3
合 計						14	25

③国際的な研究プロジェクトへの参加状況

総 数	5		
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単に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 五十嵐郁男
H28 年から 3 年間	アジア、アフリカ、欧米諸国 英国・動植物安全庁 南アフリカ・オンデルステポルト獣医学研究所 インド・国立馬研究所 タイ・カセサート大学、チェンマイ大学、家畜衛生研究所 モンゴル・獣医学研究所 カナダ・食糧検査庁 米国・ワシントン州立大学 メキシコ・動物衛生研究所 アルゼンチン・農業技術研究所	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

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
H29 年から 3 年間	ベトナム・フエ大学 タイ・カセサート大学 フィリピン・デラサール大学 スリランカ・獣医学研究所	プロジェクト名：JSPS 拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）・マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築 プロジェクト概要：本事業では、これまでセンターが設立初期から形成して来たアジア諸国（ベトナム、タイ、フィリピン、スリランカ）の研究機関との交流ネットワークを活用し、新たにマダニ媒介原虫感染症の制圧に特化した国際共同研究拠点を構築することを目指す。すなわち、ゲノム科学に立脚した、各流行地域に適したマダニとマダニ媒介原虫感染症に対する斬新な診断・治療・予防法の創出を通し、開発途上国における家畜生産性向上への貢献を目的とした国際ネットワークのプラットフォームを形成する。さらに、日本側及び相手国側の大学院生・若手研究者を積極的に本事業の中心で活躍させることにより、マダニ媒介原虫感染症の基礎・応用研究に精通したグローバルな若手研究者を育成する。 参加国：日本・ベトナム・タイ・フィリピン・スリランカ 予算見込み額・2000 万円	玄 学南 横山直明 福本晋也 白藤梨可

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 29 年度	
		派遣状況	招へい状況
事業区分	合 計	83	51
	文部科学省事業	0	4
	日本学術振興会事業	27	6
	当該法人による事業	34	14
	その他の事業	22	27
派遣先国	① アジア	61	45
	② 北米	6	0
	③ 中南米	3	0
	④ ヨーロッパ	5	4
	⑤ オセアニア	1	0
	⑥ 中東	2	1
	⑦ アフリカ	5	1

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	3	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	22	16
JSPS 拠点形成	JSPS 拠点形成事業キックオフミーティング	8	0
合 計		33	16

6. 教育活動・人材養成

①大学院生等の受入状況

区 分	平成 29 年度	
		うち外国人
博士後期課程	18	17
うち社会人 DC	0	0
修士・博士前期課程	8	5
うち社会人 MC	0	0
学 部 生	18	0
合 計	44	22

②留学生の受入状況

区 分	平成 29 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	4
⑦アフリカ	6
合 計	27

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 29 年度	
	学内	学外
博士号取得者数	6	1

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	29 年 9 月 29 日
	氏 名	ワン カンボ WANG Guanbo (王 冠博) 中国	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Analysis of host defense immunity and development of recombinant vaccines against <i>Babesia microti</i> infection.		
	日本語訳	バベシアマイクロティ感染に対する宿主免疫の解析と組換えワクチンの開発		
2	専攻分野名	家畜環境衛生学	学位授与 年月日	29 年 9 月 29 日
	氏 名	アジルワン グスワント Azirwan Guswanto インドネシア	担当教員	五十嵐郁男
	学位論文 の題名	Studies on the development of diagnostic methods and chemotherapeutics of babesiosis.		
	日本語訳	バベシア病の診断法と化学療法の開発に関する研究		
3	専攻分野名	家畜環境衛生学	学位授与 年月日	29 年 9 月 29 日
	氏 名	リーソンブン アーボン LEESOMBUN Arpron タイ	担当教員	西川義文
	学位論文 の題名	Efficacy of piperaceae plant extracts and microorganism-derived compounds: metacytofilin and kijimicin against <i>Toxoplasma gondii</i> .		
	日本語訳	トキソプラズマ・ゴンディに対するコショウ科植物抽出物、微生物由来化合物メタサイトフィリンおよびキジマイシンの効果		
4	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	30 年 3 月 20 日
	氏 名	モレフェ ンタティスイ イノセンシア Molefe Nthati Innocentia 南アフリカ	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Repositioning of orally administered compounds for the treatment of African trypanosomosis.		
	日本語訳	ドラッグ・リポジショニングによる新規トリパノソーマ病経口治療薬開発に関する研究		

5	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	30 年 3 月 20 日
	氏 名	バトドルジ ダバスレン Batdorj Davaasuren モンゴル	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Studies on the development of dourine specific diagnostic methods.		
	日本語訳	媾疫特異的診断技術の確立に向けた研究		
6	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	30 年 3 月 20 日
	氏 名	マカランダ エイドリアン ミキ キュラー MACALANDA Adrian Miki Cular フィリピン	担当教員	河津信一郎
	学位論文 の題名	Studies on the evaluation of potential antigens for an antigen and antibody-based serodiagnostic assays for <i>Schistosoma japonicum</i> infection.		
	日本語訳	抗原及び抗体の検出に基づく血清診断法の開発のための日本住血吸虫抗原の評価に関する研究		
7	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	30 年 3 月 13 日
	氏 名	ブドリコ パトリック VUDRIKO Patrick ウガンダ	担当教員	鈴木宏志
	学位論文 の題名	Studies on Control of Acaricide Resistant Ticks in Uganda		
	日本語訳	ウガンダ共和国における薬剤耐性マダニの対策法に関する研究		

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
6	249	15	836	2	34	23	1119
○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	
H29.7.26	シンポジウム	国際	Strategies for the Control of Ticks and Tick-borne Diseases	国際シンポジウム「マダニとマダニ媒介感染症の制御戦略」が日本学術振興会拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）の一環として実施された。学外から10名（海外8名・国内2名）の招待演者および学内からの8名の一般演者による最新の研究成果が発表され、活発な議論が交わされた。		50	
H29.8.27 ～8.30	研究会	国内 国際	第25回分子寄生虫学ワークショップ／ 第15回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会	分子を合言葉にした寄生虫研究の横断的研究集会で、寄生虫、節足動物、寄生虫症・マラリアの基礎研究に関係する46名の研究者・学生が参加した。“Scienceの場では皆が平等である”というスタンスのもと、活発な議論が繰り返される内容の濃い研究集会となった。 （本学世話人：西川義文、河津信一郎）		46	
H29.9.11	シンポジウム	国際	The 1st International Japan-Mongolia Joint Symposium on Protozoan Diseases Prevention	SATREPS PROJECT FOR EPIDEMIOLOGICAL STUDIES ON ANIMAL PROTOZOAN DISEASES IN MONGOLIA AND DEVELOPMENT OF EFFECTIVE DIAGNOSTIC MEASURES		29	
H29.11.14	セミナー	国際	上海獣医学研究所との共同研究セミナー	日中合同セミナー（マダニとマダニ媒介感染症の制御戦略）		21	

H30.3.6	研究会	国際	原虫病研究センター共同 研究成果報告会	本研究センターと他大学の先生方とで実施した、共同研究の成果報告会 発表者（Speaker）： 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 正谷 達磨 氏 北里大学獣医学部 獣医寄生虫学研究室 准教授 筏井 宏実 氏 公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 上級研究員 二瓶 浩一 氏 早稲田大学 先進理工学部 教授 中尾 洋一 氏	25
---------	-----	----	------------------------	--	----

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	センター専用のホームページ（日本語版・英語版）を開設し、研究活動を国内外に向け、広く紹介している。なお、研究内容は研究者のみならず、一般市民に向けても、理解が得られるよう、工夫しており、例えば、多くの原虫病を媒介し、人や動物に甚大な被害を与えている「マダニ」の研究については、「マダニ解説ビデオ」を制作し、公開している。 また、平成 29 年度には OIE コラボレーティングセンター及びリファレンスラボラトリーの専用ホームページを新たに作成し、実施可能な「ウマピロプラズマ病」「ウシバベシア病」「スー病」の 3 疾病に関する情報と検査依頼手順を公開する等、発信する情報量を充実させている。
SNS	研究ジャーナルや人材育成活動などの情報を発信するため、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や一般ユーザ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	毎年センター概要や研究活動を紹介したリーフレット（日本語版・英語版）を作成し、国内外の関係機関への送付や公共施設への設置、市民が来場するイベントでの配布等により、センターの活動について広く周知している。

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ンポアとしての意義を明らかにするため、地元に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 29 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。マラリア原虫の感染メカニズム解析には、遺伝子組換え原虫が必須のツールとなってきています。ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* は全生活環を実験室で再現可能であることから、マラリアのモデルとして研究に用いられています。本原虫における遺伝子操作では、*in vivo* ピリメタミン、WR99210 薬剤選択システムが常用されています。しかしながらそれらの併用が難しいことに加え、宿主毒性薬剤を使用できないという制約から、他の選択システムがなく、遺伝子操作の制限が大きいです。この問題を解決し、より自由度の高い遺伝子操作を可能にするため、我々は *P. berghei* における *in vitro* 薬剤選択法の開発を進めました。その結果、薬剤存在下の1周期培養・マウス体内増殖を繰り返す新たな選択法を考案し、本法を用いピユーロマイシン・ブラストサイジン選択システムの確立に成功しました。この研究成果は、より自由度の高い組換えネズミマラリア原虫作製の機会を提供するものであり、マラリア研究の進展に寄与することが期待されます(論文リスト1)。

- ・ 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が、その中でもヒトの下痢症で検出される微生物種であるクリプトスポリジウム、ブラストシスティス、腸管出血性大腸菌について詳細に解析を行ったところ、ヒトへの病原性を持つクリプトスポリジウム種は検出されない、ST14 型ブラストシスティスがエゾシカに蔓延している、O26 をはじめとする多様な血清型の出血性大腸菌がエゾシカから高い割合で検出されることが明らかとなりました(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 29 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. Akira Soga, Hironori Bando, Mami Ko-ketsu, Hirono Masuda-Suganuma, Shin-ichiro Kawazu and **Shinya Fukumoto**. High efficacy in vitro selection procedure for generating transgenic parasites of *Plasmodium berghei* using an antibiotic toxic to rodent hosts. **Scientific Reports**. 2017; 7: 4001. PMID: 28638105
2. Madoka Ichikawa-Seki, Tomoko Shiroma, Tatsuya Kariya, Ryo Nakao, Yuma Ohari, Kei Hayashi, **Shinya Fukumoto**. Molecular characterization of *Fasciola* flukes obtained from wild sika deer and domestic cattle in Hokkaido, Japan. **Parasitology International**. 2017; 66: 519-521. PMID: 28396295

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

1. 十勝毎日新聞（2017年7月2日18面）遺伝子組み換えマウスマラリア原虫の作製法確立についての記事掲載
2. 北海道新聞（2017年10月11日22面）マウスマラリア原虫の遺伝子組み換え体を効率的に作製する方法についての記事掲載

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
3. 筏井宏実：北里大学獣医学部、マラリア原虫の媒介蚊体内ステージのオーシスト形成機構の解明、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究

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す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す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29年度研究の総括

- ・ マダニに媒介される赤血球内寄生原虫であるバベシアは約 100 種類同定されているが、牛に寄生する3種類 (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia ovata*) のみについて遺伝子組換え方法が確立されています。他のバベシアについても遺伝子組換え方法の導入が求められています。そこで、犬に寄生するバベシア (*Babesia gibsoni*) について遺伝子組換え方法の確立を試みました。最初は、*Babesia gibsoni* の伸長因子αのプロモーター領域を特定し、GFP 遺伝子発現プラスミドを構築して虫体に導入したところ、GFP 一過性発現虫体の作製に成功しました。次に、伸長因子αプロモーターを含む6種類の *Babesia gibsoni* のプロモーターの制御を受けるルシフェラーゼ発現プラスミドを作製し、異なるプロモーターの活性を測定したところ、アクチンプロモーターが最も強い活性を有することが判明しました。また、*Babesia gibsoni* と *Babesia bovis* の伸長因子αとアクチンプロモーターをそれぞれ、異種虫体に導入してそのプロモーター活性を調べたところ、これらのプロモーターは異種虫体においても機能することを突き止めました。さらに、これらのプロモーターを用いた、*Babesia gibsoni* の外来遺伝子安定発現系の確立にも成功しました。（論文リスト 3、6）

- ・ バベシア属の原虫の中、*Babesia microti* はネズミ由来のバベシアですが、人にも感染する人獣共通感染症の病原原虫としても知られています。この原虫感染症に対する組換えワクチン開発を試みました。バベシア原虫の赤血球侵入に関わるとされる Apical Membrane Antigen 1 (BmAMA1)と Rhoptry Neck Protein 2 (BmRNP2) をクローニングし、組換え BmAMA1 と組換え BmRNP2 を作製しました。これらの組換えタンパク質を単独あるいは組み合わせでハムスターに免疫した後に、*Babesia microti* で攻撃感染させたところ、組み合わせで免疫した群のみににおいて有意な感染防御効果が認められました。この結果により、これら2種類の抗原の組み合わせが *Babesia microti* 感染症に対する有効なワクチン候補になりうるということが明らかとなりました。（論文リスト 14）
- ・ アフリカにおける家畜のマダニ媒介感染症の被害は甚大とされているが、西アフリカに位置しているベナン国における疫学調査とリスク分析のデータはほとんどないのが現状であります。ブラジルからの輸入牛により侵入したとされるオウシマダニ (*Rhipicephalus microplus*) 分布地域（南部地域）と非分布地域（北部地域）における牛のマダニ媒介病原体（バベシア属、タイレリア属、アナプラズマ属）の寄生状態を調べました。その結果、南部地域における感染率は、北部地域より有意に高く、オウシマダニの分布がこれらの感染率の差に影響することが示唆されました。これらの結果から、オウシマダニの積極的駆除がベナン国におけるマダニ媒介感染症の制圧に有効であることが明らかとなりました。（論文リスト 2）
- ・ 南アフリカ、スーダンおよびトルコにおける小型反芻動物（羊・山羊）におけるマダニ媒介感染症の流行実態調査を広範囲に渡り実施しました。南アフリカにおいてはアナプラズマ属（36.3%）、タイレリア属（19.8%）、エーリキア属（14.3%）が、スーダンにおいてはアナプラズマ属（60.1%）、タイレリア属（12.9%）が、トルコにおいてはアナプラズマ属（60.0%）、タイレリア属（35.9%）、バベシア属（5.2%）がそれぞれ重要なマダニ媒介病原体であることが明らかとなりました。アナプラズマ属、タイレリア属、エーリキア属感染動物には顕著な臨床症状は認められなかったが、バベシア属感染動物には重症の貧血症状が認められました。これらの結果は、養羊産業が盛んなこれらの地域におけるマダニ媒介感染症制御対策の重要性を強く提起するものであります。（論文リスト 1、4、12、16）

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医寄生虫学会理事
- ・ 日本寄生虫学会理事
- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 日本熱帯医学会評議員

② 主催した学会、研究会等

- ・ 中日国際シンポジウム「マダニ媒介感染症研究の現状と展望」（平成 29 年 6 月 24 日、上海）

獣医学研究所)

- ・ 国際シンポジウム「マダニとマダニ媒介感染症の制御戦略」(日本学術振興会拠点形成事業-アジア・アフリカ学術基盤形成型)(平成 29 年 7 月 26 日、帯広畜産大学原虫病研究センター)
- ・ スリランカにおける原虫病研究センター元 JICA 研修員・大学院生・共同研究者らによる研究集会(平成 29 年 8 月 29 日、コロンボ)

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 平成 29 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. Seung-Hun Lee, Ehab Mossaad, Abdalla Mohamed Ibrahim, Ahmed Ali Ismail, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Aaron Edmond Ringo, Yang Gao, Huanping Guo, Jixu Li, Artemis Efstratiou, Peter Musinguzi, Tamador EE Angara, Keisuke Sukanuma, Noboru Inoue, Xuenan Xuan*. Detection and molecular characterization of tick-borne pathogens infecting sheep and goats in Blue Nile and West Kordofan states in Sudan. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 598-604. PMID: 29426590
2. Paul Franck Adjou Moumouni, Gilbert Luc Aplogan, Hirotaka Katahira, Yang Gao, Huanping Guo, Artemis Efstratiou, Charoonluk Jirapattharasate, Guanbo Wang, Mingming Liu, Aaron Edmond Ringo, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan*. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of veterinary important tick-borne pathogens in cattle from *Rhipicephalus microplus*-invaded and non-invaded areas of Benin. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 450-464. PMID: 29307783
3. Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Shinuo Cao, Masahito Asada, Guanbo Wang, Yang Gao, Huanping Guo, Jixu Li, Patrick Vudriko, Artemis Efstratiou, Aaron Edmond Ringo, Seung-Hun Lee, Hassan Hakimi, Tatsunori Masatani, Fujiko Sunaga, Shin-ichiro Kawazu, Junya Yamagishi, Lijun Jia, Noboru Inoue, Xuenan Xuan*. Identification and characterization of interchangeable cross-species functional promoters between *Babesia gibsoni* and *Babesia bovis*. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 330-333. PMID: 29174364
4. Aaron Edmond Ringo, Paul Franck Adjou Moumouni, Moeti Taioe, Charoonluk Jirapattharasate, Mingming Liu, Guanbo Wang, Yang Gao, Huanping Guo, Seung-Hun Lee, Weiqing Zheng, Artemis Efstratiou, Jixu Li, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Oriel Thekisoe, Xuenan Xuan*. Molecular analysis of tick-borne protozoan and rickettsial pathogens in small ruminants from two South African provinces. **Parasitology International**. 2018; 67: 144-149. PMID: 29155280
5. Ahmed Abdelmoniem Mousa, Daniel Barry Roche, Mohamad Alaa Terkawi, Kyohko Kameyama, Ketsarin Kamyinkird, Patrick Vudriko, Akram Salama, Shinuo Cao, Sahar Orabi, Hanem Khalifa, Mohamed Ahmed, Mabrouk Attia, Ahmed Elkirdasy, Yo-

- shifumi Nishikawa, Xuenan Xuan*, Emmanuel Cornillot. Human babesiosis: Indication of a molecular mimicry between thrombospondin domains from a novel *Babesia microti* BmP53 protein and host platelets molecules. **PLoS One**. 2017; 12: e0189383. PMID: 29040286
6. Mingming Liu, Masahito Asada, Shinuo Cao, Paul Franck Adjou Moumouni, Patrick Vudriko, Artemis Efstratiou, Hassan Hakimi, Tatsunori Masatani, Fujiko Sunaga, Shin-ichiro Kawazu, Junya Yamagishi, Xuenan Xuan*. Transient transfection of intraerythrocytic *Babesia gibsoni* using *elongation factor-1 alpha* promoter. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 2017; 16: 56-59. PMID: 28729071
 7. Mingming Liu, Lijun Jia, Shinuo Cao, Paul Franck Adjou Moumouni, Charoonluk Jirapattharasate, Guanbo Wang, Yang Gao, Huanping Guo, Mo Zhou, Yu LZ, Xue SJ and Xuenan Xuan*. Molecular detection of *Theileria* species in cattle from Jilin province, China. **Tropical Biomedicine**. 2017; 34: 598-606.
 8. Weiqing Zheng, Haiying Chen, Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Artemis Efstratiou, Liu ZB and Xuenan Xuan*. First evidence of *Mycoplasma haemocanis* in China. **Tropical Biomedicine**. 2017; 34: 983-990.
 9. Huanping Guo, Ferda Sevinc, Onur Ceylan, Mutlu Sevinc, Ege Ince, Yang Gao, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Artemis Efstratiou, Guanbo Wang, Shinuo Cao, Mo Zhou, Charoonluk Jirapattharasate, Aaron Edmond Ringo, Weiqing Zheng, Xuenan Xuan*. A PCR survey of vector-borne pathogens in different dog populations from Turkey. **Acta Parasitologica**. 2017; 62: 533-540. PMID: 28682765
 10. Ketsarin Kamyngkird, Shinuo Cao, Bumduuren Tuvshintulga, Akram Salama, Ahmed Abdelmoniem Mousa, Artemis Efstratiou, Yoshifumi Nishikawa, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan*. Effects of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors on the growth of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in vitro. **Experimental Parasitology**. 2017; 176: 59-65. PMID: 28286324
 11. Charoonluk Jirapattharasate, Paul Franck Adjou Moumouni, Shinuo Cao, Aiko Iguchi, Mingming Liu, Guanbo Wang, Mo Zhou, Patrick Vudriko, Artemis Efstratiou, Tanasak Changbunjong, Sivapong Sungpradit, Parntep Ratanakorn, Walasinee Moonarmart, Poonyapat Sedwisai, Thekhawet Weluwanarak, Witsanu Wongsawang, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan*. Molecular detection and genetic diversity of bovine *Babesia* spp., *Theileria orientalis*, and *Anaplasma marginale* in beef cattle in Thailand. **Parasitology Research**. 2017; 116: 751-762. PMID: 28028631
 12. Mo Zhou, Shinuo Cao, Ferda Sevinc, Mutlu Sevinc, Onur Ceylan, Sepil Ekici, Charoonluk Jirapattharasate, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Guanbo Wang, Aiko Iguchi, Patrick Vudriko, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan*. Molecular detection and genetic characterization of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* amongst apparently healthy sheep and goats in the central region of Turkey. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2017; 8: 246-252. PMID: 27908771
 13. Weiqing Zheng, Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Xiaoqing Liu, Artemis Efstratiou, Zhanbin Liu, Yangqing Liu, Huiying Tao, Huanping Guo, Guanbo Wang, Yang Gao, Zifen Li, Aaron Edmund Ringo, Charoonluk Jirapattharasate, Haiying Chen, Xuenan Xuan*. First molecular detection of tick-borne pathogens in dogs from

- Jiangxi, China. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2017; 79: 248-254. PMID: 27890889
14. Guanbo Wang, Artemis Efstratiou, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Charoonluk Jirapattharasate, Huanping Guo, Yang Gao, Shinuo Cao, Mo Zhou, Hiroshi Suzuki, Ikuo Igarashi, **Xuenan Xuan***. Expression of truncated *Babesia microti* apical membrane protein 1 and rhoptry neck protein 2 and evaluation of their protective efficacy. **Experimental Parasitology**. 2017; 172: 5-11. PMID: 27876473
 15. Adrian P Ybañez, Rochelle Haidee D Ybañez, MaxFrancis G Talle, Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, **Xuenan Xuan***. First report on *Babesia vogeli* infection in dogs in the Philippines. **Parasitology International**. 2017; 66: 813-815. PMID: 27713098
 16. Ferda Sevinc, Mo Zhou, Shinuo Cao, Onur Ceylan, Mehmet Fatih Aydin, Mutlu Sevinc, **Xuenan Xuan**. Haemoparasitic agents associated with ovine babesiosis: A possible negative interaction between *Babesia ovis* and *Theileria ovis*. **Veterinary Parasitology**. 2018; 252: 143-147. PMID: 29559137
 17. Rochelle Haidee D Ybanez, Adrian P Ybanez, Lyra Lee A Arnado, Laila Monika P Belarmino, Knowlie Gay F Malingin, Paul Bien C Cabilete, Ziggy Ryan O Amores, Maxfrancis G Talle, Mingming Liu, **Xuenan Xuan**. Detection of *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Babesia* spp. in dogs of Cebu, Philippines. **Veterinary World**. 2018; 11: 14-19. PMID: 29479151
 18. Patrick Vudriko, James Okwee-Acai, Joseph Byaruhanga, Dickson Stuart Tayebwa, Robert Omara, Jeanne Bukeka Muhindo, Charles Lagu, Rika Umemiya-Shirafuji, **Xuenan Xuan**, Hiroshi Suzuki. Evidence-based tick acaricide resistance intervention strategy in Uganda: Concept and feedback of farmers and stakeholders. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 254-265. PMID: 28978456
 19. Weiqing Zheng, Yangqing Liu, Huiying Tao, Zifen Li, **Xuenan Xuan**, Xiaoqing Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Yayun Wu, Wenqing Liu, Haiying Chen. First molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in rodent populations of Nanchang, China. **Japanese Journal of Infectious Diseases**. 2018; 71: 129-133. PMID: 29491242
 20. Adrian Miki C Macalanda, Jose Ma M Angeles, Kharleezelle J Moendeg, Anh Tm Dang, Luna Higuchi, Noboru Inoue, **Xuenan Xuan**, Masashi Kirinoki, Yuichi Chigusa, Lydia R Leonardo, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, Yasuyuki Goto, Shin-Ichiro Kawazu. Evaluation of *Schistosoma japonicum* thioredoxin peroxidase-1 as a potential circulating antigen target for the diagnosis of Asian schistosomiasis. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2018; 80: 156-163. PMID: 29187698
 21. Ehab Mossaad, Rawan A Satti, Abdeen Fadul, Keisuke Suganuma, Bashir Salim, E A Elamin, Simon Peter Musinguzi, **Xuenan Xuan**, Noboru Inoue. The incrimination of three trypanosome species in clinically affected German shepherd dogs in Sudan. **Parasitology Research**. 2017; 116: 2921-2925. PMID: 28856450
 22. Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, James Okwee-Acai, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, Charoonluk Jirapattharasate, Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Kozo Fujisaki, **Xuenan Xuan**, Hiroshi Suzuki. Genetic mu-

- tations in sodium channel domain II and carboxylesterase genes associated with phenotypic resistance against synthetic pyrethroids by *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* ticks in Uganda. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 2017; 143: 181-190. PMID: 29183590
23. Sylvatrie-Danne Dinzouna-Boutamba, Sanghyun Lee, Ui-han Son, Hae Soo Yun, So-Young Joo, Sookwan Jeong, Man Hee Rhee, Dongmi Kwak, Xuenan Xuan, Yeonchul Hong, Dong-Il Chung, Youn-Kyoung Goo. Determination of multiple-clone infection at allelic dimorphism site of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in the Republic of Korea by pyrosequencing assay. **Acta Tropica**. 2017; 176: 300-304. PMID: 28847673
 24. Nthatisi Innocentia Molefe, Shino Yamasaki, Adrian Miki C Macalanda, Keisuke Suganuma, Kenichi Watanabe, Xuenan Xuan, Noboru Inoue. Oral administration of azithromycin ameliorates trypanosomosis in *Trypanosoma congolense*-infected mice. **Parasitology Research**. 2017; 116: 2407-2415. PMID: 28674747
 25. Michihito Tagawa, Yuhei Yamamoto, Genya Shimbo, Aiko Iguchi, Xuenan Xuan, Mizuki Tomihari, Kazuro Miyahara. Gene and protein expression of a soluble form of CTLA-4 in a healthy dog. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2017; 79: 871-875. PMID: 28392507
 26. Abdelbaset Eweda Abdelbaset, Hend Alhasan, Doaa Salman, Mohamed Hassan Karam, Mahmoud Abd Ellah Rushdi, Xuan Xuenan, Makoto Igarashi. Evaluation of recombinant antigens in combination and single formula for diagnosis of feline toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**. 2017; 172: 1-4. PMID: 27876472
 27. Batdorj Davaasuren, Tovuu Amgalanbaatar, Simon Peter Musinguzi, Keisuke Suganuma, Davaajav Otgonsuren, Ehab Mossaad, Sandagdorj Narantsatsral, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, Xuenan Xuan, Noboru Inoue. The evaluation of GM6-based ELISA and ICT as diagnostic methods on a Mongolian farm with an outbreak of non-tsetse transmitted horse trypanosomosis. **Veterinary Parasitology**. 2017; 244: 123-128. PMID: 28917303
 28. Ehab Mossaad, Bashir Salim, Keisuke Suganuma, Peter Musinguzi, Mohammed A Hassan, EA Elamin, GE Mohammed, Amel O Bakhiet, Xuenan Xuan, Rawan A Satti and Noboru Inoue. *Trypanosoma vivax* is the second leading cause of camel trypanosomosis in Sudan after *Trypanosoma evansi*. **Parasites & Vectors**. 2017; 10: 176. PMID: 28403897

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. 組換えバベシア原虫作製法の確立と応用、中日国際シンポジウム：マダニ媒介感染症研究の現状と展望、平成 29 年 6 月 24 日、中国上海獣医学研究所

9. 獲得研究費

1. 平成 29 年度 JSPS 研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）、マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、代表、平成 29 年度～31 年度
2. 平成 29 年度 科研費特別研究員奨励費、東南アジアにおける牛マダニ媒介原虫病の疫学調査と制御対策へのアプローチ、代表、平成 29 年度～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. 山岸潤也：北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、フタトゲチマダニのドラフトゲノム解析、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 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、トキソプラズマ虫体細胞膜の生体膜ミクロドメインをナノスケールレベルで可視化する、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

医学分野で重要なマラリア原虫は、世界で年間 3～5 億人が罹患、年間 200 万人もの命を奪っています。わが国にも存在するトキソプラズマはその感染による流産や新生児の先天性トキソプラズマ症を引き起こし、少子化が進む現代社会には無視できない問題です。また畜産業界では、家畜原虫感染症による家畜の生産性の低下が問題視され、ネオスポラの感染による牛の流産例が全国的に見つかっており、被害の拡大が懸念されています。我々の研究室では、原虫感染による脳神経系の機能異常や宿主動物の行動変化、流産や垂直感染のメカニズムに関する研究を行っています。また、炎症反応や免疫抑制を制御する原虫因子の同定と解析を進めています。これら科学的な知見を基盤に、多機能性リポソーム等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 29 年度研究の総括

- ・ Toll-like receptor (TLR) 2 は TLR ファミリーに属する受容体タンパク質で、トキソプラズマに対する防御免疫の作動に不可欠であることが知られています。また神経炎症等に関連し、中枢神経系におけるその病理学的な機能の研究も進みつつあります。本研究ではトキソプラズマ感染時、脳細胞で TLR2 が担う機能の解明を目指し、TLR2 欠損マウスを用いたトランスクリプトーム解析を行いました。TLR2 欠損型および野生型マウスの脳組織からアストロサイト (AS)、ミクログリア (MG)、ニューロン (Neu) を採取、培養し、トキソプラズマ PLK 株のタキゾイトを感染後、mRNA を抽出して RNA-seq 解析を行いました。まず非感染細胞と比較して感染細胞で発現が変動した遺伝子を抽出し、さらにその発現変動遺伝子を細胞種ごとに TLR2 欠損型と野生型で比較解析しました。AS および MG では、野生型で感染により発現が変動した遺伝子の多くが TLR2 欠損型では変動が見られなくなりました。一方 Neu では、他の細胞種に比べて TLR2 の欠損により発現が変動しなくなる遺伝子の数が少なくなりました。発

現変動が見られなくなった遺伝子に対して Gene Ontology (GO) 解析を行ったところ、AS と MG ではともに免疫応答に関連した GO が上位を占めました。Neu では核や代謝関連の GO が上位に現れ、免疫関連は順位を下げました。これらの結果から、AS や MG では免疫細胞と同様、TLR2 がトキソプラズマに対する防御免疫に重要であることが示されました。また、生体内で Neu には他の細胞種よりも原虫の感染が多いことが知られていますが、これは TLR2 を介した原虫に対する防御経路を Neu が欠いているためであることが示唆されました。本研究の結果は、トキソプラズマ感染における脳神経系の役割の理解に貢献すると考えます（論文リスト3）

- ・ 細胞内寄生原虫トキソプラズマの妊娠期の感染は流産や胎児への先天性トキソプラズマ症を引き起こし、重篤化します。しかし、感染による流産発症メカニズムは明らかになっていません。今回、トキソプラズマ感染によるマウスの流産モデルを確立し、その病態について解析しました。妊娠子宮組織の遺伝子発現解析により、ケモカイン受容体 CCR5 の感染依存的な発現上昇が認められました。そこで、CCR5 遺伝子欠損 (CCR5KO) マウスと野生型マウスを用い、トキソプラズマ感染による妊娠期病態を比較しました。野生型マウスの妊娠 3 日めにトキソプラズマを感染させると、すべての個体で胚の発育不良とアポトーシスが認められました。一方、CCR5KO マウスでは胚の生存率が上昇し、妊娠 10 日めで約 8 割の個体で妊娠が維持されました。この病態メカニズムには CCR5 とそのリガンドの相互作用が推測され、天然型リガンドの RANTES (CCL5)あるいは原虫由来リガンド Cyclophilin-18 の関与が示唆されます。これら受容体とリガンドの相互作用を標的とした創薬は、先天性トキソプラズマ症の対策に貢献すると思われます。（論文リスト5）
- ・ トキソプラズマの感染は世界の公衆衛生の諸問題に大きな影響を与えています。トキソプラズマ症は精神疾患、神経疾患、視神経に傷害を与えることが知られています。トキソプラズマの感染は世界中に広がっていますが、その中でもインドネシアのヒトにおける感染率は 50%を超えています。インドネシアは大小さまざまな島から構成されており、今回はスラウェシ島北部のヒト、ブタ、ウシにおけるトキソプラズマ感染状況を調査しました。ヒト血清サンプル(856 検体)の 58.5%がトキソプラズマ陽性で、男性と女性間での陽性率に差は認められませんでした。0~9 歳では感染率が 10%以下でしたが、10 歳以上から感染率が 40%以上に増加していました。感染源として食肉に着目しブタとウシの感染率を調査したところ、それぞれ 2.3%と 14.9%でした。以上の結果は、スラウェシ島北部のヒトにはトキソプラズマ感染が蔓延しており、本地域の感染要因を特定する必要があることを示しています。本研究結果は、インドネシア・サムラランギ大学との共同研究の成果です。（論文リスト6）
- ・ 病原性原虫トキソプラズマのワクチンを開発するためには、免疫活性化能をもつワクチン抗原を使用することが有効であると考えられます。本研究では、トキソプラズマのペルオキシレドシン 1 (TgPrx1) が免疫活性化能と防御免疫効果を持つことを見出しました。TgPrx1 を免疫細胞マクロファージ作用させたところ、免疫活性化に重要な NF- κ B シグナルを活性化し、炎

症性サイトカインの産生を誘導しました。この結果は、TgPrx1 が免疫活性化を誘導するアジュバント効果を持つことを示しています。TgPrx1 をマウスに免疫すると、抗原特異的な抗体産生とリンパ球の活性化が認められました。さらに、TgPrx1 を免疫したマウスはトキソプラズマの感染に対し抵抗性を示し、原虫の脳内感染を減少させマウスの生存率が増加しました。以上より、TgPrx1 のような免疫活性化能をもつ抗原はワクチン開発に有効であることが示されました。（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
- ・ 日本獣医寄生虫学会常任理事・渉外・広報担当理事

② 主催した学会、研究会等

- ・ 第25回分子寄生虫学ワークショップ（平成29年8月27日～8月30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
- ・ 日本獣医学会寄生虫分科会、会計監査
- ・ The Journal of Protozoology Research 編集委員長

6. 平成29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. Karin Uesaka, Kenji Koyama, Noriyuki Horiuchi, Yoshiyasu Kobayashi, Yoshifumi Nishikawa, Hisashi Inokuma. A clinical case of neosporosis in a 4-week-old holstein friesian calf which developed hindlimb paresis postnatally. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 2018; 80: 280-283. PMID: 29237996
2. Uesaka K, Hisashi Inokuma, Noriyuki Horiuchi, Yoshiyasu Kobayashi, Hidefumi Furukawa, Yoshifumi Nishikawa. Detection of anti-*Neospora caninum* antibody in serum and cerebrospinal fluid from a calf with neosporosis. **Japanese journal of veterinary parasitology**. 2017; 16:18-21.
3. Kousuke Umeda, Sachi Tanaka, Fumiaki Ihara, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Yoshifumi Nishikawa*. Transcriptional profiling of Toll-like receptor 2-deficient primary murine brain cells during *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS One**. 2017; 12: e0187703. PMID: 29136637

4. Ahmed Abdelmoniem Mousa, Daniel Barry Roche, Mohamad Alaa Terkawi, Kyohko Kameyama, Ketsarin Kamyngkird, Patrick Vudriko, Akram Salama, Shinuo Cao, Sahar Orabi, Hanem Khalifa, Mohamed Ahmed, Mabrouk Attia, Ahmed Elkirdasy, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan, Emmanuel Cornillot. Human babesiosis: Indication of a molecular mimicry between thrombospondin domains from a novel *Babesia microti* BmP53 protein and host platelets molecules. **PLoS One**. 2017; 12: e0185372. PMID: 29040286
5. Maki Nishimura, Kousuke Umeda, Masayuki Suwa, Hidefumi Furuoka and Yoshifumi Nishikawa*. CCR5 is Involved in Interruption of Pregnancy in Mice Infected with *Toxoplasma gondii* During Early Pregnancy. **Infection and Immunity**. 2017; 85: pii: e00257-17. PMID: 28630065
6. Josef Tuda, Sri Adiani, Madoka Ichikawa-Seki, Kousuke Umeda, Yoshifumi Nishikawa*. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in humans and pigs in North Sulawesi, Indonesia. **Parasitology International**. 2017; 66: 615-618. PMID: 28465107
7. Ragab M. Fereig, Yasuhiro Kuroda, Mohamad Alaa Terkawi, Motamed Elsayed Mahmoud, Yoshifumi Nishikawa*. Immunization with *Toxoplasma gondii* Peroxiredoxin 1 Induces Protective Immunity against Toxoplasmosis in Mice. **PLoS One**. 2017; 12: e0176324. PMID: 28448521
8. Azirwan Guswanto, Puttik Allamanda, Euis Siti Mariamah, Tserendorf Munkjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Hitoshi Takemae, Thillaiampalam Sivakumar, Mahmoud AbouLaila, Mohamad Alaa Terkawi, Madoka Ichikawa-Seki, Yoshifumi Nishikawa, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi. Evaluation of immunochromatographic test (ICT) strips for the serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Western Java, Indonesia. **Veterinary Parasitology**. 2017; 239: 76-79. PMID: 28413078
9. Ketsarin Kamyngkird, Shinuo Cao, Bumduuren Tuvshintulga, Akram Salama, Ahmed Abdelmoniem Mousa, Artemis Efstratiou, Yoshifumi Nishikawa, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan. Effects of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors on the growth of *Theileria equi* and *Babesia caballi* *in vitro*. **Experimental Parasitology**. 2017; 176: 59-65. PMID: 28286324

総説（＊責任著者）

1. Yoshifumi Nishikawa*, Towards a Preventive Strategy for Neosporosis: Challenges and Future Perspectives for Vaccine Development Against Infection with *Neospora caninum*. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2017; 79: 1374-1380. PMID: 28690279
2. 猪原史成、西川義文*：トキソプラズマ感染によるヒトの精神疾患とげっ歯類の行動変化、**獣医寄生虫学会誌（Jpn. J. Vet. Parasitol.）**、2016、15(2)、90-99

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. ホストを操る寄生虫:トキソプラズマ (Host manipulation by parasite, *Toxoplasma gondii*)、分子生物・生化学会合同大会 ConBio2017、2017 年 12 月 6 日
2. Introduction of National Research Center on Protozoan Diseases, Obihiro University, Japan、Weill Cornell Medical College (アメリカ)、2017 年 11 月 14 日
3. Introduction of National Research Center on Protozoan Diseases, Obihiro University, Japan、Animal Health Diagnostic Center (AHDC), Cornell University, College of Veterinary Medicine (アメリカ)、2017 年 11 月 13 日
4. Development of screening system for anti-toxoplasmosis agents、The 1st International Symposium on Natural Resources-based Drug Development (インドネシア)、2017 年 8 月 21 日
5. Toxoplasmosis: A Neglected Zoonoses、Airlangga University (インドネシア)、2017 年 8 月 18 日

9. 獲得研究費

1. 平成 29 年度 地域産学バリュープログラム (科学技術振興機構)、ネオスポラ感染に対する社会実装可能な診断方法の開発、代表、平成 29 年度～平成 30 年度
2. 平成 29 年度 挑戦的研究 (萌芽) (文部科学省)、脳内寄生虫トキソプラズマの感染による記憶改変メカニズムの解明 (17K19538)、代表、平成 29 年度～平成 30 年度
3. 伊藤記念財団平成 29 年度研究助成、食肉家畜における原虫感染症の血清診断法の開発と血清疫学的研究、代表、平成 29 年度
4. 平成 29 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、トキソプラズマ症の総合的対策に向けた開発研究、分担、平成 29 年度～平成 31 年度
5. 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
6. 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

10. 特許申請・取得

1. 西川義文、二瓶浩一、飯島正富、一色邦夫、大庭俊一、土井宏育、木村智之、波多野和樹、村松秀行、五十嵐雅之、山崎勝久：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、及び流産又は死産防止剤、特願 2017-243872

2. 西川義文、ラガブ マッハルーフ マハムッド フェレイク：アジュバント、特願 2017-252032

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. Hadi Kuncoro: Mulawarman University, Screening of Anti-*Toxoplasma* Agent From East Borneo Natural Resource 2018 年 2 月 5 日～、共同研究契約
2. 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、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究
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. 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
5. 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
6. 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プロブコールが循環中のビタミン E レベルの抑制、抗原虫効果を発揮することを発見しました。さらに、プロブコールと既存の抗マラリア薬である DHA (dihydroartemisinin)の併用効果が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。現在、臨床応用へ向けての研究を進めています。

これらに加えて、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、妊娠能との関係についても研究課題としています。

また、本年度は、「日本学術振興会論文博士号取得支援希望者に対する支援事業」の支援を受け、ウガンダ・マケレレ大学・アシスタント講師の Patrick VUDRIKO 氏の博士号取得の対象となる研究の実験・論文発表を行うとともに、学位申請とその取得を果たしました。

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、この一連の技術は盲導犬をはじめ

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 29 年度研究の総括

- ・ アフリカ諸国においては、マダニ媒介性感染症が家畜生産に甚大な被害をもたらしており、この大きな要因のひとつに不適切な殺ダニ剤の使用が考えられていますが、その実態についての調査は乏しいものでした。そこで、ウガンダ各地の農場におけるマダニ対策の実態調査を実施し、採取したマダニに薬剤抵抗性が存在すること、およびその抵抗性遺伝子を明らかにするとともに、RFLP 法による殺ダニ剤抵抗性迅速診断法を開発しました（論文リスト 1）。これらの成績からウガンダ各地の農場においては殺ダニ剤抵抗性マダニに対する適切な対策法の実施が必要であると考えられたため、短期・中期的な介入プログラムを考案しました。すなわち、政府関係者、医薬品販売業者、大学等の研究機関、獣医師、畜産業関係者間における情報共有不足が、不適切なマダニ対策の実施に繋がっていると推測されたため、各畜産農家に対する採取したマダニの薬剤感受性判定結果の提供に加え、適切な殺ダニ剤の選択と計画的な使用法の提案を行うとともに、各関係者に向けてセミナーを開催し、ウガンダにおける殺ダニ剤抵抗性マダニ対策法確立の緊急性と重要性について啓蒙活動を実施しました。これらステークホルダーからのフィードバックを集計した結果、殺ダニ剤抵抗性マダニ対策法の確立には本プログラムの推進が非常に有益であると考えられました（論文リスト 5）。殺ダニ剤の不適切な供給と使用、畜産業関係者の知識不足が、誤ったマダニ対策法実施の主要因であることが明らかになりました。
- ・ マラリアは、蚊が宿主動物を吸血することでマラリア原虫が感染する赤血球寄生性原虫感染症で、その患者は重度の貧血、脳マラリアや多臓器不全などの重篤な症状を呈することが知られていますが、いまだに十分な予防・治療法はなく、新たな予防・治療法の開発が必要とされている疾患です。最近、ビタミン E の誘導体であるコハク酸トコフェロールが酸化作用を有することが報告され、がん研究の分野で注目を集めていますが、感染症、特に原虫感染に着目した研究はなされていませんでした。そこで、コハク酸トコフェロールの効果を酸化的負荷に対する感受性の高いマラリア原虫を用いて検証したところ、*P. yoelii* 17XL と *P. berghei* ANKA 感染のどちらにおいても、コハク酸トコフェロールの有意なマウス生存期間の延長とパラシテミアの低下を認めました。現在、エーザイとの共同研究で、より抗マラリア作用の強いビタミン E 誘導体の開発を継続しています。

- ・ これまで盲導犬をはじめとする身体障害者補助犬の効率的育成を果たす目的の一環として、人工授精法の改良を試みてきました。そのひとつとして卵黄に代わる耐凍剤としてスキムミルクを用いた凍結保存液を開発してきましたが、今年度は長期間にわたる繁殖成績を整理して実効性、実用性を検討した結果、スキムミルクを用いた凍結保存液は、卵黄を用いたものと遜色なく、イヌ精子の人工授精に充分利用可能であることが明らかとなりました（論文リスト3）。これによって、凍結精液作製の省力化が図られます。

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 29 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. Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, James Okwee-Acai, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, Charoonluk Jirapattharasate, Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Kozo Fujisaki, Xuenan Xuan, **Hiroshi Suzuki***. Genetic mutations in sodium channel domain II and carboxylesterase gened associated with phenotypic resistance against synthetic pyrethroids by *Rhipicephalus(Boophilus) decoloratus* ticks in Uganda. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 2017; 143:181-190.PMID: 29183590

2. Aaron Edmond Ringo, Paul Franck Adjou Moumouni, Moeti Taioe, Charoonluk Jirapattarasate, Mingming Liu, Guanbo Wang, Yang Gao, Huanping Guo, Seung-Hun Lee, Weiqing Zheng, Artemis Efstratiou, Jixu Li, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Oriel Thekisoe, Xuenan Xuan*. Molecular analysis of tick-borne protozoan and rickettsial pathogens in small ruminants from two South African provinces. **Parasitology International**. 2018; 67:144-149. PMID: 29155280
3. Yasuyuki Abe, Sakimi Yokozawa, Rika Umemiya-Shirafuji, Paul franck Adjou Moumouni, Y Suwa, Hiroshi Suzuki*. Fertilizing ability of canine spermatozoa cryopreserved with skim milk-based extender in a retrospective study. **Reproduction in Domestic Animals**. 2018; 53:237-242. PMID: 29110350
4. Rika Umemiya-Shirafuji, Takeshi Hatta, Kazuhiro Okubo, Moeko Sato, Hiroki Maeda, Aiko Kume, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi, Naotoshi Tsuji, Kozo Fujisaki, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki*. Transovarial persistence of *Babesia ovata* DNA in a hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system. **Acta Parasitologica**. 62, 836-841. 2017; 62:836-841. PMID: 29035855
5. Patrick Vudriko, James Okwee-Acai, Joseph Byaruhanga, Dickson Stuart Tayebwa, Robert Omara, Jeanne Bukeka Muhindo, Charles Lagu, Rika Umemiya-Shirafuji, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki*. Evidence-based tick acaricide resistance intervention strategy in Uganda: Concept and feedback of farmers and stakeholders. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 254-265. PMID: 28978456
6. Takuya Hori, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Shinji Harakawa. Configuration-dependent variability of the effect of an electric field on the plasma glucocorticoid level in immobilized mice. **Bioelectromagnetics**. 2017; 38: 265-271. PMID: 28236325
7. Shinji Harakawa, Takuya Hori, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki*. Time-dependent changes in the suppressive effect of electric field exposure on immobilization-induced plasma glucocorticoid increase in mice. **Bioelectromagnetics**. 2017; 38:272-279. PMID: 28130781
8. Charoonluk Jirapattarasate, Paul Franck Adjou Moumouni, Shinuo Cao, Aiko Iguchi, Mingming Liu, Guanbo Wang, Mo Zhou, Patrick Vudriko, Artemis Efstratiou, Tanasak Changbunjong, Sivapong Sungpradit, Parntep Ratanakorn, Walasinee Moonarmart, Poonyapat Sedwisai, Thekhawet Weluwanarak, Witsanu Wongsawang, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan. Molecular detection and genetic diversity of bovine *Babesia* spp., *Theileria orientalis*, and *Anaplasma marginale* in beef cattle in Thailand. **Parasitology Research**. 2017; 116:751-762. PMID: 28028631
9. Mo Zhou, Shinuo Cao, Ferda Sevinc, Mutlu Sevinc, Onur Ceylan, Sepil Ekici, Charoonluk Jirapattarasate, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Guanbo Wang, Aiko Iguchi, Patrick Vudriko, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan. Molecular detection and genetic characterization of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* amongst apparently

- healthy sheep and goats in the central region of Turkey. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2017; 8:246-252. PMID: 27908771
10. Guanbo Wang, Artemis Efstratiou, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Charoonluk Jirapattharasate, Huanping Guo, Yang Gao, Shinuo Cao, Mo zhou, **Hiroshi Suzuki**, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan. Expression of truncated *Babesia microti* apical membrane protein 1 and rhoptry neck protein 2 and evaluation of their protective efficacy. **Experimental Parasitology**. 2017; 172:5-11. PMID: 27876473
11. Moeko Sato, Takeshi Hatta, Hiroki Maeda, Daigo Tsubokawa, M Abdul Alim, Naotoshi Tsuji, Noboru Inoue, **Hiroshi Suzuki**, Rika Umemiya-Shirafuji. Application of Percoll density gradient centrifugation for separation of *Babesia ovata* infected erythrocytes. **Journal of Protozoology Research**. 2017; 27: 8-12.

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 26 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)
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
3. 平成 29 年度 論文博士取得希望者に対する支援事業 日本学術振興会
4. 平成 29 年度 二国間交流事業共同研究 (中国) 日本学術振興会

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. 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、共同研究

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。

また、本年度よりスタートした「共同利用・共同研究拠点事業 マダニバイオバンク整備とベクターバイオロジーの新展開」の一環として、マダニの鑑別・繁殖・供給システムから遺伝子情報までを網羅した日本初のマダニバイオバンク整備を進めています。

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 29 年度研究の総括

- ・ 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、卵母細胞の細胞質の特徴により、発育ステージをⅠ～Ⅴに分類しました。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、マダニの卵形成および病原体の介卵伝播を理解する上での重要な基礎情報となります。（論文リスト1）
- ・ *in vitro* 培養バベシア *Babesia ovata* 感染牛赤血球の中には、分裂期にある虫体以外に crisis form と呼ばれる異常形態の虫体が発見することがあります。バベシア感染マダニの作出にお

いては、異常形態の虫体を可能な限り排除し、より多くの分裂期虫体を吸血に供することが重要となることから、パーコール密度勾配遠心法を用いた *B. ovata* 感染牛赤血球の調整法の確立を試みました。その結果、パーコール密度勾配遠心法により、分裂期虫体感染赤血球を高比重層に、cysis form 感染赤血球を低比重層に分離することに成功しました。さらに、高比重層を回収し、新鮮牛赤血球およびメディウムとともに培養を行ったところ、虫体の増殖が認められ、本法が虫体の生存および増殖に影響しないことが判明しました。以上のことから、本法は、人工吸血法のような *B. ovata* 分裂期虫体を必要とする実験系に極めて有用であると考えられました。（論文リスト 7）

- ・ 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しました。そ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。（論文リスト 5）

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 評議員、渉外・広報委員（兼 国際交流委員）
- ・ 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 29 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. Ryo Mihara, Rika Umemiya-Shirafuji, Yasuyuki Abe, Tomohide Matsuo, Noriyuki Horiuchi, Suguru Kawano, Kozo Fujisaki, Hiroshi Suzuki. The development of oocytes in the ovary of a parthenogenetic tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Parasitology International**. 2018; 67(4): 465–471. PMID: 29678671
2. Paul Franck Adjou Moumouni, Gilbert Luc Aplogan, Hirotaka Katahira, Yang Gao,

- Huanping Guo, Artemis Efstratiou, Charoonluk Jirapattharasate, Guanbo Wang, Mingming Liu, Aaron Edmond Ringo, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of veterinary important tick-borne pathogens in cattle from *Rhipicephalus microplus*-invaded and non-invaded areas of Benin. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9(3): 450-464. PMID: 29307783
3. Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, James Okwee-Acai, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, Charoonluk Jirapattharasate, Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Kozo Fujisaki, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki. Genetic mutations in sodium channel domain II and carboxylesterase genes associated with phenotypic resistance against synthetic pyrethroids by *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* ticks in Uganda. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 2017; 143: 181-190. PMID: 29183590
 4. Yasuyuki Abe, Sakimi Yokozawa, Rika Umemiya-Shirafuji, Paul franck Adjou Moumouni, Y Suwa, Hiroshi Suzuki. Fertilizing ability of canine spermatozoa cryopreserved with skim milk-based extender in a retrospective study. **Reproduction in Domestic Animals**. 2018; 53(1): 237-242. PMID: 29110350
 5. Rika Umemiya-Shirafuji*, Takeshi Hatta, Kazuhiro Okubo, Moeko Sato, Hiroki Maeda, Aiko Kume, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi, Naotoshi Tsuji, Kozo Fujisaki, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki. Transovarial persistence of *Babesia ovata* DNA in a hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system. **Acta Parasitologica**. 2017; 62(4): 836-841. PMID: 29035855
 6. Patrick Vudriko, James Okwee-Acai, Joseph Byaruhanga, Dickson Stuart Tayebwa, Robert Omara, Jeanne Bukeka Muhindo, Charles Lagu, Rika Umemiya-Shirafuji, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki. Evidence-based tick acaricide resistance intervention strategy in Uganda: Concept and feedback of farmers and stakeholders. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9(2): 254-265. PMID: 28978456
 7. Moeko Sato, Takeshi Hatta, Hiroki Maeda, Daigo Tsubokawa, M Abdul Alim, Naotoshi Tsuji, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Rika Umemiya-Shirafuji*. Application of Percoll density gradient centrifugation for separation of *Babesia ovata*-infected erythrocytes. **Journal of Protozoology Research**. 2017; 27(1-2): 8-12.

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

1. 第 62 回ヒューマンネット十勝 in 畜大、「原虫病研究センターにおけるマダニ研究の紹介」、帯広畜産大学総合研究棟 1 号館、2017 年 7 月 6 日
2. 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 29 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、2017 年 7 月 29 日
3. 寄生虫観察の体験実習、第 7 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、2017 年 12 月 9 日

8. 招待講演等

1. 第 160 回日本獣医学会学術集会・公衆衛生学分科会シンポジウム、「マダニ生物学から見た原虫伝播メカニズムの理解」、鹿児島大学郡元キャンパス、2017 年 9 月 13 日

9. 獲得研究費

1. 平成 29 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 29 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. 平成 29 年度 基盤研究 (B) (海外学術調査) (文部科学省)、ケニアとウガンダにおける殺ダニ剤抵抗性マダニの分布調査と迅速検査法の開発 (17H04641)、分担、平成 29 年度～平成 31 年度
4. 平成 29 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、マダニ吸血プロセスにおけるロンギスタチンの分泌意義と疾患制御への応用 (17H03919)、分担、平成 29 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. 十勝毎日新聞 (2017 年 7 月 8 日 2 面)、異業種交流会「ヒューマンネット十勝」でマダニの研究紹介についての記事掲載
2. 十勝毎日新聞 (2018 年 1 月 11 日 25 面)、「共同利用・共同研究拠点事業 マダニバイオバンク整備とベクターバイオロジーの新展開 (平成 29 年度～平成 33 年度)」において作成したリーフレット「とかちマダニじてん」についての記事掲載

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 中尾 亮：北海道大学大学院獣医学研究院、マダニから分離した *Spiroplasma* 属共生菌の微生物学的特性解析、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究
2. 田仲 哲也：鹿児島大学共同獣医学部、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、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究
3. Haiyan Gong : Chinese Academy Of Agricultural Sciences、RNA interference of Serpins in Soft tick *Ornithodoros moubata* to reveal the molecules associated with serpins function、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究

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、ピロプラズマ原虫の赤血球侵入、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 29 年度研究の総括

- ・ 牛バベシア *Babesia bovis* と *Babesia bigemina* の組換え抗原 SBP-4 と rRAP1/CT17 を用いて、迅速・簡便な血清診断法であるイムノクロマト法の単独および複合ストリップを作製し、間接ELISAと比較検討した。その結果、*B. bovis* と *B. bigemina* とも間接ELISA、単独イムノクロマト法、複合イムノクロマト法の順で陽性率が若干減少したが、3法は高い一致率を示した。以上の結果より、イムノクロマト法は迅速性が求められる流行地での疫学調査に有効な血清診断法である事が示唆された。（論文リスト11）
- ・ N-acetyl-L-cysteineの*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia divergens*, *Theileria equi*に対する増殖抑制効果を検討した。その結果、N-acetyl-L-cysteineはマイクロモルオーダーの低濃度で原虫の増殖を抑制した。特にdiminazene aceturateと併用した場合、*B. bovis* と *B. caballii* に対してより高い抑制効果を示し、今後の更なる検討により新規薬剤となる可能性が高い。（論文リスト10）

- ・ 牛バベシア *Babesia divergens* に対するワクチン候補の開発のため、赤血球結合たんぱく質 (BdEBP) に対する抗血清を作製し、赤血球の侵入に対する効果を検討した。その結果、BdEBP に対する抗血清は *B. divergens* の赤血球への侵入を阻止する事が示され、BdEBP はワクチン候補となりうる可能性を示した。(論文リスト8)
- ・ クロファジミン(CF) は培養バベシアの増殖を抑制し、マウスバベシア実験系でもその治療効果が示された。しかしながら、CFは感染マウスのバベシアを用いた治療では、完全に殺滅する事が出来ない事も明らかになっている。そこで本研究では、治療効果が高いが副作用も強く現在最も良く使用されているジミナゼン・アセチューレート (DA) とCF を併用し、効果が高く副作用の少ない治療法について検討した。その結果、併用療法は単独治療法よりも効果が高く、CF は mRNA とDNA濃度を抑制し、DAはDNA 量のみを抑制する事が示唆された。以上より、DA・CF併用治療法はこれまでよりも効果の高い治療法となる事が期待される。(論文リスト4)
- ・ マウスバベシア実験による新規薬剤の治療効果を迅速により簡単な評価法について、SYBR Green I (SG I)を用いて検討した。その結果、2.5% HCT で SG I を2倍希釈で用いると最適の評価が得られ、顕微鏡により血液塗抹標本を用いて算出する方法と高い相関が得られた。(論文リスト5)
- ・ *B. bovis* SBP-4および *B. bigemina* RAP-1a 組換え抗原を用いたenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)および immunochromatographic test (ICT), 更に各遺伝子を標的とした nested PCR (nPCR) を、インドネシアで採取した牛の487 例の血液サンプルを用いて評価した。その結果、*B. bovis* では ELISA, 単一-ICT, 複数-ICT と nPCR で340 (69.8%), 317 (65.1%), 307 (63.0%) 247例 (50.7%)が陽性反応を示した。一方、*B. bigemina*では134 (27.5%), 130 (26.7%), 127 (26.1%) and 93 例(19.1%)がそれぞれ陽性反応を示した。また、125 (25.7%), 113 (23.2%), 109 (22.4%) 52 例(10.7%) が混合感染であった。更にnPCR で陽性例を示した塩基配列は各国で得られた分離株の塩基配列を高い相関率を示した。(論文リスト3)
- ・ 熱ショック蛋白質90阻害剤 (17-DMAG) のバベシアとタイレリアに対する増殖抑制効果を検討した。その結果、17-DMAG の *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. caballi*, と *T. equi* に対するIC50 はそれぞれ 77.6 ± 2.9 , 62.4 ± 1.9 , 183.8 ± 3.2 , 88.5 ± 9.6 , and 307.7 ± 7.2 nMであった。また、ジミナゼン・アセチューレート (DA) と17-DMAGを併用すると、相乗ないし相加効果を示した。さらに、また、*B. microti*感染マウスに17-DMAG 30 mg/kgを投与すると、治療効果が認められ、現在人バベシア病の治療に用いられている薬剤との新しい併用治療法として期待される。(論文リスト1)

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
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議員
- ・ 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
- ・ 独立行政法人日本学術振興会 第3回「野口英世アフリカ賞」医学研究分野推薦委員会委員

6. 平成29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. Azirwan Guswanto, Arifin Budiman Nugraha, Bumduuren Tuvshintulga, Dickson Stuart Tayebwa, Mohamed Abdo Rizk, Gaber El-Saber Batiha, Sambuu Gantuya, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi***. 17-DMAG inhibits the multiplication of several *Babesia* species and *Theileria equi* on *in vitro* cultures, and *Babesia microti* in mice. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. 2018; 8: 104-111. PMID: 29499568
2. Thillaiampalam Sivakumar, Dinh Thi Bich Lan, Phung Thang Long, Le Quoc Viet, Gayani Weerasooriya, Aiko Kume, Keisuke Sukanuma, **Ikuo Igarashi**, Naoaki Yokoyama. Serological and molecular surveys of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* among native cattle and cattle imported from Thailand in Hue, Vietnam. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2017; 80: 333-336. PMID: 29249730
3. Azirwan Guswanto, Puttik Allamanda, Euis Siti Mariamah, Sodirun Sodirun, Putut Eko Wibowo, Liliek Indrayani, Rudi Harso Nugroho, I Ketut Wirata, Nur Jannah, Lepsi Putri Dias, Hadi Purnama Wirawan, Rochmadi Yanto, Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama and **Ikuo Igarashi***. Molecular and serological detection of bovine babesiosis in Indonesia. **Parasites & Vectors**. 2017; 10: 550. PMID: 29110723

4. Bumduuren Tuvshintulga, Mahmoud AbouLaila, Thillaiampalam Sivakumar, Dickson Stuart Tayebwa, Sambuu Gantuya, Khandsuren Naranbaatar, Aki Ishiyama, Masato Iwatsuki, Kazuhiko Ootoguro, Satoshi Ōmura, Mohamad Alaa Terkawi, Azirwan Guswanto, Mohamed Abdo Rizk, Naoaki Yokoyama & **Ikuo Igarashi***. Chemotherapeutic efficacies of a clofazimine and diminazene aceturate combination against piroplasm parasites and their AT-rich DNA-binding activity on *Babesia bovis*. **Scientific Reports**. 2017; 7: 13888. PMID: 29066849
5. Mohamed Abdo Rizk, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Mahmoud AbouLaila, Rasha Eltaysh, Naoaki Yokoyama & **Ikuo Igarashi***. Performance and consistency of a fluorescence-based high-throughput screening assay for use in *Babesia* drug screening in mice. **Scientific Reports**. 2017; 7: 12774. PMID: 29038534
6. Rika Umemiya-Shirafuji, Takeshi Hatta, Kazuhiro Okubo, Moeko Sato, Hiroki Maeda, Aiko Kume, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi**, Naotoshi Tsuji, Kozo Fujisaki, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki. Transovarial persistence of *Babesia ovata* DNA in a hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system. **Acta Parasitologica**. 2017; 62: 836-841. PMID: 29035855
7. Duger Badral, Batsukh Odonbayar, Toshihiro Murata*, Tserendorj Munkhjargal, Bumduuren Tuvshintulga, **Ikuo Igarashi**, Keisuke Suganuma, Noboru Inoue, Adelheid H. Brantner, Gendaram Odontuya, Kenroh Sasaki, Javzan Batkhuu. Flavonoid and galloyl glycosides isolated from *Saxifraga spinulosa* and their antioxidative and inhibitory activities against species that cause piroplasmiasis. **Journal of Natural Products**. 2017; 80: 2416-2423. PMID: 28832147
8. Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Mohamed Abdo Rizk, Mohamad Alaa Terkawi, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi***. Molecular identification and antigenic characterization of *Babesia divergens* erythrocyte binding protein (BdEBP) as a potential vaccine candidate. **Parasitology International**. 2017; 66: 721-726. PMID: 28743470
9. Takahiro Ishizaki, Thillaiampalam Sivakumar, Kyoko Hayashida, Hitoshi Takemae, Bumduuren Tuvshintulga, Tserendorj Munkhjargal, Azirwan Guswanto, **Ikuo Igarashi**, Naoaki Yokoyama*. *Babesia bovis* BOV57, a *Theileria parva* P67 homolog, is an invasion-related, neutralization-sensitive antigen. **Infection, Genetics and Evolution**. 2017; 54:138-145. PMID: 28668608
10. Mohamed Abdo Rizk, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Mahmoud AbouLaila, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi***. Evaluation of the inhibitory effect of N-acetyl-L-cysteine

- on *Babesia* and *Theileria* parasites. **Experimental Parasitology**. 2017; 179: 43-48. PMID: 28655583
11. Azirwan Guswanto, Puttik Allamanda, Euis Siti Mariamah, Tserendorf Munkjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Hitoshi Takemae, Thillaiampalam Sivakumar, Mahmoud AbouLaila, Mohamad Alaa Terkawi, Madoka Ichikawa-Seki, Yoshifumi Nishikawa, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi***. Evaluation of immunochromatographic test (ICT) strips for the serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Western Java, Indonesia. **Veterinary Parasitology**. 2017; 239: 76-79. PMID: 28413078
 12. Ketsarin Kamyngkird, Shinuo Cao, Bumduuren Tuvshintulga, Akram Salama, Ahmed Abdelmoniem Mousa, Artemis Efstratiou, Yoshifumi Nishikawa, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi**, Xuenan Xuan*. Effects of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors on the growth of *Theileria equi* and *Babesia caballi in vitro*. **Experimental Parasitology**. 2017; 76: 59-65. PMID: 28286324

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. 第 86 回日本寄生虫学会記念講演 (Research global and live local ～ピロプラズマ病研究を振り返って～)

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
2. セルジーン株式会社 (米国)、バベシア病に対する新規薬剤の開発

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞者：五十嵐 郁男

受賞名：第 65 回桂田賞（第 87 回日本寄生虫学会）

受賞テーマ：ピロプラズマ症の診断および治療法の開発に関する研究

受賞年：平成 30 年 3 月 18 日

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. 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、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究
2. セルジーン株式会社：バベシア病に対する新規薬剤の開発
3. 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（科研）
馬ピロプラズマ病：英国・動植物安全庁、カナダ・食糧検査庁、インド・国立馬研究所、
タイ・チェンマイ大学
牛バベシア病：メキシコ・動物衛生研究所、アルゼンチン・農業技術中央研究所、
タイ・カセサート大学

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有効な対策を確立するために、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
- ・ 牛ピロプラズマ病の新規薬剤候補の探索に関する基礎研究

3. 平成 29 年度研究の総括

- ・ 牛タイレリア (*Theileria orientalis*) による牛小型ピロプラズマ病の発生が問題となっていた北海道東部の公共育成牧場において、北方系マダニ（シュルツェマダニ、ヤマトマダニなど）の生態を基盤としたマダニ対策予防プログラムを考案し、5 年間にわたってそのプログラムを実施してきました。その結果、北方系マダニの最盛期（5～6 月）における集中的な牛体へのマダニ対策（入牧前及び入牧直後 2 週間間隔毎最低 3 回の殺マダニ剤（フルメトリン製剤）の適用）を継続することが、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ました。本論文は、帯広畜産大学・臨床獣医学部門と北海道ひがし農業共済組合との共同研究の成果です（論文リスト 1）。
- ・ 牛バベシア (*Babesia bovis*) の BOV57 は、牛タイレリア (*Theileria parva*) のワクチン候補抗原として知られている P67 のホモログで、バベシア寄生サイクルのマダニ期及び牛血液期の両方で発現する原虫抗原です。しかし、BOV57 抗原のワクチンとしての潜在能力はこれまで調べられてきませんでした。そこで本研究では、まず組換え BOV57 (rBOV57) を作製し、

マウス及びウサギにおいて rBOV57 に対するポリクローナル抗体を作製しました。マウス抗 rBOV57 抗体を用いた間接蛍光抗体法では、BOV57 が血液寄生期メロゾイトの先端付近の原虫膜に局在していることが観察されました。さらに、試験管内原虫侵入阻害試験において、ウサギ抗 rBOV57 抗体は、*B. bovis* メロゾイトの赤血球侵入を有意に阻害することが分かりました。これらの知見は、*B. bovis* の BOV57 がメロゾイトの赤血球侵入に重要な役割を果たし、牛バベシア病に対する新たなサブユニットワクチンの候補抗原として活用できる可能性を示唆しています（論文リスト 7）。

- ・ 牛タイレリア (*Theileria orientalis*) は、しばしば感染牛に重篤な貧血を引き起こし、牛小型ピロプラズマ病を引き起こします。本研究では、北海道東部の流行地域で放牧されていた牛で測定された赤血球 (RBC) 指数を分析し、感染と貧血の関連性について調査しました。外来牛種であるホルスタインとヘレフォードでは、非感染群と比較して、感染群は低い RBC 数、ヘマトクリット値、及びヘモグロビン濃度 (HGB) を示しました。一方の在来種系統の日本短角種や黒毛種 (アングス種) ではそれらの減少が見られませんでした。結果として、ホルスタインとヘレフォードでのみ貧血牛 (HGB : 8 g / dl 以下を貧血と定義) が確認され、特にホルスタインではヘレフォードよりも高い貧血率を示すことが分かりました。牛タイレリアに感染した非貧血ヘレフォードの平均赤血球体積 (MCV) 及び平均赤血球ヘモグロビン (MCH) 値は非感染ヘレフォードのものより有意に高かったが、非貧血ホルスタインでは見られず、牛種別の溶血に対する宿主応答が貧血の発症に影響していることが示唆されました。この現象を確認するために、牛タイレリアを実験感染させた 3 頭のホルスタイン子牛の原虫寄生率及び RBC 指数についてモニターしました。感染させた子牛の中で低い原虫寄生率を示した牛は、MCV 値並びに MCH 値が上昇したものの貧血は見られませんでした。対照的に、高原虫寄生率を伴った牛は、高い MCV 値並びに MCH 値を示し、かつ HGB も低下して貧血を呈しました。ホルスタインとヘレフォードに見られた貧血は、大球性高色素性貧血に定義され、その症状は、ビタミン B1 や葉酸の不足もしくはその利用がうまくいかないときに生じるものと類似します。牛タイレリアは牛の骨髓造血能に影響することが示唆され、これを標的とした新たな対処療法が構築できる可能性が示唆されました。本論文は、産業技術総合研究所と帯広畜産大学・臨床獣医学部門との共同研究の成果です（論文リスト 12）。

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、理事
- ・ 日本寄生虫学会・評議委員
- ・ 日本熱帯医学会・評議委員
- ・ 日本衛生動物学会

② 主催した学会、研究会等

- ・ The 1st International Japan-Mongolia Joint Symposium on Protozoan Diseases Prevention, September 11, 2017 (NRCPD, Obihiro, Japan)

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
- ・ 日本中央競馬会畜産振興事業 家畜呼吸器疾患制御事業推進委員会 委員

6. 平成 29 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. 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（2017）：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**、第7巻、第1号、p7-11。
2. Azirwan Guswanto, Puttik Allamanda, Euis Siti Mariamah, Sodirun Sodirun, Putut Eko Wibowo, Liliek Indrayani, Rudi Harso Nugroho, I Ketut Wirata, Nur Jannah, Lepsi Putri Dias, Hadi Purnama Wirawan, Rochmadi Yanto, Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi. Molecular and serological detection of bovine babesiosis in Indonesia. **Parasites & Vectors**. 2017; 10: 550. PMID: 29110723
3. Bumduuren Tuvshintulga, Mahmoud AbouLaila, Thillaiampalam Sivakumar, Dickson Stuart Tayebwa, Sambuu Gantuya, Khandsuren Naranbaatar, Aki Ishiyama, Masato Iwatsuki, Kazuhiko Otoguro, Satoshi Ōmura, Mohamad Alaa Terkawi, Azirwan Guswanto, Mohamed Abdo Rizk, Naoaki Yokoyama and Ikuo Igarashi. Chemotherapeutic efficacies of a clofazimine and diminazene aceturate combination against piroplasm parasites and their AT-rich DNA-binding activity on *Babesia bovis*. **Scientific Reports**. 2017; 7:13888. PMID: 29066849
4. Mohamed Abdo Rizk, Shima Abd El-Salam El-Sayed, Mahmoud AbouLaila, Rasha Eltaysh, Naoaki Yokoyama and Ikuo Igarashi. Performance and consistency of a fluorescence-based high-throughput screening assay for use in *Babesia* drug screening in mice. **Scientific Reports**. 2017; 7:12774. PMID: 29038534
5. Rika Umemiya-Shirafuji, Takeshi Hatta, Kazuhiro Okubo, Moeko Sato, Hiroki Maeda, Aiko Kume, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi, Naotoshi Tsuji, Kozo Fujisaki, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki. Transovarial persistence of *Babesia ovata* DNA in a hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system. **Acta Parasitologica**. 2017; 62: 836-841. PMID: 29035855
6. Shima Abd El-Salam El-Sayed, Mohamed Abdo Rizk, Mohamad Alaa Terkawi,

- Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi. Molecular identification and antigenic characterization of *Babesia divergens* Erythrocyte Binding Protein (BdEBP) as a potential vaccine candidate. **Parasitology International**. 2017; 66: 721-726. PMID: 28743470
7. Takahiro Ishizaki, Thillaiampalam Sivakumar, Kyoko Hayashida, Hitoshi Takemae, Bumduuren Tuvshintulga, Tserendorj Munkhjargal, Azirwan Guswanto, Ikuo Igarashi, **Naoaki Yokoyama***. *Babesia bovis* BOV57, a *Theileria parva* P67 homolog, is an invasion-related, neutralization-sensitive antigen. **Infection, Genetics and Evolution**. 2017; 54: 138-145. PMID: 28668608
 8. Mohamed Abdo Rizk, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Mahmoud AbouLaila, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi. Evaluation of the inhibitory effect of N-acetyl-L-cysteine on *Babesia* and *Theileria* parasites. **Experimental Parasitology**. 2017; 179: 43-48. PMID: 28655583
 9. Azirwan Guswanto, Puttik Allamanda, Euis Siti Mariamah, Tserendorf Munkjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Hitoshi Takemae, Thillaiampalam Sivakumar, Mahmoud AbouLaila, Mohamad Alaa Terkawi, Madoka Ichikawa-Seki, Yoshifumi Nishikawa, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi. Evaluation of immunochromatographic test (ICT) strips for the serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in cattle from Western Java, Indonesia. **Veterinary Parasitology**. 2017; 239:76-79. PMID: 28413078
 10. Ketsarin Kamyngkird, Shinuo Cao, Bumduuren Tuvshintulga, Akram Salama, Ahmed Abdelmoniem Mousa, Artemis Efstratiou, Yoshifumi Nishikawa, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan*. Effects of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors on the growth of *Theileria equi* and *Babesia caballi* *in vitro*. **Experimental Parasitology**. 2017; 176: 59-65. PMID: 28286324
 11. Mahmoud AbouLaila, Bumduuren Tuvshintulga, Mohamed Abdo Rizk, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, **Naoaki Yokoyama** and Ikuo Igarashi. Serum-free GIT medium for short-term *in vitro* cultures of *Babesia bigemina*, *Babesia divergens*, and *Theileria equi*. **Journal of Protozoology Research**. 2017; 27: 13-22.
 12. Thillaiampalam Sivakumar, Ikehara Y, Ikuo Igarashi, Hisashi Inokuma, **Naoaki Yokoyama***. Dynamics of erythrocyte indices in relation to anemia development in *Theileria orientalis*-infected cattle. **Journal of Protozoology Research**. 2017; 27: 23-33.

総説

該当なし

著書

1. 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
2. 横山直明（分担執筆）：感染に対する獲得免疫、p108-119、獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠「獣医免疫学」第2刷、池田輝雄ら監修、緑書房、2018 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 25 年度 地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム(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、平成 25 年度～平成 30 年度
2. 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
3. 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
4. 平成 29 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）、スリランカで実装可能な牛バベシア病に対する簡易診断法の開発研究、代表、平成 29 年度～平成 31 年度
5. 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
6. 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
7. 平成 29 年度 研究拠点形成事業-B.アジア・アフリカ学術基盤形成型（日本学術振興会）（代表 玄学南）、分担、平成 29 年度～平成 33 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. Seekkuge Susil Priyantha Silva: Veterinary Sesserch Institute, Sri Lanka, Reserch and Academic Collaboration between Veterinary Sesserch 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. Phung Thang Long : Hue University of Agriculture and Forestry, Development of immunochromatographic (ICT) assays applicable for the field survey of bovine babesiosis in Vietnam、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究
3. 山根 芳多郎：共立製薬株式会社 先端技術開発センター、牛の小型ピロプラズマ病ワクチンの開発に関する試験研究、平成 25 年 3 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日、共同研究契約

1. 研究テーマの概要

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

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

2. 主な研究テーマ

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

3. 平成 29 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、マラリア原虫やトキソプラズマで汎用されている技術の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の整備が急務になっております。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*）で GAP を開発するために必須となる同原虫のゲノムデータベースを完成して、専門誌に公表いたしました。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（論文リスト3）。
- ・ マラリアは世界 91 の国と地域で流行が認められる感染症で、年間 2 億人が新たにマラリアに感染し、このうち約 43 万人が不幸にしてこの感染症によって命を落としています。マラリアの治療は、抗マラリア薬による化学療法が基本になります。化学療法剤による感染症の治療は一般に薬剤耐性株出現との競争であり、マラリアのワクチンが開発の途上にあることを考慮す

れば、つねに新規の抗マラリア薬の開発に努めなければなりません。今年度は、インドネシアに自生するフクギ科の植物 *Garcinia celebica* の葉のエタノール抽出物から抗熱帯熱マラリア原虫活性を示す化合物 (Catechin) を同定して、専門誌に公表いたしました (論文リスト 4)。*G. celebica* はマンゴスチンの仲間で、野生のサルがこの葉を好んで食べることから、これまでも、抗がん作用のある化合物などの探索の対象とされてきました。今回見出された抗マラリア原虫活性は、Catechin が誘導する酸化ストレスに由来する可能性があります。現在、この化合物の新規抗マラリア薬創薬への応用に向けて、薬理作用の詳細について検討を進めています。

- ・ 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、フィリピンの日本住血吸虫症流行地由来の寄生虫 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) 解析の成果を専門誌に公表しました (論文リスト 6)。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。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。このような分子疫学解析から得られるデータは、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情報になると考えます。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。現在、患者、スイギュウおよびイヌから得られた単一の虫卵から寄生虫の DNA を抽出して、MGL 解析をおこなう実験系の整備を進めています。
- ・ 一方、日本住血吸虫症の診断法を開発する研究では、成虫が患者血液中に分泌する抗原の検出に基づく血清診断法の開発を試みました。日本住血吸虫の排泄・分泌抗原 (excretory secretory antigen) から、分泌抗原のひとつ、Thioredoxin peroxidase-1 (SjTPx-1) を選択して、この抗原分子を実験感染動物や患者の血清中から検出するサンドイッチ酵素抗体法 (DAS-ELISA) を構築いたしました。現行の DAS-ELISA は患者血清からの抗原の検出感度が 40% と低く、フィールドでの性能評価に移行する前に、プロトコルの改良が必要です。抗原の検出に基づく診断法は、有病期の患者を効率的に診断するのに有効なツールになります (論文リスト 1)。

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・理事（用語担当）
- ・ 日本獣医寄生虫学会・理事（副理事長）
- ・ 日本獣医学会・評議委員

② 主催した学会、研究会等

- ・ 第 25 回分子寄生虫学ワークショップ・第 15 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会（平成 29 年 8 月 27 日～8 月 30 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
- ・ The Journal of Veterinary Medical Science 編集委員（寄生虫学担当）

6. 平成 29 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. Adrian Miki C Macalanda, Jose Ma M Angeles, Kharleezelle J Moendeg, Anh Tm Dang, Luna Higuchi, Noboru Inoue, Xuenan Xuan, Masashi Kirinoki, Yuichi Chigusa, Lydia R Leonardo, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, Yasuyuki Goto, **Shin-Ichiro Kawazu***. Evaluation of *Schistosoma japonicum* thioredoxin peroxidase-1 as a potential circulating antigen target for the diagnosis of Asian schistosomiasis. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2017; 80: 156-163. PMID: 29187698
2. Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Shinuo Cao, Masahito Asada, Guanbo Wang, Yang Gao, Huanping Guo, Jixu Li, Patrick Vudriko, Artemis Efstratiou, Aaron Edmond Ringo, Seung-Hun Lee, Hassan Hakimi, Tatsunori Masatani, Fujiko Sunaga, **Shin-ichiro Kawazu**, Junya Yamagishi, Lijun Jia, Noboru Inoue, Xuenan Xuan*. Identification and characterization of interchangeable cross-species functional promoters between *Babesia gibsoni* and *Babesia bovis*. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2017; 9: 330-333. PMID: 29174364
3. Junya Yamagishi, Masahito Asada, Hassan Hakimi, Takeshi Q Tanaka, Chihiro Sugimoto and **Shin-ichiro Kawazu**. Whole-genome assembly of *Babesia ovata* and comparative genomics between closely related pathogens. **BMC Genomics**. 2017; 18: 832. PMID: 29078748
4. Rizky Abdulah, Eka W Suradji, Anas Subarnas, Unang Supratman, Milyadi Sugijanto, Ajeng Diantini, Keri Lestari, Melisa I Barliana, **Shin-ichiro Kawazu** and Hiroshi Koyama. Catechin isolated from *Garcinia celebica* leaves inhibit *Plasmodium falciparum*

- growth through the induction of oxidative stress. **Pharmacognosy Magazine**. 2017; 13: S301-305. PMID: 28808396
5. Mingming Liu, Masahito Asada, Shinuo Cao, Paul Franck Adjou Moumouni, Patrick Vudriko, Artemis Efstratiou, Hassan Hakimi, Tatsunori Masatani, Fujiko Sunaga, **Shin-ichiro Kawazu**, Junya Yamagishi, Xuenan Xuan*. Transient transfection of intraerythrocytic *Babesia gibsoni* using elongation factor-1 alpha promoter. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 2017; 216: 56-59. PMID: 28729071
 6. Kharleezelle J Moendeg, Jose Ma M Angeles, Ryo Nakao, Lydia R Leonardo, Ian Kendrick C Fontanilla, Yasuyuki Goto, Masashi Kirinoki, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, Noboru Inoue, Yuichi Chigusa, **Shin-ichiro Kawazu***. Geographic strain differentiation of *Schistosoma japonicum* in the Philippines using microsatellite markers. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2017; 11: e005749. PMID: 28692692
 7. Akira Soga, Hironori Bando, Mami Ko-ketsu, Hirono Masuda-Suganuma, **Shin-ichiro Kawazu** and Shinya Fukumoto. High efficacy in vitro selection procedure for generating transgenic parasites of *Plasmodium berghei* using an antibiotic toxic to rodent hosts. **Scientific Reports**. 2017; 7: 4001. PMID: 28638105

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. Studies on development of *Babesia* parasites using the gene manipulation and bioimaging analysis, 10th National Congress^{SEP} of the Mexican Association of Veterinary Parasitologists (AMPAVE) (第 10 回メキシコ獣医寄生虫学会 (AMPAVE) : シンポジウム) , 2017 年 8 月 10 日 Puebla, Mexico
2. Investigation on intra-erythrocytic development of *Babesia* parasites using bioimaging analysis, 26th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) In conjunction with 53rd MSPTM Annual Conference (AMPAVE) (第 26 回世界獣医寄生虫学会議 (WAAVP) ・第 53 回マレーシア寄生虫学熱帯医学会大会 : プレナリーセッション) , 2017 年 9 月 8 日 Kuala Lumpur, Malaysia

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 29 年度（平成 29 年 5 月 31 日）

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. Romeo R. Quizon and 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. 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、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

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

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

2. 主な研究テーマ

- ・ トキソプラズマオーシスト壁の生化学的解析
- ・ 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
- ・ 腸管感染寄生虫の疫学調査

3. 平成 29 年度研究の総括

- ・ 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。オーシストはオーシスト壁と呼ばれる固い外殻構造を持ち、そのため環境中で多くの消毒薬や環境の変化に対して抵抗性であり、数年を超えて生存することにより、深刻な感染源となっています。我々は新規のオーシスト壁を構成するタンパク質を明らかにしました。
- ・ 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3）。
- ・ 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4）。

- ・ 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5）。

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 29 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. Wilawan Pumidonming, Hirotaka Katahira, **Makoto Igarashi**, Doaa Salman, Abdelbaset E Abdelbaset, Khamphon Sangkaeo. Potential risk of a liver fluke *Opisthorchis viverrini* infection brought by immigrants from prevalent areas: a case study in the lower Northern Thailand. **Acta Tropica**. 2018; 178 : 213-218. PMID: 29191517.
2. Doaa Salman, Liria Hiromi Okuda, Akio Ueno, George Dautu, Feifei Zhang, **Makoto Igarashi***. Evaluation of novel oocyst wall protein candidates of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**. 2017; 66: 643-651. PMID: 28571766
3. Abdelbaset E Abdelbaset, Barbara A Fox, Mohamed H Karram, Mahmoud R Abd Ellah, David J Bzik, **Makoto Igarashi***. Lactate dehydrogenase in *Toxoplasma gondii* controls virulence, bradyzoite differentiation, and chronic infection. **PLoS One**. 2017; 12: e0173745. PMID: 28323833
4. Abdelbaset Eweda Abdelbaset, Hend Alhasan, Doaa Salman, Mohamed Hassan Karram, Mahmoud Abd Ellah Rushdi, Xuan Xuenan, **Makoto Igarashi***. Evaluation of recombinant antigens in combination and single formula for diagnosis of feline toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**. 2017; 172: 1-4. PMID: 27876472

5. Wilawan Pumidonming, Doaa Salman, Dulyatad Gronsang, Abdelbaset E Abdelbaset, Khamphon Sangkae, Shin-ichiro Kawazu, **Makoto Igarashi***. Prevalence of gastrointestinal helminth parasites of zoonotic significance in dogs and cats in lower Northern Thailand. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2017; 78: 1779–1784. PMID: 27570099

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

◆-----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、天然物を用いた抗原虫薬のスクリーニング

3. 平成 29 年度研究の総括

- ・ トキソプラズマは全人類の 1/3 が感染しているとされる広く蔓延した病原体です。トキソプラズマ感染は健康なヒトにおいては不顕性感染であるものの、免疫不全患者においては死に至ることもあります。しかし、その薬剤治療の選択肢は限られており、新しい治療法が求められています。本研究では金沢大学がん進展制御研究所より供与された天然物及びアメリカ食品医薬品局（FDA）認可化合物のライブラリーを用いて、抗トキソプラズマ活性の解析を行った。その結果、トキソプラズマの増殖を抑える 32 種の化合物を同定した。本研究成果は、抗原虫薬の選択肢を増やすために大規模なスクリーニングが行えるだけでなく、既存薬を他の用途に使用可能であるかを検証するために有効な手段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。我々はこれまでに糖鎖の一種であるジェランガムに硫酸基を付加した硫酸化ジェランを合成し、*in vitro*において熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入と増殖を抑制することを示しました。また、硫酸化ジェランは宿主細胞毒性が低く、血液に対する抗凝固作用も低いことも明らかにしました。本研究では、硫酸化ジェランの抗マラリア活性について *in vivo* で解析を行いました。ローデントマラリア原虫である *Plasmodium berghei* ANKA、*P. yoelii* 17XL をマウスに感染させ、硫酸化ジェランの存在下で増殖阻止効果を解析した結果、ともに増殖阻止効果は乏しいことがわかりました。本研究は、マウスへのジェランガム、硫酸化ジェランへの投与に関する初めての報告です。（論文リスト2）

- ・ 現状のトキソプラズマ症に対する治療に対してはいくつかの欠点があり、他の選択薬や新しい治療法が求められています。我々はこれまでに金属ナノ粒子の抗トキソプラズマ作用を解析し、この作用には原虫の酸化還元シグナルが関与し、ミトコンドリアの膜電位に影響を与えることで、原虫の宿主細胞侵入、増殖、感染性に影響を与えることを明らかにしました。本研究ではさらにこの作用のメカニズムについて解析を行った結果、宿主細胞の低酸素誘導因子やキヌレニン経路、トリプトファン代謝経路が関わってい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3）
- ・ 現在用いられているトキソプラズマ症の治療薬は炎症などの症状を引き起こす原因であるタキゾイトに対しては有効ですが、潜伏感染を引き起こすブラディゾイトには効果がありません。そこで本研究では、タキゾイトの増殖を抑えるとともに、ブラディゾイトに対しても効果を示す化合物の探索を目的としました。東京大学創薬機構から供与された機能既知化合物のうち828個に対するスクリーニングを実施でき、まずタキゾイトの増殖を阻害する化合物を22個同定しました。続いてそれらの化合物の、宿主細胞毒性を示す濃度と原虫増殖阻害作用を示す濃度の差を検証し、その差が10倍以上である化合物を2個選抜しました。こうして選抜された化合物 TanshinoneIIA、Hydroxyzine に対して、原虫増殖に対する50%阻害濃度、化合物の作用機序、ブラディゾイトに対する効果を検証しました。その結果、これらの化合物が宿主細胞へのタキゾイトの侵入には効果を示さず、宿主細胞内での原虫の分裂・増殖に対して抑制的に働くことを明らかにしました。また、既存薬であるピリメタミンと比較してブラディゾイトを誘導しにくいことを明らかにしました。（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

該当なし

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 一次審査専門評価委員

6. 平成 29 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. Oluyomi Stephen Adeyemi, Tatsuki Sugi, Yongmei Han, **Kentaro Kato***. Screening of chemical compound libraries identified new anti-*Toxoplasma gondii* agents. Parasitology Research. **Parasitology Research**. 2018; 117: 355-363. PMID: 29260298
2. Recuenco Frances C, Takano Ryo, Sugi Tatsuki, Takemae Hitoshi, Murakoshi Fumi, Ishiwa Akiko, Inomata Atsuko, Enomoto-Rogers Yukiko, Fundador Noreen Grace V, Iwata Tadahisa, Horimoto Taisuke, Akashi Hiroomi, **Kato Kentaro***. Assessment of the growth inhibitory effect of gellan sulfate in rodent malaria *in vivo*. **Japanese Journal of Veterinary Research**. 2017; 65: 207-212.
3. Oluyomi Stephen Adeyemi, Yuho Murata, Tatsuki Sugi, Yongmei Han, **Kentaro Kato***. Modulation of host HIF-1α activity and the tryptophan pathway contributes to the anti-*Toxoplasma gondii* potential of nanoparticles. **Biochemistry and Biophysics Reports**. 2017; 11: 84-92. PMID: 28955772
4. Yuho Murata, Tatsuki Sugi, Louis M Weiss, **Kentaro Kato***. Identification of Compounds that Suppress *Toxoplasma gondii* Tachyzoites and Bradyzoites. **PLoS One**. 2017; 12: e0178203. PMID: 28609444
5. Shin Murakami, Akiko Takenaka-Uema, Tomoya Kobayashi, **Kentaro Kato**, Masayuki Shimojima, Massimo Palmarini, Taisuke Horimoto. Heparan sulfate proteoglycan is an important attachment factor for cell entry of Akabane and Schmallenberg viruses. **Journal of Virology**. 2017; 91: pii: e00503-17. PMID: 28539443

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

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 29 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、2017 年 7 月 29 日

8. 招待講演等

1. Oluyomi Adeyemi、加藤健太郎「Exploring amino acid modification of nanoparticles for selective anti-parasite action and enhanced biocompatibility」、第 160 回日本獣医学会 日本獣医寄生虫学奨励賞受賞講演、2017 年 9 月 13 日
2. 加藤健太郎「トキソプラズマ症の病態発現機構と対策技術に関する研究」、第 160 回日本獣医学会 学会賞受賞講演、2017 年 9 月 14 日

9. 獲得研究費

1. 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
2. 平成 29 年度 基盤研究 (B) (一般研究) (文部科学省)、トキソプラズマの潜伏感染虫体構成因子の網羅的解析 (17H03913)、代表、平成 29 年度～平成 31 年度
3. 平成 29 年度 基盤研究 (B) (海外学術研究) (文部科学省)、翼手目由来感染症リスクの対応戦略構築のための疫学的基礎データの収集 (17H04653)、分担、平成 29 年度～平成 31 年度
4. 平成 29 年度 共同利用・共同研究 一般研究 I (富山大学和漢医薬学総合研究所)、原虫感染症に有効な生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とその作用機序の解析、代表、平成 29 年度
5. 平成 29 年度 医学研究奨励 (武田科学振興財団)、マラリアの病態発現の主因である赤血球膜への蛋白質輸送システムの解明、代表、平成 29 年度
6. 平成 29 年度 創薬支援推進事業 創薬総合支援事業 (AMED)、アカデミア創薬プラットフォームを活用した抗マラリア薬の探索、分担、平成 29 年度

10. 特許申請・取得

1. 加藤健太郎、アデエミ オルヨミ：抗トキソプラズマ剤及びこれを含む医薬、2017 年 4 月 7 日、特願 2017-076436
2. 加藤健太郎、村田 優穂、杉 達紀、野中 基弘：抗原虫作用を持つ生薬由来化合物と生薬エキス、2017 年 4 月 19 日、特願 2017-083202
3. 加藤健太郎、村越 ふみ：抗原虫作用を持つヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、2017 年 8 月 22 日、特願 2017-159087
4. 加藤健太郎、アデエミ オルヨミ：抗トキソプラズマ原虫剤、2017 年 10 月 24 日、特願 2017-205211

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞者：Oluyomi Adeyemi

受賞名：第8回日本獣医寄生虫学奨励賞（日本獣医寄生虫学会）

受賞テーマ：Exploring amino acid modification of nanoparticles for selective anti-parasite action and enhanced biocompatibility

受賞年：平成29年9月13日

2. 受賞者：加藤健太郎

受賞名：2017-2018年度日本獣医学会賞（日本獣医学会）第122号

受賞テーマ：トキソプラズマ症の病態発現機構と対策技術に関する研究

受賞年：平成29年9月14日

12. 報道等

1. 北海道新聞（2017年4月7日16面）金属ナノ粒子の抗原虫効果についての記事掲載

2. 十勝毎日新聞（2017年11月14日21面）加藤准教授に獣医学会賞「トキソプラズマ」解析についての記事掲載

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 門脇 真：富山大学和漢医薬学総合研究所、原虫感染症に有効な生薬由来化合物及び生薬エキスの同定とその作用機序の解析、2017年4月1日～2018年3月31日、平成29年度 富山大学和漢医薬学総合研究所 共同利用・共同研究 一般研究Ⅰ

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。さらに OIE リファレンスラボラトリー（スーラ病（*Trypanosoma evansi* 感染症））として、動物トリパノソーマ病に関する各種診断業務を行っています。

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 29 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。さらに媾疫と診断されたオスウマの生殖器から、新規媾疫トリパノソーマ培養馴化株の確立に成功しました。本年度は新規媾疫トリパノソーマ培養馴化株を用いて薬剤感受性を *in vitro* で評価する試験系を開発しました（論文リスト 4）。また他種動物トリパノソーマ症で有効であることが確認されている遺伝子組換え抗原（rGM6 抗原）の媾疫診断に対する有効性の評価を行い、同抗原を用いた血清診断法が媾疫の診断及び疫学調査に対して有効であることが明らかになりました（論文リスト 11）（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。さらに既存のトリパノソーマ治療薬は注射での投与が必要であるため、医療インフラが未整備な地方でも治療が可能な経口治療薬の開発が強く求められています。そこで我々は新規トリパノソーマ症治療薬の候補とな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、抗生物質の一種であるアジスロマイシンに比較的強い抗トリパノソーマ活性があることがわかりました。さらにマウスを用いたトリパノソーマ感染モデルにおいて、アジスロマイシン経口投与により血中原虫数の上昇が抑制され生存率が有意に上昇することを明らかにしました（論文リスト 4）。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キノコ（*Fomitopsis officinalis*）抽出物中の抗トリパノソーマ活性を有する化合物群を単離、構造を決定し報告しました（論文リスト 2）（東北医科薬科大学薬学部 生薬学教室との共同研究）。

- ・ スーダン国は世界第 2 位のラクダ飼養国であり、トリパノソーマ症によりラクダ産業に大きな経済被害が出ていると考えられています。そこでスーダン国の 2 地点からラクダ血液をサンプリングし、トリパノソーマ病に対する血清学的疫学調査および分子疫学調査を実施しました。その結果、これまでに報告のあった *Trypanozoon* 亜属トリパノソーマに加え、*Trypanosoma vivax* がスーダン国のラクダに感染していることを初めて明らかにしました（論文リスト 12）。さら同国のイヌを対象に同様の疫学調査を行い、トリパノソーマ感染が蔓延していることが明らかになりました（論文リスト 5）。

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

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 29 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. Seung-Hun Lee, Ehab Mossaad, Abdalla Mohamed Ibrahim, Ahmed Ali Ismail, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Aaron Edmond Ringo, Yang Gao, Huanping Guo, Jixu Li, Artemis Efstratiou, Peter Musinguzi, Tamador EE Angara, Keisuke

- Suganuma**, Noboru Inoue, Xuenan Xuan*. Detection and molecular characterization of tick-borne pathogens infecting sheep and goats in Blue Nile and West Kordofan states in Sudan. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 598-604. PMID: 29426590
2. Shinen Naranmandakh, Toshihiro Murata, Batsukh Odonbayar, **Keisuke Suganuma**, Javzan Batkhuu, Kenroh Sasaki. Lanostane triterpenoids from *Fomitopsis officinalis* and their trypanocidal activity. **Journal of Natural Medicines**. 2018; 72: 523–529. PMID: 29417466
 3. Thillaiampalam Sivakumar, Dinh Thi Bich Lan, Phung Thang Long, Le Quoc Viet, Gayani Weerasooriya, Aiko Kume, **Keisuke Suganuma**, Ikuo Igarashi, Naoaki Yokoyama. Serological and molecular surveys of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* among native cattle and cattle imported from Thailand in Hue, Vietnam. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2017; 80:333-336. PMID: 29249730
 4. Batdorj Davaasuren, Tovuu Amgalanbaatar, Simon Peter Musinguzi, **Keisuke Suganuma**, Davaajav Otgonsuren, Ehab Mossaad, Sandagdorj Narantsatsral, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, Xuenan Xuan, Noboru Inoue. The evaluation of GM6-based ELISA and ICT as diagnostic methods on a Mongolian farm with an outbreak of non-tsetse transmitted horse trypanosomosis. **Veterinary Parasitology**. 2017; 244:123-128. PMID: 28917303
 5. Ehab Mossaad, Rawan A Satti, Abdeen Fadul, **Keisuke Suganuma***, Bashir Salim, E A Elamin, Simon Peter Musinguzi, Xuenan Xuan, Noboru Inoue. The incrimination of three trypanosome species in clinically affected German shepherd dogs in Sudan. **Parasitology Research**. 2017; 116: 2921-2925. PMID: 28856450
 6. Duger Badral, Batsukh Odonbayar, Toshihiro Murata*, Tserendorj Munkhjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Ikuo Igarashi, **Keisuke Suganuma**, Noboru Inoue, Adelheid H Brantner, Gendaram Odontuya, Kenroh Sasaki, Javzan Batkhuu. Flavonoid and Galloyl Glycosides Isolated from *Saxifraga spinulosa* and Their Antioxidative and Inhibitory Activities against Species That Cause Piroplasmosis. **Journal of Natural Products**. 2017; 80: 2416-2423. PMID: 28832147
 7. Abo El Fadl Eman A, El-Ashker Maged, **Suganuma Keisuke**, Kayano Mitsunori. Discriminant analysis for the prediction and classification of tick-borne infections in some dairy cattle herds at Dakahlia Governorate, Egypt. **Japanese Journal of Veterinary Research**. 2017; 65: 127-133.
 8. Nthatisi Innocentia Molefe, Shino Yamasaki, Adrian Miki C Macalanda, **Keisuke Suganuma**, Kenichi Watanabe, Xuenan Xuan, Noboru Inoue. Oral administration of azithromycin ameliorates trypanosomosis in *Trypanosoma congolense*-infected Mice. **Parasitology Research**. 2017; 116: 2407-2415. PMID: 28674747
 9. Moeti O Taioe, Makhosazana Y Motloang, Boniface Namangala, Amos Chota, Nthatisi

- I Molefe, Simon P Musinguzi, **Keisuke Sukanuma**, Polly Hayes, Toi J Tsilo, John Chainey, Noboru Inoue, Oriel M M Thekiso. Characterisation of tabanid flies (Diptera: Tabanidae) in South Africa and Zambia and detection of protozoan parasites they are harbouring. **Parasitology**. 2017; 144: 1162-1178. PMID: 28502276
10. **Keisuke Sukanuma***, Nthati Innocentia Molefe, Noboru Inoue. An ATP-Based Luciferase Viability Assay for Animal African Trypanosomes Using a 96-Well Plate. **Methods in Molecular Biology**. 2017; 1601: 89-95. PMID: 28470520
 11. **Keisuke Sukanuma***, Shino Yamasaki, Nthati Innocentia Molefe, Peter Simon Musinguzi, Batdorj Davaasuren, Ehab Mossaad, Sandagdorj Narantsatsral, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, Noboru Inoue. The establishment of *in vitro* culture and drug screening system for a newly isolated strain of *Trypanosoma equiperdum*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. 2017; 7: 200-205. PMID: 28437733
 12. Ehab Mossaad, Bashir Salim, **Keisuke Sukanuma**, Peter Musinguzi, Mohammed A Hassan, E A Elamin, G E Mohammed, Amel O Bakhiet, Xuenan Xuan, Rawan A Satti and Noboru Inoue. *Trypanosoma vivax* is the second leading cause of camel trypanosomiasis in Sudan after *Trypanosoma evansi*. **Parasites & Vectors**. 2017; 10:176. PMID: 28403897
 13. Albertus Eka Yudistira Sarwono, **Keisuke Sukanuma**, Shinya Mitsuhashi, Tadashi Okada, Simon Peter Musinguzi, Kengo Shigetomi, Noboru Inoue, Makoto Ubukata. Identification and characterization of guanosine 5'-monophosphate reductase of *Trypanosoma congolense* as a drug target. **Parasitology International**. 2017; 66: 537-544. PMID: 28366788

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

1. 2017 年 7 月 29 日 帯広畜産大学オープンキャンパス「原虫病への挑戦」
2. 2017 年 12 月 9 日 畜大ふれあいフェスティバル「寄生虫を観察してみよう～顕微鏡や虫眼鏡で寄生虫・マダニ・昆虫を観察してみない?～」

8. 招待講演等

1. 菅沼啓輔. トリパノソーマとトリパノソーマ症について、早稲田大学 先進理工学術院、2018 年 2 月、東京

2. 菅沼啓輔、Narantsatsral S, Battsetseg B, Battur B, 井上昇. モンゴルにおける媾疫トリパノソーマの研究、第 86 回寄生虫学会大会 生態・疫学談話会、2017 年 3 月、札幌、北海道
3. Suganuma K, Murata T, Molefe NI, Narantsatsral S, Orkhon B, Batsukh O, Davaasuren B, Mizushima B, Javzan B, Sasaki K, Battur B, Battsetseg B, Inoue N. Establishment of in vitro drug sensitivity assay against *T. equiperdum* Mongolian strains and the screening of trypanocidal compounds extracted from Mongolian herbal plants. Achievements and current level of veterinary-biological sciences, 2017, Sept., 27, Ulaanbaatar, Mongolia
4. Suganuma K, Narantsatsral S, Battur B, Battsetseg B, Inoue N. Characterisation of newly isolated and culture adapted *Trypanosoma equiperdum*. 2nd International Conference on Non Tsetse Transmitted Animal Trypanosomosis, 2017, Dec., 18-19, Antwerp, Belgium

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)、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
3. 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
4. 平成 29 年度 笹川科学研究助成、接着と組織侵入から探る媾疫 (こうえき) トリパノソーマの寄生適応戦略 (29-509)、代表、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. 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、2017 年 4 月 1 日～2018 年 3 月 31 日、平成 29 年度原虫病研究センター共同研究

2. 中尾 洋一：早稲田大学・先進理工学学部・ケミカルバイオロジークラス、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、2017年4月1日～2018年3月31日、平成29年度原虫病研究センター共同研究
3. 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、蠕虫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、2017年4月1日～2018年3月31日、平成29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

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 <i>VESA1α</i> 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、<i>VESA</i> タンパク質は <i>VESA1α</i> と <i>VESA1β</i> 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 <i>VESA1α</i> 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 <i>VESA1β</i> 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 <i>VESA1β</i> の発現のみが感染赤血球細胞膜近傍で確認された。次に <i>VESA1α</i> 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 <i>VESA1α</i> 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 <i>VESA1α</i> 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。

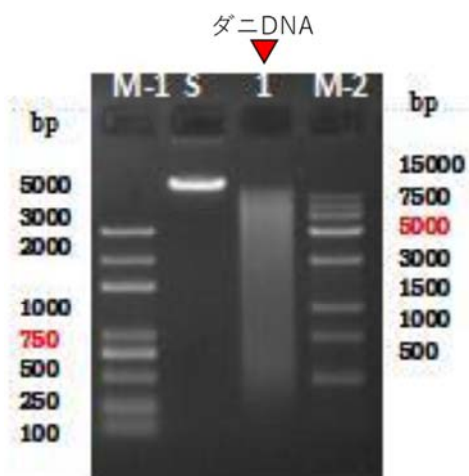


図1 精製DNAの評価

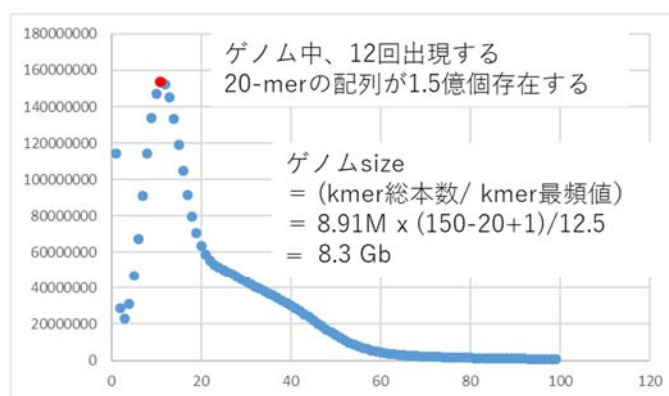


図2 k-mer法によるゲノムサイズの推定

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。		

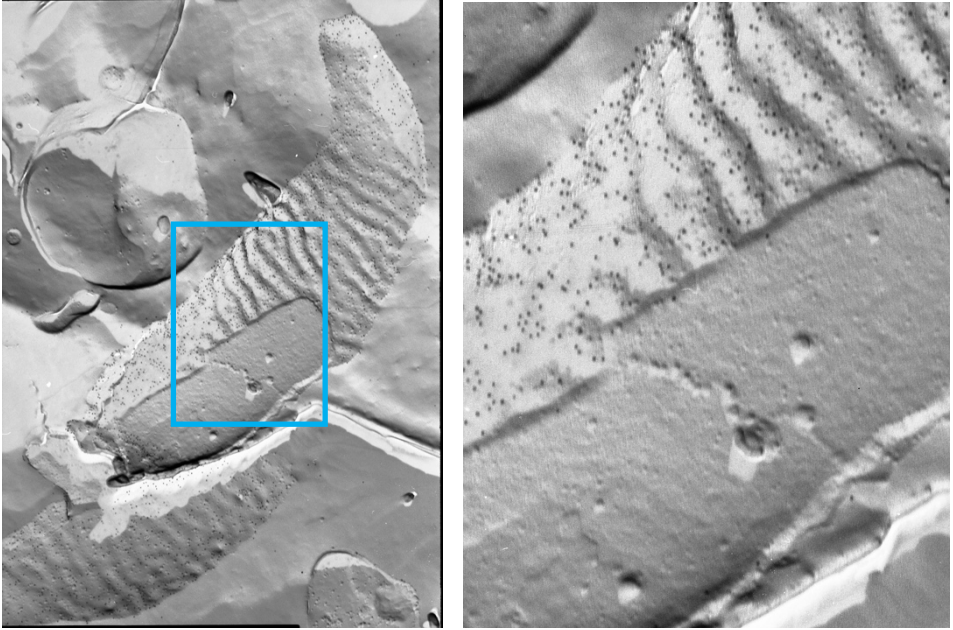
研究経過の概要	本共同研究はH23年度より北里大で見出された抗原虫活性物質ライブラリーについて、帯広畜産大学(五十嵐教授)の下、以下の原虫種で抗バベシア活性評価を行うことで新たな治療薬シードの発見を目指すために開始した。 ・ <i>in vitro</i> 培養牛バベシア(<i>Babesia bovis</i> および <i>B. bigemina</i>) ・ <i>in vitro</i> 培養馬バベシア(<i>T. equi</i> および <i>B. caballi</i>) ・ <i>in vivo</i> マウスバベシア(<i>B. microti</i>)感染モデル (1) 北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 Ootoguro, 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 Batkhuu、<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 Batkhuu, 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 Batkhuu, 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 Batkhuu, 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 Batkhuu, 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 群</th><th>7% H₂O₂ 群</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 群	7% H ₂ O ₂ 群	0	0.15	0.25	15	0.13	0.31	30	0.06	0.14
接種後時間 (分)	Milli-Q 群	7% H ₂ O ₂ 群											
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 溝疫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、溝疫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、溝疫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

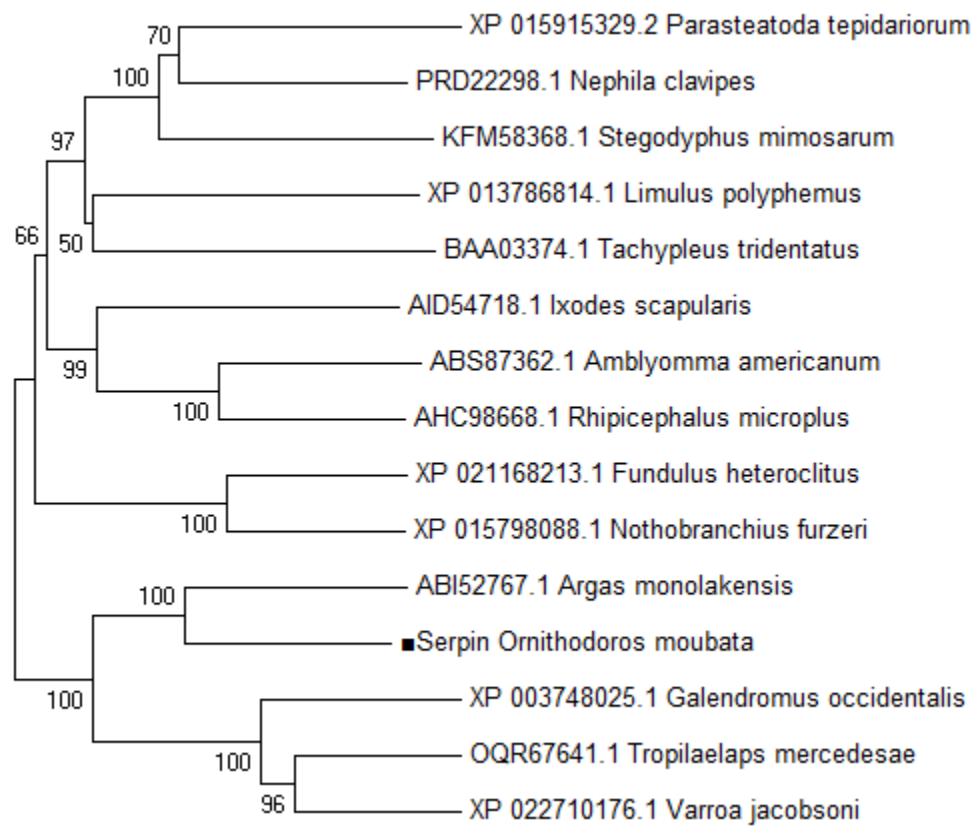
The paper is under writing for publication.

Attach reference materials as necessary.

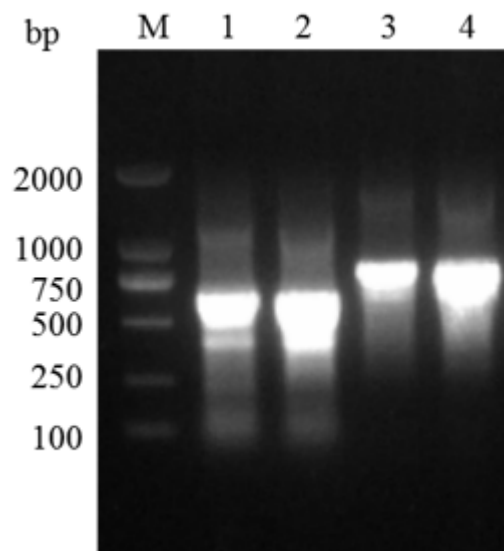
(1) Figure 1 Domain of serpin from *O. moubata*



(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> が馬に感染する溝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。

帯広畜産大学 原虫病研究センター

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地

TEL (0155) 49-5642 (事務室)

FAX (0155) 49-5643

HP アドレス : URL: <http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/>