

文部科学省認定 共同利用・共同研究拠点
OIEコラボレーティングセンター

原虫病研究センター 年報

NRCPD 2018 | 平成30年度

 帯広畜産大学

Obihiro University
of Agriculture
and Veterinary Medicine

**National Research Center
for Protozoan Diseases**

OIE collaborating centre
for surveillance and control
of animal protozoan diseases

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
⑤原虫病研究センター運営委員会委員	5
3. 予算、決算、外部資金等	6
①歳出決算額	6
②研究費総額、研究者 1 人当たりの研究費	6
③科学研究費等の採択状況	7
④その他の外部資金獲得状況	8
4. 研究活動	10
①共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む）	10
②共同研究課題採択一覧	10
③共同利用・共同研究の参加状況	11
④学会誌、学術雑誌、国際会議等に掲載された論文数	12
⑤出版物の発行部数	12
⑥受賞状況	12
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	13
5. 国際交流状況	13
①国際シンポジウム等の主催・参加状況	13
②国際学術交流協定の状況	15
③国際的な研究プロジェクトへの参加状況	16
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）	19
⑤その他・国際研究協力活動の状況	19
6. 教育活動・人材養成	20
①大学院生等の受入状況	20

②留学生の受入状況	20
③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数	20
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	21
7. 情報発信・広報活動等	22
①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）	22
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	23
8. 分野等の研究活動	24
節足動物衛生工学分野	24
生体防御学分野	28
ゲノム機能学分野	45
高度診断学分野	55
先端予防治療学分野	68
感染病理学分野	77
地球規模感染症学分野	80
9. 共同研究成果報告書	85
<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	86
哺乳動物細胞へのトキソプラズマ感染における宿主・ミトコンドリアの形態 および生理機能への影響	88
バングラデシュにおけるタイレリア感染牛摘発技術の開発	90
新興リーシュマニア症のリザーバー調査法の確立	92
ロタウイルスの感染がもたらす仔牛のクリプトスポリジウム原虫への抵抗性 と免疫応答の関係	94
犬バベシア症に対するニューキノロン系薬剤の有用性の検討	96
クリプトスポリジウムタンパク質 NPPPs を標的にした薬剤開発と評価	98
新規抗アピコンプレクサ類原虫剤の育種による生産性向上化および バイオコンバージョンによる誘導体の創成	100
トキソプラズマ虫体細胞膜の生体膜構成脂質をナノスケールレベルで可視化する	102
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	104
モンゴル国薬用植物による現地家畜トリパノソーマ症・ピロプラズマ症対策	106
フタトゲチマダニゲノムがコードする遺伝子の機能予測	109
<i>Spiroplasma</i> 属共生菌導入マダニを用いたマダニ共生細菌の維持機構の解明	111
クリプトスポリジウム症発症メカニズム解明に向けた形態学的アプローチ	113
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と作用機序解明	115

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・農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、地球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 30 年度 (H30.12.15 現在)					
	現 員 数	女 性 数	外 国 人 数	任期制導入状況		
				任 期 付 教 員 数	女 性 数	外 国 人 数
教 授	7	0	1	0	0	0
准教授	2	0	0	0	0	0
講 師	0	0	0	0	0	0
助 教	2	1	0	2	1	0
助 手	0	0	0	0	0	0
合 計	11	1	1	2	1	0

②技術系職員数

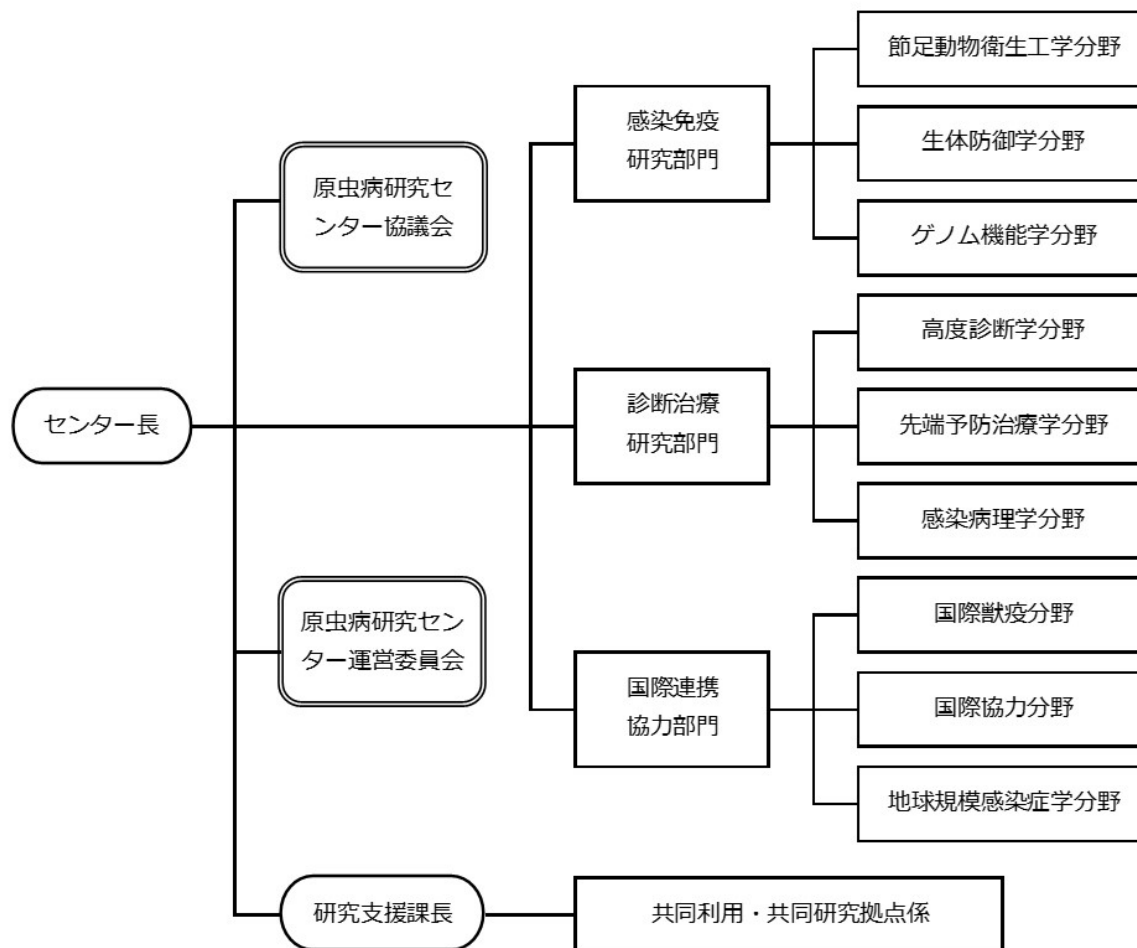
区 分		平成 30 年度 (人)	
技術系職員数		15	
	うち常勤	6	
	うち非常勤	9	

③事務系職員数

区 分		平成 30 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 30 年度】



⑤原虫病研究センター運営委員会委員

氏 名	所 属 機 関 名	役 職	備 考
小野 憲一郎	株式会社日本動物高度医療センター	取締役	委員長
片倉 賢	北海道大学大学院獣医学研究科	教授	帯広畜産大学の役員及び職員以外の者で原虫病に関する学識経験者のうちからセンター長の指名する者
狩野 繁之	国立研究開発法人国立国際医療研究センター研究所	熱帯医学・マラリア研究部長	
木下 タロウ	国立大学法人大阪大学微生物病研究所	寄付研究部門教授	
釘田 博文	O I E アジア太平洋地域事務所	代表	
杉本 千尋	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	特任教授	
平山 謙二	国立大学法人長崎大学熱帯医学研究所	教授	
堀井 俊宏	国立大学法人大阪大学微生物病研究所	教授	
玄 学南	原虫病研究センター	教授	センター専任の教授
五十嵐 郁男	原虫病研究センター	教授	
鈴木 宏志	原虫病研究センター	教授	
河津 信一郎	原虫病研究センター	教授	
横山 直明	原虫病研究センター	教授	
五十嵐 慎	原虫病研究センター	教授	
西川 義文	原虫病研究センター	教授	

3. 予算、決算、外部資金等

①歳出決算額

区 分	平成 30 年度（単位：百万円）	
	決算額	うち運営費交付金
人 件 費	180	139
物 件 費	203	35
計	383	174

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 30 年度 (単位：百万円)	11	347	175	31.5	15.9

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 B（海外）	26304038	継 続	准教授・福本晋也	3,500
基盤研究 A（海外）	16H02768	継 続	教授・五十嵐 郁男	8,500
基盤研究 B（一般）	16H05026	継 続	准教授・福本 晋也	3,500
基盤研究 B（一般）	16H05033	継 続	教授・横山 直明	3,900
基盤研究 B（一般）	17H03913	継 続	准教授・加藤 健太郎	4,100
基盤研究 B（一般）	18H02335	新 規	教授・西川 義文	5,000
基盤研究 B（一般）	18H02336	新 規	教授・玄 学南	4,800
基盤研究 B（一般）	18H02337	新 規	教授・五十嵐 郁男	4,700
基盤研究 C（特設）	16KT0141	継 続	准教授・加藤 健太郎	1,200
挑戦的研究（萌芽）	17K19538	継 続	教授・西川 義文	2,800
挑戦的研究（萌芽）	18K19257	新 規	教授・横山 直明	2,400
挑戦的研究（萌芽）	18K19258	新 規	教授・河津 信一郎	2,400
国際共同研究強化 (B)	18KK0188	新 規	教授・玄 学南	4,700
若手研究 B	16K18793	継 続	助教・菅沼 啓輔	1,200
若手研究 B	16K18794	継 続	助教・白藤 梨可	800
若手研究 B	17K17570	継 続	特任研究員・ 梅田 剛佑	1,300
若手研究 B	18K14577	新 規	特任研究員・ 猪原 史成	1,600
研究活動スタート 支援	17H06496	継 続	特任研究員・ 白水 貴大	700
特別研究員奨励費 (外国人特別研究員)	17F17105	継 続	教授・玄 学南	1,200
特別研究員奨励費 (外国人特別研究員)	18F18089	新 規	教授・玄 学南	1,200
特別研究員奨励費 (外国人特別研究員)	18F18403	新 規	教授・玄 学南	700
特別研究員奨励費 (外国人特別研究員)	18F18091	新 規	教授・五十嵐 郁男	1,100
特別研究員奨励費 (外国人特別研究員)	18F18399	新 規	教授・横山 直明	600

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	医療分野国際科 学技術共同研究 開発推進事業	継 続	助教・菅沼 啓輔	2,220
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	教授・西川 義文	769
国立研究開発法人 日本医療研究開発 機構	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	教授・西川 義文	5,615
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	継 続	教授・西川 義文	1,356
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	18,830
農業・食品産業技術 総合研究機構	革新的技術開発・ 緊急展開事業	新 規	教授・横山 直明	7,394
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	1,470
独立行政法人 日本学術振興会	二国間交流事業 共同研究	継 続	教授・横山 直明	2,450
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	1,000
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	継 続	教授・鈴木 宏志	1,200
国立大学法人 北海道大学	卓越大学院プロ グラム	新 規	教授・横山 直明	2,272
日本中央競馬会	畜産振興事業	新 規	准教授・加藤 健太郎	11,280

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)
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	6,132
C (株)	共同研究	新 規	准教授・加藤 健太郎	1,000
D (株)	共同研究 1	新 規	教授・河津 信一郎	1,300
D (株)	共同研究	新 規	助教・菅沼 啓輔	1,440
D (株)	共同研究 2	新 規	教授・河津 信一郎	1,300
E (株)	共同研究	新 規	教授・五十嵐 郁男	200
一般財団法人 旗影会	一般財団法人旗 影会研究助成	新 規	教授・玄 学南	1,000
公益財団法人 日中医学協会	日中笹川医学奨 学金	新 規	教授・玄 学南	700
公益財団法人 秋山生命科学振興 財団	秋山記念生命科 学振興財団研究 助成	新 規	特任研究員・ 猪原 史成	500
公益財団法人 伊藤記念財団	伊藤記念財団研 究助成	新 規	准教授・福本 晋也	800
(株) 白寿生化学研 究所	寄附講座	継 続	教授・鈴木 宏志	20,000
F (株)	寄附金	新 規	助教・白藤 梨可	27
G (株)	寄附金	新 規	助教・白藤 梨可	200

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）	15
うち国際的な共同利用・共同研究数	0
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	0
うち国内での共同利用・共同研究数	15
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	15

② 共同研究課題採択一覧

研究代表者	研 究 課 題 名（15 件）	センター内 共同研究者
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 2	河津 信一郎
小柴 琢己	哺乳動物細胞へのトキソプラズマ感染における宿主・ミトコンドリアの形態および生理機能への影響	西川 義文
高島 康弘	バングラデシュにおけるタイレリア感染牛摘発技術の開発	横山 直明
加藤 大智	新興リーシュマニア症のリザーバー調査法の確立	横山 直明
村越 ふみ	ロタウイルスの感染がもたらす仔牛のクリプトスポリジウム原虫への抵抗性と免疫応答の関係	加藤 健太郎
井口 愛子	犬バベシア症に対するニューキノロン系薬剤の有用性の検討	玄 学南
古川 敦	クリプトスポリジウムタンパク質 NPPPs を標的にした薬剤開発と評価	加藤 健太郎
二瓶 浩一	新規抗アピコンプレクサ類原虫剤の育種による生産性向上およびバイオコンバージョンによる誘導体の創成	西川 義文
正谷 達膳	トキソプラズマ虫体細胞膜の生体膜構成脂質をナノスケールレベルで可視化する	玄 学南
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
村田 敏拓	モンゴル国薬用植物による現地家畜トリパノソーマ症・ピロプラズマ症対策	菅沼 啓輔
山岸 潤也	フタトゲチマダニゲノムがコードする遺伝子の機能予測	玄 学南
中尾 亮	<i>Spiroplasma</i> 属共生菌導入マダニを用いたマダニ共生細菌の維持機構の解明	白藤 梨可

暮地本 宙己	クリプトスポリジウム症発症メカニズム解明に向けた形態学的アプローチ	加藤 健太郎
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と作用メカニズム解析	菅沼 啓輔

③共同利用・共同研究の参加状況

区 分	平成 30 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	72 (26)	37 (12)	61 (22)	20 (9)	1138 (349)	554 (153)	940 (262)	445 (127)
国立大学	16	41 (5)	2 (0)	10 (3)	3 (0)	59 (7)	4 (0)	23 (5)	6 (0)
公立大学	1	2 (2)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	6 (6)	0 (0)	6 (6)	0 (0)
私立大学	8	15 (1)	0 (0)	5 (1)	2 (0)	79 (30)	0 (0)	63 (30)	31 (0)
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	18	49 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	65 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
民間機関	17	69 (12)	0 (0)	2 (2)	0 (0)	74 (14)	0 (0)	4 (4)	0 (0)
外国機関	13	42 (16)	42 (16)	18 (10)	2 (2)	676 (203)	676 (203)	415 (185)	2 (2)
その他	1	13 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	13 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	82	303 (65)	81 (28)	98 (40)	27 (11)	2110 (613)	1234 (356)	1451 (492)	484 (129)

※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 30 年度	
論 文 数		76	
うち国際学術誌に掲載された論文数		69	

⑤出版物の発行部数

出 版 物 の 名 称	発 行 部 数
The Journal of Protozoology Research	233

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	平成 29 年度 森永賞	H30 年 6 月	公衆衛生上重要な人獣共通感染症であるクリプトスポリジウム症の下痢発症メカニズムの超微細構造解析
劉 明明	第 9 回 日本獣医寄生虫学奨励賞	H30 年 9 月	Establishment of a stable transfection system for genetic manipulation of <i>Babesia gibsoni</i>
梅田 剛佑	第 9 回 日本獣医寄生虫学奨励賞	H30 年 9 月	トキソプラズマ感染時の Toll-like receptor 2 および CC chemokine receptor 5 の機能解析—マウス初代脳細胞のトランスクリプトームから—
曾賀 晃	岐阜大学大学院連合獣医学研究科長表彰受賞	H30 年 9 月	Studies on the Development of the High Efficacy Methods for Generating Transgenic Parasites in Rodent Malaria Model
加藤 健太郎	平成 30 年度 北海道科学技術奨励賞	H31 年 2 月	原虫病の感染メカニズムの解明と対策技術の開発

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
2	41	8	197	2	56	3	236	15	532

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 30 年度	
主催件数		5	
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	H30.7.12 ～7.13	International Symposium on Strategies for the Control of Ticks and Tick-borne Diseases in Thailand	30 (26)
2	H30.8.10	The scientific meeting of the NRCPD & former JICA participants, PhD student and collaborators in Vietnam	21 (20)
3	H31.1.22	Joint Seminar between SHVRI and NRCPD	18 (16)
4	H31.2.22	原虫病研究センター共同研究成果報告会	25 (10)
5	H31.3.5	コーネル大学寄生虫学関連教員と原虫病研究センターならびに関連教員との共同研究会	31 (22)

(2)参加状況

区 分	平成 30 年度		
参加件数	9		
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	H30.4.12	The first human babesiosis conference（成果発表）	1
2	H30.6.14	70th Annual Scientific Sessions of the Sri Lanka Veterinary Association 2018（招待講演、成果発表）	3
3	H30.6.29	第 4 回非ツェツェ媒介性動物トリパノソーマ症（NTTAT）年次会議参加と OIE 陸生動物診断・ワクチンマニュアル改訂版作成に関する審議	1
4	H30.7.11 ～7.13	51st SSR Annual Meeting（成果発表）	1
5	H30.8.20 ～8.23	14th International Congress of Parasitology（招待講演、成果発表）	15
6	H30.10.29 ～11.1	第 67 回アメリカ熱帯医学会（成果発表）	1
7	H30.12.2 ～12.4	The 3rd International Conference on Non Tsetse Transmitted Animal Trypanosis（成果発表）	1
8	H31.2.11 ～2.14	iCOMOS2019（招待講演）	1
9	H31.2.26 ～3.1	USJCMSP International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim（招待講演）	1

②国際学術交流協定の状況

協定総数	15						
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
2008 年 11 月	2023 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	MOA	原虫病	1	3
2010 年 9 月	2020 年 9 月	中国	中国農業科学院上海獣医学研究所	MOU	原虫病	4	4
2011 年 9 月	2021 年 9 月	中国	延辺大学	MOU	原虫病	0	0
2014 年 5 月	2018 年 5 月	スリランカ	スリランカ獣医学研究所	MOA	原虫病	0	6
2014 年 5 月	2018 年 5 月	タイ	ラジャマンガラ大学獣医学部	MOA	原虫病	0	0
2015 年 10 月	2018 年 10 月	インドネシア	サムラトランギ大学	MOA	原虫病	0	0
2015 年 12 月	2020 年 12 月	ケニア	ナイロビ大学	MOA	原虫病	0	0
2015 年 12 月	2020 年 12 月	ウガンダ	マケレレ大学	MOA	原虫病	0	0
2016 年 3 月	2019 年 3 月	フィリピン	フィリピン大学・セブ校	MOA	原虫病	2	2
2016 年 6 月	2021 年 6 月	ブルキナファソ	ワガドゥーグー大学	MOA	原虫病	0	0
2017 年 2 月	2022 年 2 月	南アフリカ	ノースウェスト大学	MOA	原虫病	0	1
2017 年 2 月	2022 年 2 月	エジプト	マンスーラ大学	MOA	原虫病	0	0
2017 年 11 月	2022 年 11 月	中国	中国青海獣医学研究所	MOA	原虫病	16	0
2018 年 1 月	2023 年 1 月	ブルキナファソ	国際湿地帯畜産研究開発センター	MOA	原虫病	0	0
2018 年 5 月	2022 年 5 月	フィリピン	セブ工科大学	MOU	原虫病	2	2
合 計						25	18

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
平成 25 年度～平成 30 年度	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	横山 直明 菅沼 啓輔
平成 27 年度～令和元年度	ザンビア・ザンビア大学	プロジェクト名：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・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 プロジェクト概要：本事業では、ザンビアにおけるアフリカ睡眠病(HAT)流行実態の調査、HAT 感染のリスクファクター分析による感染制御対策の策定、ICT HAT 診断キットの開発を最終目的として、HAT 流行実態調査及び HAT リスクファクターの収集と分析及び ICT HAT 診断キットの有用性評価と社会実装を担当する。疫学調査の実施とトリパノソーマ分離培養法の検討・試行、さらに動物トリパノソーマ病で有用性が示されている GM6 抗原を用いた ICT を HAT 診断に利用するための基礎的検討及び HAT 患者検体を用いた HAT 診断 ICT キット有用性評価の試行を行う。 参加国：ザンビア 予算見込み額：2,470 万円	菅沼 啓輔

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
平成 28 年度～平成 30 年度	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
平成 29 年度～令和元年度	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 菅沼 啓輔

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
平成 30 年度～令和 2 年度	トルコ・セルチユーク大学	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）・トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立 プロジェクト概要：バベシア原虫はマダニにより媒介される住血寄生虫である。家畜に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死性感染症を引き起こし、地球規模で畜産業の脅威となっている。本研究では、古来よりアジア・ヨーロッパ・中東などの家畜交易中継地として知られるトルコに着目した。当国における遺伝的に多様な原虫集団を対象とし、ゲノム疫学的手法に基づく家畜バベシア症の流行実態の解明と、ゲノム情報に立脚した現地即応型のバベシア症制御戦略の構築を目指す。 参加国：日本・トルコ 予算見込み額：1780 万円	玄 学南 五十嵐 慎

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 30 年度	
		派遣状況	招へい状況
事業区分	合 計	68	58
	文部科学省事業	0	0
	日本学術振興会事業	23	9
	当該法人による事業	10	2
	その他の事業	35	47
派遣先国	① アジア	55	47
	② 北米	3	4
	③ 中南米	2	0
	④ ヨーロッパ	2	1
	⑤ オセアニア	4	1
	⑥ 中東	1	0
	⑦ アフリカ	1	5

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 29 年度家畜感染症上級専門家育成コース	3	0
地球規模課題対応 国際科学技術協力 プログラム (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	17	21
合 計		20	21

6. 教育活動・人材養成

①大学院生等の受入状況

区 分	平成 30 年度	
		うち外国人
博士後期課程	11	11
うち社会人 DC	0	0
修士・博士前期課程	6	4
うち社会人 MC	0	0
学 部 生	19	0
合 計	36	15

②留学生の受入状況

区 分	平成 30 年度
①アジア	14
②北米	0
③中南米	0
④ヨーロッパ	0
⑤オセアニア	0
⑥中東	6
⑦アフリカ	3
合 計	23

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 30 年度	
	学内	学外
博士号取得者数	2	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	畜産衛生学	学位授与 年月日	H30 年 9 月 28 日
	氏 名	ガオ ヤン GAO Yang (高 洋) 中国	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Functional characterization of <i>Toxoplasma gondii</i> SAG1-related sequence 2 and evaluation of its potential in serodiagnosis		
	日本語訳	トキソプラズマの SRS2 分子の機能解析と血清診断抗原としての評価		
2	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	H30 年 9 月 28 日
	氏 名	リュウ ミンミン LIU Mingming (劉 明明) 中国	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Establishment of transient and stable transfection systems for genetic manipulation of <i>Babesia gibsoni</i>		
	日本語訳	バベシア・ギブソニの遺伝子操作のための一過性及び安定したトランスフェクションシステムの確立		
3	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	H30 年 9 月 21 日
	氏 名	ソガ アキラ 曽賀 晃	担当教員	福本 晋也
	学位論文 の題名	Studies on the Development of the High Efficacy Methods for Generating Transgenic Parasites in Rodent Malaria Model		
	日本語訳	齧歯類マラリアモデルにおける効率的遺伝子組換え原虫作製法の開発に関する研究		

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
2	59	8	349	4	117	14	525
○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	
H30.12.5	セミナー	国際	藤崎幸藏客員教授による講義「中国の新疆・青海省のマダニ種」の開催	藤崎幸藏客員教授による講義「中国の新疆・青海省のマダニ種」を開催した。現在中国より来日中の3名の共同研究員の他、マダニ研究に従事する留学生が参加した		11	
H31.1.22	セミナー	国際	上海獣医学研究所との合同セミナー	10名の研究者がマダニとマダニ媒介感染症の診断・治療・予防法開発に関する研究発表を行った。		18	
H31.2.22	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）： 長崎大学熱帯医学研究所 麻田正仁助教 京都府立医科大学医学研究科 村越ふみ助教 帯広畜産大学保健管理センター 暮地本宙己特任准教授 鳥取大学農学部共同獣医学科 井口愛子講師		25	
H31.3.5	研究会	国際	コーネル大学寄生虫学関連教員と原虫病研究センターならびに関連教員との共同研究会	コーネル大学寄生虫学関連教員と原虫病研究センターならびに関連教員との共同研究実現に向けた見学及び研究紹介・研究打ち合わせ		31	

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（プロジェクト、国際協力）や研究成果（論文リスト、受賞、年報）のほか、毎年度発行している年報や原虫病に関する国際的定期刊行誌「The Journal of Protozoology Research ISSN 0917-4427」等を掲載し、国内外に向け広く紹介している。 なお、研究内容が研究者のみならず、一般市民に向けても、広く理解が得られるよう、情報発信について工夫している。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」や「とかちマダニじてん」を制作し、公開している。 さらに、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、実施可能なスーラ病診断検査に関する情報と検査依頼手順を公開した。また、この手順書は、米国農務省・動植物検疫所 (USDA-APHIS) ホームページからも公開されている。
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 30 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、本法を用いブラストサイジング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6)。

- ・ 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、住肉孢子虫、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。平成 30 年度においては、その中でもタイレリア、トキソプラズマについて調査を行いました。タイレリアについては高度に蔓延していること、多くのエゾシカ個体が抗トキソプラズマ抗体を有していることが確認されました。(論文リスト 3,5,7)。

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

- ・ 第 70 回日本衛生動物学会大会

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 平成 30 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. Yenni Yusuf, Tatsuya Yoshii, Mitsuhiro Iyori, Kunitaka Yoshida, Hiroaki Mizukami, **Shinya Fukumoto**, Daisuke S Yamamoto, Asrar Alam, Talha Bin Emran, Fitri Amelia, Ashekul Islam, Hiromu Otsuka, Eizo Takashima, Takafumi Tsuboi and Shigeto Yoshida. Adeno-Associated Virus as an Effective Malaria Booster Vaccine Following Adenovirus Priming. **Frontiers in Immunology**. 2019; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00730>
2. Jamsransuren D, Yoshii K, Kariwa H, Asakawa M, OKuda K, Fujii K, **Fukumoto S**, Umemiya-Shirafuji R, Sasaki M, Matsumoto K, Yamaguchi E, Ogawa H, Imai K, Epidemiological survey of tick-borne encephalitis virus infection in wild animals on Hokkaido and Honshu islands, Japan. **Jpn J Vet Res**, 2019: In press.
3. Tokio Hoshina, **Shinya Fukumoto**, Hiroka Aonuma, Erisha Saiki, Seiji Hori, Hirotaka Kanuka. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild sika deer in Japan.

- Parasitology International.** 2019; 71: 76-79. PMID: 30940609
4. Aboubacar Sombié, Erisha Saiki, Félix Yaméogo, Tatsuya Sakurai, Takahiro Shirozu, **Shinya Fukumoto**, Antoine Sanon, David Weetman, Philip J. McCall, Hirotaka Kanuka and Athanase Badolo. High frequencies of F1534C and V1016I *kdr* mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgandé (Ouagadougou), Burkina Faso. **Tropical Medicine and Health.** 2019; 47: 2. PMID: 30787670
 5. Seung-Hun Lee, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Mingming Liu, Byamukama Benedicto, Maria Agnes Tumwebaze, Damdinsuren Boldbaatar, Rika Umemiya-Shirafuji, **Shinya Fukumoto***, Xuenan Xuan. Differential diagnosis and molecular characterization of *Theileria* spp. in sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido, Japan. **Parasitology International.** 2019; 70: 23-26. PMID: 30664981
 6. Akira Soga, Mami Ko-ketsu, **Shinya Fukumoto***. Development of a bsd-blasticidin selection system in *Plasmodium berghei*. **FEBS Letters.** 2018; 592: 1847-1855. PMID: 29774536
 7. Shunya Shibata, Thillaiampalam Sivakumar, Ikuo Igarashi, Rika Umemiya-Shirafuji, Hisashi Inokuma, **Shinya Fukumoto**, Naoaki Yokoyama. Epidemiological survey of a cervine *Theileria* in wild deer, questing ticks, and cattle in Hokkaido, Japan. **Ticks and Tick-borne Diseases.** 2018; 9: 1235-1240. PMID: 29753652
 8. **Shinya Fukumoto***. Introduction to the biology of the pathogens and vectors. **Medical Entomology and Zoology.** 2018; 69: 147.

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. Dissecting vectorial capacity for the dog heartworm disease in *Aedes aegypti* to establish the genetically modified non-vector mosquito. The 10th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia、岐阜市岐阜大学、平成 30 年 2 月 19 日

9. 獲得研究費

1. 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
2. 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 (16K15035)、代表、平成 28 年度～平成 30 年度
3. 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 30 年度
4. 平成 30 年度伊藤記念財団研究助成事業、エゾシカ由来腸管出血性大腸菌の食品衛生リスクに関する研究

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. Antoine Sanon : University of Ouagadougou, MEMORANDUM OF AGREEMENT, BETWEEN UFR LIFE AND EARTH SCIENCE, UNIVERSITE OUAGA I PR JOSEPH KI-ZERBO, BURKINA FASO AND NATIONAL RESEARCH CENTER FOR PROTOZOAN DISEASES, OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE, JAPAN、2016 年 6 月～2021 年 5 月、学術協定
2. 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 30 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、バベシア症やトキソプラズマ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。バベシアやトキソプラズマに感染し、回復した動物は同じ種または近縁種の原虫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、新規ワクチン開発につながります。バベシア症は重度の溶血性貧血を主徴としますが、この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。一方、バベシアを媒介するマダニ体内における虫体の発育ステージの解明と伝播阻止ワクチンの開発にも取り組んでいます。また、国内外におけるマダニ媒介感染症の流行実態の調査と制御戦略の確立に関する研究も展開しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ バベシア症などにおけ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
- ・ バベシア症やトキソプラズマ症に対する治療・予防法の開発
- ・ マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発
- ・ マダニ媒介感染症の流行実態の調査と制御戦略の確立

3. 平成 30 年度研究の総括

- ・ トキソプラズマにはデンスグラニュール（濃縮顆粒）という小器官が存在しますが、虫体が宿主細胞に侵入した後この小器官からは多くのタンパク質が分泌され（デンスグラニュールタンパク質（GRAs））、寄生体胞の形成や宿主への病原性に関与するとされています。本研究では TgGRA9 の機能解析を行いました。いままで先行研究により TgGRA9 の存在は判明しましたが、その機能は不明のままでした。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 系を用いて RH 株（遺伝子型 I）と PLK 株（遺伝子型 II）の TgGRA9 ノックアウト虫体を作出しました。マウスモデルにおけるこれら TgGRA9 欠損株は、遺伝子型特異的病原性を示しました。RHΔGRA9 はその親株（野生型）との間に病原性の変化が認められなかったが、PLKΔGRA9 は親株（野生型）より、病原性が著しく低下していることが判明しました。これらの結果より、マウスモデルにおいて TgGRA9 は遺伝子型特異的に病原性に関わっていることが示唆されました。（論文リスト 1）
- ・ 犬バベシア症は、バベシア（*Babesia canis canis*, *Babesia gibsoni*）の赤血球内寄生によって引き起こされるマダニ媒介性疾患である。バベシアに感染した犬は、重度な溶血性貧血を引き起こし、死に至る場合も多い。日本を含む世界中に発生が認められ、その被害は深刻とされ

るが、いまだに副作用の少ない有効な治療法が開発されていないのが現状である。そこで、当研究室では特に日本を含むアジア地域で流行が深刻とされる犬バベシア (*B. gibsoni*) 症に対する治療法を開発してきた。今年度は、バベシアなどアピコンプレックス門原虫に認められる アピコプラストと呼ばれる植物の葉緑体由来の小器官に存在する植物ホルモンアブシジン酸とジベレリンの抑制剤として知られるフルリドン (FLU) とイナベンフィド (INA) の抗バベシア作用について調べてみました。FLU と INA の *B. gibsoni* に対する IC₅₀ はそれぞれ 60.6 と 4.3μM でありました。一方、FLU と INA は犬腎由来の MDCK 細胞に対しては非常に低い細胞毒性を示しました。これらの結果により、FLU と INA は犬バベシア症に対する治療薬の候補として今後さらなる検討が必要であることが示唆されました。(論文リスト 5)

- ・ 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。近年、ヒトのバベシア症例の報告は増加の傾向にあり、その予防対策が求められている。この原虫感染症に対するプラスミドとアデノウイルスをベースとした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) をワクチン候補分子として選択し、BmAMA1 を発現するプラスミド pBmAMA1 と組換えアデノウイルス Ad5BmAMA1 を作製しました。pBmAMA1 と Ad5BmAMA1 を用いた異種プライム・ブースト法にてハムスターを免疫し、*B. microti* に対する感染防御能を評価しました。その結果、異種プライム・ブースト法がられ、*B. microti* 感染に対する一定の防御効果が認められました。これらの結果は、異種 DNA プライミングおよび組換えアデノウイルスブースト法が *B. microti* に対するワクチン接種の防御効果を改善し得ることを示している。(論文リスト 14)

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医寄生虫学会理事
- ・ 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

- ・ 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 30 年 7 月 12 日~13 日、タイ・カセサート大学)
- ・ ベトナム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 30 年 8 月 10 日、ベトナム獣医学研究所)

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 長崎大学熱帯医学研究所運営協議会委員

6. 平成 30 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. Huanping Guo, Yang Gao, Honglin Jia, Paul Franck Adjou Moumouni, Tatsunori Masatani, Mingming Liu, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Jixu Li, Yongchang Li, Maria Agnes Tumwebaze, Byamukama Benedicto, **Xuenan Xuan***. Characterization of strain-specific phenotypes associated with knockout of dense granule protein 9 in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 2019; 299: 53-61. PMID: 30849416
2. Nthatsi I Molefe, Peter S Musinguzi, Daisuke Kondoh, Kenichi Watanabe, Oriel M M Thekisoe, **Xuenan Xuan**, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma. Short- and long-term effects of orally administered azithromycin on *Trypanosoma brucei brucei*-infected mice. **Experimental Parasitology**. 2019; 199: 40-46. PMID: 30840850
3. Ybañez Adrian P, Ybañez Rochelle Haidee D, Armonia Reynald Klint M, Chico James Knowell E, Ferraren Kevin James V, Tapdasan Emerson P, Salces Caro B, Maurillo Bon Christian A, Galon Eloiza May S, Macalanda Adrian Miki C, Moumouni Paul Franck A, **Xuenan Xuan***. First molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and the ectoparasite biodiversity in dairy water buffalo and cattle in Bohol, Philippines. **Parasitology International**. 2019; 70: 77-81. PMID: 30776450
4. Seung-Hun Lee, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Mingming Liu, Byamukama Benedicto, Maria Agnes Tumwebaze, Damdinsuren Boldbaatar, Rika Umemiya-Shirafuji, Shinya Fukumoto, **Xuenan Xuan***. Differential diagnosis and molecular characterization of *Theileria* spp. in sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido, Japan. **Parasitology International**. 2019; 70: 23-26. PMID: 30664981
5. Mingming Liu, Tatsunori Masatani, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Yang Gao, Huanping Guo, Jixu Li, Yongchang Li, **Xuenan Xuan***. Inhibitory effects of the phytohormone inhibitors fluridone and inabenfide against *Babesia gibsoni* in vitro. **Veterinary Parasitology**. 2019; 265: 19-23. PMID: 30638516
6. Weiqing Zheng, **Xuenan Xuan**, Renlong Fu, Huiying Tao, Rongman Xu, Yangqing Liu, Xiaoqing Liu, Jiafu Jiang, Haixia Wu, Hongmei Ma, Yi Sun, Haiying Chen. Preliminary investigation of ixodid ticks in Jiangxi Province of Eastern China. **Experimental and Applied Acarology**. 2019; 77: 93-104. PMID: 30542968
7. Weiqing Zheng, **Xuenan Xuan**, Renlong Fu, Huiying Tao, Yangqing Liu, Xiaoqing Liu, Dongmei Li, Hongmei Ma, Haiying Chen. Tick-borne pathogens in Ixodid ticks from Poyang lake region, southeastern China. **Korean Journal of Parasitology**. 2018; 56: 589-596. PMID: 30630280
8. Paul Franck Adjou Moumouni, Huanping Guo, Yang Gao, Mingming Liu, Aaron

- Edmond Ringo, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, **Xuenan Xuan***. Identification and genetic characterization of Piroplasmida and *Anaplasmataceae* agents in feeding *Amblyomma variegatum* ticks from Benin. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2018; 14: 137-143.
9. Aaron Edmond Ringo, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Mingming Liu, Yussuf Haji Khamis, Yang Gao, Huanping Guo, Weiqing Zheng, Artemis Efstratiou, Eloiza May Galon, Jixu Li, Saruda Tiwananthagorn, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Oriel Thekiso, **Xuenan Xuan***. Molecular detection and characterization of tick-borne protozoan and rickettsial pathogens isolated from cattle on Pemba Island, Tanzania. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1437-1445. PMID: 30207275
 10. Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, James Okwee-Acai, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, John Son Bbira, Kozo Fujisaki, **Xuenan Xuan**, Hiroshi Suzuki. C190A knockdown mutation in sodium channel domain II of pyrethroid-resistant *Rhipicephalus appendiculatus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1590-1593. PMID: 30115585
 11. Huanping Guo, Chunsheng Yin, Eloiza May Galon, Jige Du, Yang Gao, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Artemis Efstratiou, Seung-Hun Lee, Jixu Li, Aaron Edmond Ringo, Guanbo Wang, Yongchang Li, Maria Agnes Tumwebaze, **Xuenan Xuan***. Molecular survey and characterization of *Theileria annulata* and *Ehrlichia ruminantium* in cattle from Northwest China. **Parasitology International**. 2018; 67: 679-683. PMID: 29959093
 12. Adrian P Ybañez, Rochelle Haidee D Ybañez, Maxfrancis G Talle, Rinna Marie T Arreglo, Mary Janniel C Geens, Jun Gelacio I Villas III, Stephanie R Villar, Charmen L Laruga, Shinuo Cao, Franck Paul Adjou Moumouni, Mingming Liu, Ikuo Igarashi, **Xuenan Xuan***. Serological and molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Philippine horses. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1125-1128. PMID: 29693550
 13. Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Masahito Asada, Hassan Hakimi, Tatsunori Masatani, Patrick Vudriko, Seung-Hun Lee, Shin-ichiro Kawazu, Junya Yamagishi, **Xuenan Xuan***. Establishment of a stable transfection system for genetic manipulation of *Babesia gibsoni*. **Parasites & Vectors**. 2018; 11:260. PMID: 29685172
 14. Guanbo Wang, Longzheng Yu, Artemis Efstratiou, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Huanping Guo, Yang Gao, Shinuo Cao, Mo Zhou, Jixu Li, Aaron Edmond Ringo, **Xuenan Xuan***. Evaluation of the protective effect of a prime-boost strategy with plasmid DNA followed by recombinant adenovirus expressing BmAMA1 as vaccines against *Babesia microti* infection in hamster. 63(2):368-374, 2018. **Acta**

- Parasitologica.** 2018; 63: 368-374. PMID: 29654677
15. 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
 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. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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
 21. Patrick Vudriko, James Okwee-Acai, Joseph Byaruhanga, Dickson Stuart Tayebwa, Samuel George Okech, Robert Tweyongyere, Eddie M. Wampande, Anna Rose

- Ademun Okurut, Kenneth Mugabi, Jeanne Bukeka Muhindo, Jesca Lukanga Nakavuma, Rika Umemiya-Shirafuji, **Xuenan Xuan**, Hiroshi Suzuki. Chemical tick control practices in southwestern and northwestern Uganda. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 945-955. PMID: 29606621
22. 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
23. 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
24. Rochelle Haidee Ybanez, Adrian Ybanez, Lyra Lee Arnado, Laila Monika Belarmino, Knowlie Gay Malingin, Paul Bien Cabilite, Ziggy Ryan Amores, Maxfrancis 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

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. 人獣共通原虫感染症の監視・制御を目指した国際研究拠点の構築、日本大学主催シンポジウム：One Health の実践に向けて-次世代研究者と国際協力による感染症制御への挑戦-、平成 30 年 11 月 30 日、日本大学生物資源科学部

9. 獲得研究費

1. 平成 29 年度 研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）、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、2018 年度～2019 年度

2. 平成 29 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、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、2017 年度～2018 年度
3. 平成 30 年度 基盤研究（B）（一般）（文部科学省）、マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発、代表、2018 年度～2021 年度
4. 平成 30 年度 国際共同研究強化(B)（文部科学省）、トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立、代表、2018 年度～2021 年度
5. 平成 30 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発、代表、2018 年度～2019 年度
6. 平成 30 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、ネズミバベシア原虫：マダニ体内ステージ発育の分子基盤の解明と新規制御法の開発、代表、2018 年度～2020 年度
7. 旗影会平成 30 年度研究助成、食肉媒介性トキソプラズマ症に対する新規標準血清診断法の開発、代表、2018 年度

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：劉 明明（当時大学院生）

受賞名：第 9 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：Establishment of a stable transfection system for genetic manipulation of *Babesia gibsoni*

受賞年：平成 30 年 9 月 12 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. 山岸潤也：北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、タトゲチマダニゲノムがコードする遺伝子の機能予測、2018 年 4 月 1 日～2019 年 3 月 31 日、平成 30 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構成脂質をナノスケールレベルで可視化する、2018 年 4 月 1 日～2019 年 3 月 31 日、平成 30 年度原虫病研究センター共同研究
3. 井口 愛子：岩手大学農学部、犬バベシア症に対するニューキノロン系薬剤の有用性の検討、2018 年 4 月 1 日～2019 年 3 月 31 日、平成 30 年度原虫病研究センター共同研究
4. Ferda SEVINC：トルコ Selcuk 大学獣医学部、トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立、2018 年 10 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、国際共同研究強化(B)（文部科学省）

5. Tawin INPAKAEW : タイ Kasetsart 大学獣医学部、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、2017 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
6. Dinh Thi Bich LAN : ベトナム Hue 大学獣医学部、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、2017 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
7. Adrian YBANEZ : フィリピン大学セブ校獣医学部、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、2017 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
8. Appudurai ARULKANTHAN : スリランカ Peradeniya 大学獣医学部、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、2017 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）

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 30 年度研究の総括

- ・ 牛ネオスポラ症の対策にはコストの面からもワクチン開発が重要とされていますが、現在市販されているワクチンはありません。今回、新しいワクチン開発戦略の一つとして免疫活性化能を有するタンパク質を用いたサブユニットワクチンの検証を行いました。ネオスポラ (*Neospora caninum*) のデンスグラニュルタンパク質 6 (NcGRA6) をマウスマクロファージに作用させると、炎症性サイトカイン IL-12 の産生を誘導しました。そこで NcGRA6 の免疫活性化能に着目し、アジュバントを使用することなく NcGRA6 の単独免疫で感染防御効果を得ることに成功しました。NcGRA6 の免疫により抗原特異的な抗体産生と細胞性免疫を誘導することが可能で、マウスの感染実験において 90%以上のマウスが生存する結果を示しました（コントロールの生存率は 16.7%）。従って、NcGRA6 はネオスポラのワクチン開発に有望な抗原であることが示されました。本研究結果はエジプト・South Valley 大学との共同研究の成果であり、一部は基盤研究 (B) (一般) (日本学術振興会：15H04589, 18H02335)の

研究助成で実施しました。（論文リスト 1）

- ・ タイでは健康のために伝統的な薬草が使われています。本研究では7種類のタイの薬草からエタノール抽出エキスを調整し、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）とトキソプラズマ（*Toxoplasma gondii*）に対する薬効を培養試験で評価しました。K. parviflora, P. palatiferum と A. muricata の抽出エキ스는熱帯熱マラリア原虫に対し効果を示し、K. parviflora と M. sapientum (ripe fruit peel) の抽出エキ스는トキソプラズマの増殖を阻害しました。今回の結果はタイの薬草は抗原虫薬の創薬シーズになる可能性を示しています。本研究はタイ・マヒドン大学獣医学部との共同研究であり、一部は寿原記念財団の研究助成により実施しました。（論文リスト 2）

- ・ ネオスポラ（*Neospora caninum*）はウシの流産を引き起こす病原性原虫です。ネオスポラの蔓延は畜産業に経済的損失をもたらしますが、ワクチンや治療薬などは開発されていません。我々のこれまでの研究により、ワクチン抗原をオリゴ糖リポソーム内へ封入することで効果的な防御免疫を誘導できることが明らかとなっています。今回、ネオスポラのサイクロフィリンを封入したオリゴ糖リポソーム（NcCyp-OML）を作製し、ワクチン効果を検証しました。NcCyp-OML をマクロファージに作用させると NF-κB を活性化し、炎症性サイトカイン IL-12 の産生を促進させるました。NcCyp-OML の免疫により抗原特異的な抗体産生と細胞性免疫を誘導することが可能で、マウスの感染実験において感染マウスの生存率を優位に向上させました。このワクチン効果は Toll 様受容体 2（TLR2）欠損マウスでは認められなかったことから、NcCyp-OML の効果を発揮させるためには TLR2 が必要であることが明らかとなりました。今回の結果は、ネオスポラのワクチン開発には TLR2 依存的な免疫誘導が重要であることを示しています。本研究結果はエジプト・South Valley 大学との共同研究の成果であり、一部は基盤研究（B）（一般）（日本学術振興会：15H04589, 18H02335）の研究助成で実施しました。（論文リスト 3）

- ・ 子牛におけるクリプトスポリジウム・パルバム（*Cryptosporidium parvum*）の感染は激しい下痢症を引き起こし発育不良につながることから、経済的損失が大きい疾患です。本疾病対策には早期診断による衛生管理が必須であり、汚染地域を把握するためには血清疫学調査が有効です。これまでに CpP23 が診断用抗原として知られていますが、実際の感染牛に対する反応性が認められな場合も存在していました。そこで本研究では有用な診断用抗原の同定を目的に、CpP23 に加えて CpGP15, CpP2 そして CpGP60 について ELISA による抗原性の比較解析を行いました。CpP23 と CpGP15 はクリプトスポリジウム・パルバム感染の標準牛血清に対し優れた反応性を示し、2つの抗原の結果を組み合わせると特異性が 100%に上昇しました。今回の結果は野外血清サンプルを用いた解析の際に疑陰性の可能性を回避できることになり、CpP23 と CpGP15 を用いた ELISA による農場の検査の有用性を示唆しています。本研究結果はエジプト・South Valley 大学との共同研究の成果であり、一部は帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究経費（27-joint-2, 28-joint-6）、基盤研究（B）（海外学術調査）（文部科

学省：26304037)、研究成果最適展開支援プログラム A-STEP (科学技術振興機構：AS242Z03137P) の研究助成で実施しました。(論文リスト 5)

- ・ 新世界ザルへのトキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) の感染は致死的であり、リスザルにおけるトキソプラズマ症の流行事例が多数報告されています。今回、日本で飼育されているリスザルの死亡例からトキソプラズマ症を同定しました。病理組織学的検査により全身臓器に原虫が認められ、肺水腫と診断しました。感染個体の脳組織から乳剤を作製し、免疫不全マウスへ接種することで原虫株の分離に成功しました。分離株の遺伝子多型解析を行い、タイプ II 型と一部タイプ I 型の遺伝子マーカーが検出されました。マウスの病原性試験の結果、標準のタイプ II (PLK 株) と比較して分離株の病原性の低下が認められました。今回の結果は、日本で初のリズザル由来分離株の解析結果となります。本研究結果はエジプト・South Valley 大学、Mansoura 大学との共同研究の成果であり、一部は最先端・次世代研究開発支援プログラム (日本学術振興会：2011/LS003)、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 (AMED、JP18fk0108010) の研究助成で実施しました。(論文リスト 6)
- ・ ネオスポラ症に対する有効な治療法・予防法は開発されていないのが現状であり、ネオスポラ (*Neospora caninum*) 感染に対する治療薬やワクチンの開発は最重要課題の一つです。そのためには、原虫感染の病原性発症メカニズムを理解することが必要です。ネオスポラ感染により誘導される過剰な炎症反応は病態悪化につながることを示唆されています。そこで、過剰な炎症反応を誘発する原虫分子が病原性因子であるという仮説を立て研究を進めました。炎症反応を測定できるスクリーニング系を構築し 20 種類の原虫因子を調べたところ、3 種類の候補分子を得ることができました。次に CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集技術を確立し、それぞれの候補分子を欠損させたネオスポラ原虫を作出しました。マウスの感染実験により、デンスグラニルタンパク質 7 (NcGRA7) を欠損させた原虫株は病原性が著しく低下することが判明しました。NcGRA7 の機能を解析したところ、NcGRA7 は感染細胞内に放出され炎症反応の誘導に関わる様々な細胞応答を活性化していることが明らかとなりました。これらの結果から、ネオスポラから分泌される NcGRA7 が病原性因子として機能し、ネオスポラの病態発症に関与していることが明らかとなりました。ネオスポラの病原性因子の報告は世界初となります。本研究結果はエジプト・South Valley 大学との共同研究の成果であり、一部は基盤研究 (B) (一般) (日本学術振興会：15H04589, 18H02335) の研究助成で実施しました。(論文リスト 11)
- ・ ネオスポラ (*Neospora caninum*) のデンスグラニルタンパク質 7 (NcGRA7) は有用な診断用抗原の一つですが、その抗原性領域については明らかにされていません。本研究では、NcGRA7 (全長 217 アミノ酸) を次の 5 つの断片として作製し、それぞれの抗原性をマウス、イヌ、ウシの抗ネオスポラ血清を用いて評価しました (NcGRA7m (27-217 アミノ酸), NcGRA7m3 (27-160 アミノ酸), NcGRA7m4 (27-135 アミノ酸), NcGRA7m5 (161-190 アミノ酸), and NcGRA7m6 (188-217 アミノ酸))。NcGRA7m、NcGRA7m3 と NcGRA7m4

はマウスとイヌの抗ネオスポラ血清との反応性を示しました。一方で、ウシの抗ネオスポラ血清と反応したのは NcGRA7m でした。本結果は動物種によって抗原性を示す領域が異なることを示唆しており、免疫学的な解析には対象動物種を考慮する必要があることを示しています。本研究結果はエジプト・South Valley 大学との共同研究の成果であり、一部は基盤研究 (B) (一般) (日本学術振興会: 15H04589)、地域産学バリュープログラム (科学技術振興機構: VP29117937665)、伊藤記念財団 (514) の研究助成で実施しました。(論文リスト 12)

- ・ クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) の感染はヒトと子牛の下痢症を引き起こすことから、健康被害と農業経済的な損失に繋がります。クリプトスポリジウムの診断は、糞便サンプルからのオーシスト、DNA、抗原の同定よりなされています。クリプトスポリジウム特異抗体の検出は感染の履歴を追跡できることから、本感染症のサーベイランスに適した方法です。今回、現場での使用を想定し、クリプトスポリジウム特異抗体を検出できるイムノクロマトテスト (ICT) の作製を行いました。CpP23 と CpGP15 を搭載した ICT を作製しウシ血清で反応性を評価したところ、クリプトスポリジウム・パルバム感染の標準牛血清に対し優れた反応性を示し、同一抗原を用いた ELISA と高い一致度を示しました。クリプトスポリジウム特異抗体を検出できる ICT の作製は成果初の報告となり、フィールドでの応用が期待されます。本研究結果はエジプト・South Valley 大学との共同研究の成果であり、一部は基盤研究 (B) (一般) (日本学術振興会: 15H04589)、伊藤記念財団 (514) の研究助成で実施しました。(論文リスト 13)

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議委員
- ・ 日本寄生虫学会評議委員
- ・ 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 26 回分子寄生虫学ワークショップ (平成 30 年 9 月 19 日~9 月 22 日、道後温泉 花ゆづき 会議室、愛媛県)
- ・ 第 161 回日本獣医学会学術集会・日本獣医寄生虫学会・寄生虫分科会シンポジウム「アジア諸国における寄生虫学研究の現状 (Current status of parasitology research in Asian Countries) (平成 30 年 9 月 11 日、つくば国際会議場)

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
- ・ The Journal of Protozoology Research 編集委員長
- ・ The Korean Journal of Parasitology, a member of Editorial Board

6. 平成 30 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. Ragab M Fereig, Naomi Shimoda, Hanan H Abdelbaky, Yasuhiro Kuroda, Yoshifumi Nishikawa*. *Neospora* GRA6 possesses immune-stimulating activity and confers efficient protection against *Neospora caninum* infection in mice. **Veterinary Parasitology**. 2019; 267: 61-68. PMID: 30878088
2. Arpron Leesombun, Sookruetai Boonmasawai, Yoshifumi Nishikawa*. Ethanol Extracts from Thai Plants have Anti-*Plasmodium* and Anti-*Toxoplasma* Activities In Vitro. **Acta Parasitologica**. 2019; 1-5. PMID: 30820881
3. Ragab M Fereig, Hanan H Abdelbaky, Yasuhiro Kuroda, Yoshifumi Nishikawa*. Critical role of TLR2 in triggering protective immunity with cyclophilin entrapped in oligomannose-coated liposomes against *Neospora caninum* infection in mice. **Vaccine**. 2019; 37: 937-944. PMID: 30660401
4. Cornelia Appiah-Kwarteng, Taizo Saito, Natsuki Toda, Katsuya Kitoh, Yoshifumi Nishikawa, Christopher Adenyo, Boniface Kayang, Ebenezer Oduro Owusu, Kenji Ohya, Miho Inoue-Murayama, Fumiya Kawahara, Kisaburo Nagamune, Yasuhiro Takashima. Native SAG1 in *Toxoplasma gondii* lysates is superior to recombinant SAG1 for serodiagnosis of *T. gondii* infections in chickens. **Parasitology International**. 2019; 69: 114-120. PMID: 30630114
5. Madoka Ichikawa-Seki, Ragab M Fereig, Tatsunori Masatani, Aiko Kinami, Yoko Takahashi, Katsuya Kida, Yoshifumi Nishikawa*. Development of CpGP15 recombinant antigen of *Cryptosporidium parvum* for detection of the specific antibodies in cattle. **Parasitology International**. 2019; 69: 8-12. PMID: 30391553
6. Maki Nishimura, Takashi Goyama, Sohei Tomikawa, Ragab M Ferei, El-Sayed N El-Alfy, Kisaburo Nagamune, Yoshiyasu Kobayashi, Yoshifumi Nishikawa*. Outbreak of toxoplasmosis in four squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Japan. **Parasitology International**. 2019; 68: 79-86. PMID: 30347233
7. Hironori Bando, Youngae Lee, Naoya Sakaguchi, Ariel Pradipta, Ji Su Ma, Shun Tanaka, Yihong Cai, Jianfa Liu, Jilong Shen, Yoshifumi Nishikawa, Miwa Sasai, Masahiro Yamamoto. Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for *Toxoplasma* GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response. **MBio**. 2018; 9: e01738-18. PMID: 30301855
8. Hironori Bando, Naoya Sakaguchi, Youngae Lee, Ariel Pradipta, Ji Su Ma, Shun Tanaka, De-hua Lai, Jianfa Liu, Zhao-Rong Lun, Yoshifumi Nishikawa, Miwa Sasai and Masahiro Yamamoto. *Toxoplasma* Effector TgIST Targets Host IDO1 to Antagonize the IFN- γ -Induced Anti-Parasitic Response in Human Cells. **Frontiers in Immunology**. 2018; 9: 2073. PMID: 30283439

9. Tatsunori Masatani, Ragab M Fereig, Konosuke Otomaru, Shingo Ishikawa, Isshu Kojima, Seiji Hobo, Yoshifumi Nishikawa. Seroprevalence of *Cryptosporidium parvum* and *Neospora caninum* in cattle in the southern Kyushu region of Japan. **Parasitology International**. 2018; 67: 763-767. PMID: 30110654
10. Baldorj Pagmadulam, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Ragab M Fereig, Makoto Igarashi, Naoaki Yokoyama, Badgar Battsetseg, Yoshifumi Nishikawa*. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in cattle in Mongolia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2018; 14: 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.08.001>
11. Yoshifumi Nishikawa*, Naomi Shimoda, Ragab M Fereig, Tomoya Moritaka, Kousuke Umeda, Maki Nishimura, Fumiaki Ihara, Kaoru Kobayashi, Yuu Himori, Yutaka Suzuki and Hidefumi Furuoka. *Neospora caninum* dense granule protein 7 regulates pathogenesis of neosporosis by modulating host immune response. **Applied and Environmental Microbiology**. 2018; 84: e01350-18. PMID: 30006392
12. Hanan H Abdelbaky, Ragab M Fereig, Yoshifumi Nishikawa*. Identification of the antigenic region of *Neospora caninum* dense granule protein 7 using ELISA. **Parasitology International**. 2018; 67: 675-678. PMID: 29959092
13. Ragab M Fereig, Hanan H Abdelbaky, Fumiaki Ihara, Yoshifumi Nishikawa*. Development and evaluation of the first immunochromatographic test that can detect specific antibodies against *Cryptosporidium parvum*. **Acta Tropica**. 2018; 185: 349-356. PMID: 29932929
14. Ruenruetai Udonsom, Yaowalark Sukthana, Yoshifumi Nishikawa, Ragab M Fereig, Charoonluk Jirapattharasate. Current situation of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection among beef cattle in Kanchanaburi, Ratchaburi and Nakhon Patom provinces, Thailand. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**. 2018; 48: 403-409.
15. Hany M Ibrahim, Gamalat Y Osman, Azza H Mohamed, Abduladeem G M Al-Selwi, Yoshifumi Nishikawa, Fathy Abdel-Ghaffar. *Toxoplasma gondii*: Prevalence of natural infection in pigeons and ducks from middle and upper Egypt using serological, histopathological, and immunohistochemical diagnostic methods. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 2018; 13: 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.04.002>

総説（＊責任著者）

1. Ragab M Fereig, Hanan H Abdelbaky, Yoshifumi Nishikawa. Past achievements, current situation and future challenges for vaccine development against *Cryptosporidium parvum* and *C. hominis* infections. **The Journal of Protozoology Research**. 2018; 28: 39-52. https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/wp/wp-content/uploads/2019/02/leview-JPR-2018-4_proof-final.pdf

2. Ragab M Fereig, Hanan H Abdelbaky, Adel Elsayed Ahmed Mohamed, Yoshifumi Nishikawa. Recombinant subunit vaccines against *Toxoplasma gondii*: Successful experimental trials using recombinant DNA and proteins in mice in a period from 2006 to 2018. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences**. 2018; 1: 1005.

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 30 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、2018 年 8 月 4 日

8. 招待講演等

1. 細胞内寄生原虫トキソプラズマによるホスト・マニピュレーション、第 161 回日本獣医学会学術集会・公衆衛生分科会シンポジウム、2018 年 9 月 11 日

9. 獲得研究費

1. 平成 30 年度 基盤研究 B (一般) (文部科学省)、家畜病原性原虫ネオスポラの感染による流産発症機構の解明 (18H02335)、代表、平成 30 年度～令和 2 年度
2. 平成 29 年度・第 32 回研究助成金 (公益財団法人 寿原記念財団)、先天性トキソプラズマ症発症機序の解明と新規治療法の確立に向けた基盤研究、代表、平成 30 年度
3. 平成 30 年度 大阪大学微生物病研究所共同研究 (大阪大学微生物病研究所)、トキソプラズマ原虫の NFκB 依存的な病態発症メカニズムの解明、代表、平成 30 年度
4. 平成 30 年度 研究拠点形成費等補助金 (卓越大学院プログラム事業費) 「One Health フロンティア卓越大学院」に関するトライアル (予行演習・予備試験) 等の実施 (北海道大学)、分担、平成 30 年度
5. 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
6. 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
7. 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～令和元年度
8. 平成 28 年度 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業、日本におけるトキソプラズマの分子疫学調査と新規診断法の開発、分担、平成 28 年度～平成 30 年度

10. 特許申請・取得

1. 西川義文、ラガブ マッハルーフ マハムッド フェレイク：ネオスポラ原虫感染症に対するワ

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞者：梅田 剛佑（指導若手研究者）

受賞名：第 9 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：トキソプラズマ感染時の Toll-like receptor 2 および CC chemokine receptor 5 の機能解析—マウス初代脳細胞のトランスクリプトームから—

受賞年：平成 30 年 9 月 11 日

12. 報道等

1. 十勝毎日新聞（2018 年 7 月 26 日 1 面）牛の流産抑制に道 西川帯畜大教授 原因物質を発見 ネオスポラ感染
2. 週刊新潮（2018 年 11 月 1 日 pp36-39）トキソプラズマ症の記事に関するコメントが掲載
3. デイリー新潮（2018 年 11 月 4 日）寄生虫感染で自殺率 1・5 倍… 成人にもリスクがある「トキソプラズマ」レポート <https://www.dailyshincho.jp/article/2018/11040800/>
4. 国立大学附置研究所・センター会議の HP（2018 年 12 月 19 日）インタビュー記事が掲載（宿主を支配する微生物 ヒトに蔓延する「顧みられない感染症」の実態に迫る）http://shochou-kaigi.org/interview/interview_61/

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. 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～2020 年 3 月 31 日、共同研究契約
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. 小柴 琢己：九州大学 大学院理学研究院、哺乳動物細胞へのトキソプラズマ感染における宿主・ミトコンドリアの形態および生理機能への影響、2018 年 4 月 1 日～2019 年 3 月 31 日、平成 30 年度原虫病研究センター共同研究

7. 二瓶 浩一：（公財）微生物化学研究会・微生物化学研究所、新規抗アピコンプレクサ類原虫剤の育種による生産性向上化およびバイオコンバージョンによる誘導体の創成、2018 年 4 月 1 日～2019 年 3 月 31 日、平成 30 年度原虫病研究センター共同研究
8. 山本 雅裕：大阪大学微生物病研究所、トキソプラズマ原虫の NFκB 依存的な病態発症メカニズムの解明、2018 年 4 月 1 日～2019 年 3 月 31 日、平成 30 年度大阪大学微生物病研究所共同研究

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や非流行地居住者の流行地への旅行の際の予防的利用が期待されます。臨床応用へ向けての研究成果が期待されます(総説1)。

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、妊孕能との関係についても研究課題としています。

発生・生殖工学の技術開発研究

バイオサイエンスの解析系を充実するためには、発生工学とそれを支える体外受精、胚移植、配偶子の凍結保存、凍結乾燥保存などの生殖工学の技術開発が不可欠です。当研究分野では、マウスを対象とした発生・生殖工学技術の深耕を図るとともに、この一連の技術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。

また、マウスの初期発生における卵割時間と発生能との関係をタイムラプスシネマトグラフィーを用いて検討しています。

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 30 年度研究の総括

- ・ 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（論文 5）。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 10）。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
- ・ マラヤ大学（マレーシア） 学位論文審査外部審査委員

6. 平成 30 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. Paul Franck Adjou Moumouni, Huanping Guo, Yang Gao, Mingming Liu, Aaron Edmond Ringo, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan. Identification and genetic characterization of Piroplasmida and *Anaplasmatidae* agents in feeding *Amblyomma variegatum* ticks from Benin. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2018; 14: 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.006>
2. Aaron Edmond Ringo, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Mingming Liu, Yussuf Haji Khamis, Yang Gao, Huanping Guo, Weiqing Zheng, Artemis Efstratiou, Eloiza May Galon, Jixu Li, Saruda Tiwananthagorn, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Oriel Thekisoe, Xuenan Xuan. Molecular detection and characterization of tick-borne protozoan and rickettsial pathogens isolated from cattle on Pemba Island, Tanzania. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1437-1445. PMID: 30207275
3. Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, James Okwee-Acai, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, John Son Bbira, Kozo Fujisaki, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki*. C190A knockdown mutation in sodium channel domain II of pyrethroid-resistant *Rhipicephalus appendiculatus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1590-1593. PMID: 30115585
4. Takuya Hori, Takaki Nedachi, Hiroshi Suzuki, Shinji Harakawa. Characterization of the suppressive effects of extremely-low-frequency electric fields on a stress-induced increase in the plasma glucocorticoid level in mice. **Bioelectromagnetics**. 2018; 39: 516-528. PMID: 30091796
5. Aiko Kume, Shunji Kasai, Hana Furuya, Hiroshi Suzuki*. α-Tocopheryl succinate-suppressed development of cerebral malaria in mice. **Parasitology Research**. 2018:

- 117: 3177–3182. PMID: 30030625
6. 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: 465–471. PMID: 29678671
 7. Patrick Vudriko, James Okwee-Acai, Joseph Byaruhanga, Dickson Stuart Tayebwa, Samuel George Okech, Robert Tweyongyere, Eddie M Wampande, Anna Rose Ademun Okurut, Kenneth Mugabi, Jeanne Bukeka Muhindo, Jesca Lukanga Nakavuma, Rika Umemiya-Shirafuji, Xuenan Xuan, **Hiroshi Suzuki***. Chemical tick control practices in southwestern and northwestern Uganda. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 945-955. PMID: 29606621
 8. 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
 9. 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
 10. 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

総説

1. **Hiroshi Suzuki***, Aiko Kume and Maria Shirely Herbas. Potential of Vitamin E Deficiency, Induced by Inhibition of α -Tocopherol Efflux, in Murine Malaria Infection. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019; 20: 64. PMID: 30586912

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. 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
2. 平成 30 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。

さらに、2017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

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

3. 平成30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。我々はこれまで、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詳細に観察し、卵母細胞の発育ステージ分類基準（Ⅰ～Ⅴ）を新たに設定しました（論文リスト6）。さらに、卵母細胞の発育に必要不可欠の卵黄タンパク質前駆体（ビテロジェニン；Vg）について、その受容体（VgR）の卵母細胞におけるmRNA発現およびタンパク質の局在を解析しました。その結果、ステージⅠ～Ⅲ卵母細胞の細胞質内にVgR mRNAが検出され、また、VgRタンパク質はステージⅠ～Ⅲの細胞質内およびステージⅣ、Ⅴの細胞質辺縁に局在することが明らかになりました。次に、RNA干渉法によりVgR発現抑制雌ダニを作出し、その卵巣（飽血後4日目）を観察したところ、対照群と異なり、ステージⅣおよびⅤの卵母細胞が観察されませんでした。以上のことから、フタトゲチマダニ単為生殖系の卵母細胞におけるVgRの発現と局在は、発育ステージにより異なるパターンを示すことが判明しました。また、卵母細胞は、急速吸血期にステージⅠからⅡ、飽血後にステージⅡからⅢへと発育し、その後、

VgR による Vg の取り込みが活発化することによりステージⅢからⅣへと移行することが明らかになりました。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。

- ・ マダニコロニーの維持管理および原虫感染マダニの作出は、マダニにおける原虫媒介機構の解明やワクチン候補分子の探索等において、極めて重要です。国外では、医学・獣医学上重要なマダニ種の遺伝子情報やセルバンクが公開されており、世界中の研究者にとって必要不可欠のツールとなっていますが、国内ではそのような体制は十分ではありません。原虫病研究センターでは、国内最重要マダニ種であるフタトゲチマダニを累代飼育しており、国内外の研究機関・民間企業等に供給し、研究・試験に活用されてきました。現在、フタトゲチマダニ以外のマダニ種の実験室順化を進めており、マダニの飼育および供給体制のさらなる拡充を目指しています。また、原虫感染マダニモデルの確立（論文リスト 3）、野外採集マダニにおけるタイレリアなど病原体の検出（論文リスト 5）を、「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」の一環として実施しました。

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

- ・ 第 70 回日本衛生動物学会大会、平成 30 年 5 月 11 日～13 日、事務局

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 平成 30 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（#Equally contributed authors）

1. Seung-Hun Lee, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Mingming Liu, Byamukama Benedicto, Maria Agnes Tumwebaze, Damdinsuren Boldbaatar, Rika Umemiya-Shirafuji, Shinya Fukumoto, Xuenan Xuan. Differential diagnosis and molecular characterization of Theileria spp. in sika deer (Cervus nippon) in Hokkaido, Japan. **Parasitology International**. 2019; 70: 23-26. PMID: 30664981
2. Paul Franck Adjou Moumouni, Huanping Guo, Yang Gao, Mingming Liu, Aaron

- Edmond Ringo, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan. Identification and genetic characterization of Piroplasmida and *Anaplasmataceae* agents in feeding *Amblyomma variegatum* ticks from Benin. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2018; 14: 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.006>
3. Kyoko Hayashida, Rika Umemiya-Shirafuji, Thillaiampalam Sivakumar, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Chihiro Sugimoto, Naoaki Yokoyama. Establishment of a mouse-tick infection model for *Theileria orientalis* and analysis of its transcriptome. **International Journal for Parasitology**. 2018; 48: 915-924. PMID: 30176237
 4. Patrick Vudriko[#], Rika Umemiya-Shirafuji[#], James Okwee-Acai, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, John Son Bbira, Kozo Fujisaki, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki. C190A knockdown mutation in sodium channel domain II of pyre-throid-resistant *Rhipicephalus appendiculatus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1590-1593. PMID: 30115585
 5. Shunya Shibata, Thillaiampalam Sivakumar, Ikuo Igarashi, Rika Umemiya-Shirafuji, Hisashi Inokuma, Shinya Fukumoto, Naoaki Yokoyama. Epidemiological survey of a cervine *Theileria* in wild deer, questing ticks, and cattle in Hokkaido, Japan. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1235-1240. PMID: 29753652
 6. 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: 465–471. PMID: 29678671
 7. Patrick Vudriko, James Okwee-Acai, Joseph Byaruhanga, Dickson Stuart Tayebwa, Samuel George Okech, Robert Tweyongyere, Eddie M Wampande, Anna Rose Ademun Okurut, Kenneth Mugabi, Jeanne Bukeka Muhindo, Jesca Lukanga Nakavuma, Rika Umemiya-Shirafuji, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki. Chemical tick control practices in southwestern and northwestern Uganda. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 945-955. PMID: 29606621
 8. Kodai Kusakisako, Emmanuel Pacia Hernandez, Melbourne Rio Talactac, Kentaro Yoshii, Rika Umemiya-Shirafuji, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka. Peroxiredoxins are important for the regulation of hydrogen peroxide concentrations in ticks and tick cell line. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 872-881. PMID: 29576393
 9. Remil Linggatong Galay, Tomohide Matsuo, Emmanuel Pacia Hernandez, Melbourne Rio Talactac, Kodai Kusakisako, Rika Umemiya-Shirafuji, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka. Immunofluorescent detection in the ovary of host antibodies against a secretory ferritin injected into female *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Parasitology International**. 2018; 67: 119-122. PMID: 29056475

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. 2018 年度（第 5 期）森のガイド養成講座～マダニについて～、帯広の森・はぐくむ、2018 年 6 月 16 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 30 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、2018 年 8 月 4 日
3. 寄生虫観察の体験実習、第 8 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、2018 年 12 月 8 日

8. 招待講演等

1. 第 70 回日本衛生動物学会大会・第 26 回病害動物の生理分子生物談話会、「原虫病研究センターにおけるマダニ研究の展開」、とかちプラザ（北海道帯広市）、2018 年 5 月 11 日
2. 14th International Congress of Parasitology (ICOPA2018)、「Oogenesis in a parthenogenetic tick, *Haemaphysalis longicornis*」、EXCO Convention Center (Daegu, Korea)、2018 年 8 月 21 日
3. 14th International Congress of Parasitology (ICOPA2018)、「Autophagy-related genes in ticks」、EXCO Convention Center (Daegu, Korea)、2018 年 8 月 21 日

9. 獲得研究費

1. 平成 30 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
2. 平成 30 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～令和元年度
3. 平成 30 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発 (18H02336)、分担、平成 30 年度～令和 3 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. 北海道新聞（2018 年 8 月 10 日 17 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」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、*Spiroplasma* 属共生菌導入マダニを用いたマダニ共生細菌の維持機構の解明、平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日、平成 30 年度原虫病研究センター共同研究
2. 寺田 裕：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門、日本産マダニ種の遺伝子型別解析、平成 30 年 4 月 18 日～平成 31 年 1 月 31 日、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 30 年度研究の総括

- ・ インドネシアの西ジャワ島において馬ピロプラズマ症の疫学調査を行った。4 力所から 235 頭の馬血液サンプルを集め、*Theileria equi* EMA-2 および *Babesia caballi* Bc48 遺伝子および組換え抗原を用いた n PCR および enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を行った。その結果、*T. equi* で 5 例(2.1%)、*B. caballi* で 15 例(6.45%)が ELISA で陽性を示した。nPCR で、それぞれ *T. equi* で 1 例、*B. caballi* で 4 例が nPCR で陽性を示した。nPCR で陽性例を示した EMA-2 の塩基配列はフロリダとワシントンで得られた塩基配列に類似していたが、Bc48 遺伝子配列はインドネシアに特有であった。（論文リスト 15）
- ・ トポイソメラーゼ阻害剤の nitidine 塩化物（NC）とおよびカンプトテシン（Cpt）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、（NC）とおよびカンプトテシン（Cpt）の *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. caballi*, と *T. equi* に対する NC の IC₅₀

はそれぞれ 1.01 ± 0.2 、 5.34 ± 1.0 、 0.11 ± 0.03 、 $2.05 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 、および Cpt の IC_{50} は 11.67 ± 1.6 、 4.00 ± 1.0 、 2.07 ± 0.6 、および $0.33 \pm 0.02 \mu\text{M}$ であった。また、*B. microti* 感染マウスに NC 20mg/kg を投与すると、ジミナゼン・アセチュレートと同様の治療効果が認められ、明らかな副作用も認められなかった。今後、牛および馬のピロプラズマ病に対する新たな治療薬として期待される。（論文リスト 10）

- ・ ウガンダ中央部と東部におけるダニ媒介性の東海岸熱、バベシア病、およびアナプラズマ病に関する分子疫学調査を用いて行った。その結果、*B. bigemina*、*T. parva*、および *A. marginale* の PCR 陽性率は、中央部と東部でそれぞれ 17.2、65.1、および 22.0%、および 10.0、26.5、および 3% であったが、*B. bovis* は検出されなかった。また、調査地域で採集した 548 匹のダニのうち、*Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* が 319 匹、*Rhipicephalus appendiculatus* が 147 匹、*Amblyomma variegatum* が 76 匹、*Rhipicephalus evertsi evertsi* が 6 匹であった。中央部では *Rhipicephalus* 属のダニ、東部では *A. variegatum* が優勢であった。両地域において、ダニの適切な管理法や設備が欠けており、早急にダニ媒介感染症の制圧戦略の構築が求められている。（論文リスト 7）
- ・ フルオロキノロン抗生物質の *in vitro* の *Babesia divergens* に増殖抑制と *B. microti* 感染マウスの治療効果を検討した。その結果、Enrofloxacin、トロバフロキサシン、およびエノキサシンは、*B. divergens* に対して最も効果的な増殖抑制効果を示した。また、エノキサシンあるいはトロバフロキサシンとジミナゼン・アセチュレートとの組み合わせにより増殖抑制効果が増大した。更に、*B. microti* によって感染したマウスにおいて、エノキサシンとジミナゼン・アセチュレートの組み合わせにより、その療法効果が増強された。これらの結果は、安全で安価なフルオロキノロンが動物または人のバベシア病の治療薬として有望である事を示した。（論文リスト 5）
- ・ セイヨウクロタネソウの成分であるチモキノン (TQ) のピロプラズマ原虫に対する増殖抑制効果を検討した。その結果、牛バベシア原虫 *B. bovis*、*B. bigemina*、*B. divergens* および馬ピロプラズマ原虫 *T. equi*、*B. caballi*、に対する TQ の IC_{50} はそれぞれ 35.41 ± 3.60 、 7.35 ± 0.17 、 0.28 ± 0.016 、 74.05 ± 4.55 、 $67.33 \pm 0.94 \mu\text{M}$ であった。また、TQ とジミナゼン・アセチュレートとの組み合わせにより増殖抑制効果が増大した。更に、*B. microti* 感染マウスに、70mg/kg の経口投与および 50mg/kg の腹腔内投与により堅調な治療効果が認められ、ピロプラズマ病の治療薬の一つとして期待される。（論文リスト 4）
- ・ 牛バベシア原虫 *Babesia bovis* の治療に使用されているジミナゼン・アセチュレート (DA) とクロファジミン (CF) の薬剤抵抗性に関する検討をおこなった。12 日間の $0.04 \mu\text{M}$ の DA 薬剤プレッシャーにより、最大 8 倍の IC_{50} の増加が認められた。しかし、この抵抗性は長期間（15 日間）維持できず、DA の薬剤抵抗性は不安定である事が判明した。また、DA 抵抗性の *B. bovis* は CF に対して感受性であった。これらの結果は、*B. bovis* 感染牛に DA が効かない

場合、他の薬剤例えば CF が推奨される。（論文リスト 3）

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本熱帯医学会評議員
- ・ 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

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 30 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. Erandi Gunasekara, Thillaiampalam Sivakumar, Hemal Kothalawala, Thuduwege Sanath Abeysekera, Amitha Sampath Weerasingha, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Ratnam Kanagaratnam, Palitha Rohana Yapa, Atambekova Zhyldyz, **Ikuo Igarashi**, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Naoaki Yokoyama. Epidemiological survey of hemoprotozoan parasites in cattle from low-country wet zone in Sri Lanka. **Parasitology International**. 2019; 71: 5-10. PMID: 30858106
2. Dorj Ganchimeg, Badarch Batbold, Toshihiro Murata, Bekh-Ochir Davaapurev, Tserendorj Munkhjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Keisuke Suganuma, **Ikuo Igarashi**, Buyanmandakh Buyankhishig, Kenroh Sasaki, Dulamjav Batsuren, Javzan Batkhuu. Flavonoids isolated from the flowers of *Pulsatilla flavescens* and their anti-piroplasm activity. **Journal of Natural Medicines**. 2019; 1-8. PMID: 30847754
3. Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi**. Development of unstable resistance to diminazene aceturate in *Babesia bovis*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. 2019; 9: 87-92. PMID: 30785049
4. Shima Abd El-Salam El-Sayed, Mohamed Abdo Rizk, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi**. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effect of thymoquinone on piroplasm parasites. **Parasites & Vectors**. 2019; 12: 37. PMID: 30651142
5. Mohamed Abdo Rizk, Mahmoud AbouLaila, Shima Abd El-Salam El-Sayed, Azirwan

- Guswanto, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi**. Inhibitory effects of fluoroquinolone antibiotics on *Babesia divergens* and *Babesia microti*, blood parasites of veterinary and zoonotic importance. **Infection and Drug Resistance**. 2018; 11: 1605-1615. PMID: 30310296
6. Thillaiampalam Sivakumar, Bumduuren Tuvshintulga, Atambekova Zhyldyz, Hemal Kothalawala, Palitha Rohana Yapa, Ratnam Kanagaratnam, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Thuduwege Sanath Abeysekera, Amitha Sampath Weerasingha, Junya Yamagishi, **Ikuo Igarashi**, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Naoaki Yokoyama. Genetic analysis of *Babesia* isolates from cattle with clinical babesiosis in Sri Lanka. **Journal of Clinical Microbiology**. 2018; 56: pii: e00895-18. PMID: 30158190
 7. Dickson Stuart Tayebwa, Patrick Vudriko, Bumduuren Tuvshintulga, Azirwan Guswanto, Arifin Budiman Nugraha, Sambuu Gantuya, Gaber El-Saber Batiha, Simon Peter Musinguzi, Mariam Komugisha, Jonh Son Bbira, James Okwee-Acai, Robert Tweyongyere, Eddie M Wampande, Joseph Byaruhanga, Paul Franck Adjou Moumouni, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi**. Molecular epidemiology of *Babesia* species, *Theileria parva*, and *Anaplasma marginale* infecting cattle and the tick control malpractices in central and eastern Uganda. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1475-1483. PMID: 30017724
 8. Mahmoud Rezk Aboulaila, Mohamed A Rizk, Shimaa El-Sayed, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi**. *In vitro* antiparasitic effects of six beverages on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Annals of Complementary and Alternative Medicine**. 2018; 3: 3-8.
 9. Shunya Shibata, Thillaiampalam Sivakumar, **Ikuo Igarashi**, Rika Umemiya-Shirafuji, Hisashi Inokuma, Shinya Fukumoto, Naoaki Yokoyama. Epidemiological survey of a cervine *Theileria* in wild deer, questing ticks, and cattle in Hokkaido, Japan. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1235-1240. PMID: 29753652
 10. Dickson Stuart Tayebwa, Bumduuren Tuvshintulga, Azirwan Guswanto, Arifin Budiman Nugraha, Gaber El-Saber Batiha, Sambuu Gantuya, Mohamed Abdo Rizk, Patrick Vudriko, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, **Ikuo Igarashi**. The effects of nitidine chloride and camptothecin on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1192-1201. PMID: 29730263
 11. 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**. 2018; 63: 433-433. PMID: 29701057
 12. Adrian P Ybañez, Rochelle Haidee D Ybañez, Maxfrancis G Talle, Rinna Marie T Arreglo, Mary Janniel C Geens, Jun Gelacio I Villas III, Stephanie R Villar, Charmen L Laruga,

- Shinuo Cao, Franck Paul Adjou Moumouni, Mingming Liu, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan. Serological and molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Philippine horses. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1125-1128. PMID: 29693550
13. Arifin Budiman Nugraha, Umi Cahyaningsih, Amrozi Amrozi, Yusuf Ridwan, Srihadi Agungpriyono, Dharmawaty Muhammad Taher, Azirwan Guswanto, Sambuu Gantuya, Dickson Stuart Tayebwa, Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi. Serological and molecular prevalence of equine piroplasmiasis in Western Java, Indonesia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2018; 14: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.07.009>
 14. Badgar Battsetseg, Thillaiampalam Sivakumar, Naranbaatar Khandsuren, Sandagdorj Narantsatsral, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Batsaikhan Enkhtaivan, Batdorj Davasuren, Daiki Mizushima, Gayani Weerasooriya, Ikuo Igarashi, Banzragch Battur, Naoaki Yokoyama. Serosurvey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in Mongolia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2018; 13: 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.04.003>
 15. 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

書籍

該当なし

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. パラグアイチャコ地方ロマ・プラタ市でパラグアイ生産者組合連盟（FECOPROD）の要請による牛バベシア病に関する講演、2018年6月1日
2. 馬ピロプラズマ病の確定診断：英国（1件）、オーストラリア（1件）、ニュージーランド（40件）
3. 馬ピロプラズマ病の血清診断法に関する技術指導（原虫センターで1回、香港で1回）

8. 招待講演等

1. 第 14 回国際寄生虫学会招待講演 (Development of novel diagnostic methods and drugs for babesiosis)、韓国・大邱、2018 年 8 月 21 日
2. 第 14 回国際寄生虫学会招待講演 (An immunochromatographic test for human babesiosis caused by *Babesia microti*)、韓国・大邱、2018 年 8 月 22 日

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. 平成 30 年度 基盤研究 (B) (文部科学省)、ピロプラズマ病に対するコンビネーション治療法の家畜への実用化を目指した研究開発 (18H02337)、代表、平成 30 年度～令和 2 年度
3. 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 90 回日本農学賞 (日本農学会)
受賞テーマ：家畜の原虫病に対する診断、治療、予防法に関する研究
受賞年：平成 31 年 4 月 5 日 (2 月 15 日に決定)
2. 受賞者：五十嵐 郁男
受賞名：第 56 回読売農学賞 (読売新聞社)
受賞テーマ：家畜の原虫病に対する診断、治療、予防法に関する研究
受賞年：平成 31 年 4 月 5 日 (2 月 26 日に決定)

12. 報道等

1. 北海道新聞 (2018 年 5 月 5 日)：桂田賞受賞についての記事掲載
2. 読売新聞 (2019 年 3 月 26 日)：日本農学賞、読売農学賞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. 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
2. シンスター・ジャパン：開発中医薬品候補物質のバベシア症への薬効確認

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応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応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 30 年度研究の総括

- ・ ベトナム国固有の黄色牛（ $n=101$ ）並びにタイ国からの輸入牛（ $n=54$ ）における牛ピロプラズマ（*Babesia bovis* と *Babesia bigemina*）の感染状況を、血清診断用 ELISA と原虫検出用 PCR を用いて調査しました。その結果、ベトナム黄色牛（ELISA：73.3%と 77.2%、PCR：15.8%と 30.7%）は、タイ牛（ELISA：42.6%と 55.6%、PCR：5.6%と 7.4%）と比較して高い感染率を示しました。ベトナムに輸入される牛はさらなる原虫の導入のリスクがあり、その対策が必要となることが示されました。本論文は、フエ大学との国際共同研究の成果です（論文リスト 20）。
- ・ モンゴル国全土で放牧されている牛（ $n=1,946$ ）の牛ピロプラズマ（*Babesia bovis* と *Babesia bigemina*）の感染流行マップを作成するための、血清診断用 ELISA を用いて疫学調査を行いました。県毎にばらつきがあるものの、それぞれの平均感染率は 18.0%と 22.4%と高い値でした。モンゴル国では、マダニ対策を含めた全国規模の牛ピロプラズマ病・対応策が必要となることが示されました。本論文は、モンゴル生命科学大学・獣医学研究所との国際共同研究の

成果です（論文リスト 16）。

- ・ 北海道に生息する野生のエゾシカに感染しているシカタイレリアの MPSP 遺伝子を同定し、その塩基配列をもとに遺伝子診断用 PCR を確立した後、エゾシカ (n=91)、マダニ (n=671)、及び放牧牛 (n=767) のシカタイレリアの感染状況を調査しました。その結果、1) エゾシカに感染しているシカタイレリア種は *Theileria* sp. Sika1 で、遺伝子配列がよく保存されていること、2) シカタイレリアはエゾシカに高度に感染していること (97.8%)、3) シュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) とヤマトチマダニ (*Haemaphysalis japonica*) によって媒介されること、及び 4) 牛には感染しないことが示されました。一方で、5) 牛タイレリア (*Theileria orientalis*) はエゾシカには感染していませんでした。本論文は、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 15）。
- ・ スリランカ国でバベシア様臨床症状（血色素尿など）を呈する牛 (n=13) に感染している牛バベシアの遺伝学的解析を行いました。その結果、3 種の牛バベシア (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, 及び *Babesia* sp. Hue-1) が検出されましたが、さらにかつてバングラデシュで検出された *Babesia* sp. Mymensingh も検出されました。*Babesia* sp. Hue-1 は *Babesia bovis* と *Babesia bigemina* と共感染していましたが、*Babesia* sp. Mymensingh は単独感染でした。本研究により、牛に臨床症状を誘起する新たなバベシア (*Babesia* sp. Mymensingh) が明らかになりました。本論文は、スリランカ獣医学研究所と北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターとの国際共同研究の成果です（論文リスト 9）。
- ・ 国内で経済的被害をもたらしている牛タイレリア (*Theileria orientalis*) に人工感染した牛赤血球移入マウスを用いて、牛タイレリアに感染したフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) の作出に成功しました。さらに、マダニの唾液腺から原虫を回収し、牛タイレリアのスポロゾイト期の転写パネルも明らかにした。本基礎研究は、牛タイレリアの生物学やワクチン開発の進展に向けて重要なツールとなることが期待されます。本研究は、北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターとの共同研究の成果です（論文リスト 8）。

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 2nd SATREPS Scientific Progress Meeting in Mongolia, February 20, 2019 (IVM,

Ulaanbaatar, Mongolia)

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 国際獣医事務局 (OIE) 牛バベシア病、馬ピロプラズマ病専門家 (2019 年 3 月より)
- ・ 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
- ・ 北海道大学卓越大学院 One Health Ally Course 運営委員会 委員
- ・ モンゴル国獣医・畜産分野人材育成能力強化プロジェクト国内支援委員会 委員 (2019 年 3 月より)

6. 平成 30 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. Erandi Gunasekara, Thillaiampalam Sivakumar, Hemal Kothalawala, Thuduwege Sanath Abeysekera, Amitha Sampath Weerasingha, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Ratnam Kanagaratnam, Palitha Rohana Yapa, Atambekova Zhyldyz, Ikuo Igarashi, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Naoaki Yokoyama*. Epidemiological survey of hemoprotozoan parasites in cattle from low-country wet zone in Sri Lanka. **Parasitology International**. 2019; 71: 5-10. PMID: 30858106
2. Keigo Takeda, Hiromasa Yamada, Kenji Ishikawa, H Sakakita, Jaeho Kim, Masashi Ueda, Jun-ichiro Ikeda, Yoshihiro Akimoto, Yosky Kataoka, Naoaki Yokoyama, Yuzuru Ikehara and Masaru Hori*. Systematic diagnostics of the electrical, optical, and physicochemical characteristics of low-temperature atmospheric-pressure helium plasma sources. **Journal of Physics D: Applied Physics**. 2019; 52: 165202.
3. Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi*. Development of unstable resistance to diminazene aceturate in *Babesia bovis*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. 2019; 9: 87-92. PMID: 30785049
4. Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Mohamed Abdo Rizk, Naoaki Yokoyama and Ikuo Igarashi*. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effect of thymoquinone on piroplasm parasites. **Parasites & Vectors**. 2019; 12: 37. PMID: 30651142
5. Batsaikhan Enkhtaivan, Sandagdorj Narantsatsral, Batdorj Davaasuren, Davaajav Otgonsuren, Tovuu Amgalanbaatar, Erdenekhuu Uuganbayar, Myagmar Zoljargal, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Keisuke Suganuma, Nthatisi Innocentia Molefe, Thillaiampalam Sivakumar, Noboru Inoue, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, Naoaki Yokoyama*. Molecular detection of *Anaplasma ovis* in small ruminants and ixodid ticks from Mongolia. **Parasitology International**. 2019; 69: 47-53. PMID: 30458297
6. Gaber El-Saber Batiha, Amany Magdy Beshbishy, Dickson Stuart Tayebwa, Hazem

- Mohammed Shaheen, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Inhibitory effects of *Uncaria tomentosa* bark, *Myrtus communis* roots, *Origanum vulgare* leaves and *Cuminum cyminum* seeds extracts against the growth of *Babesia* and *Theileria* *in vitro*. **Jpn. J. Vet. Parasitol.** 2018; 17: 1-13.
7. Mohamed Abdo Rizk, Mahmoud AbouLaila, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Azirwan Guswanto, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Inhibitory effects of fluoroquinolone antibiotics on *Babesia divergens* and *Babesia microti*, blood parasites of veterinary and zoonotic importance. **Infection and Drug Resistance.** 2018; 11: 1605-1615. PMID: 30310296
 8. Kyoko Hayashida, Rika Umemiya-Shirafuji, Thillaiampalam Sivakumar, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Chihiro Sugimoto, **Naoaki Yokoyama***. Establishment of a mouse-tick infection model for *Theileria orientalis* and analysis of its transcriptome. **International Journal for Parasitology.** 2018; 48: 915-924. PMID: 30176237
 9. Thillaiampalam Sivakumar, Bumduuren Tuvshintulga, Atambekova Zhyldyz, Hemal Kothalawala, Palitha Rohana Yapa, Ratnam Kanagaratnam, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Thuduwege Sanath Abeysekera, Amitha Sampath Weerasingha, Junya Yamagishi, Ikuo Igarashi, Seekkuge Susil Priyantha Silva, **Naoaki Yokoyama***. Genetic analysis of *Babesia* isolates from cattle with clinical babesiosis in Sri Lanka. **Journal of Clinical Microbiology.** 2018; 56: e00895-18. PMID: 30158190
 10. Baldorj Pagmadulam, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Ragab M Fereig, Makoto Igarashi, **Naoaki Yokoyama**, Badgar Battsetseg, Yoshifumi Nishikawa*. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in cattle in Mongolia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.** 2018; 14: 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.08.001>
 11. Arifin Budiman Nugraha, Umi Cahyaningsih, Amrozi Amrozi, Yusuf Ridwan, Srihadi Agungpriyono, Dharmawaty Muhammad Taher, Azirwan Guswanto, Sambuu Gantuya, Dickson Stuart Tayebwa, Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Serological and molecular prevalence of equine piroplasmiasis in Western Java, Indonesia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.** 2018; 14: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.07.009>
 12. Dickson Stuart Tayebwa, Patrick Vudriko, Bumduuren Tuvshintulga, Azirwan Guswanto, Arifin Budiman Nugraha, Sambuu Gantuya, Gaber El-Saber Batiha, Simon Peter Musinguzi, Mariam Komugisha, Jonh Son Bbira, James Okwee-Acai, Robert Tweyongyere, Eddie M Wampande, Joseph Byaruhanga, Paul Franck Adjou Moumouni, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Molecular epidemiology of *Babesia* species, *Theileria parva*, and *Anaplasma marginale* infecting cattle and the tick control malpractices in central and eastern

- Uganda. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1475-1483. PMID: 30017724
13. Daiki Mizushima, Tovuu Amgalanbaatar, Batdorj Davaasuren, Nthatisi Innocentia Molefe, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, Noboru Inoue, Naoaki Yokoyama, Keisuke Suganuma*. The utility of an rTeGM6-4r-based immunochromatographic test for the serological diagnosis of non-tsetse-transmitted equine trypanosomosis in rural areas of Mongolia. **Parasitology Research**. 2018; 117: 2913–2919. PMID: 29943319
 14. Mahmoud Rezk Aboulaila, Mohamed A Rizk, Shimaa El-Sayed, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi*. *In vitro* antiparasitic effects of six beverages on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Annals of Complementary and Alternative Medicine**. 2018; 3: 3-8.
 15. Shunya Shibata, Thillaiampalam Sivakumar, Ikuo Igarashi, Rika Umemiya-Shirafuji, Hisashi Inokuma, Shinya Fukumoto, Naoaki Yokoyama*. Epidemiological survey of a cervine *Theileria* in wild deer, questing ticks, and cattle in Hokkaido, Japan. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1235-1240. PMID: 29753652
 16. Badgar Battsetseg, Thillaiampalam Sivakumar, Naranbaatar Khandsuren, Sandagdorj Narantsatsral, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Batsaikhan Enkhtaivan, Batdorj Davaasuren, Daiki Mizushima, Gayani Weerasooriya, Ikuo Igarashi, Banzragch Battur, Naoaki Yokoyama*. Serosurvey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in Mongolia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2018; 13: 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.04.003>
 17. Dickson Stuart Tayebwa, Bumduuren Tuvshintulga, Azirwan Guswanto, Arifin Budiman Nugraha, Gaber El-Saber Batiha, Sambuu Gantuya, Mohamed Abdo Rizk, Patrick Vudriko, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi*. The effects of nitidine chloride and camptothecin on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2018; 9: 1192-1201. PMID: 29730263
 18. 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**. 2018; 63: 433–433. PMID: 29701057
 19. 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
 20. 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

総説

該当なし

著書

1. **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
2. **横山直明**（分担執筆）：マラリア原虫および原虫一般、p88-89、未来を創るグライコサイエンスー我が国のロードマップー、谷口直之ら編集、日本糖鎖科学コンソーシアム、2018年
3. **Yokoyama N**, and Sivakumar T（分担執筆）（2018）：Effect of Plasma Irradiation on the In Vitro Growth of *Babesia* and *Trypanosoma* Parasites, P129-130, In Plasma Medical Science, Toyokuni S, Ikehara Y, Kikkawa F, and Hori M (eds.), Elsevier Inc., Chennai.
4. **横山直明**（分担執筆）：バベシア症、p100-103、臨床獣医師のための犬と猫の感染症診療、前田健、佐藤宏監修、緑書房、2018年
5. **横山直明**（分担執筆）：バベシア症、p48-49、動物病院スタッフのための犬と猫の感染症ガイド、小沼 守、前田 健、佐藤 宏監修、緑書房、2019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

1. Tools and strategies for the control of bovine piroplasmiasis. 70th Annual Scientific Sessions of the Sri Lanka Veterinary Association, Kandy, Sri Lanka. 2018年6月14日
2. 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、科学と開発をつなぐブリッジ・ワークショップ、東京、2018年7月30日

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 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～令和元年度

4. 平成 28 年度 基盤研究 (B) (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
5. 平成 30 年度 挑戦的研究 (萌芽) (文部科学省)、シカ小型ピロプラズマが牛小型ピロプラズマ病の発症に与える影響 (18K19257)、代表、平成 30 年度～令和元年度
6. 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～令和 3 年度
7. 平成 30 年度 特別研究員奨励費 (文部科学省)、既存薬剤が効かないヒトバベシア病にも対峙できる併用治療法の開発 (外国人特別研究員 TUVSHINTULGA BUMDUUREN)、受入研究者、平成 30 年度～令和 2 年度
8. 平成 30 年 基盤研究 (B) (文部科学省)、ピロプラズマ病に対するコンビネーション治療法の家畜への実用化を目指した研究開発 (18H02337) (代表者 五十嵐郁男)、分担、平成 30 年度～令和 2 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

1. モンゴル国立生命科学大学 名誉教授称号授与 (2019 年 2 月)

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. 加藤 大智: 自治医科大学, 新興リーシュマニア症のリザーバー調査法の確立、平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日、平成 30 年度原虫病研究センター共同研究
3. 高島 康弘: 岐阜大学、バングラデシュにおけるタイレリア感染牛摘発技術の開発、平成 30 年 4 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日、平成 30 年度原虫病研究センター共同研究
4. 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。バベシアおよびマラリア原虫で、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 30 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、外国産のバベシア原虫（バベシア・ボービス *Babesia bovis*）で過酸化水素（ H_2O_2 ）センサープローブ（Hyper）を発現する原虫株を作製して、専門誌に公表いたしました。Hyper 発現原虫株では、細胞質の H_2O_2 を大腸菌由来のセンサー分子で検知して蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の原理を応用して検出することで、細胞内で派生する活性酸素種（ROS）の挙動をリアルタイムかつ定量的に観察することが出来ます。*B. bovis* では、抗酸化タンパク質（チオレドキシンペルオキシダーゼ）を欠損した原虫株で、活性窒素種（RNS）に対する感受性が亢進することが報告されておりますが、この RNS の生成にも H_2O_2 が関与しております。また、*B. bovis* が赤血球に侵入する際に観察される滑走運動においても、 H_2O_2 などの ROS や RNS が多量に派生していることが想定されます。Hyper 発現原虫株を利用することで、バベ

シア原虫の酸化ストレス応答や滑走運動に関連して派生する ROS や R N S の原虫細胞内での挙動について、バイオイメーキングの手法を用いて、詳しく観察し解析を加えることが出来るようになります（論文リスト1）。

- ・ 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。一方、日本住血吸虫症の診断法を開発する研究では、POCT をはじめとする、この寄生虫病の排除・撲滅に向けて社会実装に適した手法の開発を目指しております。今年度は、リアルタイム qPCR 法を応用して日本住血吸虫症の重症度、即ち感染動物の各種臓器に塞栓する虫卵数を定量的に評価する手法を開発して専門誌に公表しました（論文リスト3）。この手法を従前の病理組織学的な観察手法と併用することで、新規の創薬開発で必須となるマウスでの感染実験における病態の評価を、より簡便かつ客観的にこなうことが出来るようになりました。

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（倫理委員会・利益相反委員会担当）
- ・ 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 26 回分子寄生虫学ワークショップ・第 16 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会（平成 30 年 9 月 19 日～9 月 22 日、道後温泉 花ゆづき 会議室）

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム世話人代表
- ・ 長崎大学熱帯医学研究所・熱帯医学研究拠点運営協議会委員
- ・ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程教育リーディングプログラム学術委員会委員

6. 平成 30 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. Masahito Asada, Hassan Hakimi and Shin-ichiro Kawazu*. The application of the HyPer fluorescent sensor in the real-time detection of H₂O₂ in *Babesia bovis* merozoites *in vitro*. **Veterinary Parasitology**. 2018; 255: 78-82. PMID: 29773141
2. Mingming Liu, Paul Franck Adjou Moumouni, Masahito Asada, Hassan Hakimi, Tatsunori Masatani, Patrick Vudriko, Seung-Hun Lee, Shin-ichiro Kawazu, Junya

- Yamagishi and Xuenan Xuan*. Establishment of a stable transfection system for genetic manipulation of *Babesia gibsoni*. **Parasites & Vectors**. 2018; 11: 260. PMID: 29685172
3. Anh Tm Dang, Jose Ma M Angeles, Kharleezelle J Moendeg, Adrian Miki C Macalanda, Luna Higuchi, Chiho Oto, Masashi Kirinoki, Yuichi Chigusa, Lydia R Leonardo, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, Yasuyuki Goto, **Shin-Ichiro Kawazu***. Utilization of real time PCR for the assessment of egg burden in the organs of *Schistosoma japonicum* experimentally infected mice. **Experimental Parasitology**. 2018; 189: 61-65. PMID: 29679595

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 and application of gene manipulation methodologies for investigation of gene function and lifecycle of *Babesia* parasites, The 14th International Congress of Parasitology (ICOPA XIV) (第 14 回国際寄生虫会議 (ICOPA XIV)) : シンポジウム、Daegu, Korea、2018 年 8 月 23 日
2. Development of a sensitive and specific Point-of-Care Diagnostics (POCT) for *Schistosoma japonicum* infection in humans,第 59 回日本熱帯医学会大会: シンポジウム、長崎市、2018 年 11 月 11 日
3. Asian Zoonotic Schistosomiasis in the Philippines, The 4th International Conference on One Medicine One Science (iCOMOS 2019) (第 4 回国際 One Health 会議 (iCOMOS 2019)) : シンポジウム、Chiang Mai, Thailand、2019 年 2 月 11 日
4. *Schistosoma japonicum* TPx-1 as SE antigen target for diagnosis of Asian schistosomiasis, The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 21st International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. Parasitic Diseases Panel Meeting (第 21 回日米医学合同 EID 会議寄生虫疾患部会パネル会議) : シンポジウム、Hanoi, Vietnam、2019 年 3 月 1 日
5. Asian Zoonotic Schistosomiasis in the Philippines: Medical and Veterinary integrated approaches in the disease control, 第 88 回日本寄生虫学会大会 : シンポジウム、長崎市、2019 年 3 月 16 日

9. 獲得研究費

1. 平成 30 年度 挑戦的研究（萌芽）（文部科学省）、サイトカイン発現住血原虫の開発研究（18K19258）、代表、平成 30 年度～令和元年度
2. 共同研究 ネオファーマジャパン株式会社、5-ALA（5-アミノレブリン酸）の日本住血吸虫症治療効果の検証（K18051）、代表、平成 30 年度～令和元年度
3. 共同研究 ネオファーマジャパン株式会社、5-ALA（5-アミノレブリン酸）のピロプラズマ病治療効果の検証（K18087）、代表、平成 30 年度～令和 2 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. 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、2008 年 1 月～2023 年 11 月（2018 年 11 月に延長）、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 2、2018 年 4 月 1 日～2019 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

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 30 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、近年媾疫と確定診断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、複数の培養馴化野外流行株を樹立しました（Suganuma et al., 2016）。さらに地方獣医師が臨床現場で簡便にウマトリパノソーマ症（媾疫及びスーラ病）感染の有無を判別できるイムノクロマトグラフィー（GM6-ICT）キットの開発と社会実装を進めています。本年度は、モンゴル国で樹立した *T. equiperdum* 野外流行株（IVM-t1 株）の全ゲノム配列の解読とドラフトゲノムの構築を行いました。構築された *T. equiperdum* IVM-t1 株ドラフトゲノムは、既報である *T. equiperdum* OVI 株ゲノムに比べ精度が大幅に向上しました。さらに近縁種である *T. brucei* との比較ゲノム解析した結果、*T. equiperdum* 特異的な複数の遺伝子群を見出しました。本研究で得られたゲノム情報は、媾疫特異的診断法開発や *T. equiperdum* 特異的な寄生

戦略を明らかにするための基礎的情報基盤となります（論文リスト4）。また、これまでにウマトリパノソーマ症迅速診断キットとして我々が開発を進めている GM6-ICT キットの製造及び性能評価技術のモンゴル国立生命科学大学 獣医学研究所への移転を進めるとともに、GM6-ICT の保存条件の検討を行いました。その結果、乾燥条件では検出感度が大幅に低下することなく、長期間の保存が可能であることがわかり、インフラが未整備な地方部でも長期間の保存・使用に適することがわかりました（論文リスト9）。現在同診断キットはモンゴル国での製造・販売が認可され、今後地方獣医師への普及と同キットを活用したウマトリパノソーマ症防疫対策の実施が期待されます（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りうる化合物を探索するために、既存薬としてすでに活用されている化合物の抗トリパノソーマ活性評価（ドラックリポジショニング）を行いました。その結果、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 *T. congolense* 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（Molefe et al., 2017）。今年度はアジスロマイシンの *T. brucei* に対する治療効果を検証した結果、部分的な感染制御効果があることを明らかにしました（論文リスト3）。
- ・ 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3地点からサンプリングされたラクダ血清サンプルを用いてトリパノソーマ病に対する血清学的検査法の比較を行いました。我々が開発した遺伝子組換え TeGM6 抗原を用いた ELISA 法（rTeGM6-ELISA）は、OIE 推奨法のトリパノソーマ粗抗原を用いた ELISA 法と比較して $\kappa=0.55$ と中程度の一致が得られました。この結果から、rTeGM6-ELISA のラクダのトリパノソーマ症の血清学的調査法としての有用性が示されました（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 30 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. Ehab Mossaad, Bashir Salim, Keisuke Suganuma*, Mohammed A Hassan, batdorj Davaasuren, Elgailani A Elamin, Amel O Bakhiet, Rawaan A Satti, Xuenan Xuan, Peter S Musinguzi, Noboru Inoue. Utilization of crude and recombinant ELISAs for serodiagnosis of camel trypanosomosis in Sudan. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2019; 16:100278. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100278>
2. Dorj Ganchimeg, Badarch Batbold, Toshihiro Murata, Bekh-Ochir Davaapurev, Tserendorj Munkhjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Buyanmandakh Buyankhishig, Kenroh Sasaki, Dulamjav Batsuren, Javzan Batkhuu. Flavonoids isolated from the flowers of *Pulsatilla flavescens* and their anti-piroplasm activity. **Journal of Natural Medicines**. 2019; in press. PMID: 30847754
3. Nthatisi Innocentia Molefe, Peter S Musinguzi, Daisuke Kondho, Kenichi Watanabe, Oriel M M Thekiso, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma*. Short- and long-term effects of orally administered azithromycin on *Trypanosoma brucei brucei*-infected mice. **Experimental Parasitology**. 2019; 199:40-46. PMID: 30840850
4. Batdorji Davaasuren, Junya Yamagishi, Daiki Mizushima, Sandagdorj Narantsatsral, Davaajav Otgonsuren, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Badgar Battsetseg, Banzragch Battur, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma*. Draft genome sequence of *Trypanosoma equiperdum* strain IVM-t1. **Microbiology Recourse Announcements**. 2019; 8: e001119-18. PMID: 30834384
5. Orkhon Banzragchgarav, Toshihiro Murata, Bumduuren Tuvshintulga, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Noboru Inoue, Javzan Batkhuue, Kenroh Sasaki. Chemical constituents of *Bergenia crassifolia* roots and their growth inhibitory activity against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Phytochemistry Letters**. 2019; 29: 79-83. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.11.009>
6. Batsaikhan Enkhtaivan, Sandagdorj Narantsatsral, Batdorji Davaasuren, Davaajav Otgonsuren, Tovuu Amgalanbaatar, Erdenekhuu Uuganbayar, Myagmar Zoljargal, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Keisuke Suganuma, Nthatisi Innocentia Molefe, Thilaiampalam Sivakumar, Noboru Inoue, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, Naoaki Yokoyama. Molecular detection of *Anaplasma ovis* in small ruminants and

- ixodid ticks from Mongolia. **Parasitology International**. 2018; 69:47-53. PMID: 30458297
7. Kin Israel Notarte, Takashi Yaguchi, Keisuke Suganuma, Thomas Edison dela Cruz. Antibacterial, cytotoxic and trypanocidal activities of marine-derived fungi isolated from Philippine macroalgae and seagrasses. **Acta Botanica Croatica**. 2018; 77: 141-151. <https://doi.org/10.2478/botcro-2018-0016>
 8. Oluyomi Stephen Adeyemi, Nthatisi Innocentia Molefe, Oluwakemi Josephine Awakan, Charles Obiora Nwonuma, Omokolade Oluwaseyi Alejlowo, Tomilola Olaolu, Rotdelmwa Filibus Maimako, Keisuke Suganuma, Yongmei Han, Kentaro Kato. Metal nanoparticles restrict the growth of protozoan parasites. **Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology**. 2018; 22:1-9, PMID: 30033773
 9. Daiki Mizushima, Tovuu Amgalanbaatar, Batdorji Davaasuren, Nthatisi I Molefe, Banzuragch Battur, Badgar Batsetseg, Noboru Inoue, Naoaki Yokoyama, Keisuke Suganuma*. The utility of an rTeGM6-4r-based immunochromatographic test for the serological diagnosis of non-tsetse-transmitted equine trypanosomosis in rural areas of Mongolia. **Parasitology Research**. 2018; 117: 2913-2919. PMID: 29943319
 10. Morakot Kaewthamasorn, Mika Takeda, Tawee Saiwichai, Jesse N Gitaka, Sonthaya Tiawsirisup, Yuhei Imasato, Ehab Mossaad, Ali Sarani, Winai Kaewlamun, Manun Channumsin, Suchart Chaiworakul, Wichit Katepongpon, Surapong Teeveerapunya, Jarus Panthong, Dominic K Mureithi, Saw Bawm, Lat Lat Htun, Mar Mar Win, Ahmed Ali Ismail, Abdala Mohamed Ibrahim, Keisuke Suganuma, Hassan Hakimi, Ryo Nakao, Ken Katakura, Masahito Asada, Osamu Kaneko. Genetic homogeneity of goat malaria parasites in Asia and Africa suggests their expansion with domestic goat host. **Scientific Reports**. 2018; 8: 5827. PMID: 29643434

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 30 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、2018 年 8 月 4 日
2. 寄生虫観察の体験実習、第 8 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、2018 年 12 月 8 日

8. 招待講演等

1. Suganuma K, Narantsatsral S, Batsetseg B, Battur B, Watanabe K, Kobayashi Y, Yokoyama N, Inoue N. Trypanosome and trypanosomosis researches in Mongolia. The 161st meeting of the Japanese Society of Veterinary Science, 2018, Sept., Tukuba, Ibaraki

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 30 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～令和元年度
4. 共同研究 ネオファーマジャパン株式会社、5-ALA (5-アミノレブリン酸) のトリパノソーマ症治療効果の検証、代表、平成 30 年度～令和元年度

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、モンゴル国薬用植物による現地家畜トリパノソーマ症・ピロプラズマ症対策、2018 年 4 月 1 日～2019 年 3 月 31 日、平成 30 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研究室、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と作用メカニズム解析、2018 年 4 月 1 日～2019 年 3 月 31 日、平成 30 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30年度研究の総括

- ・ 樹木からの抽出物にはある種の病原体に対する抑制効果を示すことはよく知られています。我々はミズナラの外樹皮にトキソプラズマ原虫の増殖抑制効果があることを見出し、抑制物質の本体の同定に成功しました（論文リスト1）。
- ・ 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。また、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人を含む哺乳類の感染源として問題となっています。十勝地方の飼い猫における腸管内寄生虫およびトキソプラズマの調査を行ない、約12.5%の猫において何らかの寄生虫に感染し、約16%でトキソプラズマに陽性を示すことを明らかにしました（論文リスト4）。
- ・ 肝吸虫（*Opisthorchis viverrini*）は東南アジアのメコン盆地における主要な公衆衛生問題であり、タイでは総人口の約9.6%が感染していると推定されています。感染は通常臨床症状を示しませんが、消化不良、腹痛、便秘、または下痢などの軽度の症状が現れることがあります。しかし、重度の感染下では、肝臓の肥大（肝肥大）および栄養失調が観察されます。まれに、胆管炎、胆嚢炎、および胆管癌も発症する可能性があります。感染はすぐには命にかかわるものではありませんが、癌は30～40年後に発症し、診断から3～6か月以内に非常に早く死亡します。我々はタイ住民の移住と感染率の関係を調査しました（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 30 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. Marina Endo, Kengo Shigetomi, Shinya Mitsuhashi, **Makoto Igarashi** and Makoto Ubukata. Isolation, structure determination and structure-activity relationship of anti-toxoplasma triterpenoids from *Quercus crispula* Blume outer bark. **Journal of Wood Science**. 2019; 65:3. <https://doi.org/10.1186/s10086-019-1782-8>
2. Albertus Eka Yudistira Sarwono, Shinya Mitsuhashi, Mohammad Hazzaz Bin Kabir, Kengo Shigetomi, Tadashi Okada, Fumina Ohsaka, Satoko Otsuguro, Katsumi Maenaka, **Makoto Igarashi**, Kentaro Kato & Makoto Ubukata. Repurposing existing drugs: identification of irreversible IMPDH inhibitors by high-throughput screening. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. 2019; 34: 171-178. PMID: 30451014
3. Baldorj Pagmadulam, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Ragab M Fereig, **Makoto Igarashi**, Naoaki Yokoyama, Badgar Battsetseg, Yoshifumi Nishikawa. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in cattle in Mongolia. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2018; 14: 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.08.001>
4. Doaa Salman, Wilawan Pumidonming, Eiji Oohashi, **Makoto Igarashi***. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and other intestinal parasites in cats in Tokachi sub-prefecture, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2018; 80: 960-967. PMID: 29731476
5. 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

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 30 年度研究の総括

- ・ コウモリは人獣共通感染症の原因となる病原体に感染し、寄生虫感染症においても潜在的な媒介動物となっています。本研究では、北海道のコウモリについて、クリプトスポリジウムとアイメリアについて種と遺伝子型の分布の解析及び病理学解析を行いました。その結果、2 匹のクリプトスポリジウム陽性個体と 1 匹のアイメリア陽性個体を得ました。クリプトスポリジウムとアイメリアの各々について病理学解析を行った結果、各々の虫体を確認しました。また、新しいクリプトスポリジウムの遺伝子型を得ました。本研究の結果から、北海道のコウモリにおけるクリプトスポリジウムとアイメリアの寄生状態の一端が明らかとなりました。（論文リスト 5）
- ・ 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。本研究では、生薬ライブラリー（生薬由来化合物、生薬抽出物）を用いて、熱帯熱マラリア原虫の増殖阻止効果を赤内型のステージにおいて解析しました。その結果、4種の化合物 (berberine chloride、coptisine chloride、palmatine chloride、dehydrocorydaline nitrate) と2種の抽出物 (Phellodendri cortex、Coptidis rhizoma) で高い抗マラリア作用と低い細胞毒性を確認しました。また、これら6種の化合物と抽出物はトロホゾイト期およびシゾン期の原虫に作用しました。本研究で同定した化合物と抽出物は既存薬と同等程度の濃度で効果を示し、また原虫選択性も高いことから、将来的に利用できる可能性があります。また、トロホゾイト期およびシゾン期に作用することから、遺伝子複製等に作用している可能性があり、機序の解明は臨床応用を目指す上で重要と考えられます。（論文リスト6）

- ・ アフリカトリパノソーマ症はアフリカ睡眠病とも呼ばれ、ツェツェバエが媒介し、トリパノソーマ属の原虫によって引き起こされる人獣共通感染症です。感染初期は発熱、頭痛、筋肉痛や関節痛などの比較的軽い症状ですが、感染が中枢神経に達すると、錯乱やけいれん発作、歩行困難などの症状が現れます。治療せず放置すると昏睡に陥り、数ヶ月から数年で死に至ります。現在の薬剤治療では薬剤選択肢が限られており、副作用や耐性株の出現の問題があります。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。本研究では金属ナノ粒子（金、銀、白金）とそれらの合金について、抗トリパノソーマ作用について解析を行いました。その結果、金ナノ粒子、銀ナノ粒子は *T. b. brucei* に増殖阻害効果があるが、*T. congolense*, *T. evansi* については低濃度では増殖阻害効果が低いことがわかりました。合金については、Ag-Au-NP については比較的效果があるものの、他の合金はトリパノソーマへの増殖阻害効果が低いことがわかりました。本研究成果は、金属ナノ粒子を基にした新規の抗トリパノソーマ薬としての可能性を示すものです。（論文リスト4）
- ・ 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。現状のトキソプラズマ治療のための薬剤は限られており、薬価の高騰もあり、代替薬が求められています。これまでに我々は、金属ナノ粒子が特異的にトキソプラズマの増殖阻止に働くことを明らかとしました。今回、金属ナノ粒子の表面にアミノ酸を被膜することで、トキソプラズマへの増殖阻止作用が増大することを明らかとしました。アミノ酸被膜金属ナノ粒子の抗原虫作用には、酸化ストレスや低酸素誘導因子の調節によるキヌレニン経路の活性化等の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、金属ナノ粒子を基にした新規の抗トキソプラズマ薬としての可能性だけでなく、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
- ・ 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 30 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, Yuho Murata, Tatsuki Sugi, Yongmei Han, **Kentaro Kato***. Nanoparticles show potential to retard bradyzoites *in vitro* formation of *Toxoplasma gondii*. **Folia Parasitologica**. 2019; 21: 66. PMID: 30799835
2. Albertus Eka Yudistira Sarwono, Shinya Mitsunashi, Mohammad Hazzaz Bin Kabir, Kengo Shigetomi, Tadashi Okada, Fumina Ohsaka, Satoko Otsuguro, Katsumi Maenaka, Makoto Igarashi, **Kentaro Kato**, Makoto Ubukata. Repurposing Existing Drugs: Identification of Irreversible IMPDH Inhibitors by High-Throughput Screening. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. 2019; 34: 171-178. PMID: 30451014
3. Alaa M Terkawi, Ryo Takano, **Kentaro Kato***. Differential gene expression profile of human neutrophils cultured with *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes. **Journal of Immunology Research**. 2018; 2018: 6709424. PMID: 30069491
4. Oluyomi Stephen Adeyemi, Nthatisi Innocentia Molefe, Oluwakemi Josephine Awakan, Charles Obiora Nwonuma, Omokolade Oluwaseyi Alejlowo, Tomilola Olaolu, Rotdelmwa Filibus Maimako, Keisuke Suganuma, Yongmei Han, **Kentaro Kato***. Metal nanoparticles restrict the growth of protozoan parasites. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**. 2018; 46: S86-S94. PMID: 30033773
5. Fumi Murakoshi, Kenji Koyama, Takumi Akasaka, Noriyuki Horiuchi, **Kentaro Kato***. Molecular and histopathological characterization of *Cryptosporidium* and *Eimeria* species in bats in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 2018; 80: 1395-1399. PMID: 30012934
6. Motohiro Nonaka, Yuho Murata, Ryo Takano, Yongmei Han, Mohammad Hazzaz Bin

- Kabir, **Kentaro Kato***. Screening of a library of traditional Chinese medicines to identify anti-malarial compounds and extracts. **Malaria Journal**. 2018; 17: 244. PMID: 29941026
7. Oluyomi Stephen Adeyemi, Yuho Murata, Tatsuki Sugi, Yongmei Han, **Kentaro Kato***. Exploring amino acid-capped nanoparticles for selective anti-parasitic action and improved host biocompatibility. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. 2018; 14: 847-867. PMID: 29883557
 8. Hitoshi Takemae, Kyousuke Kobayashi, Tatsuki Sugi, Yongmei Han, Haiyan Gong, Akiko Ishiwa, Frances C Recuenco, Fumi Murakoshi, Ryo Takano, Yuho Murata, Kisaburo Nagamune, Taisuke Horimoto, Hiroomi Akashi, **Kentaro Kato***. *Toxoplasma gondii* RON4 binds to heparan sulfate on the host cell surface. **Parasitology International**. 2018; 67: 123-130. PMID: 29081389

総説（*責任著者）

1. **Kentaro Kato***. How does *Toxoplasma gondii* invade host cells? **The Journal of Veterinary Medical Science**. 2018; 80: 1702-1706. PMID: 30282883

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. 加藤健太郎「北海道におけるクリプトスポリジウムの現状」、平成 30 年度十勝子牛研究会、2018 年 12 月 10 日

9. 獲得研究費

1. 平成 30 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 30 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～令和元年度
3. 平成 30 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～令和元年度
4. 平成 30 年度 日本中央競馬会畜産振興事業（日本中央競馬会）、家畜下痢症の感染制御のための事業、代表、平成 30 年度～令和 2 年度
5. 共同研究費（田村製薬・三菱ケミカルフーズ）、イソチオシアン酸アリルのクリプトスポリジ

ウムへの効果検証、代表、平成 30 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞者：加藤健太郎

受賞名：平成 29 年度 森永賞（森永奉仕会）

受賞テーマ：公衆衛生上重要な人獣共通感染症であるクリプトスポリジウム症の下痢発症メカニズムの超微細構造解析

受賞年：平成 30 年 6 月 2 日

2. 受賞者：加藤健太郎

受賞名：平成 30 年度 北海道科学技術奨励賞（北海道）

受賞テーマ：原虫病の感染メカニズムの解明と対策技術の開発

受賞年：平成 31 年 2 月 14 日

12. 報道等

1. 十勝毎日新聞（2018 年 5 月 20 日 18 面）「トキソプラズマ 感染症抑制増大の新技术法」についての記事掲載
2. 北海道新聞（2018 年 7 月 28 日 22 面）「金属ナノ粒子 アミノ酸で加工 トキソプラズマ症 原虫の増殖を抑制」についての記事掲載
3. 十勝毎日新聞（2019 年 2 月 19 日 2 面）「道科学技術賞 原虫病対策を発見」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）

田村製薬(株)・三菱ケミカルフーズ(株)、イソチオシアン酸アリルのクリプトスポリジウムへの効果検証、2018 年 6 月 4 日～2019 年 3 月 31 日

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

令和元年 5 月 28 日

採択番号	30-共同-1		
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	<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		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	あさだ まさひと 麻田 正仁	長崎大学熱帯医学研究所・助教 研究の総括、遺伝子組換え原虫作製	
研究分担者	かねこ おさむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・教授 脳性マラリアとの比較考察	
	やはた かずひで 矢幡 一英	長崎大学熱帯医学研究所・助教 細胞接着実験支援	
	はきみ はっさん ハキミ ハッサン	長崎大学熱帯医学研究所・JSPS 外国人特別研究員 遺伝子組換え原虫作製	
	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 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<i>Babesia bovis</i> 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、そのメカニズムについては殆ど解明されていない。この病態の分子機構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、非接着株間でのトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行い、これら株間で発現する <i>ves-1a</i> 配列に違いがあることを明らかにした。H30 年度の研究では、遺伝子改変技術を用いて、当該遺伝子を過剰発現した際に観察される細胞接着に関わる表現型の変化を解析し、原虫側のリガンドを同定することを目的としている。		
研究経過の概要	H29 年度共同研究: H29 年度は <i>ves</i> 遺伝子の発現について精査を行ったところ、各クローン間で発現する <i>ves-1a</i> の配列に違いが見られることが明らかとなった。<i>ves-1a</i> 配列についてプライマーウォーキング法にて配列を確認すると共に、各クローン毎で予想された <i>ves-1a</i> 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 <i>ves-1a</i> 配列を過剰発現する原虫株を作製し、間接蛍光抗体法にて過剰発現を確認した。 H30 年度共同研究: H29 年度に作製した <i>ves-1a</i> 過剰発現原虫の他 <i>ves-1a</i>, <i>ves-1β</i> を過剰発現する原虫株を複数作製し、ウシ血管内皮細胞を使った接着試験を行った。ところが、高接着性クローンで発現している <i>ves-1a</i> を過剰発現原虫させた株において血管内皮細胞に接着性の上昇は見られなかった。そこで、<i>ves-1</i> 遺伝子座のノックアウトを行うため、発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の同定を試みた。その結果、<i>B. bovis</i> 第 2 染色体上の特定の遺伝子が <i>ves-1a</i>, <i>ves-1b</i> として発現していることが示唆される結果を得た。		

研究成果の 概 要	・ <i>ves-1</i> 過剰発現株の作製と細胞接着試験 血管内皮細胞高接着株(C1, C3)及び低接着株(C5)で発現している <i>ves-1a</i>, <i>ves-1b</i> 配列を <i>ves-1a</i> ないし <i>ves-1b</i> 単独、あるいは <i>ves1a</i>, <i>ves1b</i> 双方とも過剰発現する原虫を作出した。GFP タグを付加した <i>ves-1a</i>、mCherry タグを付加した <i>ves-1b</i> をエピソードにて過剰発現するプラスミド計 8 種類を作製し、エレクトロポレーション法にて低接着株である C2 株に遺伝子導入を行い、WR99210 にて組換え原虫の選択を行った。その結果、原虫が得られ、過剰発現した <i>ves1a</i>, <i>ves1b</i> の原虫感染赤血球表面での発現は抗 GFP 抗体、抗 mCherry 抗体を使用した間接蛍光抗体法にて確認した。 得られた原虫を用い、ウシ脳毛細血管内皮細胞を使用した細胞接着試験を行ったところ、予想に反し、低接着株(C5)の <i>ves1a</i> を過剰発現する原虫株 1 株において細胞接着性の上昇がみられた。その一方で、高接着株(C1)の <i>ves-1a</i> を過剰発現する原虫株を含め、他の株では細胞接着性の上昇は見られなかった。また、<i>ves-1a</i> の発現量を増加させるため、培地中の WR99210 添加量を増やしたが、細胞接着性の向上は見られず、一方で培養を継続するにつれ、GFP ないし mCherry の発現が検出できない原虫の割合が増加した。 ・ 発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の同定 <i>ves1</i> 過剰発現による表現型解析により予想通りの結果が得られなかったため、<i>ves-1</i> 遺伝子座のノックアウトを行うため、発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の同定を試みた。<i>ves-1</i> 遺伝子は多重遺伝子だが、Allred et al., 2012 によれば、発現している <i>ves-1</i> は LAT と呼ばれる特定の遺伝子座であることが推測されている。そこで、北海道大学の山岸博士の協力を得て C3 株の MinION による全ゲノムシーケンスを行った。その結果、C3 株第 2 染色体上の特定の遺伝子が <i>ves-1a</i>, <i>ves-1b</i> として発現していることが示唆され、本解析により、血管内皮細胞に接着性の原虫株で発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座が初めて特定された。現在 PCR による確認とノックアウト用プラスミドの設計を行っている。
研究成果の 発 表	国際学会発表 [1] Asada M, Hakimi H, Yamagishi J, Sakaguchi M, Yahata K, Kawazu SI, Kaneko O. <i>Babesia bovis ves1a</i> expression is correlated with cytoadhesion of parasite-infected erythrocyte to the endothelial cells. ICOPA2018, Daegu, Korea. Aug 19-24. 2018 [2] Asada M, Hakimi H, Yamagishi J, Sakaguchi M, Yahata K, Kawazu SI, Kaneko O. <i>Babesia bovis ves1a</i> expression is correlated with cytoadhesion of parasite-infected erythrocyte to the endothelial cells. The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. Sep 10-13. 2018

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 31 年 4 月 15 日

採択番号	30 共同-2		
研究部門	感染免疫研究部門 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	哺乳動物細胞へのトキソプラズマ感染における宿主・ミトコンドリアの形態 および生理機能への影響		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	こしば たくみ 小柴 琢己	九州大学 大学院理学研究院・准教授	
研究分担者	まつお なおてる 松尾 尚輝	九州大学 大学院システム生命学府・大学院生	
	やすかわ かい 安川 開	九州大学 大学院システム生命学府・大学院生	
	西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	細胞内におけるエネルギー産生工場であるミトコンドリアは、真核生物の代謝系を中心に生命機能の維持には不可欠なオルガネラである。近年、ミトコンドリアの新たな役割として抗ウイルス自然免疫におけるプラットフォームとして機能していることが明らかになってきた。私たちの研究グループでは、これまでにミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫についての一貫した研究を進めおり、その生理的な重要性を世界に先駆けて明らかにしてきた (Sci. Signal 2009, 2011; PNAS 2013; Nat. Commun. 2014; Sci. Rep. 2017)。本研究の目的は、トキソプラズマを始めとした原虫に感染した宿主細胞内でミトコンドリアがどのような振る舞いをするのか、これまでに行ってきたウイルスでの知見とは異なる新たな相互作用に情報を得ることにある。一方で、原虫(感染者)側のミトコンドリアの役割にも着目し、感染前後における原虫側のミトコンドリア機能変化が宿主への病原性に及ぼす影響も理解したいと考えた。そこで、本研究では宿主および感染微生物の両者のミトコンドリアの働きに注目した、それぞれの相関解析を行った。		

研究経過の概要	これまでの先行研究(PLoS Biol. 2014)や、我々の予備知見において、トキソプラズマ感染細胞内において一部のミトコンドリアがタキゾイド周辺に集まり、あたかも特異的な相互作用が行われている様子が顕微鏡像により確認された(未発表データ)。このようなミトコンドリアの観察像がどのような生理的な意義を持つのかを生化学的、及び細胞生物学的な実験を駆使して明らかにすることを研究目的として、具体的に以下のような実験計画を行った。 1) 宿主ミトコンドリア□原虫間における物質輸送の解析;宿主ミトコンドリアから原虫側へATP やタンパク質を始めとした物量の輸送や、その逆行輸送が行われているかを細胞分画によりそれぞれを単離調製し、質量分析などから物質の特定を試みた。 2) 宿主ミトコンドリア□原虫間の隣接の作用機序解析;宿主ミトコンドリアと原虫の隣接に関わる両者の責任タンパク質群を同定する。トキソプラズマゲノムの相補遺伝子をクローニングした発現ライブラリー(西川研究室)を哺乳動物細胞にトランスフェクションし、発現細胞内のミトコンドリア形態を免疫染色法にて観察する。また、遺伝子改変トキソプラズマを作製し、両者隣接の作用機序を明らかにすることを試みた。
研究成果の概要	トキソプラズマが感染細胞内で分泌する GRA ファミリータンパク質群に注目した。計 17 種類の GRA 遺伝子(FLAG タグ付加)を培養細胞に導入し、細胞分画と免疫染色法により、発現したそれぞれの GRA タンパク質の細胞内における局在解析を行った。初めに、HEK293 を用いた細胞分画法による実験では、多くの GRA タンパク質がミトコンドリアを含んだ画分に含まれていることが確認できた。そこで、三種類の培養細胞(Hela、MEF、及び A549 細胞)にこれら GRA 遺伝子を導入し、その細胞内局在を免疫染色法により詳細に調べた。その結果、GRA8、9、16、及び 25 発現細胞においてそれらの局在がミトコンドリアのマーカータンパク質と非常によく一致している像が得られた。特筆すべきは、GRA8 に関して、その発現細胞内における局在箇所の約 7 割以上がミトコンドリアと一致していた。一方、GRA9 及び 25 に関しては、一部の発現タンパク質においてミトコンドリアとの局在が観察されたが、それ以外のタンパク質においてはほぼ細胞質中に存在していた。また、GRA16 においても高い割合でミトコンドリア局在が観察されたが、大部分は核に局在していることが明らかになった。 そこで、これら 4 種類の GRA タンパク質がミトコンドリアのどの部分に局在しているのか、その局在様式を詳細に調べるために、次に細胞分画により得られたミトコンドリア画分を高塩濃度(KCl)の緩衝液で洗浄し、その一部の画分にはプロテアーゼを添加することでミトコンドリア上に蓄積している可能性のある タンパク質の消化実験を試みた。その結果、4 種類全ての GRA 発現細胞から得られたミトコンドリアでは、GRA タンパク質の存在が確認できなくなったことから、これら 4 種類のタンパク質は全てミトコンドリア外膜上に局在していると考えた。また、高塩濃度の緩衝液で洗浄した場合でも同様に、GRA タンパク質の存在が確認できなくなったことから、これらタンパク質は静電的にミトコンドリア膜や外膜上のタンパク質と相互作用している可能性が示唆された。最後に、これら4種類の GRA タンパク質と相互作用する宿主細胞内タンパク質を調べる目的で免疫沈降も行った。予備的な結果では、各種相互作用候補因子を確認できている。
研究成果の発表	該当年度は、特になし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 17 日

採択番号	30 共同-3		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	横山 直明
研究課題名	バングラデシュにおけるタイレリア感染牛摘発技術の開発		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	たかしま やすひろ 高島 康弘	岐阜大学応用生物科学部・准教授	
研究分担者	たにぐち ゆうじ 谷口 祐二	岐阜大学・連合獣医学研究科・大学院生	
	さいとう だいぞう 齋藤 大造	岐阜大学・連合獣医学研究科・大学院生	
	もいずーる らーまん Moizur Rahman	Rajshahi Univ. Faculty of Agriculture, Associate Professor	
	よこやま なおあき 横山 直明	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 30 年 5 月 9 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	ウシには数種のタイレリア (<i>Theileria</i>) が感染するが、これらを区別できる種特異的 PCR がいくつか報告されている。しかしタイレリアの遺伝子配列は種内変異があるため既報のプライマーが別の地域でもうまく機能するとは限らない。申請者らは、インドの <i>T. annulata</i> と <i>T. orientalis</i> を区別できる既報のプライマーについて、バングラデシュの原虫ではアニーリング部位に変異があるためうまく機能しないことを確認している。そこで本研究ではバングラデシュにおいて使用できる種特異的 PCR を開発し、同国におけるタイレリアの分布状況を明らかにする。総研究費の 80% 程度を占める現地調査費は他の経費でまかない、本共同研究費は検出系の開発にしぼって研究をすすめる。		
研究経過の概要	バングラデシュのウシ血液 DNA サンプルを既報の方法に従って PCR に供し[PLoS ONE 12(3): e0174595.]タイレリア遺伝子の検出を試みたところ、報告にある種特異的プライマーでは病原性の低い <i>T. orientalis</i> と病原性の高い <i>T. annulata</i> を PCR では区別できなかった。そこで 2 組のプライマーを新たに設計し、これらのプライマーを用いればバングラデシュの sample についても <i>T. orientalis</i> と病原性の高い <i>T. annulata</i> を区別できることを確認した。これらのプライマーを用いて、症状からピロプラズマ症を疑うウシの血液 DNA を調べたところ、その一部から <i>T. annulata</i> DNA が検出された。また、無症状のウシから <i>T. annulata</i> DNA が検出された。本研究により、バングラデシュのウシにおける <i>T. orientalis</i> 感染症の存在が初めて証明された。		

研究成果の 概 要	バングラデシュの臨床獣医師に聞き取りを行い、近年 <i>T. annulata</i> 感染が疑われる症例が見られた農村2か所を調査地とした。これらの農村で無症状の在来牛(あるいは在来牛を親とする交雑種)60 頭から採血し、DNA を得た。この DNA を新たに設計した <i>T. annulata</i> 特異的プライマーをもちいた PCR に供したところ、いずれの農村からも陽性を示す個体がみられた。陽性となったサンプルについては、改めて <i>Theileria</i> の COX3 領域をターゲットとする PCR に供し、増幅された箇所の塩基配列を決定して既報の各種 <i>Theileria</i> と比較したところ、既報の <i>T. annulata</i> の配列と 99%以上の一致率を見た。系統樹を作成したところ、高いブートストラップ値で <i>T. annulata</i> とクレードを形成した。以上から、これらの個体は <i>T. annulata</i> に不顕性感染していることが分かった。さらに臨床症状から熱帯ピロプラズマ病(<i>T. annulata</i> 感染症)と仮診断された 5 個体の血液についても同様に解析した。このうち 1 頭で <i>T. annulata</i> 特異的 PCR 陽性となった。 以上の成果から、バングラデシュにおける <i>T. annulata</i> の存在が初めて証明された。
研究成果の 発 表	2019 年 5 月現在、以下の論文を投稿中 Mst. Ishrat Zerine MONI, Kei HAYASHI, Thillaiapalam SIVAKUMAR, Moizur RAHMAN, Lovely NAHAR, Md. Zakirul ISLAM, Naoaki YOKOYAMA, Katsuya KITO, Cornelia APPIAH-KWARTENG, Yasuhiro TAKASHIMA. First Molecular detection of <i>Theileria annulata</i> in Bangladesh

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 31 年 4 月 12 日

採択番号	30 共同－4		
研究部門	高度診断学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	横山 直明
研究課題名	新興リーシュマニア症のリザーバー調査法の確立		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	(かとう ひろとも) 加藤 大智	自治医科大学医学部 感染・免疫学講座・医動物学部門・教授	
研究分担者			
	水島 大貴	帯広畜産大学原虫病研究センター・特任研究員	
	横山 直明	帯広畜産大学原虫病研究センター高度診断学分野・教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 4 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	リーシュマニア症は、吸血昆虫サシチョウバエに媒介されるリーシュマニア原虫によって引き起こされる人獣共通原虫感染症である。ヒト病原性のリーシュマニア原虫は約 20 種報告されており、感染種が病態（皮膚型、粘膜皮膚型、内臓型）を決定する要因となる。タイではリーシュマニア症の流行がなく、輸入感染症例しか報告されていなかった。しかしながら、10 年ほど前からタイで内臓型リーシュマニア症の国内発生がみられるようになり、原因種は 2 種の新種の原虫であることが明らかにされた。近年、新興リーシュマニア症はタイ周辺国や欧米、カリブ海諸国からも報告されており、リザーバーやベクターなど、伝播経路やリスク因子の特定は本症を制御する上では不可欠である。 本研究は、新興リーシュマニア症の感染経路を明らかにするため、イムノクロマトグラフィーによる簡便なリザーバー調査系を確立することを目的とする。		
研究経過の概要	新興リーシュマニア症の原因となる 2 種の原虫のうち、より多くの感染が報告されている <i>Leishmania martiniquensis</i> の K39 抗原および Heat Shock Protein 70 (HSP70) を候補抗原に選定した。これら 2 種の抗原について、大腸菌発現系により組換えタンパクを発現・精製し、また、作製した組換えタンパクを用いて、ウサギ免疫血清を得た。これらの組換えタンパク抗原および抗血清を用いてイムノクロマトストリップを作製した。陽性コントロール血清を用いて感度を検討したが、作製したストリップでは検出感度が低く、実用化にはさらなる改善が必要であると考えられた。		

研究成果の 概 要	本研究は、新興リーシュマニア症の感染経路を明らかにするため、イムノクロマトグラフィーによる簡便なリザーバー調査系を確立することを目的とする。 新興リーシュマニア症の原因となる 2 種の原虫 (<i>Leishmania martiniquensis</i> および <i>Leishmania siamensis</i>) のうち、より多くの感染が報告されている <i>L. martiniquensis</i> の K39 抗原および Heat Shock Protein 70 (HSP70) を候補抗原に選定し、これら 2 種の抗原をコードする遺伝子を pET vector に組み込み、大腸菌発現系を用いて組換えタンパクを作製した。組換えタンパクは Thioredoxin-6xHistidine (Trx-His) との融合タンパクとして発現・精製した (Trx-His-LmK39, Trx-His-LmHSP70)。これらの組換えタンパクとアジュバントをウサギに免疫し、抗体価の高い抗血清を得ることができた。またイムノクロマトグラフィーに用いる抗原として、<i>L. martiniquensis</i> K39 抗原および HSP70 をコードする遺伝子を pCold vector に組み込み、6xHistidine (His) との融合タンパクとして発現・精製した (His-LmK39, His-LmHSP70)。これらの抗原と金コロイドを結合させコンジュゲートパッドを作製し、また、抗原と抗血清を原虫病研究センター所有のテストストリップ作製装置 BIODOT によりメンブレンに塗布してイムノクロマトグラフィーのストリップを作製した。陽性コントロール血清を用いて感度を検討したが、作製したストリップでは検出感度が低く、実用化にはまだまだ改善が必要であると考えられた。 The figure displays two immunochromatography test strips. The left strip is labeled 'LmK39' and shows three lanes with concentrations of 200, 300, and 400 µg/mL. The right strip is labeled 'LmHSP70' and shows four lanes with concentrations of *400, 200, 300, and 400 µg/mL. Both strips have a 'Control line' and a 'Test line'. In all lanes, a red line is visible in the 'Control line' position, and a red line is also visible in the 'Test line' position, indicating a positive result for all concentrations tested.
研究成果の 発 表	特記事項なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 31 日

採択番号	30 共同-5		
研究部門	国際連携研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	加藤 健太郎
研究課題名	ロタウイルスの感染がもたらす 仔牛のクリプトスポリジウム原虫への抵抗性と免疫応答の関係		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	むらこし ふみ 村越 ふみ	京都府立医科大学・大学院医学研究科・感染病態学・助教	
研究分担者	いとう めぐみ 伊藤 めぐみ	帯広畜産大学・助教	
	(原虫共同研究担当教員名) 加藤 健太郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 32 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	畜産農家における仔牛下痢症の原因として、 <i>Cryptosporidium parvum</i> およびウシロ タウイルス (BRV) の腸管感染が挙げられる。BRV には産前母牛に投与するワクチンが 存在するが、 <i>C. parvum</i> に対するワクチン・治療薬は存在せず、激しい下痢症によって 仔牛の生育不良や斃死を引き起こす。畜産現場において、両病原体の共感染は頻繁に 報告される。そのため、本研究では BRV との共感染が <i>C. parvum</i> に与える影響に着目 した。本研究において、仔牛へのウシロタウイルス(BRV)の顕性/不顕性感染は、その後 に感染する <i>C. parvum</i> による水様性下痢の日数を有意に減少させた。そこで、細胞株を 用いた試験において二種の病原体のせめぎあいを詳細に調べた。		
研究経過の 概 要	本研究実験手順 ・農場における調査 複数の畜産農家の仔牛から毎日直腸便を採取し、糞便性状、ウシロタウイルスを含めた 各種病原体の検出およびクリプトスポリジウムの OPG (oocyst per gram) の計測を行っ た。 ・細胞株を用いた調査 BIE (ウシ腸管上皮) 細胞に BRV および <i>C. parvum</i> を感染させ、 <i>C. parvum</i> の細胞へ の侵入率が変化するか調べた。 BIE 細胞に poly(I:C)をトランスフェクションし、IFN β の発現を RTPCR にて調査した。		

研究成果の 概 要	<i>C. parvum</i> 単独感染仔牛 8 頭、BRV と <i>C. parvum</i> の共感染仔牛 4 頭の検体を得た。両群の結果を比較すると、BRV と <i>C. parvum</i> 共感染仔牛は、初期の OPG および下痢を呈する日数が有意に減少した。また、オーシスト排出期間は有意に長期化した。細胞での共感染実験においては、共感染区において <i>C. parvum</i> の侵入数が有意に低下した。また、poly(I:C)によって抗ウイルス応答を誘導した区においても、同様に原虫感染数が有意に低下した。 これらから、ロタウイルスと共感染した仔牛は、<i>C. parvum</i> による下痢の症状が軽減することが明らかとなった。また、ウシ腸管上皮細胞が BRV と <i>C. parvum</i> の共感染実験に用いることができることを明らかにした。細胞株を用いた BRV と <i>C. parvum</i> の共感染実験において、BRV の感染は <i>C. parvum</i> の細胞侵入に影響を与えられたと考えられた。そのため、共感染仔牛において、初期の OPG が減少していたと考えられる。 poly(I:C)を用いた細胞株における共感染実験において、dsRNA の刺激によってウシ由来細胞から IFN が発現した。このことから、dsRNA ウイルスである BRV がウシに感染すると宿主側の抗ウイルス応答が起こり、それが仔牛の下痢の日数の減少に繋がっている可能性があると考えられた。また、poly(I:C)のトランスフェクションによって <i>C. parvum</i> の侵入数も減少したため、dsRNA の刺激は <i>C. parvum</i> の細胞侵入にも影響を与えている可能性があり、今後詳しく調べる予定である。
研究成果の 発 表	さらに研究を進めた上で、学会発表、論文投稿を計画している。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 28 日

採択番号	30 共同-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	玄 学南
研究課題名	犬バベシア症に対するニューキノロン系薬剤の有用性の検討		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いぐち あいに 井口 愛子	鳥取大学農学部共同獣医学科獣医臨床検査学教室・講師	
研究分担者			
	玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	犬バベシア症はマダニ媒介性赤血球内寄生原虫である <i>Babesia gibsoni</i> によって引き起こされ、重要な溶血性貧血、黄疸、脾腫および血色素尿を呈し死に至ることもある犬の重要な感染症の一つである。治療にはアトバコン(ATV)が用いられ即効性があることが知られているが、再発しその再発原虫は ATV に対する感受性が低下することが問題となっている。本研究では犬バベシア症に対する新規治療薬としてニューキノロン系薬剤に着目した。単剤での使用ならびに ATV との併用による治療効果を検討することを目的とし、<i>in vitro</i> にて培養株を用いた薬剤感受性試験を実施した。ニューキノロン系薬剤はすでに動物用医薬品の販売があり、犬に対する安全性が示されている薬剤である。		
研究経過の概要	2004 年に自然感染した犬から分離し、培養・維持している野生型 <i>B. gibsoni</i> 培養株を用いた。ニューキノロン系薬剤であるオフロキサシン(OFLX)およびエンロフロキサシン(ERFX)に対する薬剤感受性試験を実施した。続いて ATV とそれぞれの薬剤を併用した際の相互作用を評価した。評価後、薬剤を含まない培養液を用いて培養を続け、再増殖の有無を確認した。再増殖が認められた場合には gDNA を抽出し、ATV 耐性関連遺伝子 M121I の保有率を検出した。 【薬剤感受性試験】 各薬剤を 2 段階希釈し、最終濃度 OFLX 0～750μM、ERFX 0～80μM となるように薬剤添加培養液を作成した。各培養液を用いて 144 時間の培養を行った。培養液は 24 時間毎に上清の 50%を交換し、48 時間ごとに血液塗抹標本を作製した。血液塗抹標本はギムザ染色を行い、赤血球 1,000 個に対する		

研究成果の 概 要	感染赤血球の割合である parasitemia を算出した。その結果を基に培養後 144 時間における 50%増殖抑制濃度(IC₅₀)を算出した。 培養後 144 時間における IC₅₀ は OFLX 94.3±5.5μM、ERFX 26.0±5.3μM であった。両薬剤共に μM レベルでの増殖抑制効果が認められた。しかし各薬剤の推奨用量における血中最高濃度(OFLX 21.0μM、ERFX 4.9μM)と比較するといずれも非常に高値であり、単剤では犬へ投与する際の投与量・毒性量が懸念された。 【併用薬剤感受性試験】 Modified fixed-ratio isobologram 法に基づき ATV と OFLX(ATV:OFLX 0:750、0.1:375、0.2:187、0.4:94、0.8:47、1.6:0 (μM))、ATV と ERFX(ATV:ERFX 0:100、0.1:50、0.2:25、0.4:12、0.8:6、1.6:0 (μM))の両薬剤が添加された培養液作成した。各組合せを 2 段階希釈した培養液を用いて 144 時間培養を行い、血液塗抹標本にて parasitemia の計測を行った。その結果を基に fractional inhibitory concentration (FIC)を算出し、薬剤の相互作用を評価した。さらに薬剤を含まない培養液で培養を続け、定期的に血液塗抹標本を作製し再増殖の有無を評価した。M121I 保有率は抽出した gDNA を用いて real-time PCR 法により算出した。 ATV と OFLX は相加効果を示し、ATV と ERFX は一部相乗効果を示したものの、大部分は相加効果を示した。両薬剤は ATV との併用が可能であること示唆された。各濃度の組み合わせの暴露後、薬剤を含まない培養液で培養を開始した。薬剤暴露後に完全に増殖抑制できていなかった組み合わせにおいて薬剤除去後 7 日では原虫が確認されなかった。しかし培養後 35 日までにすべての組み合わせにおいて再増殖を認めた。再増殖時の M121I 保有率は 1%未満であり、ATV 単剤暴露後の再増殖時よりも低値であった。 ATV とニューキノロン系薬剤の併用は原虫の再増殖を抑制できないものの、M121I 保有率は低値であったことから ATV 感受性低下を防ぐ効果的な併用療法であることが示唆された。また薬剤暴露中止後も増殖が抑制されたことから、ニューキノロン系薬剤は <i>B. gibsoni</i> に対し遅延死を引き起こす可能性が示唆された。
研究成果の 発 表	本研究は第 161 回日本獣医学会学術集会にて口頭発表を行った。現在、英語論文の投稿準備中である。 ・第 161 回日本獣医学会学術集会 「<i>Babesia gibsoni</i> に対するニューキノロン系抗菌薬の有効性の評価」○益田美佐、井口愛子、内田直宏、小林沙織、佐藤れえ子、山崎真大

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 29 日

採択番号	30 共同-7		
研究部門	国際連携部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	加藤 健太郎
研究課題名	クリプトスポリジウムタンパク質 NPPPs を標的にした薬剤開発と評価		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふるかわ あつし 古川 敦	北海道大学大学院薬学研究院・助教	
研究分担者			
	加藤 健太郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	クリプトスポリジウムの nonspecific polyprenyl pyrophosphate synthase(NPPPs)を標的とした薬剤開発においては、非常に弱い抗クリプトスポリジウム活性を持つ低分子化合物が以前報告されている (<i>Chem and Biology</i>, 2008)。しかし、<i>in silico</i> に基づく薬剤探索や、タンパク質立体構造を十分に吟味した探索がされたとは言い難い。本研究では、NPPPs に対して <i>in silico</i> スクリーニングや Differential Scanning Fluorometry (DSF)を用いたスクリーニングを実施し、新規阻害剤の探索を行う。さらに、<i>in vitro</i> での活性試験やタンパク質との複合体構造明らかにし、より高活性な化合物の探索を目指す。		
研究経過の概要	X 線立体構造解析や DSF 等のハイスループットなスクリーニングのための NPPPs のタンパク質発現を目指し、既報の方法に比べ安価に発現できる大腸菌発現系の構築を目指した。BL21(DE3)等の一般的な大腸菌株を用いて大腸菌で発現検討を行ったが、発現量が極めて低いことがわかった。そのため、発現量の増加を目指し、エアレーションの改善および Rosetta2(DE3)や C43(DE3)など様々な大腸菌株を用いて発現条件の検討を行った。また、精製に用いるタグの検討も行った。さらに、哺乳動物細胞 HEK293T を用いたタンパク質発現検討も行った。		

研究成果の 概 要	これまで各種大腸菌や哺乳動物細胞を用いた発現系を用いて NPPPs タンパク質の発現を行った。しかし、現在までのところ、結晶化の試行やスクリーニング等の生化学実験に十分な量の NPPPs タンパク質は得られていない。そのため、今後はコドン最適化したコンストラクトの作製や昆虫細胞を用いた発現、当研究室で実績のあるカイコ発現系での NPPPs の発現検討を行う。また、近年タンパク質の立体構造解析に少量のサンプルで済むクライオ電子顕微鏡が広く利用されて来た。我々も導入したクライオ電子顕微鏡を用いた立体構造解析についても取り組みを始める。
研究成果の 発 表	特になし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 30 日

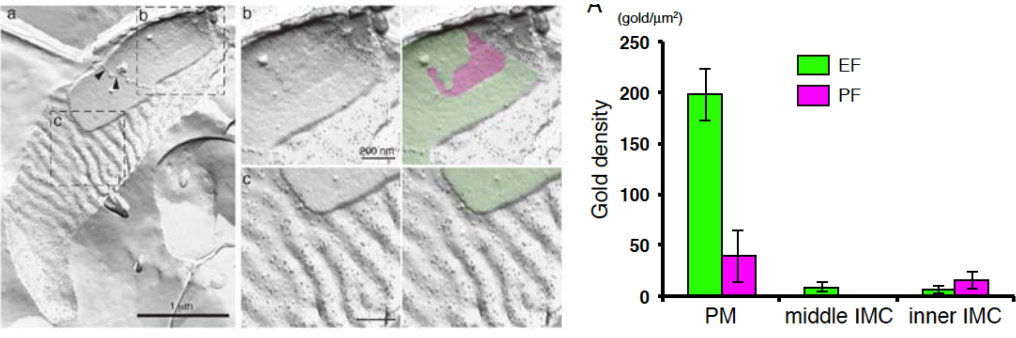
採択番号	30 共同-8		
研究部門	生体防御学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	新規抗アピコンプレクサ類原虫剤の育種による生産性向上化および バイオコンバージョンによる誘導体の創成		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	にへい こういち 二瓶 浩一	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員 研究総括と実験(抗原虫活性スペクトラムの検証)の実施	
研究分担者	いいじま まさとみ 飯島 正富	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員 抗原虫剤の生産性亢進株の開発	
	どい ひろやす 土井 宏育	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員 抗原虫剤のバイオコンバージョン法の開発	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 抗原虫活性を持つ化合物の判定および検出系の開発	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	アピコンプレクサ類原虫のトキソプラズマは、世界人口の約3割以上が感染していることが推定されており、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大きな問題となっている。さらに、家畜の生産性の低下が問題視されるトキソプラズマの仲間であるネオスポラ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。一方、世界三大感染症の一つマalariaもアピコンプレクサ類原虫であるプラスモディウムの感染により発症し、年間3～5億人が罹患し、その内、約200万人もの命を奪う医学分野で重要な疾患である。我々はトキソプラズマをはじめとするアピコンプレクサ類原虫症に対して極めて有効と考えられるメタサイトフィリン(MCF)を発見した(特願 2017-243872)。アピコンプレクサ類原虫に対して <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> 系において優れた抗原虫活性を示す MCF は現存の方法では生産性が悪く、実用化に向けて生産方法の改善をする必要がある。本研究課題では育種による MCF の生産方法の効率化および育種による MCF 誘導体変換方法の開発を行い、新たな原虫剤の創成を行うことを目的とした。		

研究経過の概要	原虫病薬のほとんどは、市場規模が新規原虫薬の開発費を下回るため、大手の製薬企業の関心は低いのが現状である。従って、利潤に左右されない公的研究機関で抗原虫薬の探索および創薬に向けた開発を実施することが重要である。我々の研究目的は感染者数の多いトキソプラズマによる繁殖障害問題を解決するための創薬に繋がる新規技術・有用化合物を提供することにある。これまでに我々は原虫薬開発に適した天然化合物ライブラリーの構築を行い、トキソプラズマ感染マウスに対する優れた治癒効果を示す MCF を発見した。しかしながら糸状菌によって産生される MCF は、生産効率が悪く、化合物の生産性の向上化させる必要がある。MCF の実用化に向けて種々の動物実験をする必要があり、化合物量を担保することが必須である。MCF の生産性向上化および育種による構造活性相関解析に加え、他の原虫に対する抗原虫作用のパネル評価を行い、独自の新規抗原虫薬の実用化に向けた開発を実施した。
研究成果の概要	MCF はトキソプラズマおよびネオスポラの他、マラリア原虫に対する抗原虫活性を示した。MCF は既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性値を示した。さらに、MCF はクロロキン耐性マラリア原虫に対し、高い抗原虫活性を示した。世の中でマラリア既存薬に対する耐性株が出現している現状を考慮すると、MCF が次世代マラリア薬のリード化合物として発展することが期待できる。 MCF が新たな原虫創薬における重要な意義を持つ化合物であることが明らかであるにも関わらず、既存の MCF 生産菌の育種による生産方法では、MCF の原虫に対する作用機序解析、小型および大型動物（マウス、ネコ、ヤギ、ニワトリ等）を用いた感染モデルを用いた解析を進めるのに必要な量を担保するのが困難な状況である。この現状を打開するために、低コストで且つ効率的な MCF の生産方法の開発が急務である。 これまでの方法では、MCF 生産菌 (<i>Metarhizium</i> sp.) をリッター培養当たり MCF 収量が数 mg 程度（最大でも 10mg 以下）の生産効率であった。我々の目標は精製工程を含めてリッター培養当たり 100mg オーダー以上の MCF の収量を得る安定的な生産方法の開発である。本研究において、MCF 生産糸状菌への紫外線照射による突然変異導入および無機塩、アミノ酸添加物等、培地組成、培養条件の改良により、リッター培養当たり最大で約 60mg オーダーの収量への向上化に成功した。本成果は大きな進展であり、MCF の実用化が期待できる結果でもあった。今後は精製工程を含め、リッター培養当たり 100mg オーダーの MCF 収量を目指し、研究を進める予定である。一方、育種法により MCF のフェニル基にハロゲンの導入を試みた。その結果、ハロゲンがフェニル基の位置特異的に導入されることを確認し、フッ素を導入した MCF 誘導体の作成に成功した。フッ素の導入により高い抗原虫活性が得られることを期待したものの、実際にその抗原虫活性は MCF に比べて 1/20 程度であった。しかしながら、育種法により MCF の誘導体展開が可能であることが明らかとなり、今後も育種法による MCF の誘導体化による新規創薬の開発につなげていく予定である。 本研究課題の成果により、有効な治療法および予防法が存在しない当該感染症対策に大きく貢献できると捉えている。
研究成果の発表	該当なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 24 日

採択番号	30 共同-9		
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構成脂質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 達膳	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 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	昨年度の本共同研究課題を実施する過程において、トキソプラズマがラフト・カベオラを持たない可能性が示唆された。そこで、本年度はその確認をさらに実施するとともに、ラフト・カベオラマーカに限らず、膜蛋白質などの原虫表面における局在様態を解析する。昨年度に引き続き、トキソプラズマを対象として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を破壊すること無く可視化し、さらに構成する機能性膜蛋白質の局在のマッピングを目指す。		
研究経過の概要	1. 急速凍結切断レプリカ法を用いて、膜レプリカを作製した。すなわち、トキソプラズマ RH 株及び PLK 株を精製し、これを金箔へ接着させ、瞬時に液体窒素によって急速凍結した。このようにして原虫細胞膜を金箔へ接着させ、金箔ごと脂質二重膜のうち外側の膜をナイフで削り取った(凍結切断)。むき出しになった内側の膜へカーボン蒸着することで、脂質レプリカを作成した。 2. トキソプラズマの虫体表面に存在する表面蛋白質 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、原虫細胞膜表面の広範囲にシグナルを認めた。なお、インナーメンブレンコンプレックス(IMC)や、細胞膜の P 面にはほとんど認められなかった。		

研究成果の 概 要	SAG1 は GPI アンカー蛋白質に分類される。哺乳類では GPI アンカー蛋白質は脂質ラフトに存在するとされる。上述の通りトキソプラズマがラフトを持たないことが示唆されたため、SAG1 の細胞膜上の分布様式も哺乳類細胞とは異なることが示唆される。そのため、金コロイド標識した SAG1 の分布を解析した。その結果、SAG1 は他の生物の GPI アンカー型蛋白質のように膜表面の部分部分に散在するのではなく、その分布は一様であった。  図 1: (左)トキソプラズマ表面における SAG1 の分布。黒いドットが金コロイド標識された SAG1 を示す。(右)SAG1 の密度。PM:細胞膜;EF:E 面;PF: P 面。
研究成果の 発 表	正谷 達磨、富奥 甘奈、藤田 秋一「急速凍結・凍結割断レプリカ標識法を利用したトキソプラズマ虫体における免疫電顕法の適用」第 161 回日本獣医学会学術集会、つくば国際会議場、2018 年 9 月 11 日 Yuna Kurokawa*, Tatsunori Masatani*, Rikako Konishi, Kanna Tomioku, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita. Nanoscale analysis reveals random distribution of GPI-anchored protein SAG1 in the membrane of living <i>Toxoplasma gondii</i> (投稿中)*contributed equally

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 22 日

採択番号	30 共同－10		
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			
	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 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 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。		

研究経過の概要	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 — ① <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作製した4種類の抗体の計5種類の抗体について伝搬阻止試験を実施し、そのエピトープの違いによる反応性を比較検討中である。 ② <u>遺伝子欠損原虫および Tag 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 原虫の作製を試みクローニングに成功し、赤内型および蚊体内ステージにおける表現型について解析中である。 — PbCap494 蛋白質 — ① <u>PbCap494 蛋白質の遺伝子欠損 (KO) 原虫および過剰発現 (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 原虫の赤内型および蚊体内ステージについて比較したところ、赤血球内寄生率の増加、gametocyte 形成率、雌雄 gametocyte 比、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。さらに、28 日目以降の蚊の唾液腺から sporozoite を分離し、その運動性およびマウスへの感染能についても解析を行ったが差は見られなかった。 WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫を感染させて吸血後 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、KO 原虫において oocyst 形成数は減少し、大きさも小さかった。透過型電子顕微鏡による観察を行ったところ、KO 原虫および OE 原虫の oocyst は WT 原虫に比べて発育が遅延していた。さらに、KO 原虫の oocyst 壁は WT 原虫に比べて菲薄化していた。 以上、PbCap494 は蚊体内ステージにおける初期の oocyst 壁形成に関与していると推察された。 ② <u>抗 PbCap494 抗体を用いた局在解析および運動性試験</u> 抗 PbCap494 抗体を用いて間接蛍光抗体により PbCap494 の ookinete 細胞膜における局在解析を行った。ookinete は PFA 固定/TritonX-100 処理および PFA 固定/未処理、生鮮状態のものを用いた。いずれも PbCap494 が ookinete の細胞膜表面で強く反応していた。 抗 PbCap494 抗体と反応させた ookinete と抗体未反応の ookinete の運動性を比較したところ、抗 PbCap494 抗体と反応させた ookinete の運動性は明らかに低下していた。以上、PbCap494 は ookinete の細胞膜表面に発現し、運動性に関わるタンパク質であると示唆された。
研究成果の発表	

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 22 日

採択番号	30-共同-11		
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	モンゴル国薬用植物による現地家畜トリパノソーマ症・ピロプラズマ症対策		
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 モンゴル国薬用植物の成分薬効解析、合成、現地調査	
研究分担者	なりた こういち 成田 紘一	東北医科薬科大学・薬学部・助教 有力な活性が見られた化合物の化学合成	
	ブヤンヒシグ Buyankhishig B.	東北医科薬科大学生薬学教室・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・教授 抗ピロプラズマ活性試験	
	(原虫研共同研究担当教員名) 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教 抗トリパノソーマ活性試験、動物実験	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 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無く、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 年度から継続的に帯広畜産大学菅沼啓輔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でいる。また今年度(30 年度)からは合成化学の専門家成田紘一助教もチームに加わり、一連のスクリーニングによって明らかになった有力な活性化合物をシーズとして、関連化合物を合成する。これにより構造活性相関を検討することでより高い効果が見込める化合物を示すことを発展的の目標とする。		

研究経過の 概 要	平成 28, 29 年度 (28-joint-12, 29-joint-6)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。また今年度からこれまでのスクリーニングによって有力な活性を示した化合物及びその関連化合物の合成を試み、構造活性相関について検討した。 抗ピロプラズマ活性化合物の探索 シベリアを含むロシア、中国、モンゴルにかけて広く分布し、多様な薬効が伝承されるユキノシタ科植物の <i>Bergenia crassifolia</i> から牛などのピロプラズマ症の原因となる <i>Babesia bovis</i> 及び <i>B. bigemina</i> に対して生育阻害活性を示す化合物を得た (業績 1)。ここでの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、これは昨年度の成果で報告した <i>Saxifraga spinulosa</i> 由来活性成分で得た考察 (<i>J. Nat. Prod.</i> 2017, 80, 2416-2423)と一致した。 次に、モンゴル国の早春に他の植物に先んじて花を咲かせ、家畜やヒトの強壮につながると思われる <i>Pulsatilla flavescens</i> から馬などのピロプラズマ症の原因となる <i>Babesia caballi</i> 及び <i>Theileria equi</i> に対して生育阻害活性を示す化合物を得た (業績 2)。 <i>Brachanthemum gobicum</i> 由来抗トリパノソーマ活性リグナン モンゴル国ゴビ砂漠に分布するキク科 <i>Brachanthemum gobicum</i> はそれを乾燥したものを燃やし、その煙で家畜動物を燻すことで体表寄生虫を除去する目的で用いるユニークな有用植物として知られている。本植物から抗トリパノソーマ活性 (<i>Trypanosoma congolense</i>)を示す 9 種類のアシル化リグナンを見出した。ここで得たアシル化リグナンはラセミ混合物として存在していることをキラルカラムにより分離することで示し、分光学的データを測定した (業績 3)。
研究成果の 概 要	抗原虫活性成分の探索について 1. 牛などのピロプラズマ症の原因となる原虫 <i>Babesia bovis</i> 及び <i>B. bigemina</i> に対して生育阻害活性を示す <i>Bergenia crassifolia</i> 由来成分を見出し、新規化合物 2 種類の化学構造決定とともに報告した (業績 1)。 2. 馬などのピロプラズマ症の原因となる原虫 <i>Babesia caballi</i> 及び <i>Theileria equi</i> に対して生育阻害活性を示すフラボノイド類をモンゴル国でヤルホイト称し強壮作用が知られる植物 <i>Pulsatilla flavescens</i> から見出し、新規フラボノイド 3 種類の化学構造決定とともに報告した (業績 2)。 3. 抗トリパノソーマ活性 (<i>Trypanosoma congolense</i>)を示す <i>Brachanthemum gobicum</i> 由来アシル化リグナンを見出した。またここで得た一連の新規リグナン関連化合物はいずれもラセミ混合物として存在することを示した (業績 3)。

研究成果の 概 要	モンゴル国での応用に向けた取り組みについて 昨年度までと同様に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開始しており、モンゴル国の問題をモンゴル国の資源で解決するための応用研究の展開に結び付いている。 化学合成による構造活性相関の追究について 本課題における一連のスクリーニング結果のうち、有力なトリパノソーマ活性を示した化合物について、成田紘一博士によって化学合成が試みられた。今後は構造活性相関の追究とより効果が高く低毒性の化合物を見出すべく継続的に合成研究を進める予定である。
研究成果の 発 表	<原著論文> 1) Chemical constituents of <i>Bergenia crassifolia</i> roots and their growth inhibitory activity against <i>Babesia bovis</i> and <i>B. bigemina</i>, Orkhon Banzragchgarav, *Toshihiro Murata, Bumduuren Tuvshintulga, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Noboru Inoue, Javzan Batkhoo, Kenroh Sasaki, <i>Phytochemistry Letters</i>, 29, 79-83 (2019). DOI: https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.11.009 2) Flavonoids isolated from the flowers of <i>Pulsatilla flavescens</i> and their anti-piroplasm activity, Dorj Ganchimeg, Badarch Batbold, *Toshihiro Murata, Bekh-Ochir Davaasuren, Tserendorj Munkhjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Buyanmandakh Buyankhishig, Kenroh Sasaki, Dulamjav Batsuren, Javzan Batkhoo, <i>Journal of Natural Medicines</i>, On the web. DOI: http://doi.org/10.1007/s11418-019-01294-8 3) Acylated lignans from <i>Brachanthemum gobicum</i> and their trypanocidal activity, Batsukh Odonbayar, *Toshihiro Murata, Keisuke Suganuma, Yoshinobu Ishikawa, Buyanmandakh Buyankhishig, Javzan Batkhoo, Kenroh Sasaki, <i>Journal of Natural Products</i>, 82, 774-784. DOI:10.1021/acs.jnatprod.8b00670 <シンポジウム> The Japan-Mongolia Joint research meeting, Toshihiro Murata, The Research Project of Mongolian Medicinal Plants, Ulaanbaatar, Mongolia, 2018 年 8 月

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 29 日

採択番号	30-共同-12		
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	フタトゲチマダニゲノムがコードする遺伝子の機能予測		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	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 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 フタトゲチマダニ試料およびトランスクリプトームデータの提供	
	(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 研究助言	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	吸血性節足動物であるマダニ類は、吸血自体による不快感・障害に加え、SFTSV(重症熱性血小板減少症候群ウイルス)、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、回帰熱、ボレリア類等を媒介する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。国内のマダニ類では、フタトゲチマダニ(<i>Haemaphysalis longicornis</i>)が優占種の1つとされ、SFTSV の他、Q 熱(コクシエラ)、日本紅斑熱(リケッチア)の病原体を媒介する。さらに、バベシア原虫のベクターでもあり、人のみならず、畜産業にも多大な経済的被害をもたらしている。これらの対策立案を想定した際、マダニのゲノムは、疫学・殺ダニ剤開発・組換えマダニワクチン開発等、広範囲にわたる研究・開発を行う上での基盤情報となりうるが、国内優占種であるフタトゲチマダニについては、ゲノム情報に関する基盤整備が極めて不十分であるのが実情である。このような背景から我々は、帯広畜産大学で長期にわたり維持されているフタトゲチマダニのコロニーを材料に、ドラフトゲノムの解析に着手した。		

研究経過の概要	これまで、Illumina 社製次世代シーケンサーを用いて、142Gb のフタゲチマダニ由来配列を取得している。しかしながら、k-mer 法から、そのゲノムサイズは 8.3-8.8Gb と推定され、一般に <i>de novo genome assembly</i> に必要な x30～x50 の深度に満たないことが判明した。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。 そこで今回、同じく Illumina 社製次世代シーケンサーで、146Gb の塩基を追加取得し、基準である x30 を上回るデータの取得に成功した。さらに、近年利用可能となった超長鎖出力を可能とする次世代シーケンサー MinION を導入、3 回の Run により 4.5Gb を取得した。これらを材料に再度 <i>de novo genome assembly</i> を試みたが、巨大なデータの使用に解析サーバーが耐えられず、これまでのところ良好な結果は得られていない。現在、解析パイプラインの見直しによる計算の効率化、MinION リードの追加取得と断片からの遺伝子予測の可能性を検討している。
研究成果の概要	研究分担者の白藤博士よりフタゲチマダニより精製したゲノム DNA の供与を受け、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 146.1Gb、891 Mreads の塩基配列を得た。これに前年度までに取得した 141.6Gb を加えた 287.7 Gb、1.89 Greads を <i>de novo genome assembly</i> を行うためのデータとして用意した。これは、8.3-8.7 Gb と推定されるフタゲチマダニゲノムの x33～x35 の深度にあたり、十分なデータ量と考えられる。そこで、最初に Quality trimming を行い、質の保たれた 265.7 Gb、1.83 Greads を確保した。次に、ABYSS を用いて、assembly を試みたが、恐らくメモリ不足により結果を得ることはできなかった。 一方で近年、超長鎖配列の出力を可能とする次世代シーケンサー、MinION の利用が可能となった。この超長鎖配列は <i>de novo genome assembly</i> において、integrity の向上に大きく寄与することが知られている。そこで、本研究においても、本シーケンサーを利用し、FLO-MIN106 を 1 枚、FLO-MIN107 を 2 枚の計 3 枚を用いて 4.5 Gb、3.3 Mreads を取得した。しかしながら、今回取得した総データ量はフタゲチマダニの推定ゲノムサイズにも満たず、<i>de novo genome assembly</i> に用いるには、追加データの取得が必要と考えられる。 今後、フタゲチマダニの <i>de novo genome assembly</i> を成功させるために、以下の方法が考えられる。まず、MinION を用いた超長鎖配列の追加取得については、コストパフォーマンスに優れる PromethION の利用を視野に入れる。一方、Illumina 社製次世代シーケンサーで取得した短鎖配列については、十分なデータ量を取得しているため、情報解析方法を工夫する必要がある。具体的には、北海道大学情報基盤センター大型計算機システムの利用、BBnorm を用いた短鎖配列のカバレッジのノーマライズによるデータ量のダウンサイジング、Velvet 等の ABYSS 以外のアセンブラーの使用が考えられる。とくに情報解析は大きな予算を必要としないため、プロジェクト終了後も継続して進めたい。
研究成果の発表	特記事項無し

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 31 日

採択番号	30 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	白藤 梨可
研究課題名	<i>Spiroplasma</i> 属共生菌導入マダニを用いたマダニ共生細菌の維持機構の解明		
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	おがた しょうへい 小方 昌平	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	まつお かい 松尾 權	北海道大学獣医学部・学部学生	
	まつもと たてき 松本 干城	北海道大学獣医学部・学部学生	
	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 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マダニは体内に多様な微生物を保有するが、その一部は共生細菌としてマダニの生命活動に重要な役割を持つことが知られつつある。申請者は、マダニの持つ微生物群をメタゲノム解析手法により特定し、特にマダニ集団内で多くを占める細菌群について、マダニ体内での役割解析を進めている。これまでの共同研究で、マダニの共生菌の一つである <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の単為生殖系フタゲチマダニ(原虫研累代飼育株・岡山株)への接種試験を行い、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌が介卵伝播することを確認した。本研究では、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌を両性生殖系フタゲチマダニ(原虫研累代飼育株・大分株)に接種し、その体内での局在と宿主マダニの表現型への影響を評価することを目的とした。		
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(ISE6)を用いて分離した <i>Spiroplasma</i> 属共生菌(Sp1-1 株)を実験に用いた。本菌は、昨年度実施した共同研究において単為生殖系フタゲチマダニの成ダニにマイクロインジェクションにより投与することで、成ダニ体内に定着し、その成ダニが産卵した卵に移行することを確認している。本実験では同様のプロトコールにより <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を両性生殖系フタゲチマダニに投与した。接種後のマダニはウサギを用いた吸血に供し、産卵に至るまでの日数、卵重量、飽血時体重飽血後体重を測定した。また、卵から DNA を抽出し PCR により <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の感染有無を評価した。		

研究成果の概要	SP-4 無細胞培地で培養した菌体を 2 種類の濃度 (A と B (A は B の 100 倍の菌体量)) に希釈し、A 希釈菌液をオス 23 個体、メス 27 個体に自動マイクロインジェクターにより接種した。同様に、B 希釈菌液をオス 26 個体、メス 45 個体に接種した。また、陰性コントロールとして、PBS をオス 29 個体、メス 60 個体に接種した。交配の組み合わせから、以下の 8 群を準備した。①非接種オス+非接種メス、②PBS 接種オス+PBS 接種メス、③A 菌液接種オス+A 菌液接種メス、④B 菌液接種オス+B 菌液接種メス、⑤A 菌液接種オス+PBS 接種メス、⑥B 菌液接種オス+PBS 接種メス、⑦PBS 接種オス+A 菌液接種メス、⑧PBS 接種オス+B 菌液接種メス。合計 102 個体のマダニを用い、合計 4 羽のウサギを用いて吸血試験に供した。 産卵に至るまでの日数、卵重量、卵重量と飽血時体重の比を評価したところ、コントロール群 (①および②) と比較して、③群で卵重量と雌飽血時体重の比の低下が見られた。また、卵の一部を取り分け、DNA を抽出し 16S リボソーマル RNA 遺伝子をターゲットとした特異的 PCR により <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の感染有無を評価した。その結果、全ての接種群において <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の遺伝子は検出されず、両性生殖系フタゲチマダニにおいては、介卵伝播がみられなかった。 以前に行った単為生殖系フタゲチマダニを用いた <i>Spiroplasma</i> 属共生菌接種試験では、接種菌液中に抗生物質 (ペニシリン・ストレプトマイシン) が含まれていた。その結果、フタゲチマダニが保有する <i>Coxiella</i> 属細菌の卵への伝播率の低下が観察されるなど、フタゲチマダニが本来持つ細菌群の攪乱が示唆された。今回の接種菌液中には抗生物質は含まれていなかった。仮説の一つとして、マダニ体内の微生物叢が安定した条件下では、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌の外部導入が困難となったことが考えられた。本仮説が正しい場合、投与する抗生物質の種類や量の条件検討することでマダニが保有する微生物叢を操作できる可能性を示すものであり、マダニと微生物の相互関係を解析する上で、優先して取り組む課題を提起したこととなる。また、別の仮説として、単為生殖系と両性生殖系で <i>Spiroplasma</i> 属共生菌に対する感受性が異なり、両性生殖系では <i>Spiroplasma</i> 属共生菌感染に抵抗性をもつことが考えられた。今後、抗生物質不使用条件下において単為生殖系フタゲチマダニに <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を投与する実験を行うことで、両方の仮説を検証する必要がある。
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

令和元年 5 月 31 日

採択番号	30 共同-14		
研究部門	地球規模感染症学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	加藤 健太郎
研究課題名	クリプトスポリジウム症発症メカニズム解明に向けた形態学的アプローチ		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ぼちもと ひろき 暮地本 宙己	帯広畜産大学保健管理センター・特任准教授	
研究分担者	こんどう だいすけ 近藤 大輔	帯広畜産大学基礎獣医学研究部門獣医解剖学研究室・助教	
	加藤 健太郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	クリプトスポリジウム症は、ヒトにおける最も重要な人獣共通感染症の一つであるが、ヒトへの感染性や発症メカニズムには不明な点が多く、その解明のためにクリプトスポリジウムの微細構造を含む形態学的知見を確立する必要がある。本研究ではクリプトスポリジウム感染モデルマウス腸管組織の微細構造解析を行うことで、ヒトのクリプトスポリジウム症の診断や治療、予防法研究のための基本的知見を得るとともに、マウス動物モデルにおける感染様式に関する形態学的基盤の強化を目的として実施した。		

研究経過の概要	原虫病研究センターにおいて <i>Cryptosporidium parvum</i> を感染させた SCID マウスモデルを作製した。感染後 2 週間を経過し胃腸症状を呈しているモデルマウスより腸管組織を採取後、0.5% Paraformaldehyde (PFA)・0.5% Glutaraldehyde (GA)・0.1 M phosphate buffer (PB) にて 30 分間の浸漬固定を実施した。その後腸管組織の一部については 2% GA・0.1 M PB にて 2-3 日間追加固定した後に 1% 四酸化オスミウム溶液にて後固定し、常法に従い L.R.White 樹脂に包埋した。L.R.White 樹脂包埋標本より 0.5 μm 厚の準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡観察に供した。また同標本より 70nm 厚の超薄雪片を作製し、酢酸ウランを用いた電子染色を施して透過電子顕微鏡観察に供した。さらに腸管組織の一部については、0.5% PFA・0.5% GA・0.1 M PB への浸漬固定後、ただちに 1% 四酸化オスミウム溶液にて後固定した。その後段階的に濃度を上昇させた DMSO 溶液に浸漬して氷晶防止処置を施し液体窒素中で凍結切断を実施した。凍結切断後の試料を 0.1% 四酸化オスミウム溶液にてオスミウム浸軟処理を実施した後、1% 四酸化オスミウムおよび 1% タンニン酸溶液を用いた導電染色処理を行った。処理後の試料はエタノール上昇系および t ブチルアルコールへと置換し凍結乾燥後にアルミニウム試料台に載台し、白金パラジウムコーティングによる帯電防止処置を実施して電解放出型走査電子顕微鏡観察に供した。
研究成果の概要	クリプトスポリジウム感染 SCID マウスモデルの腸管組織を用いて実施された過去の研究で、クリプトスポリジウムが小腸微絨毛間に侵入する侵入形態や、複雑な形態の feeder organelle を形成することが示されている (Umehiya R, et al. J Parasitol. 2005;91(5):1034-9.; Rosales MJ, et al. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(6):847-50.)。しかし feeder organelle をはじめとするクリプトスポリジウムに関連した微細構造の立体的特性については、不明な点が残されていた。 本研究課題において実施したオスミウム浸軟試料の走査電顕観察により、クリプトスポリジウムに関連した細胞内微細構造の三次元的可視化が可能となった。これらの走査電顕所見は、同一個体から取得した樹脂包埋標本を用いた光顕及び透過電顕所見との対比的観察により裏付けられた。特に feeder organelle の形状について、透過電顕観察から 3 つの異なる性状を有する部位が同定されたが、走査電顕観察により、上述の異なる 3 部位は連続性をもった構造であることが示された (現在論文投稿中)。これらの所見は動物個体におけるクリプトスポリジウム症発症メカニズムに関わる形態学的基盤の解明の一端に貢献できると考えられた。
研究成果の発表	「研究成果の概要」欄で述べた通り、研究成果の一部に関する論文を投稿しており、現在はリバイスを行なっている。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 20 日

採択番号	30-共同-15		
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と作用機序解明		
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	
研究分担者	いとう しゅん 伊藤 駿	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士 2 年 活性化合物の精製・構造決定	
	たきぐち ありさ 滝口 ありさ	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士 2 年 活性化合物の精製・構造決定	
	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・助教 抗トリパノソーマ活性試験	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トリパノソーマ症は病状が進行すると死に至り得る深刻な感染症だが、既存薬は副作用が強いいため新たな治療薬の開発が望まれている。申請者は独自に採取・収集してきた海洋生物抽出物ライブラリーを所有しており、抗リーシュマニア活性を持つ新規化合物クリスタキシセニン(Ishigami et al., <i>J. Org. Chem.</i>, 2012)など様々な新規天然化合物を単離、構造決定してきた。有望な天然化合物については将来的な創薬を目指し、合成研究も進めている(Fumiyama et al, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>, 2016 など)。 先行研究において、貴センター菅沼啓輔助教が開発した試験管内トリパノソーマ培養系を用いてスクリーニングを実施した結果、強力な抗トリパノソーマ活性を示す抽出物サンプルを複数見出した。このうち山口県青海島産カイメンから活性を指標に精製を進めた結果、5α,8α-Epidioxysterogosta-6,24(28)-dien-3β-ol(IC₅₀=41ng/mL)を同定している。 そこで本研究では、新たなトリパノソーマ治療薬のリード化合物を得ることを目的とし、これまでに得たヒットサンプルから活性本体の更なる探索を行い、リード化合物候補を充実させる。さらに、リード化合物の標的タンパク質の同定を行って作用機序を解明し、新たな治療薬開発のための知見を集積させる。		

研究経過の概要	本研究では、<i>in vitro</i> アッセイにおける抗トリパノソーマ活性を指標にした活性化合物の単離・同定を継続して行った。加えて、研究代表者が保有する海洋生物抽出物ライブラリーに対して、大規模なスクリーニングを実施した。 スクリーニングで抗トリパノソーマ活性が認められた海洋生物をメタノールで抽出した後、溶媒分画、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製を行った。得られた画分は 96 ウェルプレートで培養した <i>Trypanosoma congolense</i> に添加し、生細胞測定試薬を用いて抗トリパノソーマ活性を算出した。最終的に単離された活性化合物について、MS スペクトル、¹H-NMR、¹³C-NMR、ならびに各種二次元 NMR スペクトル (COSY、NOESY、TOCSY、HMBC、HMQC など) を測定し、スペクトルデータを解析することで構造を同定した。
研究成果の概要	貴センター菅沼啓輔助教との共同研究により、研究代表者が保有する海洋生物抽出ライブラリー5622 サンプル (脂溶性画分及び水溶性画分各 2811 サンプル) に対して抗トリパノソーマ原虫活性スクリーニングを行った。同時にトリパノソーマ原虫に対する選択的活性を評価するために、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株およびマウス白血病細胞株 P388 に対する細胞毒性試験も行った。 この結果、脂溶性画分 (サンプル濃度 0.25μg/ml) 90 サンプル、水溶性画分 (サンプル濃度 1.5625μg/ml) 35 サンプルに顕著な抗トリパノソーマ活性が認められ、このうち脂溶性画分 5 サンプルと水溶性画分 4 サンプルに高選択的な抗原虫活性を見出した。 この結果を受けて現在活性本体の単離・同定を行っている。このうち屋久島新曽根産未同定海綿抽出物を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー及びシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーにより分画後、逆相 HPLC によって精製を行ったところ、新規化合物を含む 7 つの化合物の単離・同定に成功した。これらの化合物のうち 2 つの化合物において抗トリパノソーマ活性が認められ、その IC₅₀ 値は 1.17 および 1.61μg/mL であった。
研究成果の発表	1.伊藤駿、万場昌子、菅沼啓輔、中尾洋一、 抗トリパノソーマ活性を有する海洋天然化合物の探索、 日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会、2018.06.13 2.伊藤駿、万場昌子、菅沼啓輔、中尾洋一、 抗トリパノソーマ活性を有する海洋天然化合物、 第 13 回化学生態学研究会、2018.06.22

令和元年7月1日発行

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



帯広畜産大学 原虫病研究センター

〒080-8555 帯広市稲田町西2線13番地
TEL: 0155-49-5642 FAX: 0155-49-5643
<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/>

