

## **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

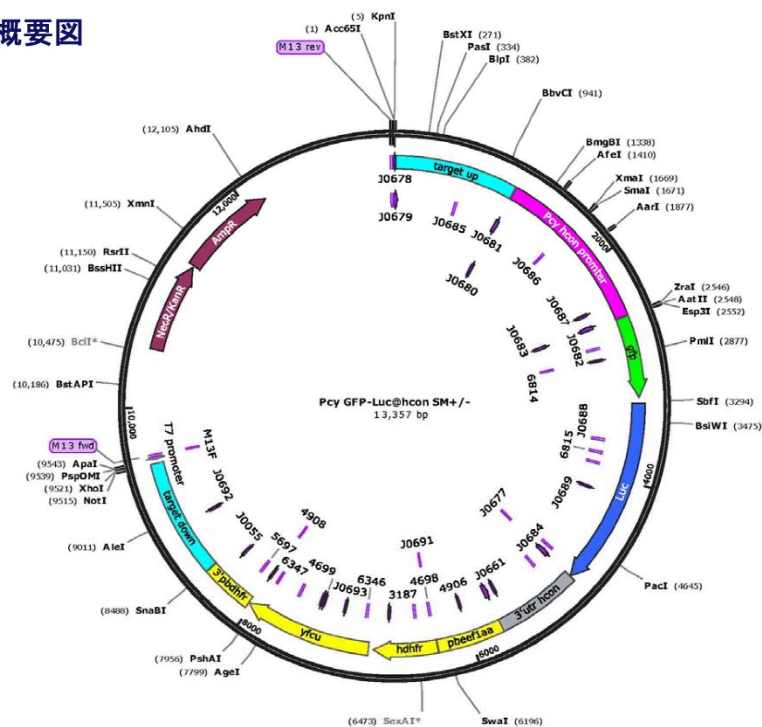
令和 2 年 5 月 29 日

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                        |        |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------|
| 採択番号  | 2019-共同-1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                        |        |
| 研究部門  | 診断治療研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員 | 河津 信一郎 |
| 研究課題名 | サルマラリアの肝臓休眠体を標的とした可視化原虫株の作製                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |        |
| 研究代表者 | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 所属部局等・職名               |        |
|       | かわい さとる<br>川合 寛                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 獨協医科大学熱帯病寄生虫病学講座・教授    |        |
| 研究分担者 | あんのうら たけし<br>案浦 健                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 国立感染症研究所寄生動物部・主任研究官    |        |
|       | おかもと むねひろ<br>岡本 宗裕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 京都大学霊長類研究所・教授          |        |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                        |        |
|       | かわづ しんいちろう<br>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  | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                        |        |
| 目的・趣旨 | <p>三日熱マラリア原虫(<i>Plasmodium vivax</i>,以下 Pv)は媒介蚊からヒトへ侵入後、肝臓内で一部の原虫が休眠体を形成し、休眠体を根治しない限り再発を繰り返すことが知られている。したがって、三日熱マラリアの感染制御には休眠体に対する対処方法がカギとなる。しかし Pv の休眠体は完全に再現される培養系が確立されておらず、一般的な動物実験に使われるネズミマラリア原虫でも休眠体が形成されないことから、いまだ多くの基盤情報が未知のまま残されている。一方、サルマラリア原虫の <i>P. cynomolgi</i>(Pcy)は、Pv とゲノム配列の相同性が 90%以上と系統的に極めて近縁の原虫種で、休眠体の形成や赤内期の増殖サイクル等、生物学的性状も非常に類似している。そのため欧米の研究機関では、Pcy を肝臓休眠体の <i>in vivo</i> モデルとして古くから用いている。近年、研究代表者らもニホンザルと Pcy を用いた肝臓休眠体疾患モデルの作出に取り組み、国内で初めて <i>in vivo</i> 実験系の確立に成功した。そこで、本研究では肝臓休眠体の休眠および再活性化に必須の分子メカニズムを明らかにすることを目的に、遺伝子導入による Pcy 可視化株の樹立を目指す。</p> |                        |        |

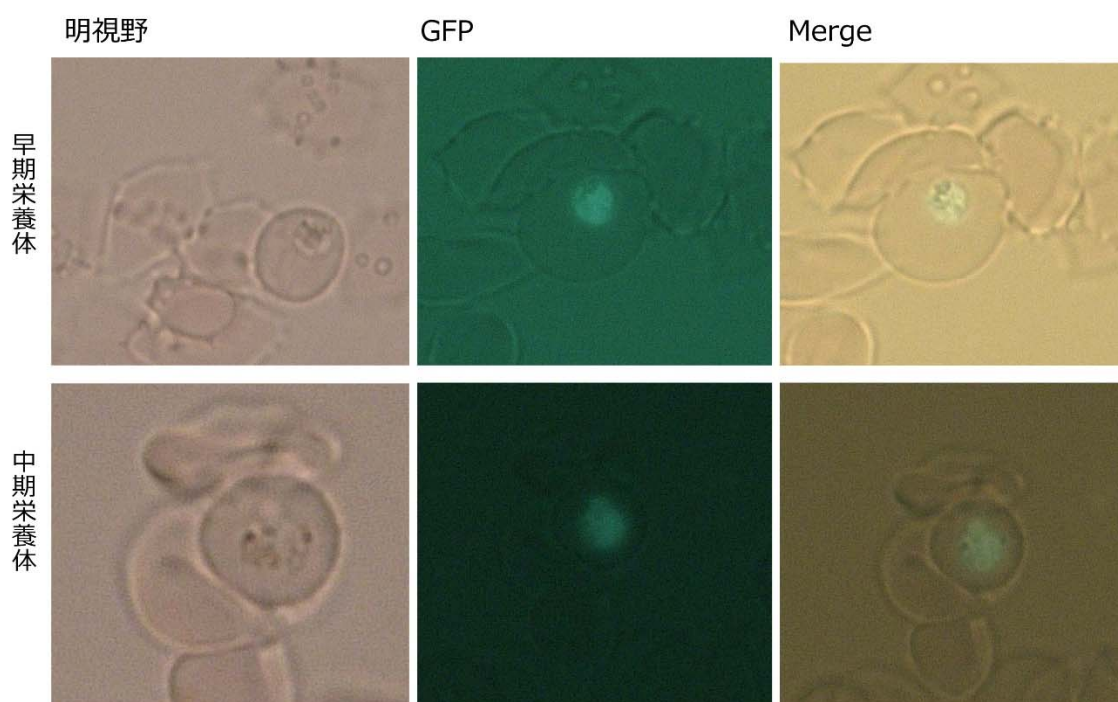
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p><b>2019 年</b><br/> 9/19-10/10: 京都大学霊長類研究所 (愛知県犬山市) から基盤研・霊長類医科学研究センター (茨城県つくば市) へ、実験用アカゲザル 4 頭を移送。導入検疫による経過観察。<br/> 11/6: 脾臓摘出、アカゲザル 4 頭 (No. 1, 2, 3, 4)。</p> <p><b>2020 年</b><br/> 1/20: サル 1 頭 (No.1) へ、<i>P. cynomolgi</i> (Pcy) を静脈内接種。<br/> 1/30: No.1 (day 10) より血液塗抹標本による寄生率の算出開始。<br/> 2/4-6: No.1 より採血 → 約 12 時間培養 → 標的遺伝子の電気穿孔法による導入 → 直ちに遺伝子導入した Pcy をサル No.2 へ静脈内接種。<br/> 2/6-10: サル No. 1 に対して、クロロキン硫酸を筋肉内投与により、治療。<br/> 2/10-24: サル No. 2 に対して、ピリメサミンを経鼻投与。<br/> 2/25: サル No. 2 で増殖した Pcy に GFP 信号を確認。凍結保存血液を作製。<br/> 2/25-3/1: サル No. 2 に対して、クロロキン硫酸を筋肉内投与により治療。<br/> 3/11: サル No.1, 2 に対して PCR により Pcy の遺伝子検出を行い、いずれも陰性。</p> |
| 研究成果の概要 | <p><b>1) 遺伝子導入ベクターの設計と作製:</b><br/> Pcy に GFP/ルシフェラーゼを発現させるためのトランスフェクションベクターを設計し、作製した (別紙、図1)。</p> <p><b>2) Pcy 分裂体感染赤血球の回収:</b><br/> 効率的な遺伝子導入を実施するためには、大量の Pcy 分裂体が必要となるため、分裂体回収のための条件を検討した。早期～中期栄養体の感染した血液をサル No.1 から採血し、混合ガスインキュベータ内で約 12 時間振盪培養を行った。培養感染血液は、Nycodenz®による密度勾配遠心分離をしたところ、大量の Pcy 分裂体感染赤血球を回収することができた。</p> <p><b>3) Pcy に対する遺伝子導入と可視化株の確立:</b><br/> Pcy 分裂体へ標的遺伝子を導入し、直ちにサル No.2 へ静脈内接種した。No.2 は接種 4 日後から 15 日間、ピリメサミンを経鼻投与を行った。接種 20 日後以降、No.2 の末梢血液中に出現した原虫に GFP シグナルが確認された (別紙、図2)。</p>                                                                                                                                      |
| 研究成果の発表 | <p>・令和 1 年度、原虫病研究センター共同研究成果報告会、2020 年 2 月 13 日、帯広畜産大学・原虫病研究センター</p> <p>・Development of an effective alternative model for <i>in vivo</i> hypnozoite-induced relapse infection: a Japanese macaque (<i>Macaca fuscata</i>) model experimentally infected with <i>Plasmodium cynomolgi</i>. Parasit Int, 2020; 76, 102096. Kawai S, Annoura T, Araki T, Shiogama Y, Soma S, Takano JI, Otake Sato M, Kaneko O, Yasutomi Y, Chigusa Y</p>                                                                                                                                                                                                           |

サルマラリアの肝臓休眠体を標的とした可視化原虫株の作製（研究代表者 川合寛）

## 組換え実験の概要図



サルマラリアの肝臓休眠体を標的とした可視化原虫株の作製（研究代表者 川合寛）



## NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 20. 5. 2020  
Project no: 2019-joint-2

### 1. Principal investigator

Name: RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.

Position: Research Scientist – Laboratory of Vector Immunology

Affiliation: Institute of Parasitology, Biology Centre CAS, Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic, Europe

### 2. Project title:

The development of a DiCre recombinase-expressing strain of *Babesia* for the creation of conditional gene knockouts.

### 3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Prof. Shin-Ichiro Kawazu and Dr. Masahito Asada

Position: Professor and Associate Professor

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

01/01/2019 -12/31/2021

3 years

### 5. Purposes and objectives

The major objective of this project is the development of novel functional genomic tools for tick-borne *Babesia* parasites, namely the creation of a stable transgenic DiCre recombinase-expressing strain(s) of *Babesia*. DiCre conditional recombinase system enables functional analysis of indispensable parasite genes where conventional non-inducible knock-out systems cannot be used. This technique has been previously applied to Apicomplexa model species *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* but *Babesia* recombinase-expressing strain has not yet been introduced.

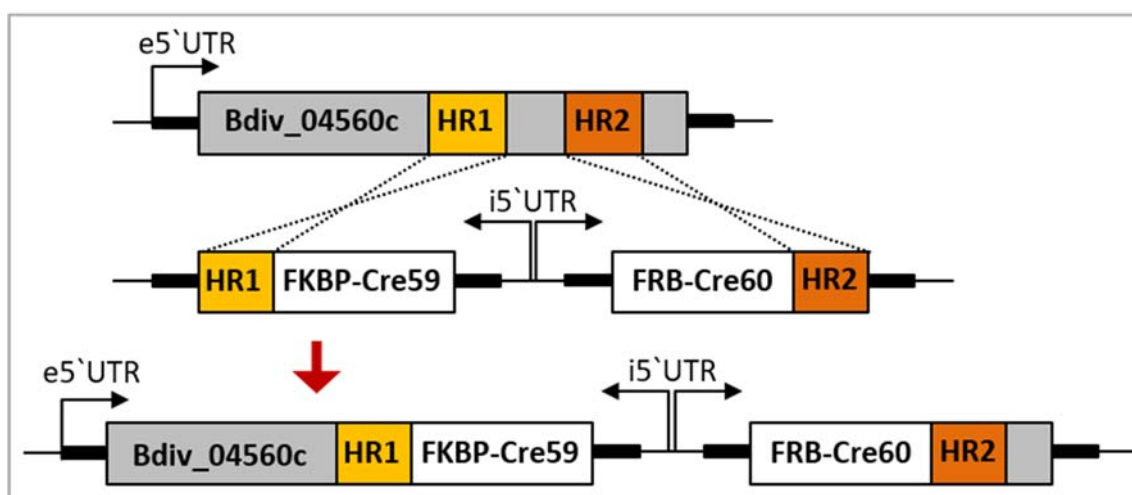
The individual objectives of this project include (i) the design and cloning of *Babesia* plasmid constructs allowing for the integration of both Cre subunits into the same genomic locus of selected *Babesia* species, (ii) generation of “parental” DiCre parasite line(s) incl. optimization of transfection strategy for *Babesia*, (iii) implementation of the loxP sites into the parasite via the both episomal and intra-genomic approaches to verify recombinase activity, and (iv) performance of conditional knock-out(s) of selected *Babesia* target genes.

### 6. Outline of research process

The first collaborative visit of two Institute of Parasitology, Biology Centre, the Czech Academy of Sciences (IoP BC CAS) research team members, Dr. Sojka and Dr. Jalovecká, to the NRCPD laboratory of prof. Kawazu took place between October 27 and November 20, 2019. The short research stay of two members was enabled by partial funding of the mobility costs from the IoP BC CAS funding resources. The research stay was primarily focused on the determination of optimal research strategies and the initial objective assessment including methodological training of techniques necessary for transgenic *Babesia* preparation. During this visit, we agreed to establish stable transgenic DiCre recombinase-expressing strain(s) of two *Babesia* species – *Babesia divergens* (Dr. Sojka and Dr. Jalovecká, Institute of IoP BC CAS, Czech Republic) and *Babesia bovis* (Prof. Kawazu and Dr. Asada, NRCPD-OUAVM, Japan). This agreement reflects the model species that have already been established in both laboratories and, thus, minimize the time that would be necessary for introduction of novel *Babesia* species.

Since the home laboratory at IoP BC CAS enables working with *ex vivo* cultures of *B. divergens*, the team of Dr. Sojka follows a pioneer mission in the development of specific transgenic tools for this particular species. In the first year of the project, the team has already identified and sequenced several *B. divergens*-specific promoters. Among selected were those that drive activity of *actin* (Bdiv\_007890), *elongation factor-1 $\alpha$*  (EF-1 $\alpha$ , Bdiv\_030590) and *hsp70* (heat shock protein, Bdiv\_029570) genes as those particular promoters showed high activity in other *Babesia* species. Other newly identified promoters are those controlling for the expression of *B. divergens calmodulin* (Bdiv\_005010c) and *chloroquine resistance transporter* (Bdiv\_036760) because such promoters are commonly used in *Babesia*-related *Plasmodium* models. In addition, the team has also successfully amplified and sequenced *B. divergens* 3' UTRs (untranslated regions) of the above-mentioned genes. Another primary objective was testing the sensitivity of *B. divergens* to selection markers used for plasmid transfection of other *Babesia* species. We successfully validated the effect of Blasticidin-S-Deaminase (BSD) and WR99210 for *B. divergens*. At the moment the last step prior final plasmid construction is the determination of optimal concentrations of these selection markers for their direct use in transfected *B. divergens* bovine erythrocyte cultures. To fulfill this task, we have recently introduced and optimized the technique of rapid parasitemia levels detection by flow cytometry analysis.

The recipient locus for DiCre cassette has already been selected based on the communication with Dr. Collins (research group of Dr. Blackman, Francis Crick Institute, London, UK) who is one of the major team members behind the introduction of the DiCre system to *P. falciparum* (Collins et al. 2013 Mol Microbiol). The most recent experimental design protocol employs the putative *Bd-6cys-E* gene (Bdiv\_04560c) displaying high homology with the *P. falciparum p230p* gene (PF3D7\_0208900) that has been used as stable recipient locus for the DiCre cassette in this malaria parasite. Moreover, targeted disruption of *B. bovis Bbo-6cys-E* gene (BBOV\_II006600), an orthologue of Bdiv\_044560c and PF3D7\_0208900 genes, indicated its dispensability for parasite blood stages. The design of construct for the generation of parental DiCre recombinase-expressing *B. divergens* lineage is depicted in Figure 1.



**Figure 1. Establishment of the inducible knock-out DiCre system in *B. divergens*.**

Schematic representation of the selected strategy to develop the parental *B. divergens* DiCre line. Bdiv\_044560c gene represents the recipient locus for rapamycin-binding FKBP-Cre59 and FRB-Cre60 proteins under the control of inserted *B. divergens*-specific promoters. HR1 and HR2 represent homologous regions, i5'UTR = inserted promoter; e5'UTR = promotor of the endogenous *B. divergens* gene.

## 7. Outline of research achievements

- *B. divergens* selected as the model *Babesia* species
- *B. divergens*-specific promoters identified and sequenced
- *B. divergens*-specific 3' untranslated regions identified and sequenced
- Flow cytometry protocol for parasitemia determination optimized for *B. divergens*
- Blasticidin-S-Deaminase (BSD) and WR99210 selection markers validated for *B. divergens*
- Optimal selection marker concentrations determination for their use in *B. divergens* cultures in progress
- Recipient locus for DiCre cassette selected
- Final plasmid construct for the generation of parental DiCre *B. divergens* lineage designed and under construction (cloning)

## 8. Publication of research achievements

Publications from this project should await future collaboration between the two groups. The two team members gave two seminar talks during their visit to NRCPD, OBIHIRO: Jalovecká et al.: Establishment of Babesia laboratory model and its experimental application; Sojka et al.: Proteolytic targets in ticks and tick-borne diseases.

Attach reference materials as necessary.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 4 月 30 日

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                        |        |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------|
| 採択番号    | 2019-共同-3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |        |
| 研究部門    | 診断治療研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 原虫病研究センター<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 所属部局等・職名               |        |
|         | あさだ まさひと<br>麻田 正仁                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 長崎大学熱帯医学研究所・助教         |        |
| 研究分担者   | かねこ おさむ<br>金子 修                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 長崎大学熱帯医学研究所・教授         |        |
|         | やはた かずひで<br>矢幡 一英                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 長崎大学熱帯医学研究所・助教         |        |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                        |        |
|         | 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    | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                        |        |
| 目的・趣旨   | <p><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殆ど接着しない原虫株を樹立し、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-1α</i> 配列に違いがあることを明らかにした。前年度は高接着株の <i>ves-1α</i> を過剰発現する原虫を各種作出し、その細胞接着性の変化を解析したが、組換え原虫株では予想された細胞接着性の上昇は見られなかった。そこで、今年度は、発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座をノックアウトすることで細胞接着性が失われるか解析を行い、その後、血管内皮細胞接着に関わる <i>ves-1α</i> 領域の決定を行い、原虫側のリガンド同定を行うとともに、血管内皮細胞側レセプターの同定に着手することを目的としている。</p> |                        |        |
| 研究経過の概要 | <p>昨年度の共同研究により推定された、発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の遺伝子破壊を試み、組換え原虫を得ることができたが、PCR により遺伝子座の破壊までは確認できなかった。得られた組換え原虫を用い、ウシ脳毛細血管内皮細胞を用いた接着試験を行い、一部の株では接着性の低下がみられたが、接着性の低下がみられない株もあり、結論を下すには破壊を試みた遺伝子座の状況や <i>ves-1</i> の発現状況などさらなる解析が必要である。</p> <p>さらに、昨年度とは異なる <i>ves-1α</i> を過剰発現する原虫を作製し、血管内皮細胞高接着株で発現している <i>ves-1α</i> を安定して過剰発現する原虫を得た。本組換え原虫について、今後血管内皮細胞接着試験を行う予定である。</p>                                                                                                                                                      |                        |        |



|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究成果の概要 | <p>・<i>ves-1</i> 遺伝子座破壊の試み</p> <p>次世代シーケンスによるゲノム・トランスクリプトーム解析により、第 2 染色体サブテロメア領域に存在する <i>ves-1</i> 遺伝子が発現していると推定された。そこで、当該遺伝子座に存在する <i>ves-1</i> <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> 配列を破壊するプラスミドコンストラクトを作製し、血管内皮細胞高接着株(C1, C3)、低接着株(C2, C5)に遺伝子導入を行った。薬剤選択の後それぞれの株について蛍光マーカートンパク質(GFP)を発現する株が得られた。得られた遺伝子導入株のクローニングを行い、遺伝子の破壊を PCR により確認しようとしたが、確認できなかった。遺伝子破壊領域が長く、遺伝子座に <i>ves</i>, <i>smorf</i>をはじめとする多数の多重遺伝子があることが原因と考えられる。そこで、得られたクローンを用い、血管内皮細胞への接着性を確認することとした。接着性試験を行った結果、高接着株由来のそれぞれ 2 クローンでは、C1 由来の C1-B6 は接着性低下、C1-B8 は接着性上昇、C3 由来の C3-E4, C3-C7 は接着性低下と、3 クローンは予想通り接着性の低下がみられたが、1 クローンは逆に接着性上昇がみられた。一方、低接着株由来のクローンでは、概ね接着性は低いままであったが、C5 由来の C5-F11 クローンでは若干接着性の上昇がみられた。今後遺伝子座の破壊状況、遺伝子導入後の <i>ves-1</i> の発現状況の精査が必要である。</p> <p>・<i>ves-1</i> 遺伝子過剰発現原虫の作製</p> <p>昨年度は主にエピソード上で <i>ves-1</i> (<math>\alpha</math> ないし <math>\beta</math>) を過発現させる実験を行ったが、<i>ves-1</i> の過発現が安定しない、<i>ves-1</i> に蛍光マーカートンパク質を融合させて発現させたが、蛍光マーカートンパク質自体が <i>ves-1</i> の赤血球側輸送や細胞接着性に影響を与えている可能性が否定できなかった。そこで、本年度は myc 配列を融合した <i>ves-1</i> <math>\alpha</math> 遺伝子を <i>ef-1</i> <math>\alpha</math> 遺伝子座に挿入する形で、<i>ves-1</i> <math>\alpha</math> 過発現原虫の作製を試みた。その結果、血管内皮細胞低接着株 C2 株に高接着株 C3 の <i>ves-1</i> <math>\alpha</math> を過発現させた原虫株が得られた。<i>ef-1</i> <math>\alpha</math> 遺伝子座への発現コンストラクトの挿入は PCR によって確認され、<i>ves-1</i> <math>\alpha</math> の過発現は抗 myc 抗体を使用した間接蛍光抗体法、ウェスタンブロット法にて確認された。得られた株をクローニング後も安定して <i>ves-1</i> <math>\alpha</math> の過発現が観察されているため、今後本原虫について血管内皮細胞接着試験を行う予定である。</p> |
| 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 2 年 5 月 25 日

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                             |       |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------|
| 採択番号    | 2019-共同-4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                             |       |
| 研究部門    | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員                                      | 西川 義文 |
| 研究課題名   | 高免疫応答型多価ウイルス様粒子を用いた原虫感染症治療用ワクチン<br>開発基盤技術の構築                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                             |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 所属部局等・職名                                                    |       |
|         | ばく よんす<br>朴 龍洙                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 静岡大学・グリーン科学技術研究所教授                                          |       |
| 研究分担者   | じょ けん<br>徐 剣                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 静岡大学・グリーン科学技術研究所学術研究員<br>( <i>N. caninum</i> の抗原提示 VLP の作製) |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                             |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                             |       |
|         | にしかわ よしふみ<br>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    | 2019 年 5 月 9 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                             |       |
| 目的・趣旨   | <p>ウイルス様粒子(virus-like particle, VLP)は、近年有望なワクチン素材として期待されている。本申請者は、これまで、カイコを用いてウイルスと同様の構造を持つ VLP の作製に成功した(Deo et al., J. Biotechnol., 165, 69–75, 2013; Tsuji et al., J. Biotechnol., 155, 185–192, 2011)。既に原虫による感染症のモデルとして、ネオスポラ原虫を研究対象にして3種類の抗原を同定し(Otsuki et al., Vet. Parasitol., 192: 284–287, 2013)、バキュロウイルスへの提示に成功した(Kato et al., Mol. Biotechnol., 57, 145–154, 2015)。本研究では、ウシネオスポラ症をターゲットとして、多価 VLP ワクチンを作製し、感染症防御試験により実証する。最終的には、鶏卵を用いるワクチン製造法では不可能であった高免疫応答型 VLP ワクチンをカイコで大量かつ安価に製造する基盤を世界に先駆けて確立することを目指す。</p>                                                                                |                                                             |       |
| 研究経過の概要 | <p>1.VLP の作製(静岡大学):VLP の骨格として、<i>Canine parvovirus</i> の構造タンパク質 Viral Protein 2 (VP2)を用いた。VP2 は、カイコで発現し、精製すると直径 20–25 nm の VLP を形成する(透過型電子顕微鏡による検証済)。VLP 上への抗原提示には <i>Streptococcus pyogenes</i> が持つフィブロネクチン結合タンパク質から発見された SpyTag (ST) /SpyCatcher (SC) 共有結合システムを利用した(Xu et al., Int. J. Mol. Sci., 20, e4228, 2019)。本研究では、分泌タンパク質 Profilin (PROF)(Suhaimi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 522, 8–13, 2020) 及び、<i>Neospora caninum</i> の近縁種である <i>Toxoplasma gondii</i> の同ファミリーに属する <i>N. caninum</i> 由来の Toxofilin (TOXO)を VLP の表面に提示する抗原の候補とし、ST/SC 共有結合システムが高免疫応答型 VLP ワクチンとしての可能性を検証した。</p> |                                                             |       |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | <p>2.マウスで感染阻害試験におけるネオスポラ症に対するワクチンとしての評価(原虫病研究センター西川教授との共同研究): 動物実験は、対照群(PBS と提示無しの VLP)とワクチン接種群を分けて、6 週齢の BALB/c マウスで行った。腹腔内にワクチン約 100 µg を接種し、2週目の計2回接種した。体液性免疫の誘導について、3週目にそれぞれの試験群から採血した。4週目に <i>N. caninum</i> 原虫による攻撃実験を行い、9週目に採血(特異抗体の生産)、脳の摘出(Real-time PCR 法より原虫の増幅)、並びに臨床観察(体重や生存率)を行い、ワクチンとしての効果をそれぞれ検証し、原虫の侵入を効果的に防御できるかどうかを定量化した。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 研究成果の概要 | <p>カイコで作製した VLP は、透過型電子顕微鏡及び動的光散乱による解析の結果、ST-VP2 は自己集合により直径 20–45 nm の円形の VLP を形成した。免疫電研の解析では VLP 表面の一部で ST の提示が確認できた。PROF と TOXO は、ST-VP2 との共有結合により、分子量のシフトが確認され、VLP 表面への提示を示唆した。</p> <p>動物試験において、抗原を注射後 3 週目に回収したマウス血清からそれぞれの抗原に対する特異的抗体反応が確認され、抗原に対する免疫は誘導された。</p> <p><i>N. caninum</i> 原虫による攻撃実験の結果、マウスの生存率は、対照群では 100%に対し、PROF 群では 67%、TOXO 群では 83%であった。抗原提示しなかった VLP 群の場合、67%が死亡した。原虫攻撃試験後の臨床観察結果、対照群に比べワクチン接種群では、明らかに体重減少や臨床症状の悪化が見られた。</p> <p>マウス脳内原虫量を RT-PCR で調べたところ、対照群とワクチン接種群とで脳内原虫量に有意差が見られなかった。</p> <p>以上のことから、ST/SC 共有結合システムによる PROF と TOXO の提示 VLP は、免疫誘導は可能であり、ある程度ネオスポラ症に対する防御効果が見られたものの、対処群との差がなく、更なる検証が必要である。今後、ネオスポラ感受性マウスの使用や接種サンプルを再度調整し、動物実験の見直しを検討する必要がある。</p> |
| 研究成果の発表 | <p>関口智史、徐剣、西川義文、Abdou Ahmed、朴龍洙、<i>Neospora caninum</i> 由来の Toxofilin タンパク質のワクチン効能に関する研究、第 88 回 日本寄生虫学会大会 (2P-23)、2020 年 5 月 30～31 日、帯広畜産大学原虫病研究センター。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 11 日

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                              |       |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------|
| 採択番号  | 2019-共同-5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                              |       |
| 研究部門  | 診断治療研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 原虫病研究センター<br>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由来抗トリパノソーマ活性化化合物をシーズとした<br>派生化合物の合成・探索と構造活性相関及び細胞毒性の検討                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                              |       |
| 研究代表者 | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 所属部局等・職名                                                     |       |
|       | むらた としひろ<br>村田 敏拓                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 東北医科薬科大学・薬学部・講師<br>(役割分担) オキサゾール、リグナンの探索、モンゴル国調査             |       |
| 研究分担者 | なりた こういち<br>成田 紘一                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 東北医科薬科大学・薬学部・助教<br>(役割分担) オキサゾールの化学合成                        |       |
|       | ブヤンヒシグ<br>Buyankhishig B.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 東北医科薬科大学学生薬学教室・博士課程(後期)大学院生<br>(役割分担) オキサゾール、リグナンの探索、モンゴル国調査 |       |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                              |       |
|       | 菅沼 啓輔                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 帯広畜産大学原虫病研究センター<br>(役割分担) 抗トリパノソーマ活性試験、動物実験                  |       |
| 研究期間  | 2019 年 4 月 4 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                              |       |
| 目的・趣旨 | <p>H28-30 年度の本共同研究で、モンゴル国薬用植物由来化合物の抗トリパノソーマ活性スクリーニングを行った。結果として医薬シーズとしても有力視されるオキサゾールアルカロイド類 (<i>J. Nat. Prod.</i>, 2016, 79, 2933-2940) とアシル化リグナン類 (<i>J. Nat. Prod.</i> 2019, 82, 774-784) を <i>T. congolense</i> に対する活性化化合物として見出した。特に活性オキサゾールは合成化学専門家の成田紘一博士により複数成分の化学合成が実現した。合成物による抗トリパノソーマ活性試験により、<b>1.</b> 天然から得た成分と同一構造の合成物で活性の再現性がとれたこと、および <b>2.</b> オキサゾール骨格を有する化合物の抗トリパノソーマ活性の発現と強さの鍵はフェニル基上の官能基の数と構造にあることが推測された。</p> <p>上記の中でとりわけ本グループで着目したのが「派生物 <b>A</b>」である。本化合物は活性オキサゾールの水酸基が化学的に置換されたものであるが、<i>Trypanosoma congolense</i> に対する高い阻害活性を維持したまま、著しく細胞毒性が低下している点を見出した。同様にリグナン類もアシル基や水酸基の有無により活性に大きな違いが見られることをこれまでの共同研究で明らかにしている。</p> <p>そこで本申請では <b>I.</b> オキサゾールを対象に多様性をもたせた化合物群を化学合成し、また <b>II.</b> これまで当グループで見出してきた活性化化合物と同様の骨格を有する化合物を天然からも探索する。続いて、<b>I</b> と <b>II</b> で得た化合物の構造活性相関と細胞毒性を随時評価することで構造最適化を図り、共同研究発の創薬を狙った安全性の高い化合物を提案することを目的とする。</p> |                                                              |       |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p><b>I.</b> 目的で述べた天然由来オキサゾールの構造を参考に 2,5-ジフェニルオキサゾール、並びに類似の基本骨格を持った化合物群を化学合成した(成田)。</p> <p><b>II.</b> これまで当グループで見出し報告してきた抗トリパノソーマ活性化合物と同様の骨格を有する化合物を継続的に探索した (Buyankhishig、村田)。</p> <p>1. <i>Oxytropis lanata</i> 地上部の成分研究<br/>         活性オキサゾールが単離されたモンゴル国マメ科植物 <i>Oxytropis lanata</i> 根部に続き、本植物の地上部についても関連化合物が得られないかと考え、成分探索を進めた。</p> <p>2. <i>Artemisia sieversiana</i> の成分研究<br/>         モンゴル国キク科植物 <i>Artemisia sieversiana</i> からこれまでの抗トリパノソーマ活性スクリーニングの結果から着目しているリグナン類、フラボノイド類、テルペノイド類の探索を行った。</p> <p><b>III.</b> 上記の <b>I</b> と <b>II</b> で得た化合物について随時、5 種類の病原性トリパノソーマ <i>Trypanosoma congolense</i>, <i>T. brucei brucei</i>, <i>T. evansi</i>, <i>T. b. rhodesiense</i>, <i>T. b. gambiense</i> に対して抗トリパノソーマ活性を評価した。<br/>         また細胞毒性 (MDBK ウシ腎臓細胞株) を評価した (菅沼)。</p> |
| 研究成果の概要 | <p>1. <i>Oxytropis lanata</i> 地上部の成分探索の結果、サポニン、フラボノイド類を中心とした 36 種類の化合物を単離構造決定した。抗トリパノソーマ活性を評価したところ、1 種類のフラボノイドが活性化合物として明らかになった。また炎症性疾患に用いるとの伝承に基づき、抗ヒアルロニダーゼ阻害活性を評価し新規サポニンを活性化合物として明らかにした。(原著論文 1)</p> <p>2. <i>Artemisia sieversiana</i> の成分探索の結果、新規セスキテルペノイドを含む合計 23 種類の成分を単離構造決定した。特にセスキテルペノイドについてはX線結晶構造解析や NOE スペクトルによって立体配置まで決定した。抗トリパノソーマ活性試験の結果、リグナン類とフラボノイド類に活性を認め、この結果はこれまで注目してきたリグナン類の構造活性相関に知見を添えるものであった。(論文投稿中)</p> <p>3. 以上の成果と合成化合物による構造活性相関評価による構造最適化を図り、共同研究発の創薬を狙った安全性の高い化合物を提案するために特許申請と論文投稿に向けて進めている(2020 年度共同研究課題として進行中)。</p>                                                                                                                                                                                                                                  |
| 研究成果の発表 | <p>&lt;原著論文&gt;<br/>         1) Hyaluronidase inhibitory saponins and a trypanocidal isoflavonoid from the aerial parts of <i>Oxytropis lanata</i>, Buyanmandakh Buyankhishig, Toshihiro Murata, Keisuke Suganuma, Javzan Batkhuu, Kenroh Sasaki. 2020, <i>Fitoterapia</i>, in press.<br/>         DOI: <a href="https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104608">https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104608</a></p> <p>&lt;学会発表&gt;<br/>         1) モンゴル国有用植物 Yargui: <i>Pulsatilla flavescens</i> 花の成分薬効研究。<br/>         村田 敏拓、菅沼 啓輔、Tserendorj Munkhjargal、Bumduuren Tuvshintulga、Buyanmandakh Buyankhishig、Dorj Ganchimeg、Badarch Batbold、Bekh-Ochir Davaapurev、五十嵐郁男、Dulamjav Batsuren、Javzan Batkhuu、佐々木 健郎。日本薬学会第 140 年会、2020 年 3 月、京都(紙上開催)。</p>                             |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和2年5月18日

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                        |       |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------|
| 採択番号    | 2019-共同-6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                        |       |
| 研究部門    | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 原虫病研究センター<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 所属部局等・職名               |       |
|         | いかだい ひろみ<br>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<br>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    | 2019年4月1日 ～ 2020年3月31日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                        |       |
| 目的・趣旨   | <p>マラリア原虫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期は、生活環において宿主環境が変化する事にもない原虫の形態を劇的に変化させる。さらに、生存する原虫数が最も減少する時期であることから、原虫の生き残りにとって非常に重要なステージであると推察される。そのオーシスト形成時において、原虫は媒介蚊との相互作用により、オーシスト壁(殻)という特殊な構造物を形成するが、その詳細については不明な点が多い。</p> <p>本共同研究では、オーカイネートからオーシスト形成期への分化、特にマラリア原虫のオーシスト壁形成に着目して、壁に関する新たな生物学的特徴を明らかにするため、オーシスト形成機構の解明を目的とした。</p>                                          |                        |       |
| 研究経過の概要 | <p>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局在や動態および機能解析、③遺伝子組み換え技術を用いた遺伝子欠損(KO)原虫作製などを行い、それら表現型の解析、④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た。</p> <p>その結果、候補遺伝子の一つがコードする蛋白質(PbCap184)は、オーシスト内部においてスポロゾイトが形成されてから蚊の唾液腺へ移行するまでに機能する蛋白質であると推察された。もう一つの蛋白質(PbCap494)は、オーカイネートの細胞膜表面にも存在し、オーシスト壁構成蛋白質としての機能と、中腸腔内から中腸細胞基底膜下へのオーカイネートの移動に関わる運動性機能をもっていることが示唆された。</p> |                        |       |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p>候補遺伝子 PbCap184 について 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、スポロゾイト期において発現しないとされる msp-9 プロモーターに置き換えた conditional KO 原虫 (以下 cdKO) を作製し、リアルタイム PCR を用いて各ステージでの mRNA の発現解析を行った。スポロゾイト期では、cdKO 原虫は野生型 (WT) 原虫の半分の発現であった。吸血後 28~30 日目に蚊の唾液腺を摘出し、蚊 1 匹の唾液腺あたりのスポロゾイト形成数を測定したところ、cdKO 原虫のスポロゾイト数は、WT 原虫の 27% となり明らかに減少していた。またスポロゾイト有している蚊を未感染マウスに吸血させたところ、cdKO 原虫のスポロゾイトはマウスに感染しなかった。以上、本遺伝子がコードする蛋白質は、オーシスト内部においてスポロゾイトが形成されてから蚊の唾液腺へ移行するまでに機能する蛋白質であると推察された。</p> <p>もう一つの候補遺伝子 PbCap494 については、KO 原虫と WT 原虫のオーカイネートを培養し、その運動性について比較検討を行ったところ、明らかに移動速度が低下した。次に、その候補蛋白質に対する抗体を作製し、オーカイネートと反応させたところ、抗体によってオーカイネートの運動性が明らかに抑制された。以上、本蛋白質はオーカイネートの細胞膜表面にも存在し、オーシスト壁構成蛋白質としての機能と、蚊の中腸腔内から中腸細胞基底膜下へのオーカイネートの移動に関わる運動性機能をもっていることが示唆された。</p> |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <p>(2019 年学会発表)<br/>中山和彦、北原優、木村勇太、箱崎純、福本晋也、筏井宏実<br/><i>Plasmodium berghei</i> の PbCap494 タンパク質は ookinete の移動運動に関与する<br/>第 162 回 日本獣医学会学術集会</p> <p>大場裕輔、曾賀 晃、福本晋也、筏井宏実<br/><i>Plasmodium berghei</i> Cap184 は蚊体内における唾液腺スポロゾイトの数に影響する<br/>第 65 回 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会</p> <p>中山和彦、北原優、木村勇太、箱崎純、曾我晃、福本晋也、筏井宏実<br/>ネズミマラリア原虫 PbCap494 はオーカイネートの運動性およびオーシスト壁形成に関与する<br/>第 42 回 日本分子生物学会</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和2年5月15日

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                  |       |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------|
| 採択番号  | 2019-共同-7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                  |       |
| 研究部門  | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員           | 福本 晋也 |
| 研究課題名 | 臨床応用を目指したアデノ随伴ウイルスを用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの開発研究                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                  |       |
| 研究代表者 | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 所属部局等・職名                         |       |
|       | いより みつひろ<br>伊従 光洋                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授               |       |
| 研究分担者 | よしだ しげと<br>吉田 栄人                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授                |       |
|       | もはまど しゃなじ<br>Mohammad<br>Shanaij                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科創薬科学専攻・<br>大学院生 |       |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                  |       |
|       | ふくもと しんや<br>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  | 2019年4月1日 ～ 2020年3月31日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                  |       |
| 目的・趣旨 | <p>アデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus; AAV)は、近年、遺伝子治療用のベクターシステムとして広く利用されているウイルスベクターであるが、ワクチンベクターとしての報告例は少ない。AAV は非病原性かつ抗原発現持続性に優れているため、安全で有効性の高いマラリアワクチンベクターに応用できると考えられる。本研究では、熱帯熱マラリア原虫抗原を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを開発し、強力な免疫応答を誘導するアデノウイルスベクター(Ad)との Heterologous Prime-Boost 免疫法を行うことで、そのワクチン効果を調査することを目的とした。マラリア抗原として、スポロゾイト期抗原 PfCSP とオオキネート期抗原 Pfs25 を標的とし、作製したワクチンの感染防御効果ならびに伝搬阻止効果をマウスモデルで評価した。</p> |                                  |       |



|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p><b>アデノ随伴ウイルス(AAV)とアデノウイルス(Ad)を用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの作製</b></p> <p>AAV 血清1型(AAV1)、AAV5、AAV8 ならびに Ad ベクターのそれぞれを用いて、熱帯熱マラリア原虫の感染防御抗原 PfCSP と伝搬阻止ワクチン抗原 Pfs25 とを融合発現する2価ワクチンを構築し大量精製した。</p> <p><b>マラリアチャレンジ感染実験</b></p> <p>(i)プライム・ブースト免疫法:Ad 初回免疫/AHV1 追加免疫の順でマウスに筋肉内接種し、PfCSP 発現型遺伝子組換えネズミマラリア原虫によるチャレンジ感染試験を行った。並行して液性免疫応答ならびに細胞性免疫応答を解析し、ワクチンの有効性を評価した。</p> <p>(ii)プライム・ターゲット免疫法:マウスに Ad 筋肉内接種/AHV8 静脈内投与を行い、上記と同様の感染実験で有効性を評価した。</p> <p><b>マラリア伝播阻止実験</b></p> <p>(i) Direct feeding assay:Ad 初回免疫/AHV 追加免疫の順でマウスに筋肉内接種し、感染血を投与後にハマダラカに吸血させ伝搬阻止効果を判定した。</p> <p>(ii) Membrane feeding assay:上記のチャレンジ感染実験で感染防御効果を示したマウスから血清を採取し、英国研究協力者 Dr. Blagborough に試料を送付した。熱帯熱マラリア原虫感染血を用いて伝搬阻止効果を判定予定である。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 研究成果の概要 | <p><b>AAV と Ad を用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの作製</b></p> <p>Pfs25-PfCSP 融合タンパクを発現するAd、AAV1、AAV5 ならびに AAV8 の各種ベクターの構築、精製に成功した。それぞれのウイルスベクターを培養細胞に導入すると、Pfs25 ならびに PfCSP が細胞表面に共局在して発現した。</p> <p><b>マラリアチャレンジ感染実験</b></p> <p>(i)プライム・ブースト免疫法:Ad/AAV1 を基盤とした2価ワクチンをマウスに筋肉内接種し PfCSP 発現型組換え原虫 PfCSP/Pb スポロゾイトによるチャレンジ感染試験を行なった結果、57%～100%の感染防御効果を示した。抗 Pfs25 抗体価と抗 PfCSP 抗体価は免疫1ヶ月後でそれぞれおよそ 200 万倍と 500 万倍であり、共に上昇した。さらに経時変化を調査したところ、抗 Pfs25 抗体価と抗 PfCSP 抗体価は免疫9ヶ月後でそれぞれおよそ 40 万倍と 100 万倍であり、ピークから緩やかに減少したものの非常に高い抗体価を維持した。</p> <p>(ii)プライム・ターゲット免疫法:肝臓指向性 AAV8 ベクターを筋肉内接種と静脈内投与し、感染防御効果を比較した。筋肉内接種マウスでは感染防御効果は 60%であったが、静脈内投与の場合 100%の完全感染防御効果が示された。</p> <p><b>マラリア伝播阻止実験</b></p> <p>(i) Direct feeding assay:赤血球期の Pfs25 発現型組換え原虫 PbPfs25DR3 を Ad/AAV1 免疫マウスに感染させた後、直接ハマダラカに吸血させ、蚊にマラリア原虫が伝播するか評価した。対照群に比較した伝播阻止効果は免疫1ヶ月後で90%以上、免疫9ヶ月後で 80%以上であり、いずれの場合でも平均オオシスト数は 99%抑制された。</p> <p>(ii) Membrane feeding assay:Ad/AAV1 ワクチン免疫によって得られた血清(抗 Pfs25 抗体値&gt;平均 100 万倍)を英国に送付済みであり、熱帯熱マラリア原虫感染血を用いて伝搬阻止効果を判定予定である。</p> |

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究成果の<br>発 表 | <p>【原著論文】</p> <p>1. Yusuf Y, Yoshii T, <u>Iyori M</u>, Mizukami H, <u>Fukumoto S</u>, Yamamoto DS, Emran TB, Amelia F, Islam A, Syafira I, <u>Yoshida S</u>. A Viral-Vectored Multi-Stage Malaria Vaccine Regimen With Protective and Transmission-Blocking Efficacies. <i>Front Immunol.</i>, 10:2412, 2019.</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. ○<u>伊従光洋</u>、Yenni Yusuf、吉井達也、<u>Mohammad Shahnij</u>、水上浩明、福本晋也、吉田栄人. 臨床応用を目指したアデノ随伴ウイルスを用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの開発研究. 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究成果報告会 帯広, 2020.2.13.</p> <p>2. ○<u>Mitsuhiro Iyori</u>, Fitri Amelia, Yenni Yusuf, Daisuke S. Yamamoto, <u>Shinya Fukumoto</u>, Kunitaka Yoshida, Kento Genshi, Tatsuya Yoshii, Hiroaki Mizukami, <u>Shigeto Yoshida</u>. The mechanism of PfCSP-based malaria vaccines and its application to the viral vectored vaccine platform. 17th International Congress of Immunology 北京, 2019.10.19-23.</p> <p>3. ○<u>伊従 光洋</u>, 小川 良平, 新倉 保, Talha Bin Emran, 丹保 秀太, 井上 信一, 小林富美恵, <u>吉田 栄人</u>. バキュロウイルス筋肉内接種による肝臓期マラリア原虫の殺傷と遺伝子発現解析. 第 75 回日本寄生虫学会西日本支部大会 金沢, 2019.9.21-22.</p> <p>4. ○大塚 広夢, <u>伊従 光洋</u>, <u>吉田 栄人</u>. ウイルスベクターと組換えタンパクを用いた PfCSP マラリアワクチンによる免疫応答の多様性. 第 75 回日本寄生虫学会西日本支部大会 金沢, 2019.9.21-22.</p> <p>5. ○<u>Mohammad Shahnaij</u>, <u>Mitsuhiro Iyori</u>, Ashekul Islam, Intan Syafira, Iroha Yamagoshi, Mayu Kajino, <u>Shigeto Yoshida</u>. Liver-directed AAV8 vaccine expressing PfCSP elicits complete protection against sporozoite challenge. 第 75 回日本寄生虫学会西日本支部大会 金沢, 2019.9.21-22.</p> <p>6. ○Yenni Yusuf, Tatsuya Yoshii, <u>Mitsuhiro Iyori</u>, Hiroaki Mizukami, <u>Shigeto Yoshida</u>. A two-dose multi-stage malaria vaccine regimen elicits protection and blocks parasite transmission. 第 75 回日本寄生虫学会西日本支部大会 金沢, 2019.9.21-22.</p> <p>7. ○<u>Mitsuhiro Iyori</u>, Fitri Amelia, Kento Genshi, Yutaro Onoue, Talha Bin Emran, <u>Shigeto Yoshida</u>. Full-length <i>Plasmodium falciparum</i> circumsporozoite protein administrated with Imject Alum elicits complete protection in mice against the transgenic <i>P. berghei</i> sporozoites. PROTEIN ISLAND MATSU-YAMA 2019 松山, 2019.9.10-11.</p> |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 4 月 24 日

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                        |       |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------|
| 採択番号    | 2019-共同-8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |       |
| 研究部門    | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員 | 白藤 梨可 |
| 研究課題名   | フタトゲチマダニの胚発生における抗酸化分子の発現プロファイルの作成                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                        |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 所属部局等・職名               |       |
|         | たなか てつや<br>田仲 哲也                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 鹿児島大学 共同獣医学部・教授        |       |
| 研究分担者   | へるなんですえまにゆえるぼつしや<br>Hernandez<br>Emmanuel Pacia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 山口大学・大学院連合獣医学研究科・4年    |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                        |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                        |       |
|         | しらふじ りか<br>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    | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                        |       |
| 目的・趣旨   | <p>マダニにとって必須の生存基盤が宿主動物からの吸血・消化にあり、血液消化産物中に含まれるヘムの代謝過程で大量の鉄や過酸化物がマダニ体内に放出される。鉄や過酸化物から被る酸化ストレスへの応答は、吸血や産卵を左右する重要な機構である。マダニ生存基盤である吸血における酸化ストレス応答は卵にも影響し、その酸化ストレス応答には抗酸化分子が関与している可能性が考えられる。我々はその重要な機構を担う抗酸化分子として、フェリチンとグルタチオン S トランスフェラーゼに着目し、卵形成および胚発生における両者の遺伝子・タンパク質の発現を、胚発生のステージごとに検証した。また、酸化ストレス産物であるマロンジアルデヒドを測定することによって、胚発生における酸化ストレスを評価した。</p>                                                                                                                                                                                                         |                        |       |
| 研究経過の概要 | <p><b>【背景】</b>マダニは人獣共通感染症を含む様々な疾病を媒介する吸血性節足動物である。マダニによる感染症を制御するためには、その生体機能の解明が不可欠である。しかし、マダニ胚発生における胚の形態や抗酸化分子の発現動態は、いまだ不明な点が多い。我々は、抗酸化分子であるグルタチオン S トランスフェラーゼ(GST)とフェリチン(FER)に着目し、フタトゲチマダニの胚発生における両者の遺伝子・タンパク質の発現を、胚発生のステージごとに検証した。また、酸化ストレス産物であるマロンジアルデヒド(MDA)を測定することによって、胚発生における酸化ストレスを評価した。</p> <p><b>【材料と方法】</b>卵は産卵から 5 日ごとにサンプリングを行い、それぞれを Day1、Day5、Day10、Day15、Day20 とした。各ステージの胚を、DAPI を用いて核染色をした後、蛍光顕微鏡で観察した。これらの卵からトータル RNA を抽出し、cDNA を合成した。続いて、リアルタイム PCR を実施し、GST と FER 遺伝子の発現量を定量した。また、ホモジナイズした卵からタンパク質を抽出した後、ウェスタンブロッティングにより、GST と FER タ</p> |                        |       |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|         | <p>ンパク質の発現量を調べた。さらに、TBARS アッセイを実施して、卵の中に含まれるMDAの濃度を測定した。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 研究成果の概要 | <p><b>【結果と考察】</b>マダニ胚の各ステージについて、蛍光顕微鏡を用いて観察した結果、発生初期において卵黄周囲に胚細胞の増殖がみられ、発生の進行に伴って、脚の伸長、顎体部ならびに腹部の形成が観察された。</p> <p><i>GST</i> 遺伝子は Day1、次いで Day10 に多く発現していることが確認された。<i>GST</i> タンパク質の発現量は、Day1 から Day15 にかけて増加傾向を示した。また、TBARS アッセイの結果、胚発生の進行に伴い、MDA の増加が確認された。これらの結果から、胚は発生の過程において、持続的な酸化ストレスに曝露されており、<i>GST</i> 発現量の増加が、酸化ストレスの処理に関与していることが示唆された。</p> <p>一方、細胞内型である <i>FER1</i> ならびに分泌型である <i>FER2</i> 遺伝子は、Day1、Day5 において発現量が低く推移し、Day10 以降、発現量の増加が確認された。また、<i>FER1</i> タンパク質の発現は、全てのステージにおいて確認されなかった。この理由として、<i>FER1</i> の mRNA には iron-responsive element(IRE)と呼ばれる構造が存在しており、iron-regulatory protein(IRP)が鉄欠乏下において IRE に結合して、タンパク質の翻訳を制御していることが考えられた。従って、胚に含まれる鉄濃度は低濃度であることが推測された。対照的に、<i>FER2</i> 遺伝子の発現量が Day1、Day5 において非常に低いにも関わらず、<i>FER2</i> タンパク質は全てのステージで確認された。そのため、雌成ダニに存在する <i>FER2</i> タンパク質が、卵に移行していることが予想された。</p> <p><b>【結論】</b>本研究では、フタゲチマダニの胚発生における胚の形態と、<i>GST</i> ならびに <i>FER</i> の発現動態について明らかにした。胚発生において、<i>GST</i> は、発現量の増加が確認され、酸化ストレスの処理に重要な役割を担うことが示唆された。<i>FER2</i> は、遺伝子の発現量が低いにも関わらず、タンパク質の発現が確認されたことから、胚発生における鉄輸送に寄与していることが予想された。</p> |
| 研究成果の発表 | <p><b>【学会発表】</b><br/>島崎 慧, <u>Emmanuel Pacia Hernandez</u>, 新原博子, 藤崎幸蔵, <u>田仲哲也</u>, フタゲチマダニ胚発生における抗酸化分子の発現動態, 第 27 回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー, 上天草総合病院, 2019 年 5 月(熊本)</p> <p><b>【論文発表】</b><br/><u>Emmanuel Pacia Hernandez</u>, Kei Shimazaki, Hiroko Niihara, <u>Rika Umemiya-Shirafuji</u>, Kozo Fujisaki, <u>Tetsuya Tanaka</u>, Expression analysis of glutathione S-transferases and ferritins during the embryogenesis of the tick <i>Haemaphysalis longicornis</i>. Heliyon 6 (3): e03644. (2020)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

# 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 31 日

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |       |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------|
| 採択番号  | 2019-共同-9                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                        |       |
| 研究部門  | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員 | 西川 義文 |
| 研究課題名 | 抗トキソプラズマ薬を脳内に送達するためのドラッグデリバリーシステムの開発                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                        |       |
| 研究代表者 | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 所属部局等・職名               |       |
|       | とけし まなぶ<br>渡慶次 学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 北海道大学大学院工学研究院応用化学部門・教授 |       |
| 研究分担者 | まえき まさとし<br>真栄城 正寿                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 北海道大学大学院工学研究院応用化学部門・助教 |       |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |       |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                        |       |
|       | にしかわ よしふみ<br>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  | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                        |       |
| 目的・趣旨 | <p>本研究は、抗トキソプラズマ薬を脳内に送達するためのドラッグデリバリーシステム (DDS)を開発することを目的とする。</p> <p>トキソプラズマは人獣共通感染性の細胞寄生性原虫であり、ヒトでは妊婦が初感染した場合、流・死産や先天性トキソプラズマ症を引き起こすほか、エイズ患者や免疫抑制剤の投与を受けている患者にトキソプラズマ性脳炎を起こす。いくつかの治療薬が開発されているが、トキソプラズマは脳などにシストして存在するため、血液脳関門を突破して脳内に抗トキソプラズマ薬を送達することは困難である。</p> <p>申請者は、DDS への応用を目的として、マイクロ流体デバイスを利用した脂質ナノ粒子やポリマーミセルの作製に取り組んできた。薬物の送達効率、ドラッグキャリアのサイズに大きく依存するため、サイズを精密に制御できるマイクロ流体デバイス(MFD)は、次世代の DDS 用キャリア作製システムとして期待されている。申請者らが開発した MFD は、10nm のサイズ分解能で、精密に DDS キャリアを作製することができる。また、10nm の極小キャリアを作製することができることから、従来は血液脳関門の存在により送達が困難とされていた脳に薬物を送達することができる可能性がある。</p> <p>そこで本研究では、さまざまな組成・サイズのドラッグキャリアを作製し、抗トキソプラズマ薬を脳内に送達するための DDS の開発に取り組む。</p> |                        |       |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p>抗トキソプラズマ薬を脳内に送達するために、①10 nm の DDS キャリア粒子の作製、②抗トキソプラズマ薬内包粒子の作製、③作製した粒子の活性評価(in vitro、および、in vivo アッセイ)を行った。</p> <p><b>①10 nm の DDS キャリア粒子の作製</b></p> <p>脳への薬物送達が可能である 10 nm 以下のキャリア粒子を作製するために、PEG 脂質を主原料とした脂質ミセル系を選択した。PEG 脂質として DMG-PEG2K を用い、粒子の安定性と薬剤保持能を向上させるために、中性リン脂質である DSPC、および、コレステロールを用いた。粒子の作製には、申請者が開発したマイクロ流体デバイスによるエタノール注入法を用いた。まず、脂質組成が粒径に与える影響を評価した結果、PEG 脂質濃度が高いほど粒径が小さくなることが明らかとなった。総脂質濃度が 20 mM で PEG 脂質濃度が 80% (モル比) 以上の場合、流量条件に依存せずにはほぼ 10 nm の粒子が生成した。また、最小で 8 nm の粒子を作製可能であり、脳への薬物送達が可能である脂質組成を見出した。一方で、PEG 脂質濃度が 60% 以下の場合、原料溶液の流量条件によって、粒径を 10 nm～18 nm に制御できることが分かった。作製した粒子を 4℃で保管し、粒径安定性を評価した。その結果、PEG 脂質の比率が 80% の粒子は、2 週間の保存で多分散度はわずかに低下したが、平均粒径の変化は確認されなかった。</p> <p><b>②抗トキソプラズマ薬内包粒子の作製</b></p> <p>キャリア粒子への抗トキソプラズマ薬の搭載を試みた。作製した脂質ミセルは内部が疎水性のため、抗トキソプラズマ薬の中から、疎水性度が比較的高いピリメタミンを第一候補とした。一方で、ピリメタミンが脂質の溶媒であるエタノールに溶解しない可能性が考えられた。そこで、ピリメタミンの溶解度を考慮して、DMSO とエタノールの混合溶液をピリメタミン、および、脂質の溶媒とした。DMSO とエタノールの比率、ピリメタミン濃度、および、脂質濃度を最適化した結果、50%～60% エタノールを用いることで、ピリメタミンや脂質が凝集することなく、粒径 18 nm 前後でピリメタミンを内包した単分散の粒子を作製することに成功した。粒子調製時の流量をさらに高流量条件にすることで、粒子の小粒径化が期待できる。</p> <p><b>③作製した粒子の活性評価</b></p> <p>作製した粒子を蛍光色素で標識し、宿主細胞、および、原虫への取り込みを in vitro アッセイによって評価した。また、粒子自体による宿主細胞への細胞毒性の評価も並行して行った。蛍光顕微鏡による観察の結果、細胞内への取り込みは観察されなかった。また、サンプル濃度が 10% の場合は顕著な細胞毒性が確認され、PEG 脂質濃度が高い方が毒性が高い傾向にあった。PEG 脂質リッチな粒子は、細胞への取り込み効率が低下することが知られている。本研究においては、粒径制御・安定性には PEG 脂質が有効であるが、in vitro 実験の結果を踏まえて、PEG 脂質濃度を低減させるなど脂質系の最適化が必要であると考えられる。</p> |
| 研究成果の発表 | <p>Preparation of pyrimethamine encapsulated lipid nanoparticles using a microfluidic device for toxoplasmosis, Yang Yi, Masatoshi Maeki, Akihiko Ishida, Hirofumi Tani, Manabu Tokeshi, 化学系学協会北海道支部 2020 年冬季研究発表会, 2B17, 2020 年 1 月 29 日</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

# NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 25, 2020

Project no: 2019-joint-10

## 1. Principal investigator

Name: DeMar TAYLOR

Position: Professor

Affiliation: Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Japan

## 2. Project title:

Identification, Characterization and Functional Analysis of the Vitellogenin Receptor in the soft tick  
*Ornithodoros moubata*

## 3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Rika UMEMIYA-SHIRAFUJI

Position: Assistant Professor

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

April 1, 2019 to March 31, 2020 1 year

## 5. Purposes and objectives

Our laboratory investigates the hormonal and nutritional regulation of egg protein synthesis in the soft tick *Ornithodoros moubata* in order to provide better understanding of reproductive in ticks for developing better strategies to control ticks. *O. moubata* is an excellent model species to investigate reproduction as regulated by feeding and mating. Presently, we focus on the incorporation of egg proteins into the oocytes by identifying and characterizing the vitellogenin receptor of *O. moubata* (*OmVgR*). During this study, we characterized the first *OmVgR* gene, we identified previously. *OmVgR* expression during the reproductive cycle of females was analyzed from the initiation of feeding until after the peak of egg laying by RT-PCR and Real-time PCR using whole ticks as well as tissues. In addition, *OmVgR* expression was also analyzed in ticks injected with Rapamycin an inhibitor of the TOR regulatory kinase to determine whether *OmVgR* expression is regulated by the nutrient signaling pathway.

## 6. Outline of research process

NCBI database was used for comparison of the *O. moubata VgR* (*OmVgR*) gene with *VgR* genes identified in other arthropods. The full sequence was then used to design 6 sets of primers to analyze the expression patterns of *OmVgR* in mated females by Real-time PCR. RNA was extracted and cDNA synthesized for tick samples at initiation of feeding, 2 hours, and 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20

days after engorgement. Presently, we are preparing samples from virgin females for the same times to compare with the mated female results. In addition, we assayed the expression of *OmVgR* in different tissues of mated engorged females. Tissues were pooled from several mated females 6 days after engorgement RNA extracted and cDNA synthesized for RT-PCR analysis. Finally, we analyzed *OmVgR* and *Vg* expression by Real-time PCR in both mated and virgin females injected with rapamycin, an inhibitor of the Target of Rapamycin (TOR) nutrient signaling kinase using RNA extracted from whole bodies of females after injection with rapamycin or the solvent (control).

## 7. Outline of research achievements

*OmVgR* shares the key motifs critical to proper functionality and shows the highest similarity to *VgRs* from hard ticks. Expression analysis revealed *OmVgR* is present at all times measured with the highest peaks appearing at 2 hours, 8 and 10 days after engorgement. Day 14 *OmVgR* expression coincides with the highest *OmVg* expression in these same samples. *OmVg* expression patterns were the same as seen in the previous study by Ogihara et al (2010). The above results show that *OmVgR* is expressed in mated engorged females from the initiation of feeding through the peak of egg laying. *OmVgR* expression occurs well before the expression of *OmVg* from day 4 and throughout the start of egg laying indicating *OmVgR* is present to function in incorporation of *Vg* in the oocytes.

Bands showed expression in the midgut, ovary and fat body but not the salivary glands. These three tissues function in *Vg* synthesis and egg development so expression of *OmVgR* indicates its importance in reproduction especially oocyte development in the ovary. However, expression in the midgut and fat body indicate it may also have other functions, studies need to be carried out to further elucidate these functions.

*OmVg* expression significantly decreased in both mated and virgin females when ticks were injected with rapamycin, but *OmVgR* expression didn't appear to be affected, except for an increase of *OmVgR* in rapamycin injected ticks on day 4. These results indicate that *OmVgR* is not directly regulated by the TOR nutrient pathway, but the increase in *OmVgR* expression in rapamycin treated mated females on day 4 remains to be explained.

## 8. Publication of research achievements

Studies are on going with plans to prepare and submit a paper on the identification and characterization of the first vitellogenin receptor gene from a soft tick, *Ornithodoros moubata*.

Plans to present the results at the 10<sup>th</sup> Tick and Tick-Borne Pathogen Conference were postponed until August 2021.

## References

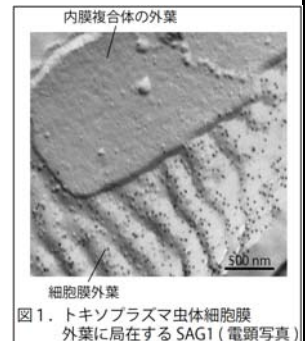


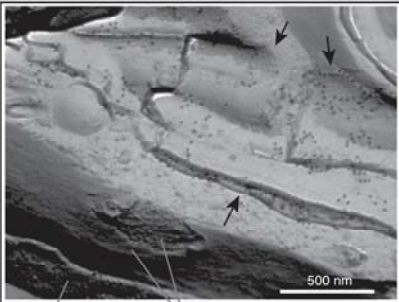
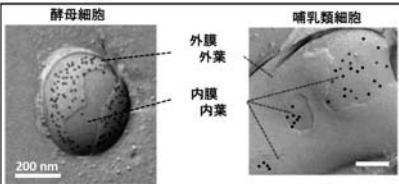
Horigane, M., T Shinoda, H. Honda and D. Taylor (2010) Characterization of a vitellogenin gene reveals two phase regulation of vitellogenesis by engorgement and mating in the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Molecular Biology* 19(4), 501-515.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 20 日

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |      |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------|
| 採択番号    | 2019-共同-11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                        |      |
| 研究部門    | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員 | 玄 学南 |
| 研究課題名   | トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質の<br>ナノスケールレベルでの分布解析                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                        |      |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 所属部局等・職名               |      |
|         | ふじた あきかず<br>藤田 秋一                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 鹿児島大学共同獣医学部・教授         |      |
| 研究分担者   | またたに たつり<br>正谷 達磨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 鹿児島大学共同獣医学部・准教授        |      |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |      |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                        |      |
|         | 玄 学南                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授     |      |
| 研究期間    | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                        |      |
| 目的・趣旨   | <p>酵母の遺伝的解析研究によって動物細胞でもオートファジー制御機構の詳細が明らかにされてきた。最近、同じ真核生物であるトキソプラズマについても、ミトコンドリア維持あるいは細胞分裂にオートファジーの関与が示唆されているが、哺乳類細胞など一般生物との違いが多く、その詳細は不明である。本研究では、申請者らが開発した急速凍結・凍結切断レプリカ法および免疫電子顕微鏡技術を駆使し、トキソプラズマのオートファゴソームの微細構造およびそれを形成する脂質膜を破壊すること無く可視化し、さらに構成する脂質成分の特定を行う。その成果に基づき、原虫におけるオートファジーの機能解明を目指す。</p>                                                                                  |                        |      |
| 研究経過の概要 | <p>申請者らは、急速凍結・凍結切断レプリカ標識(QF-FRL)法によって脂質ラフト成分である SAG1 がトキソプラズマ虫体細胞膜外葉にのみ局在することを予備実験で明らかにしている(図1の金コロイド,研究成果の1)。本研究では原虫のオートファゴソームの構成脂質成分を世界に先駆けて明らかにした。また、生体膜内で動き回る脂質を瞬時に凍結固定する本方法を使えば、生きた細胞の状態での脂質分布を明らかにできるため、正確なデータを獲得することが可能となる。</p> <p>さらに申請者らは QF-FRL 法によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示し、哺乳類培養細胞の細胞膜外葉の糖脂質 GM1, GM3、内葉のフォスフォイノシチド PI(4,5)P2 および PI(4)P の二次元的分布をナノレベルで解明することに成功した</p> |                        |      |



|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p>(藤田秋一ら, <b>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</b>, 2009; <b>Nat. Protocol</b>, 2010; 程, 藤田秋一, 大隈良典ら, <b>Nat. Commun.</b> 2014)。本研究の主題である細胞の自食作用(オートファジー)においては、細胞飢餓時での自食作用に関与するオートファゴソームの形成にホスホイノシチドの PI(3)P が必須であることは広く知られている。</p> <p>本研究では、単離精製した <i>Toxoplasma gondii</i> の細胞内における PI(3)P の微細分布を可視化することに成功した(図2)。しかしながら、酵母あるいは哺乳類培養細胞で観察された様な二重膜構造をしたオートファゴソーム(図3)の形成は明確にできなかった。今後は飢餓状態あるいは薬物処理によりオートファジー誘導時での PI(3)P の微細分布の解析を行い、無処置の <i>T. gondii</i> の細胞内構造と比較することにより、PI(3)P 陽性のオートファゴソーム様構造を検索する予定である。</p> <div data-bbox="1018 226 1418 591">  <p>細胞膜 Inner membrane complex<br/>図2. トキソプラズマ虫体の細胞内での PI3P の局在 (電顕写真)</p> </div> <div data-bbox="1018 613 1418 853">  <p>酵母細胞 外膜 内膜<br/>哺乳類細胞 外膜 内膜<br/>図3. オートファゴソームでのPI(3)Pの分布(電顕写真)<br/>PI(3)Pの標識が、酵母細胞では外膜にあり、内膜内葉にはない。ところが哺乳類細胞では内膜内葉にあり、外膜にはないことがわかる。</p> </div> |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kurokawa Y, Masatani T, Konishi R, Tomioku K, Xuan X, Fujita A. Nanoscale analysis reveals no domain formation of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein SAG1 in the plasma membrane of living <i>Toxoplasma gondii</i>. <b>Histochem Cell Biol.</b> 2019, 152: 365-375. doi: 10.1007/s00418-019-01814-3.</li> <li>2. 小西里可子、黒川夕奈、富奥甘奈、正谷達膳、藤田秋一、免疫電顕法を用いたヒト細胞感染トキソプラズマ生体膜に置ける脂質分子の微細局在. 第92回 日本生化学大会、横浜、2019年9月18日.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 6 月 10 日

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                         |       |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------|
| 採択番号    | 2019-共同-12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                         |       |
| 研究部門    | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 原虫病研究センター<br>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析                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                         |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 所属部局等・職名                |       |
|         | なかお よういち<br>中尾 洋一                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 早稲田大学理工学術院・教授           |       |
| 研究分担者   | いとう しゅん<br>伊藤 駿                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士 2 年 |       |
|         | たくぐち ありさ<br>滝口 ありさ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士1    |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                         |       |
|         | すがぬま けいすけ<br>菅沼 啓輔                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 帯広畜産大学原虫病研究センター・助教      |       |
| 研究期間    | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |       |
| 目的・趣旨   | <p>トリパノソーマ症は病状が進行すると死に至る深刻な感染症だが、既存の治療薬には強い副作用がある。このため、副作用の少ない新たな治療薬の開発が望まれている。申請者は独自に採集した海洋生物抽出物ライブラリーを活用し、貴センター菅沼啓輔特任助教との共同研究で、試験管内トリパノソーマ培養系を用いたスクリーニングをおこなった。この結果をもとに、ヒットサンプルから活性本体の探索を行い、すでに複数の抗トリパノソーマ活性物質の同定に成功している。2019 年度は更なる活性化合物の探索を行い、抗トリパノソーマ活性リード化合物を充実させる。さらに、得られた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。</p>                                                                                                                                                |                         |       |
| 研究経過の概要 | <p>2019 年度は、抗原虫スクリーニングで浮かび上がった活性サンプルから、活性本体の単離・同定を行った。この結果、鹿児島県産未同定海綿から 7 つの化合物を単離同定した。このうち 2 つに抗トリパノソーマ活性が確認されたため、構造－活性相関を検討している。別の鹿児島県産未同定海綿からは新規化合物を活性本体として単離・構造決定した。一方、鹿児島県産海綿 <i>Theonella</i> sp.からは新規骨格を有するアルカロイド化合物を活性本体として単離・構造決定した。海綿以外の生物種として、高知県産の棘皮動物サメハダテゾルモズルから、活性本体として脂肪酸誘導体を見出しており、現在構造解析を行っている。</p> <p>以上の研究によって得られた活性本体については、構造－活性相関の解析によって化学修飾可能部位を特定し、本情報を生かしたプローブのデザインを検討中である。早稲田大学で単離・同定された、活性化合物について、作用メカニズム解析のための標的タンパク質の特定に向けた具体的な準備としては、活性化合物のプローブ化の反応条件</p> |                         |       |

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | を検討している。また、標的タンパク質の特定の準備として、培養した抽出用原虫の保存を帯広畜産大学にて行っている。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 研究成果の<br>概 要 | <p>2019 年度の研究成果概要</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 鹿児島県大島新曽根産未同定海綿 (S07160) から 5 つの新規化合物を含む 7 つの manoalide 類縁体を単離した。このうち新規化合物の 2 つに抗トリパノソーマ活性 (<i>T. congolense</i> IC<sub>50</sub> 1.17 および 1.61 µg/mL) が確認されたため、構造－活性相関解析により、誘導化可能な部分構造の検討をしている。(未発表、論文作成中)</li> <li>2. 鹿児島県大島新曽根産未同定海綿 (S12158) から、抗トリパノソーマ活性化合物として新規 microsclerodermin を単離・構造決定した。本化合物は <i>T. congolense</i> に対する選択的な強い抗トリパノソーマ活性 (IC<sub>50</sub> 0.079 µg/mL) を示した。他の原虫種に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ、0.13 (<i>T. evansi</i>)、0.25 (<i>T. b. brucei</i>)、0.29 (<i>T. rhodesiense</i>)、0.17 (<i>T. b. gambiense</i>) であった。(未発表、論文作成中)</li> <li>3. 鹿児島県大島新曽根産海綿 <i>Theonella</i> sp. (S07140) から、抗トリパノソーマ活性化合物として新規アルカロイドを単離・構造決定した。本化合物の各原虫種に対する抗トリパノソーマ活性 (IC<sub>50</sub> µg/mL) はそれぞれ、0.61 (<i>T. congolense</i>)、0.60 (<i>T. evansi</i>)、1.6 (<i>T. b. brucei</i>)、1.2 (<i>T. rhodesiense</i>)、1.1 (<i>T. b. gambiense</i>) であった。本化合物は新規骨格からなるユニークな構造をしているため、その作用メカニズムもユニークなものであると期待される。現在、立体化学を含む構造の最終確定のための検討を行うとともに、標的タンパク質を同定するためのプローブ分子の検討を行っている。(未発表、特許申請検討中)</li> <li>4. 高知県産の棘皮動物サメハダテヅルモヅルからは、微量な抗トリパノソーマ活性本体として脂肪酸誘導体を見出しており、構造解析を行っている。(学会発表 2)</li> </ol> |
| 研究成果の<br>発 表 | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Nakamura, F.; Suganuma, K.; Furuya, T.; Nakao Y. “Search for Anti-Protozoan Agents from Deep Sea Organisms” AFPS-ICAPPS 2019, Bali, 2019 年 10 月 24 日.</li> <li>2. 高橋伶奈, 菅沼啓輔, 岡西政典, 中尾洋一, 『サメハダテヅルモヅルからの抗トリパノソーマ活性物質の探索』, 日本化学会第 100 春季年会, 野田, 2020 年 3 月 24 日.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 26 日

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                      |       |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------|
| 採択番号  | 2019-共同-13                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                      |       |
| 研究部門  | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 原虫病研究センター<br>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薬 DKP 誘導体の実用化                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                      |       |
| 研究代表者 | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 所属部局等・職名                                             |       |
|       | にへい こういち<br>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・<br>研究総括と実験の実施           |       |
| 研究分担者 | いいじま まさとみ<br>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・<br>抗原虫剤の生産方法の開発         |       |
|       | どい ひろやす<br>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・<br>抗原虫剤の生産方法の開発         |       |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                      |       |
|       | にしかわ よしふみ<br>西川 義文                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授・(役割分担)抗原虫活<br>性を持つ化合物の判定および検出系の開発 |       |
| 研究期間  | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                      |       |
| 目的・趣旨 | <p>アピコンプレクサ類原虫トキソプラズマは、世界人口の約 30%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の一つとなっている。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と近縁、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ラリアもアピコンプレクサ類原虫であるプラスモディウム感染により発症し、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ジケトピペラジン(DKP)誘導体の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低いため実用化に向けた生産方法の改善をする必要がある。本研究課題は、微生物を利用する育種法による MCF の生産方法の効率化および DKP 誘導体調製方法の開発を行い、新たな原虫剤の創成を行うことを目的とした。</p> |                                                      |       |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p>原虫病薬は、市場規模が新規薬剤の開発費を下回るため、大手製薬企業がその開発になかなか着手しないのが現状である。従って、利潤に左右されない大学と我々のような化合物を提供する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。我々の研究グループの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。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 研究成果の概要 | <p>ジケトピペラジン(DKP)誘導体メタサイトフィリンは、トキソプラズマ、ネオスポラおよびマラリア原虫に対する抗原虫活性を示す。さらに、MCF が既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性値を示し、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すことも示してきた。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踏まえると MCF の様なこれまでのマラリア薬もしくはアピコンプレクサ類原虫薬剤にない化学構造を持つ新規の抗原虫活性を示す薬剤が次世代原虫薬として発展することが大に期待できる。</p> <p>メタサイトフィリン(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、現存の 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。</p> <p>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。</p> <p>前年までの研究成果において、MCF 生産菌(<i>Metarhizium</i> sp. 糸状菌)をリッター培養当たり最大～60mg 程度の収量だった生産効率から、MCF 生産糸状菌への紫外線照射による突然変異導入条件の改良および無機塩、アミノ酸等の添加物組成に加え、酸素の供給効率等の培養条件の改良により、本年度は、リッター培養当たり最大で約80 mg オーダーの収量への向上化に成功した。本結果は、MCF の抗原虫薬として実用化の可能性が見えてきた大きな進展的成果である。今後は、本プロジェクトの目標収率である精製工程を含めてリッター培養当たり100mg オーダー以上の安定的な生産効率および収量に向けてさらに生産方法を改良し、研究を進める予定である。現在、将来的な工場レベルでの MCF 大量生産を見据え、酸素供給効率の制御が可能なジャーファーメンターを用いた MCF の生産方法の条件検討を行っており、最適条件の検討を進めている。</p> <p>化学合成と比較し、低予算での誘導体展開を行える微生物育種法により、MCF 誘導体の生産方法の開発を行った。その結果、生産培地にハロゲン化されたフェニル基を持つフェニルアラニンを添加することでハロゲンが導入された MCF 誘導体が得られる方法が明らかになりつつある。現在、MCF 生産菌の培養方法を栄養培地から最小培地による生育条件を検討しており、種々のアミノ酸誘導体や MCF 前駆体と予想される化合物の</p> |

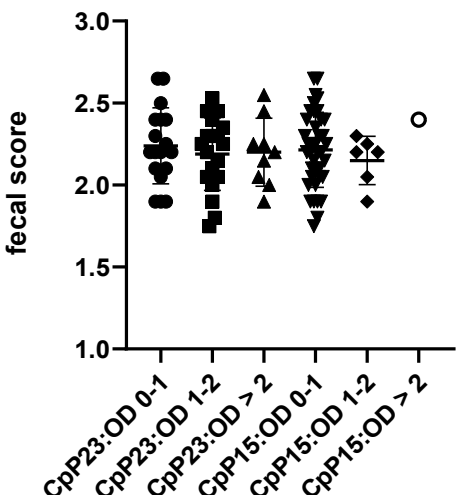
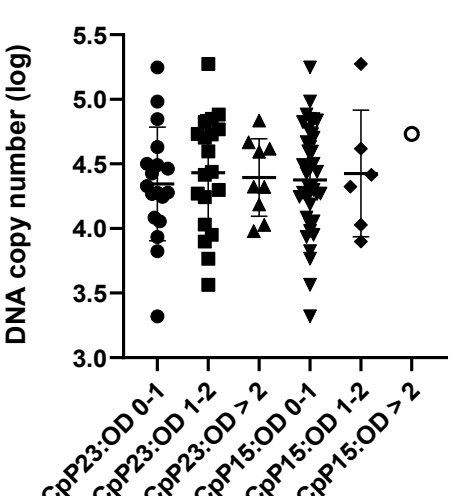
|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|              | <p>添加により新規の MCF または DKP 誘導体の調製方法の開発を進めている。</p> <p>優れた抗原虫作用を示す MCF の将来的な実用化を踏まえ、本申請内容の研究課題の遂行が不可欠であると考えられる。本研究成果を通じて MCF および DKP 誘導体がトキソプラズマ、ネオスポラの妊娠期感染による繁殖障害問題、既存薬耐性マラリアの出現問題、その他のアピコンプレクサ類原虫症の解決に期待が持てる。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 研究成果の<br>発 表 | <p>○ Lessombun A, Iijima M, Umeda K, Kondoh D, Pagmadulam B, Abdou AM, Suzuki Y, Ohba SI, Isshiki K, Kimura T, Kubota Y, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis. <i>J Infect Dis.</i> J Infect Dis. 2020 Feb 18;221(5):766-774. doi: 10.1093/infdis/jiz501.</p> <p>○ Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand T, Igarashi M, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing <i>Streptomyces</i> species from Mongolian soils. <i>Parasitol Int.</i> 2020 doi: 10.1016/j.parint.2019.101961.</p> |



帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 29 日

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-------|
| 採択番号    | 2019-共同-14                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                        |       |
| 研究部門    | 感染免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員 | 西川 義文 |
| 研究課題名   | クリプトスポリジウム症に対する初乳中の抗体による予防効果の検討                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 所属部局等・職名               |       |
|         | せき まどか<br>関 まどか                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 岩手大学・農学部共同獣医学科・助教      |       |
| 研究分担者   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                        |       |
|         | にしかわ よしふみ<br>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    | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                        |       |
| 目的・趣旨   | <p><i>Cryptosporidium parvum</i> は新生子牛の下痢症の原因として最も重要であり、畜産業に甚大な経済被害を与えている。獣医臨床現場では、初乳を十分に給与すると下痢症が軽減されると信じられてきたが、それを支持する科学的根拠は明確でない。そこで本研究では、初乳から移行した子牛血清中の <i>C. parvum</i> 抗体と、クリプトスポリジウム症の症状との相関を解析することで、移行抗体による予防効果を明らかにする。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                        |       |
| 研究経過の概要 | <p>【材料と方法】</p> <p>クリプトスポリジウム陽性農家から子牛 50 頭分の糞便と血清を採取した。これらの検体について、以下の指標の検討を行った。</p> <p>(1) 出生後から 20 日齢まで毎日糞便スコア(1:固形便 2:軟便 3:泥状便 4:水様便)を記録し、記録期間の平均値を算出して、臨床的な観点から下痢症の重篤度を評価した。</p> <p>(2) 各個体の糞便から DNA を抽出し、qPCR に供した。qPCR では、プライマーのターゲット領域を組み込んだ pUC118 をスタンダードとする絶対定量法により、8 日から 10 日齢の間に採取した糞便について、<i>C. parvum</i> オーシストの DNA コピー数を定量した。各個体について最もコピー数が多かった日齢を選択し、その日齢の <i>C. parvum</i> オーシストの DNA コピー数をクリプトスポリジウム症の分子学的な指標とした。</p> <p>(3) 各個体から出生直後に得た血清について、リコンビナント抗原(CpP23-GST、CpGP15-GST)を用いた ELISA に供し、OD 値を測定した。</p> |                        |       |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p><b>【結果および考察】</b></p> <p>検体を採取したすべての子牛で <i>C. parvum</i> の感染が確認された。</p> <p>(1)と(3)、(2)と(3)についてそれぞれ統計解析を実施したが、明確な因果関係は認められなかった(下図)。今後、サンプリングのタイミングや各指標の評価方法を再検討したい。</p> <p>(1)糞便スコアと(3)出生後血清 ELISA の関係</p>  <p>(2) <i>C. parvum</i> DNA コピー数と(3) 出生後血清 ELISA の関係</p>  |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <p>該当なし</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 31 日

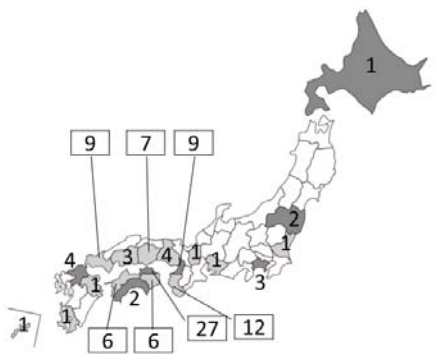
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                   |       |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------|
| 採択番号    | 2019-共同-15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                   |       |
| 研究部門    | 診断治療研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員            | 菅沼 啓輔 |
| 研究課題名   | 小型動物を用いた媾疫トリパノソマ感染モデルの構築と病理学的解析                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                   |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 所属部局等・職名                          |       |
|         | こばやし よしやす<br>古林 与志安                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター・教授      |       |
| 研究分担者   | たなか ゆうすけ<br>田中 佑典                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 帯広畜産大学獣医学研究部門基礎獣医学分野形態学系<br>・大学院生 |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                   |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                   |       |
|         | すがぬま けいすけ<br>菅沼 啓輔                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 帯広畜産大学原虫病研究センター・助教                |       |
| 研究期間    | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                   |       |
| 目的・趣旨   | <p>媾疫は <i>Trypanosoma equiperdum</i> 感染により引き起こされる馬の慢性消耗性疾患である。罹患馬は生殖器の腫脹や皮膚のプラーク状病変を呈しながら徐々に衰弱していき、末期では末梢神経の軸索変性に起因すると考えられる神経症状を呈し半数以上が死亡する。しかし、小型実験動物を用いた媾疫の病態再現モデルが未確立であるなどの背景から、その病態には不明な点が多く残されている。そこで本研究では、媾疫の病態再現モデル確立を目的に、小型実験動物の <i>T. equiperdum</i> 感受性を臨床的および病理組織学的に解析した。</p>                                                                                                                     |                                   |       |
| 研究経過の概要 | <p>2 頭の異なるモンゴルの媾疫罹患馬から分離し、培養株として樹立した <i>T. equiperdum</i> IVMt1 および t2 株を使用した。投与材料としてそれぞれの培養株を <math>1 \times 10^7</math> parasite/ml に調整し、0.1 ml を BALB/c マウスおよび NOD-<i>scid</i> マウスに腹腔内投与した。IVMt1 株投与 <i>scid</i> マウスは、接種後 10 日目より末梢血中原虫数が徐々に上昇し、29 日目に原虫血症を呈し死亡した。組織検査では原虫血症の病態が確認されたが、媾疫特有の病変再現には至らなかった。IVMt1 および t2 株投与 BALB/c マウスならびに IVMt2 株投与 <i>scid</i> マウスでは末梢血中から原虫は検出されず、組織検査でも原虫は観察されなかった。</p> |                                   |       |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p>ハリネズミは、医学領域で一部疾病のモデル動物としてすでに使用されている。ハリネズミは食虫目に属する小型動物で、げっ歯目とは系統学的に離れている。また、ハリネズミはマウスへ感染が成立しない口蹄疫に感受性を有することが知られている。マウスを用いた実験では、媼疫の病態が再現できなかったことから、ハリネズミを用いて媼疫の病態モデルが確立できるか否かについても検討した。実験には、研究代表者の研究室において実験系として飼育されているハリネズミを使用した。原虫投与量は、マウスとの体重比から換算し、<math>1 \times 10^7</math> parasites とした。IVMt1 株投与個体では 2 日目より末梢血中原虫数が上昇し、1 週間以内に死亡した。組織検査でも原虫血症が確認されたが、媼疫特有の病変再現には至らなかった。一方、IVMt2 株投与個体では投与後 5 日目から経過観察期間終了時の 30 日目まで、トリパノソーマ症に特有の周期的原虫血症を呈し、慢性感染が成立した。組織検査において、心筋では多数の虫体が浸潤し、それに伴う炎症反応が観察された。また、末梢神経周囲炎および軸索変性が認められた。</p> <p>以上の結果より、IVMt1 株は BALB/c マウスでは感染が成立しないと考えられた。<i>scid</i> マウスおよびハリネズミでは原虫は増幅するが、急性経過を辿る。一方 IVMt2 株投与群では、BALB/c マウスに加えて <i>scid</i> マウスでも感染未成立であると考えられた。一方でハリネズミは周期的原虫血症を呈し、臨床例に類似する慢性感染を示した。</p> <p>媼疫罹患馬の末梢神経ではリンパ球主体の炎症反応が認められ、病期が進行し末期になると炎症は消失し、軸索変性病変が主体となる。この変性病変が媼疫の神経症状の原因と考えられている。今回、IVMt2 株投与ハリネズミの末梢神経において媼疫罹患馬の末梢神経病変に類似する病変が観察された。今後、ハリネズミの末梢神経病変を経時評価することで、媼疫の末梢神経病変の成立過程を明らかにできる可能性が考えられた。</p> |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <p>○田中佑典、菅沼啓輔、渡邊謙一、堀内雅之、古林与志安、「小型実験動物を用いた媼疫(こうえき)の病態再現モデル確立に向けた予備的研究」、『第 7 回日本獣医病理学専門家協会学術集会』、宮崎県、2020 年 3 月。<br/>(学会中止のため、抄録のみでの発表)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 5 月 31 日

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                          |      |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------|
| 採択番号    | 2019-共同-16                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                          |      |
| 研究部門    | 感染症免疫研究部門                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員   | 玄 学南 |
| 研究課題名   | <i>Babesia gibsoni</i> におけるアトバコン耐性関連遺伝子ならびに <i>B. odocoilei</i> 様<br>原虫の疫学的調査                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                          |      |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 所属部局等・職名                 |      |
|         | いぐち あいこ<br>井口 愛子                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 鳥取大学農学部共同獣医学科獣医臨床検査教室・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    | 2019 年 4 月 1 日 ～ 2020 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                          |      |
| 目的・趣旨   | <p>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。ATV 感受性低下には推定標的部位における一塩基多型が報告されており、この一塩基多型を有する原虫が ATV 投与前にも存在する可能性を過去に示した。本研究では国内の犬バベシア症陽性検体におけるアトバコン耐性関連遺伝子の発現率の調査を検体数を増やして再調査する。</p>                                                                                                         |                          |      |
| 研究経過の概要 | <p>マルピーライフテック株式会社に協力を依頼した。2015-2018 年における犬バベシア症を疑い検査を行った検体のうち、<i>B. gibsoni</i> 遺伝子検査陽性の検体の gDNA を収集した。これらの検体に関し、地域、犬種、性別、年齢の情報を得た。ただし、これらは検査会社に提出された検体であるため、既往歴、感染歴ならびに治療歴(ATV 投与歴の有無も含む)は調査できなかった。</p> <p>①検体情報、②一塩基多型検出のための検量線作成、③検体の一塩基多型保有率の計測を行った。</p> <p>①検体情報<br/>104 検体の gDNA を収集した。検体の年齢は 0-3 歳 36 検体、4-9 歳 32 検体、10-13 歳 26 検体、14 歳以上 3 検体、不明が 8 検体であった。雄 55 検体、雌 27 検体、去勢雄 6 検体、避妊雌 10 検体、不明が 7 検体であった。犬種は雑種が 33 検体で最も多</p> |                          |      |

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の概要</p> | <p>く、次いで不明が 20 検体、土佐犬 5 検体、ミニチュアダックスフンドおよびシェットランドシープドッグが各 4 検体、ラブラドルレトリバー、ヨークシャーテリア、ポメラニアン、パグおよびチワワが各 3 検体、バーニーズマウンテンドッグ、トイプードル、柴犬、ゴールデンレトリバーおよびアメリカンピットブルが各 2 検体、その他 14 犬種が各 1 検体であった。検体の提出があった都道府県を右図に示し、各検体数を地図上に表記した。香川県の 27 検体が最多であった。また神奈川県・茨城県・福島県・北海道の東日本地域からも検体が提出された。</p>  <p>②一塩基多型検出のための検量線作成</p> <p>ATV に対する感受性の低下には <i>B. gibsoni</i> のミトコンドリアシトクローム <i>b</i> 領域における一塩基多型 M121I が関与している。塩基は 363 番目が G から T へと置換される。よって野生型 <i>B. gibsoni</i> 培養株ならびに M121I 型 <i>B. gibsoni</i> 培養株から gDNA を抽出し、TA-cloning を行い G および T をそれぞれ含むプラスミドを作成した。各プラスミドの濃度からコピー数を算出し、<math>1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^4</math> コピー数を測定できる検量線を作成した。</p> <p>③一塩基多型保有率の測定</p> <p>②で作成した検量線を用いて、各検体の M121I 保有率を測定した。G および T を検出する各プライマーを用いて real-timePCR を実施した。gDNA はお悪測定において 25ng となるように調整した。結果は T のコピー数/(G のコピー数+T のコピー数)として算出した。全検体のうち M121I 保有率が計測できたのは 9/105 検体(8.57%)であった。地域は上図の濃染部であり、高知県(1・2) 21.06%、香川県(3/27) 17.08%・14.75%・1.20%、大阪府(1/9) 12.10%、神奈川県(1/3) 7.99%、福岡県(1/4) 3.02%、福島県(1/2) 1.94%、北海道(1/1) 1.69%、であった。</p> <p>2011 年～2014 年に行った同様の調査と比較し、過去と同様に①オスに多い傾向にある、②年齢に目立った傾向はない、③犬種は雑種が多いものの一般的な家庭犬の割合に準じていた。過去の報告と異なる点は①M121I 保有率は若干増加(過去は 4.11%であった)、②大阪府は連続して M121I が検出されている、③今回初めて神奈川県・福島県・北海道の東日本地域から M121I が検出されたことであった。以上のことより感染地域の拡大もしくは人や犬の移動に伴い、犬バベシア症の発赤地域が拡大していることとその中に ATV 感受性低下原虫が少なからず含まれていることが示された。移動の有無、ATV 投与歴の有無、重症度などの情報を集めることができれば、さらに有用な調査になると思われる。</p> <p><i>B. odocoilei</i> 様原虫の疫学的調査は十分な検体数を収集できず、十分な検討ができなかった。</p> |
| <p>研究成果の発表</p> | <p>2020 年度における WJVF 第 11 回大会もしくは第 41 回動物臨床医学会年次大会での発表を検討していた。しかし両大会ともに新型コロナウイルス感染症拡大防止の観点から開催中止が決定し、本データは未発表である。</p> <p>現在、論文を執筆中である。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

# NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 28, 2020

Project no: 2019-joint-17

## 1. Principal investigator

Name: Munkhjargal Tserendorj

Position: Researcher

Affiliation: Institute of Veterinary Medicine, Zaisan-17042, Ulaanbaatar, Mongolia

## 2. Project title:

Molecular identification of fly vector of haemoparasites in Mongolia

## 3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Shinya Fukumoto

Position: Associate Professor

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

04/01/2019 – 03/31/2021 (one year)

## 5. Purposes and objectives

Insect vectors are responsible for the transmission of important parasitic diseases, causing millions of deaths every year and endangering approximately 3 billion people and animals around the world. The types of *Tabanidae* and *Aedes* or *Culex* spp are vector of cameline trypanosomiasis and filariasis, respectively. These diseases are economically important infectious diseases affecting the camel industry, especially in the camel rearing areas of the world including Mongolia. Therefore, aim of this study was to detect the major *Trypanosoma evansi* and *Dipetalonema evansi* parasites in insect vectors from different areas of Mongolia.

## 6. Outline of research process

In this study, a total of 135 specimens of mosquitoes and flies captured in two provinces, namely Umnugovi and Dundgovi in Mongolia. Mosquitoes and flies were selected to have a complete body structure, especially still has a head, thorax, legs and abdomen then insect vectors were identified with the aid of taxonomic keys based on morphological observation using microscope. Further, total genomic DNA was isolated from single whole mosquito and fly sample using Nucleo spin tissue kit following manufacturer's instructions. All gDNAs of insect vectors were screened by PCR assay using the *T. evansi-ITS1* and *D. evansi-COI* genes.

In addition, a subset of mosquito specimens was selected for identification and confirmation using PCR targeting the *COI* gene. PCR products were sequenced using Sanger technology with ABI BigDye™ Terminator v3.1 chemistry and phylogenetic analysis was performed.

## 7. Outline of research achievements

During this research, we morphologically identified the most epidemiologically important *Glossina* fly and *Aedes*, *Culex* and *Anopheles* genera of mosquito. Molecular analysis of 10 *COI* sequences was exclusively comparable with the morphological identifications of *Aedes caspius*, *Culex pipiens* and *Anopheles messeae* species. As illustrated in Fig. 1, *COI*-based phylogenetic analysis showed distinct clustering of individual species within each genus with strong bootstrap support. Our *Culex pipiens* – *COI* gene sequences clustered with those of similar species from other regions, Singapore, Brazil, Uganda and Iran reported in the NCBI database. In contrast, Mongolian *Aedes caspius*–*COI* gene sequences determined in this study was found in the different clade.

In this study, all gDNAs of flies and mosquitoes were negative for *Trypanosome* and/or *Dipetalonema evansi*, except only one mosquito DNA sample that was positive for *Trypanosome* spp. (Fig. 2). In the future, a comprehensive epidemiological survey of fly vectors of haemoparasites in different regions of Mongolia is required.

## 8. Publication of research achievements

The paper is under writing for publication.

Figure 1. Phylogenetic tree based on *COI* sequences of *Aedes*, *Culex* and *Anopheles* species mosquitoes. Numbers shown at branch nodes indicate booster values.

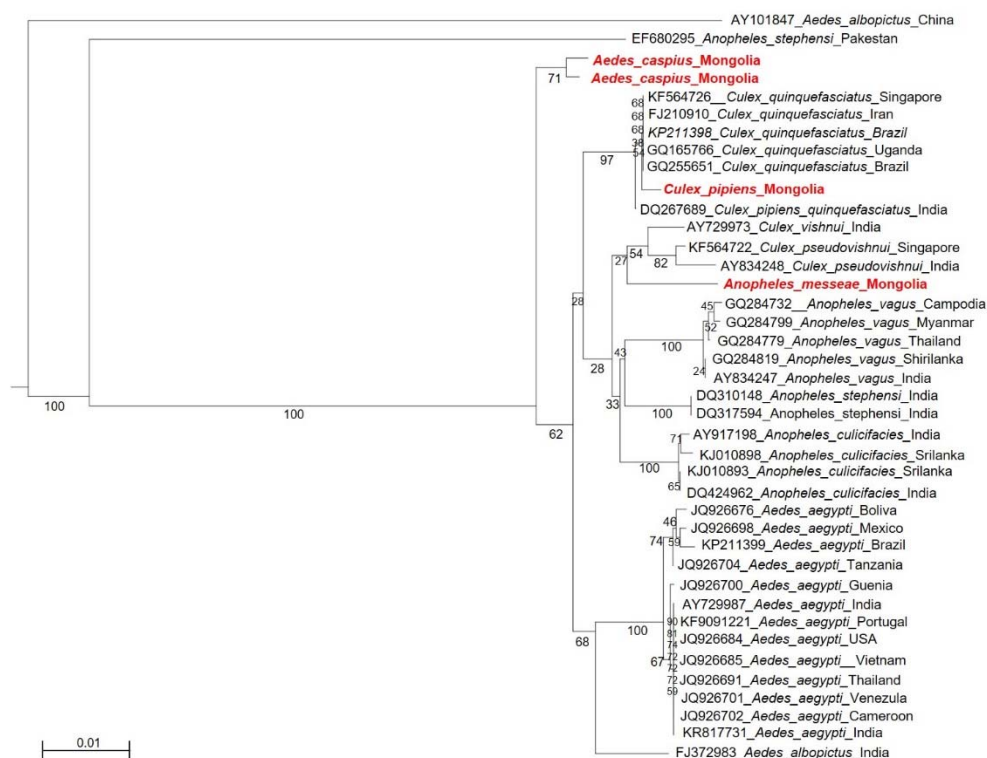
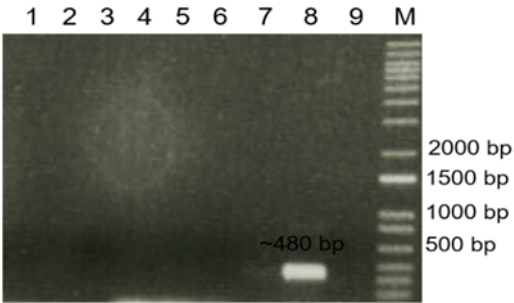




Figure 2. PCR result. M, Marker; Lanes 1-6, gDNA of fly; Lanes 7-9, gDNA of mosquitoes.



# NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 9<sup>th</sup>, 2020

Project no: 2019-joint-18

## 1. Principal investigator

Name: Haiyan Gong

Position: Associated professor

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

## 2. Project title:

Microbiome comparison of the tick *Haemaphysalis longicornis* from the labs of China and Japan

## 3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Rika Umemiya-Shirafuji

Position: Assistant Professor

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

April 1, 2019 - March 31, 2020, one year

## 5. Purposes and objectives

- (1) To obtain pathogenic microbiota in *H. longicornis* in two labs, which hints the potential infection that we should consider in the future.
- (2) To compare the composition of microorganisms harbored by unfed adult ticks cultured in the lab of Shanghai Veterinary Research Institute (SHVRI), Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS) and NRCPD, so that we can cooperated with each other to deal with the common potential pathogens.

## 6. Outline of research process

- (1) Nymphs of *H. longicornis* were fed on SPF New Zealand White rabbits until they were engorged and developed into adults. Five adults are washed with 75% ethanol twice and distilled water three times. Each adult tick was considered as one sample.
- (2) Five whole tick bodies were extracted for DNA respectively. The quantity and quality of extracted DNAs were measured using spectrophotometer and agarose gel electrophoresis, respectively.
- (3) The DNA from each sample is used as template for amplification of V5-V6 region of the 16S rRNA gene, followed by pyrosequencing on an Illumina MiSeq platform.
- (4) The obtained data from both labs are compared for the differences and similarities on the pathogens and symbionts.

## 7. Outline of research achievements

- (1) Even though the ticks came from the same lab, the microbiota in the tested 5 ticks of China was still different from each other. Only 174 genera of microorganisms were detected in HLLab3, while 354 genera were found in HLLab4.
- (2) As the symbionts in ticks, *Coxiella* showed an extreme proposition in *H. longicornis* from the lab of China as well as that of Japan. It is putative that ticks experienced a deletion of pathogens in the environment of labs. In the present study, tick-borne pathogens were not detected in the top 20 genera, which is obviously different from the field samples. As our previous other study, *Rickettsia. spp* was massively detected in the field ticks from Qinghai, Shanxi and Yunnan province of China (data was not published yet). However, the field samples were half-fed or engorged ticks, which may include the pathogens in the blood of the hosts.
- (3) Five ticks from the same clone demonstrated much difference on microbiome, but they still shared about 69 ASV/OTUs in common. The data was compared with the microbiota that harbored by ticks reared in NRCPD of Japan, and it was found that more than 93% of the sequencing reads were identical, which were assigned to *Coxiella sp.* (Umemiya-Shirafuji et al., unpublished data).

## 8. Publication of research achievements

The data about the microbiome of cultured *H. longicornis* in Chinese lab has been shared with assistant professor Rika Umemiya-Shirafuji. And the paper on the comparison of tick harbored microorganisms from both labs is under submission.

Attach reference materials as necessary.