

文部科学省認定 共同利用・共同研究拠点
OIEコラボレーティングセンター

原虫病研究センター 年報

NRCPD 2019 | 令和元年度

 帯広畜産大学

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

National Research Center for Protozoan Diseases

OIE collaborating centre for surveillance and control of animal protozoan diseases

目 次

| | |
|--------------------------------|----|
| 1. センターの概要 | 1 |
| ①沿革 | 1 |
| ②設置目的等 | 2 |
| 2. 組織等 | 3 |
| ①教員数 | 3 |
| ②技術系職員数 | 3 |
| ③事務系職員数 | 3 |
| ④組織図 | 4 |
| ⑤原虫病研究センター運営委員会委員 | 5 |
| 3. 予算、決算、外部資金等 | 6 |
| ①歳出決算額 | 6 |
| ②研究費総額、研究者 1 人当たりの研究費 | 6 |
| ③科学研究費等の採択状況 | 6 |
| ④その他の外部資金獲得状況 | 8 |
| 4. 研究活動 | 10 |
| ①共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む） | 10 |
| ②共同研究課題採択一覧 | 10 |
| ③共同利用・共同研究の参加状況 | 11 |
| ④学会誌、学術雑誌、国際会議等に掲載された論文数 | 12 |
| ⑤出版物の発行部数 | 12 |
| ⑥受賞状況 | 12 |
| ⑦研究者を対象とした研究会、シンポジウム等の実施状況 | 12 |
| 5. 国際交流状況 | 13 |
| ①国際シンポジウム等の主催・参加状況 | 13 |
| ②国際学術交流協定の状況 | 15 |
| ③国際的な研究プロジェクトへの参加状況 | 16 |
| ④研究者の海外派遣状況・外国人研究者の招へい状況（延べ人数） | 20 |
| ⑤その他・国際研究協力活動の状況 | 20 |
| 6. 教育活動・人材養成 | 21 |
| ①大学院生等の受入状況 | 21 |

| | |
|---|-----------|
| ②留学生の受入状況 | 21 |
| ③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数 | 21 |
| ④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧 | 22 |
| 7. 情報発信・広報活動等 | 23 |
| ①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等） | 23 |
| ②定期刊行物やホームページ等による一般社会に対する情報発信の取組 | 24 |
| 8. 分野等の研究活動 | 25 |
| 節足動物衛生工学分野 | 25 |
| 生体防御学分野 | 29 |
| ゲノム機能学分野 | 46 |
| 高度診断学分野 | 55 |
| 先端予防治療学分野 | 63 |
| 感染病理学分野 | 73 |
| 地球規模感染症学分野 | 76 |
| 9. 共同研究成果報告書 | 80 |
| 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 | 81 |
| The development of aDiCre recombinase-expressing strain of <i>Babesia</i> for the creation of conditional gene knockouts. | 84 |
| <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 | 87 |
| 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 ワクチン開発基盤技術の構築 | 89 |
| 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 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 | 91 |
| 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 | 93 |
| 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 | 95 |
| 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 | 98 |
| 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 | 100 |
| Identification, Characterization and Functional Analysis of the Vitellogenin Receptor in the soft tick <i>Ornithodoros moubata</i> | 102 |
| 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 構成膜脂質のナノスケールレベルでの分布解析 | 105 |
| 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 | 107 |

| | |
|---|-----|
| 新規抗アピコンプレクサ類原虫薬 DKP 誘導体の実用化 | 109 |
| 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 | 112 |
| 小型動物を用いた媾疫トリパノソーマ感染モデルの構築と病理学的解析 | 114 |
| <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> 様原虫の疫学的調査 | 116 |
| Molecular identification of fly vector of haemoparasites in Mongolia | 118 |
| Microbiome comparasion of the tick <i>Haemaphysalis longicornis</i> from the labs of China and Japan | 121 |

1. センターの概要

①沿革

I. 原虫病細胞免疫研究室（1983-1990）

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

II. 原虫病分子免疫研究センター（1990-2000）

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

1992年 4月 細胞病態生理学分野（客員研究分野）新設

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

1995年 4月 耐病性遺伝子工学分野新設

1997年 4月 節足動物衛生工学分野新設

1997年 11月 研究棟増設（970 m²）

III. 原虫病研究センター（2000～現在）

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

2002年 3月 研究棟増設（1,730 m²）

2002年 10月 「21世紀 COE プログラム」に選定

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

2005年 4月 進化生物学分野、遺伝生化学分野、国際獣疫学分野の新設

2006年 3月 研究棟増設（1,520 m²）

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

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

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

2012年 11月 寄付講座「生命平衡科学講座（白寿）」を開設

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

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

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

2018年 1月 OIE/ISO 業務担当分野として、国際獣疫分野新設

②設置目的等

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

2. 組織等

①教員数

| | 教 員 数 (単位：人) | | | | | |
|-----|----------------------|-------------|------------------|----------------------------|-------------|------------------|
| | 令和元年度 (R01.12.11 現在) | | | | | |
| | 現 員 数 | 女 性 数 | 外 国 人 数 | 任期制導入状況 | | |
| | | | | 任 期 付 教 員 数 | 女 性 数 | 外 国 人 数 |
| 教 授 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 准教授 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 講 師 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 助 教 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 助 手 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合 計 | 10 | 1 | 1 | 2 | 1 | 0 |

②技術系職員数

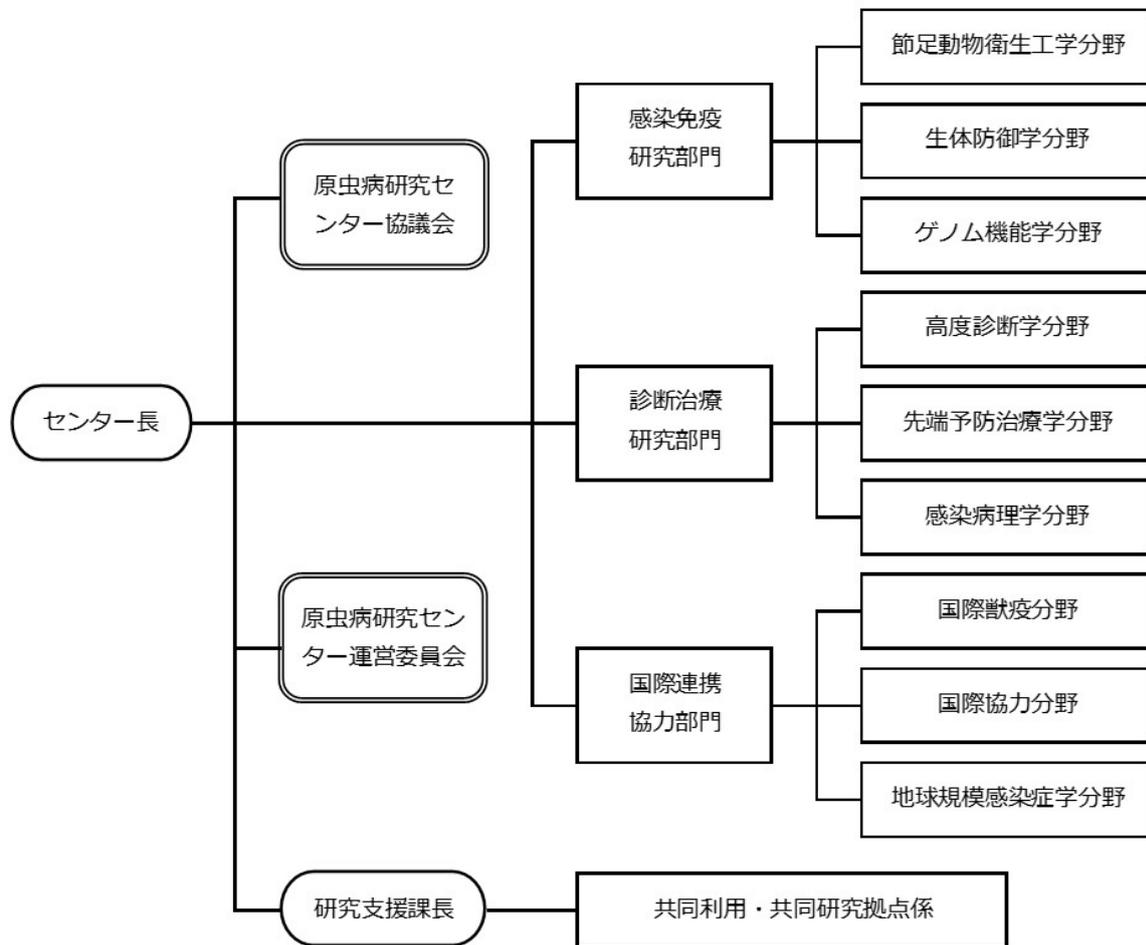
| 区 分 | | 令和元年度 (人) |
|--------|-------|-----------|
| 技術系職員数 | | 15 |
| | うち常勤 | 6 |
| | うち非常勤 | 9 |

③事務系職員数

| 区 分 | | 令和元年度 (人) |
|--------|-------|-----------|
| 事務系職員数 | | 4 |
| | うち常勤 | 1 |
| | うち非常勤 | 3 |

④組織図

【令和元年度】



⑤原虫病研究センター運営委員会委員

| 氏 名 | 所 属 機 関 名 | 役 職 | 備 考 |
|---------------------------|----------------------------|---------------|--|
| 狩野 繁之 | 国立研究開発法人国立国際医療研究センター研究所 | 熱帯医学・マラリア研究部長 | 委員長 |
| 川口 寧 | 国立大学法人東京大学医科学研究所 | 教授 | 帯広畜産大学の役員及び職員以外の者で原虫病に関する学識経験者のうちからセンター長の指名する者 |
| 釘田 博文 | O I E アジア太平洋地域事務所 | 代表 | |
| 鈴木 定彦 | 国立大学法人北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター | 教授 | |
| 野中 成晃 | 国立大学法人北海道大学獣医学研究院 | 教授 | |
| Badgar BATTSET- SEG | モンゴル獣医学研究所 | 教授 | |
| 平山 謙二 | 国立大学法人長崎大学熱帯医学研究所 | 教授 | |
| 堀井 俊宏 | 国立大学法人大阪大学微生物病研究所 | 教授 | |
| 堀本 泰介 | 国立大学法人東京大学農学部 | 教授 | |
| 玄 学南 | 原虫病研究センター | 教授 | |
| 鈴木 宏志 | 原虫病研究センター | 教授 | |
| 河津 信一郎 | 原虫病研究センター | 教授 | |
| 横山 直明 | 原虫病研究センター | 教授 | |
| 五十嵐 慎 | 原虫病研究センター | 教授 | |
| 西川 義文 | 原虫病研究センター | 教授 | |

3. 予算、決算、外部資金等

①歳出決算額

| 区 分 | 平成 30 年度 (単位：百万円) | |
|-------|-------------------|----------|
| | 決算額 | うち運営費交付金 |
| | | |
| 人 件 費 | 169 | 153 |
| 物 件 費 | 179 | 38 |
| 計 | 348 | 191 |

②研究費総額、研究者 1 人当たりの研究費

| | 教員数 (a) | 研究費総額(外部資金を含む) (b) | 研究費総額(外部資金を除く) (c) | 教員 1 人当たりの研究費(外部資金を含む) (b)/(a) | 教員 1 人当たりの研究費(外部資金を除く) (c)/(a) |
|----------------------|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 平成 30 年度 (単位：百万円) | 10 | 313 | 174 | 31 | 17 |

③科学研究費等の採択状況

| 研究種目 | 研究課題番号 | 新規 継続 | 職名・代表者 | 金額 (直接経費) (単位：千円) |
|-------------|----------|----------|-----------|-------------------------|
| 基盤研究 B (一般) | 19H03121 | 新規 | 准教授・福本 晋也 | 5,400 |
| 基盤研究 B (一般) | 19H03120 | 新規 | 教授・河津 信一郎 | 5,200 |
| 基盤研究 C (一般) | 19K06384 | 新規 | 准教授・麻田 正仁 | 1,200 |
| 基盤研究 C (一般) | 19K06416 | 新規 | 助教・白藤 梨可 | 1,200 |
| 若手研究 | 19K15972 | 新規 | 助教・菅沼 啓輔 | 1,400 |
| 挑戦的研究 (萌芽) | 19K22354 | 新規 | 教授・玄 学南 | 1,900 |
| 挑戦的研究 (萌芽) | 19K22355 | 新規 | 准教授・福本 晋也 | 2,400 |

| | | | | |
|------------------------|----------|----|--------------------------------|-------|
| 研究活動スタート支援 | 19K23704 | 新規 | 特任研究員・ ティルラセンバラム シヴァクマール | 1,100 |
| 研究活動スタート支援 | 19K23703 | 新規 | 特任研究員・ 尾針 由真 | 1,100 |
| 国際共同研究強化 (B) | 19KK0173 | 新規 | 教授・河津 信一郎 | 2,100 |
| 国際共同研究強化 (B) | 19KK0174 | 新規 | 教授・横山 直明 | 4,700 |
| 国際共同研究強化 (B) | 19KK0175 | 新規 | 准教授・福本 晋也 | 1,400 |
| 特別研究員奨励費 | 19J00148 | 新規 | 特任研究員・ 梅田 剛佑 | 1,400 |
| 特別研究員奨励費 (外国人特別研究員) | 19F19107 | 新規 | 教授・西川 義文 | 1,200 |
| 特別研究員奨励費 (外国人特別研究員) | 19F19403 | 新規 | 教授・玄 学南 | 700 |
| 基盤研究B (一般) | 18H02335 | 継続 | 教授・西川 義文 | 4,500 |
| 基盤研究B (一般) | 18H02336 | 継続 | 教授・玄 学南 | 2,800 |
| 基盤研究B (一般) | 18H02337 | 継続 | 教授・五十嵐 郁男 | 4,300 |
| 若手研究 | 18K14577 | 継続 | 特任研究員・ 猪原 史成 | 1,600 |
| 挑戦的研究(萌芽) | 18K19257 | 継続 | 教授・横山 直明 | 2,400 |
| 挑戦的研究(萌芽) | 18K19258 | 継続 | 教授・河津 信一郎 | 2,400 |
| 国際共同研究強化 (B) | 18KK0188 | 継続 | 教授・玄 学南 | 3,000 |
| 特別研究員奨励費 (外国人特別研究員) | 18F18089 | 継続 | 教授・玄 学南 | 1,100 |
| 特別研究員奨励費 (外国人特別研究員) | 18F18091 | 継続 | 教授・玄 学南 | 1,000 |
| 特別研究員奨励費 (外国人特別研究員) | 18F18399 | 継続 | 教授・横山 直明 | 1,100 |
| 特別研究員奨励費 (外国人特別研究員) | 18F18403 | 継続 | 教授・玄 学南 | 1,100 |
| 特別研究員奨励費 | 18J10448 | 継続 | 客員研究員・ 曾賀 晃 | 1,000 |

④その他の外部資金獲得状況

| 予算種目 | 番号 | 新規 継続 | 職名・代表者 | 金額 (直接経費) (単位：千円) |
|----------------------------|---|----------|----------------|-------------------------|
| 国立研究開発法人 日本医療研究開発 機構 | 医療分野国際科 学技術共同研究 開発推進事業 | 継続 | 助教・菅沼 啓輔 | 2,075 |
| 国立研究開発法人 日本医療研究開発 機構 | 新興・再興感染症 に対する革新的 医薬品等開発推 進研究事業 | 継続 | 教授・西川 義文 | 5,615 |
| 独立行政法人 日本学術振興会 | 拠点形成事業（ア ジア・アフリカ学 術基盤形成型） | 継続 | 教授・玄 学南 | 6,000 |
| 独立行政法人 日本学術振興会 | 二国間交流事業 共同研究 | 継続 | 教授・鈴木 宏志 | 1,402 |
| 独立行政法人 日本学術振興会 | 二国間交流事業 共同研究 | 継続 | 教授・横山 直明 | 1,168 |
| 独立行政法人 国際協力機構 | ABE イニシアテ ィブ | 継続 | 教授・玄 学南 | 600 |
| 独立行政法人 日本学術振興会 | 論文博士取得希 望者に対する支 援事業 | 新規 | 教授・玄 学南 | 1,200 |
| 国立大学法人 北海道大学 | 卓越大学院プロ グラム | 継続 | 教授・西川 義文 | 1,800 |
| 日本中央競馬会 | 畜産振興事業 | 継続 | 教授・玄 学南 | 12,779 |
| A（株） | 共同研究 | 継続 | 教授・鈴木 宏志 | 1,000 |
| B（株） | 共同研究 1 | 継続 | 教授・河津 信一郎 | 1,300 |
| B（株） | 共同研究 | 継続 | 助教・菅沼 啓輔 | 1,440 |
| B（株） | 共同研究 2 | 継続 | 教授・河津 信一郎 | 1,600 |
| C（株） | 共同研究 | 新規 | 教授・玄 学南 | 454 |
| 平和中島財団 | アジア地域重点 学術研究助成 | 新規 | 助教・菅沼 啓輔 | 1,500 |
| 公益財団法人 日中医学協会 | 日中笹川医学奨 学金 | 新規 | 教授・玄 学南 | 700 |
| 公益財団法人 寿原記念財団 | 寿原記念財団研 究助成 | 新規 | 特任研究員・ 岡戸 清 | 1,500 |

| | | | | |
|-------------|------|-----|----------|--------|
| (株)白寿生化学研究所 | 寄附講座 | 継 続 | 教授・鈴木 宏志 | 20,000 |
| D (株) | 寄附金 | 新 規 | 助教・白藤 梨可 | 243 |
| E (株) | 寄附金 | 新 規 | 助教・白藤 梨可 | 108 |

4. 研究活動

① 共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む）

| | |
|-----------------------|----|
| 共同利用・共同研究数（単位：件） | 18 |
| うち国際的な共同利用・共同研究数 | 3 |
| うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数 | 3 |
| うち国内での共同利用・共同研究数 | 15 |
| うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数 | 15 |

② 共同研究課題採択一覧

| 研究代表者 | 研究課題名（15件） | センター内共同研究者 |
|--------------|--|------------|
| 川合 寛 | 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 | 河津 信一郎 |
| Daniel Sojka | The development of aDiCre recombinase-expressing strain of <i>Babesia</i> for the creation of conditional gene knockouts. | 河津 信一郎 |
| 麻田 正仁 | <i>Babesia bovis</i> 感染赤血球における宿主血管内皮細胞接着機構の解明 | 河津 信一郎 |
| 朴 龍洙 | 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開発基盤技術の構築 | 西川 義文 |
| 村田 敏拓 | 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スとした派生化合物の合成・探索と構造活性相関及び細胞毒性の検討 | 菅沼 啓輔 |
| 筏井 宏実 | マラリア原虫の媒介蚊体内ステージにおけるオーシスト形成機構の解明 | 福本 晋也 |
| 伊従 光洋 | 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 | 福本 晋也 |
| 田仲 哲也 | 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 | 白藤 梨可 |
| 渡慶次 学 | 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 | 西川 義文 |
| DeMar Taylor | Identification, Characterization and Functional Analysis of the Vitellogenin Receptor in the soft tick <i>Ornithodoros moubata</i> | 白藤 梨可 |
| 藤田 秋一 | 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ナノスケールレベルでの分布解析 | 玄 学南 |
| 中尾 洋一 | 抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と作用機序解析 | 菅沼 啓輔 |
| 二瓶 浩一 | 新規抗アピコンプレクサ類原虫薬 DKP 誘導体の実用化 | 西川 義文 |

| | | |
|------------------------|--|-------|
| 関 まどか | クリプトスポリジウム症に対する初乳中の抗体による予防効果の検討 | 西川 義文 |
| 堀内 雅之 | 小型動物を用いた媾疫トリパノソーマ感染モデルの構築と病理学的解析 | 菅沼 啓輔 |
| 井口 愛子 | <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> 様原虫の疫学的調査 | 玄 学南 |
| Tserendorj MUNKHJARGAL | Molecular identification of fly vector of haemoparasites in Mongolia | 福本 晋也 |
| Haiyan Gong | Microbiome comparasion of the tick <i>Haemaphysalis longicornis</i> from the labs of China and Japan | 白藤 梨可 |

③共同利用・共同研究の参加状況

| 区分 | 令和元年度（単位：人） | | | | | | | | |
|---------------|-------------|-------------|--------------|------------|------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | 機関数 | 受入人数 | | | | 延べ人数 | | | |
| | | 外国人 | 若手研究者(35歳以下) | 大学院生 | 外国人 | 若手研究者(35歳以下) | 大学院生 | | |
| 学内(法人内) | 8 | 66 (28) | 41 (15) | 56 (24) | 18 (8) | 991 (410) | 641 (196) | 842 (347) | 324 (70) |
| 国立大学 | 16 | 61 (7) | 2 (1) | 9 (5) | 5 (3) | 78 (11) | 6 (3) | 16 (9) | 7 (5) |
| 公立大学 | 1 | 1 (1) | 0 (0) | 1 (1) | 0 (0) | 1 (1) | 0 (0) | 1 (1) | 0 (0) |
| 私立大学 | 6 | 13 (0) | 1 (0) | 5 (0) | 2 (0) | 22 (0) | 2 (0) | 10 (0) | 3 (0) |
| 大学共同利用機関法人 | 0 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 独立行政法人等公的研究機関 | 14 | 36 (6) | 1 (0) | 2 (0) | 0 (0) | 56 (11) | 2 (0) | 3 (0) | 0 (0) |
| 民間機関 | 28 | 54 (5) | 0 (0) | 2 (1) | 0 (0) | 59 (5) | 0 (0) | 2 (1) | 0 (0) |
| 外国機関 | 30 | 55 (21) | 50 (21) | 22 (13) | 6 (4) | 1090 (728) | 1086 (728) | 913 (653) | 399 (280) |
| その他 | 1 | 1 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| 計 | 82 | 303 (65) | 81 (28) | 98 (40) | 27 (11) | 2110 (613) | 1234 (356) | 1451 (492) | 484 (129) |

※下段には女性研究者数（内数）

④学会誌、学術雑誌、国際会議等に掲載された論文数

| 区 分 | | 令和元年度 | |
|------------------|--|-------|--|
| 論 文 数 | | 82 | |
| うち国際学術誌に掲載された論文数 | | 74 | |

⑤出版物の発行部数

| 出版物の名称 | 発行部数 |
|--------------------------------------|------|
| The Journal of Protozoology Research | 227 |

⑥受賞状況

| 受賞者氏名 | 賞 名 | 受賞年月 | 受賞対象となった研究課題名等 |
|-----------------|------------------|------------|---|
| 五十嵐 郁男 | 日本農学賞・読売農学賞 | H31年 4月 | 家畜の原虫病に対する診断、治療、予防法の開発に関する研究 |
| Ragab M. Fereig | 第10回 日本獣医寄生虫学奨励賞 | R1年 9月 | Development of potent and safe vaccine candidates against <i>Neospora caninum</i> infection |
| 曾賀 晃 | 第10回 日本獣医寄生虫学奨励賞 | R1年 9月 | 齧歯類マラリア原虫における宿主毒性抗生剤を用いた効率的薬剤選択法の確立 |

⑦研究者を対象とした研究会、シンポジウム等の実施状況

| シンポジウム | | 講演会 セミナー | | 研究会 ワークショップ | | そ の 他 | | 合 計 | |
|--------|------|-------------|------|----------------|------|-------|------|-----|------|
| 件数 | 参加人数 | 件数 | 参加人数 | 件数 | 参加人数 | 件数 | 参加人数 | 件数 | 参加人数 |
| 1 | 47 | 11 | 235 | 5 | 168 | 4 | 132 | 21 | 582 |

5. 国際交流状況

①国際シンポジウム等の主催・参加状況

(1)主催状況

| 区分 | 令和元年度 | | |
|-----------------|----------|---|------------------|
| 主催件数 | 12 | | |
| 主催した主な国際シンポジウム等 | | | |
| | 開催時期 | 国際シンポジウム等名称 | 参加人数 (うち外国人数) |
| 1 | R1.6.20 | 原虫病研究センターOB/OG 研究集会 | 63 (61) |
| 2 | R1.7.5 | ショウジョウバエにおける新規抗ウイルス dSTING-dIKK β -Relish 経路の発見に関する講演 | 28 (17) |
| 3 | R1.7.17 | 馬伝染性貧血、馬インフルエンザに関する研究および OIE リファレンスラボラトリーの活動について | 32 29 |
| 4 | R1.7.17 | Special lecture on "Recovery of vascular function in cerebral malaria" | 27 18 |
| 5 | R1.9.18 | 原虫病研究センター共同研究カウンターパートによる「マラリアセミナー」 | 22 15 |
| 6 | R1.9.24 | 上海獣医学研究所との合同セミナー | 10 (7) |
| 7 | R1.9.25 | 3rd International Symposium on Strategies for the Control of Ticks and Tick-borne Diseases | 47 (32) |
| 8 | R1.10.4 | 日本学術振興会外国人研究者再招へい事業 (BRIDGE Fellowship Program) | 24 20 |
| 9 | R1.10.15 | Special lecture on "How do trypanosome receptors for host macromolecules avoid the host immune response?" | 27 (23) |
| 10 | R1.11.14 | Special lecture on "Establishment of Babesia laboratory model and its experimental application." "Proteolytic targets in ticks and tick and tick borne diseases." | 22 (18) |
| 11 | R2.2.4 | JICA 招へい事業「」これからの JICA トレーニングコースを展望した研究発表会とワークショップ | 75 (43) |
| 12 | R2.2.13 | 原虫病研究センター共同研究成果報告会 | 24 (3) |

(2)参加状況

| 区 分 | 令和元年度 | | |
|-----------------|--------------------|--|------|
| 参加件数 | 12 | | |
| 参加した主な国際シンポジウム等 | | | |
| | 開催時期 | 国際シンポジウム等名称 | 参加人数 |
| 1 | R1.5.22 ～5.24 | Confarence on the Cooperation and Collaboration on Prevention and Control of Animal Diseases (成果発表) | 1 |
| 2 | R1.5.23 | One Health: Diagnostics in Zoonotic Schistosomiasis, The 1st International Forum on Collaborative Researchs in Parasitic Diseases, Parasitology Beyond Microscopy, (1st IFCR), University of the Philippines Manila (招待講演) | 1 |
| 3 | R1.6.23 ～6.24 | Bio EM 2019 (成果発表) | 1 |
| 4 | R1.6.26 ～6.27 | OIE リファレンス会議 | 1 |
| 5 | R1.7.8 ～7.10 | Eighth International Symposium on Molecular Insect Science (成果発表) | 2 |
| 6 | R1.8.13 ～8.15 | 4th International conference on NTTAT (成果発表) | 2 |
| 7 | R1.9.9 ～9.10 | 第 12 回国際感染症学会 (成果発表) | 1 |
| 8 | R1.10.14 ～10.15 | 3rd International Conference on Veterinary & Animal Sciences (成果発表) | 1 |
| 9 | R1.10.24 ～10.25 | 4th World Summit & Expo on Food Technology and Probiotic (成果発表) | 1 |
| 10 | R1.10.31 ～11.1 | Keystone Symposia 2019 The Malaria Endgame (成果発表) | 1 |
| 11 | R1.12.10 | Molecular Techniques in the Study of Babesia Parasites, Open Lecture Series: Advanced Techniques in Parasitic Diseases Research, University of the Philippines Los Baños, Philippines (招待講演) | 2 |
| 12 | R2.2.22 | The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program The 50th Joint Conference on Parasitic Diseases. (成果発表) | 1 |

②国際学術交流協定の状況

| 協定総数 | 15 | | | | | | |
|--------------|--------------|---------|-------------------|-------|-----|------|------|
| 締結年月 | 終了予定年月 | 相手国 | 機 関 名 | 協 定 名 | 分 野 | 受入人数 | 派遣人数 |
| 2008年 11月 | 2023年 11月 | フィリピン | フィリピン大学マニラ校公衆衛生学部 | MOA | 原虫病 | 0 | 4 |
| 2010年 9月 | 2020年 9月 | 中国 | 中国農業科学院上海獣医学研究所 | MOU | 原虫病 | 5 | 3 |
| 2011年 9月 | 2021年 9月 | 中国 | 延辺大学 | MOU | 原虫病 | 0 | 0 |
| 2015年 12月 | 2020年 12月 | ケニア | ナイロビ大学 | MOA | 原虫病 | 0 | 0 |
| 2015年 12月 | 2020年 12月 | ウガンダ | マケレレ大学 | MOA | 原虫病 | 1 | 4 |
| 2016年 6月 | 2021年 6月 | ブルキナファソ | ワガドゥーグー大学 | MOA | 原虫病 | 1 | 0 |
| 2017年 6月 | 2022年 6月 | 南アフリカ | ノースウェスト大学 | MOA | 原虫病 | 3 | 0 |
| 2017年 2月 | 2022年 2月 | エジプト | マンスーラ大学 | MOA | 原虫病 | 1 | 0 |
| 2017年 11月 | 2022年 11月 | 中国 | 中国青海獣医学研究所 | MOA | 原虫病 | 0 | 0 |
| 2018年 1月 | 2023年 1月 | ブルキナファソ | 国際湿地帯畜産研究開発センター | MOA | 原虫病 | 0 | 0 |
| 2018年 5月 | 2022年 5月 | フィリピン | セブ工科大学 | MOU | 原虫病 | 0 | 0 |
| 2019年 6月 | 2024年 6月 | モンゴル | モンゴル獣医学研究所 | MOA | 原虫病 | 6 | 7 |
| 2019年 7月 | 2022年 7月 | フィリピン | フィリピンカラバオセンター | MOU | 原虫病 | 0 | 4 |
| 2019年 7月 | 2024年 7月 | スリランカ | スリランカ動物生産健康局 | MOU | 原虫病 | 1 | 5 |
| 2019年 10月 | 2022年 10月 | フィリピン | カビテ州立大学 | MOU | 原虫病 | 1 | 1 |
| 合 計 | | | | | | 19 | 28 |

③国際的な研究プロジェクトへの参加状況

| 総 数 | 7 | | |
|----------------|--|--|--|
| 参加期間 | 相手国・研究機関名 | 研究プロジェクト等の概要 | 関係研究者名 |
| 平成 27 年度～令和元年度 | ザンビア・ザンビア大学 | <p>プロジェクト名：アフリカにおける顧みられない熱帯病 (NTDs) 対策のための国際共同研究プログラム・迅速診断法の開発とリスク分析に基づいた顧みられない熱帯病対策モデルの創成</p> <p>プロジェクト概要：本事業では、ザンビアにおけるアフリカ睡眠病(HAT)流行実態の調査、HAT 感染のリスクファクター分析による感染制御対策の策定、ICT HAT 診断キットの開発を最終目的として、HAT 流行実態調査及び HAT リスクファクターの収集と分析及び ICT HAT 診断キットの有用性評価と社会実装を担当する。疫学調査の実施とトリパノソーマ分離培養法の検討・試行、さらに動物トリパノソーマ病で有用性が示されている GM6 抗原を用いた ICT を HAT 診断に利用するための基礎的検討及び HAT 患者検体を用いた HAT 診断 ICT キット有用性評価の試行を行う。</p> <p>参加国：ザンビア 予算総額：2,470 万円</p> | 菅沼 啓輔 |
| 平成 29 年度～令和元年度 | ベトナム・フエ大学 タイ・カセサート大学 フィリピン・デラサール大学 スリランカ・獣医学研究所 | <p>プロジェクト名：JSPS 拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）・マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築</p> <p>プロジェクト概要：本事業では、これまでセンターが設立初期から形成して来たアジア諸国（ベトナム、タイ、フィリピン、スリランカ）の研究機関との交流ネットワークを活用し、新たにマダニ媒介原虫感染症の制圧に特化した国際共同研究拠点を構築することを目標とする。すなわち、ゲノム科学に立脚した、各流行地域に適したマダニとマダニ媒介原虫感染症に対する斬新な診断・治療・予防法の創出を通し、開発途上国における家畜生産性向上への貢献を目的とした国際ネットワークのプラットフォームを形成する。さらに、日本側及び相手国側の大学院生・若手研究者を積極的に本事業の中心で活躍させることにより、マダニ媒介原虫感染症の基礎・応用研究に精通したグローバルな若手研究者を育成する。</p> <p>参加国：日本・ベトナム・タイ・フィリピン・スリランカ 予算総額：2,000 万円</p> | 玄 学南 横山 直明 福本 晋也 白藤 梨可 菅沼 啓輔 |

| 参加期間 | 相手国・研究機関名 | 研究プロジェクト等の概要 | 関係研究者名 |
|--------------|--|---|--|
| 平成30年度～令和2年度 | トルコ・セルチユーク大学 | <p>プロジェクト名：国際共同研究強化（B）・トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立</p> <p>プロジェクト概要：バベシア原虫はマダニにより媒介される住血寄生虫である。家畜に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死感染を引き起こし、地球規模で畜産業の脅威となっている。本研究では、古来よりアジア・ヨーロッパ・中東などの家畜交易中継地として知られるトルコに着目した。当国における遺伝的に多様な原虫集団を対象とし、ゲノム疫学的手法に基づく家畜バベシア症の流行実態の解明と、ゲノム情報に立脚した現地即応型のバベシア症制御戦略の構築を目指す。</p> <p>参加国：日本・トルコ 予算見込み額：1,780万円</p> | 玄 学南 五十嵐 慎 |
| 令和元年度～令和3年度 | スリランカ・獣医学研究所、フィリピン・セブ工科大学、ベトナム・フエ大学、モンゴル・獣医学研究所、ウガンダ・マケレレ大学、ブラジル・バイア獣医協議会、アルゼンチン・農業技術研究所 | <p>プロジェクト名：国際共同研究強化（B）・新たに発見された病原性牛バベシアに対する国際防疫体制強化に向けた基盤研究</p> <p>プロジェクト概要：牛バベシア病とは、マダニによって媒介され、赤血球に寄生して牛に発熱、貧血、血色素尿を呈し、多大な経済的被害をもたらす海外悪性伝染病である。我々がスリランカ国で発見した新バベシアは、我が国で家畜法定伝染病の病原体に指定されている既知の <i>Babesia bovis</i> と <i>Babesia bigemina</i> に続く、第3の病原性牛バベシア (<i>Babesia</i> sp. <i>My-mensingh</i>) である。本研究では、海外研究機関と連携して、現地調査、分離培養、牛感染試験などを実施し、新たに発見された病原性牛バベシアに対する国際防疫体制強化に資する学術基盤を構築していく。</p> <p>参加国：日本・スリランカ・フィリピン・ベトナム・モンゴル・ウガンダ・ブラジル・アルゼンチン 予算見込み額：1,410万円</p> | 横山 直明 白藤 梨可 ティルラセンバラム シヴァクマール |

| 参加期間 | 相手国・研究機関名 | 研究プロジェクト等の概要 | 関係研究者名 |
|-------------|------------------------------------|--|------------------------|
| 令和元年度～令和4年度 | ウガンダ・マケレレ大学およびKiboga 県の農家、獣医師、畜産技師 | <p>プロジェクト名：独立行政法人 国際協力機構 草の根技術協力事業 パートナー型・マダニ媒介感染症制御による畜産農家支援プログラム</p> <p>プロジェクト概要：これまでに蓄積した研究成果の社会還元事業である。より具体的には、科学的根拠に基づいたマダニ駆除ならびにマダニ媒介感染症対策プログラムを構築し、対象農家の生産性を改善しようとするものである。</p> <p>参加国：日本・ウガンダ</p> <p>予算見込み額：10,000 万円</p> | 鈴木 宏志 玄 学南 藤崎幸蔵ら |
| 令和元年度～令和4年度 | フィリピン・フィリピン大学 | <p>プロジェクト名：国際共同研究強化 (B) ・マイクロサテライトマーカーを応用した日本住血吸虫症対策の創出を目指した研究</p> <p>プロジェクト概要：日本住血吸虫症はアジアの農村や漁村で流行し、家畜動物から中間宿主を介してヒトへの感染も成立することから、保健衛生および家畜衛生と密接に関連した顧みられない人獣共通感染症となっている。日本住血吸虫症の排除 (elimination) を達成するには、寄生虫のライフサイクルを俯瞰的に把握する必要がある。本研究では、島嶼国フィリピンの多様な寄生虫ライフサイクル全体を対象としたマイクロサテライト (STR) マーカーによる多座位の遺伝子型 (MLG) 解析解析から、各宿主を嗜好して適応した寄生虫集団の存在を証明してその遺伝的特性 (マーカー型) を明らかにする。同時にマーカーと患者での病態との関係も明らかにする。</p> <p>参加国：日本・フィリピン</p> <p>予算見込み額：1,410 万円</p> | 河津 信一郎 尾針 由真 |

| 参加期間 | 相手国・研究機関名 | 研究プロジェクト等の概要 | 関係研究者名 |
|-------------|---------------------------|---|--------|
| 令和元年度～令和5年度 | タイ・チェンマイ大学・プリンスオブソンクラーク大学 | <p>プロジェクト名：国際共同研究強化（B）・フィラリアを媒介しない蚊作出に向けたタイ王国における犬糸状虫の生態疫学調査</p> <p>プロジェクト概要：蚊は病原体の媒介者として、人類に最も脅威を与えている生物(Top Deadliest Animal)である。殺虫剤耐性、生態系への影響などへの問題から、殺虫剤による蚊の撲滅は困難である。そこで病原体を媒介しない蚊へと置換することで、感染症を制圧できないかとの概念が浮上してきた。近年のゲノム編集技術の進歩により、病原体を媒介しない蚊の実現が技術的に可能となってきた。そこで本研究では、犬糸状虫を媒介しない蚊の作出実現にむけた基礎的知見を得るために、タイ王国で犬と蚊における犬糸状虫疫学調査を行い、どのような遺伝子応答が蚊による犬糸状虫の媒介に重要なのかフィールドレベルで解析を行うことを目指す。</p> <p>参加国：日本・タイ 予算見込み額：1,410万円</p> | 福本 晋也 |

④研究者の海外派遣状況・外国人研究者の招へい状況（延べ人数）

| | | 令和元年度 | |
|------|-----------|-------|-------|
| | | 派遣状況 | 招へい状況 |
| 事業区分 | 合計 | 52 | 52 |
| | 文部科学省事業 | 0 | 0 |
| | 日本学術振興会事業 | 30 | 19 |
| | 当該法人による事業 | 22 | 33 |
| | その他の事業 | 0 | 0 |
| 派遣先国 | ① アジア | 37 | 35 |
| | ② 北米 | 4 | 0 |
| | ③ 中南米 | 0 | 1 |
| | ④ ヨーロッパ | 5 | 6 |
| | ⑤ オセアニア | 0 | 1 |
| | ⑥ 中東 | 0 | 3 |
| | ⑦ アフリカ | 6 | 6 |

⑤その他・国際研究協力活動の状況

| 事業名等 | 概要 | 受入人数 | 派遣人数 |
|-------------|---|------|------|
| JICA 招へい事業 | 地域と世界をつなぐ国際協力 ～JICA における畜産分野協力の現状と今後のニーズについて～ 十勝地域における JICA 事業の今後の展開を探るワークショップ | 4 | 0 |
| JSPS 拠点形成事業 | マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築 | 12 | 15 |
| 合計 | | 16 | 15 |

6. 教育活動・人材養成

①大学院生等の受入状況

| 区 分 | 令和元年度 | |
|-----------|-------|-------|
| | | うち外国人 |
| 博士後期課程 | 15 | 15 |
| うち社会人 DC | 0 | 0 |
| 修士・博士前期課程 | 4 | 2 |
| うち社会人 MC | 0 | 0 |
| 学 部 生 | 16 | 0 |
| 合 計 | 35 | 17 |

②留学生の受入状況

| 区 分 | 令和元年度 |
|--------|-------|
| ①アジア | 12 |
| ②北米 | 0 |
| ③中南米 | 0 |
| ④ヨーロッパ | 0 |
| ⑤オセアニア | 0 |
| ⑥中東 | 2 |
| ⑦アフリカ | 3 |
| 合 計 | 17 |

③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数

| 区 分 | 令和元年度 | |
|---------|-------|----|
| | 学内 | 学外 |
| 博士号取得者数 | 3 | 1 |

④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧

| | | | | |
|---|-------------|--|-------------|----------|
| 1 | 専攻分野名 | 畜産衛生学 | 学位授与 年月日 | R1年9月30日 |
| | 氏名 | パグマデウラン バルドルジ Pagmadulam Baldorj モンゴル | 担当教員 | 西川 義文 |
| | 学位論文 の題名 | Seroepidemiological study of <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Neospora caninum</i> in livestock in Mongolia and characterization of anti-protozoal compounds from soil bacteria in Mongolia | | |
| | 日本語訳 | モンゴルの家畜におけるトキソプラズマ・ゴンディとネオスポラ・カニナムの血清疫学調査およびモンゴルの土壌細菌由来抗原虫化合物の解析 | | |
| 2 | 専攻分野名 | 畜産衛生学 | 学位授与 年月日 | R1年9月30日 |
| | 氏名 | ホワンピン グオ Huanping Guo (郭 煥平) 中国 | 担当教員 | 玄 学南 |
| | 学位論文 の題名 | Functional characterization of dense granule protein 9 in <i>Toxoplasma gondii</i> | | |
| | 日本語訳 | トキソプラズマのGRA9分子の機能解析 | | |
| 3 | 専攻分野名 | 畜産衛生学 | 学位授与 年月日 | R2年3月19日 |
| | 氏名 | アリフィン ブジマン ヌグラハ Arifin Budiman Nugraha インドネシア | 担当教員 | 横山 直明 |
| | 学位論文 の題名 | Studies on epidemiology, development of chemotherapy and genetic modification of piroplasma | | |
| | 日本語訳 | ピロプラズマの疫学、薬剤開発および遺伝子改変に関する研究 | | |
| 4 | 専攻分野名 | 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 | 学位授与 年月日 | R2年3月13日 |
| | 氏名 | ダン トリン ミン アン DANG Trinh Minh Anh ベトナム | 担当教員 | 河津 信一郎 |
| | 学位論文 の題名 | Studies on the Diagnosis of <i>Schistosoma japonicum</i> Infection Utilizing Real-time PCR and ELISA | | |
| | 日本語訳 | リアルタイムPCR及びELISAを応用した日本住血吸虫症の診断法に関する研究 | | |

7. 情報発信・広報活動等

①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）

| シンポジウム 講演会 | | 公開講座 セミナー | | その他 (施設等の一般公開等) | | 合 計 | |
|-------------------------------|----------------|--------------|--|---|----------|-----|------|
| 件 数 | 参加人数 | 件 数 | 参加人数 | 件 数 | 参加人数 | 件 数 | 参加人数 |
| 6 | 240 | 10 | 194 | 5 | 150 | 21 | 584 |
| ○主なシンポジウム、公開講演会、施設等の一般公開の開催状況 | | | | | | | |
| 開催期間 | 形態 (区分) | 対象 | 公開講座等名称 | 概 要 | 参加 人数 | | |
| R1.7.5 | 講演会 | 国際 | ショウジョウバエにおける新規抗ウイルスdSTING-dIKKβ-Relish経路の発見に関する講演 | ショウジョウバエにおける抗ウイルスシグナル伝達経路 (dSTING-dIKKβ-Relish)および新規の抗ウイルスタンパク質 Nazo(謎)の発見 フランス国立保健医学研究所(INSERM) 田島(後藤) 彰 先生 | 28 | | |
| R1.9.24 | セミナー | 国際 | 上海獣医学研究所との合同セミナー | 二国間交流事業の一環でセミナーを開催 3名の研究者がマダニとマダニ媒介感染症の診断・治療・予防法開発に関する研究発表を行った | 10 | | |
| R1.9.25 | シンポジウム | 国際 | 3rd International Symposium on Strategies for the Control of Ticks and Tick-borne Diseases | JSPS 拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）・マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築の一環でセミナーを開催 | 47 | | |
| R2.2.4 | 研究会 ワークショップ | 国際 | JICA 招へい事業「これからの JICA トレーニングコースを展望した研究発表会とワークショップ」 | JICA 招へい事業の一環として、これからの JICA トレーニングコースを展望した研究発表会とワークショップ「Development Cooperation Connecting Local Regions and the World~ Current status and future needs of livestock cooperation in JICA ~」 | 75 | | |

| | | | | | |
|---------|-----|----|--------------------|--|----|
| R2.3.13 | 研究会 | 国際 | 原虫病研究センター共同研究成果報告会 | 本研究センターと他大学の先生方とで実施した、共同研究の成果報告会 発表者 (Speaker) : 福岡大学理学部化学科教授 小柴 琢己氏 静岡大学グリーン科学技術研究所 所長・教授 朴 龍洙氏 獨協医科大学医学部教授 川合 覚氏 金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授 伊従 光洋氏 | 24 |
|---------|-----|----|--------------------|--|----|

② 定期刊行物やホームページによる一般社会に対する情報発信の取組

| 情報発信の手段・手法 | 概要およびわかりやすい情報発信のための工夫 |
|------------|---|
| ホームページ | <p>センター専用のホームページ（日本語版・英語版）を開設し、研究活動（プロジェクト、国際協力）や研究成果（論文リスト、受賞、年報）のほか、毎年度発行している年報や原虫病に関する国際的定期刊行誌「The Journal of Protozoology Research ISSN 0917-4427」等を掲載し、国内外に向け広く紹介している。</p> <p>なお、研究内容が研究者のみならず、一般市民に向けても、広く理解が得られるよう、情報発信について工夫している。例えば多くの原虫病を媒介し、人や動物に甚大な被害を与えている「マダニ」の研究については、「マダニ解説ビデオ」や「とかちマダニじてん」を制作し、公開している。</p> <p>さらに、平成 29 年度には OIE コラボレーティングセンター及びリファレンスラボラトリーの専用ホームページを新たに作成し、実施可能なスーラ病診断検査に関する情報と検査依頼手順を公開した。また、この手順書は、米国農務省・動植物検疫所 (USDA-APHIS) ホームページからも公開されている。この取り組みにより、共同研究における申請件数や OIE コラボレーティングセンター及びリファレンスラボラトリー検査数の大幅な増加に繋がった。</p> |
| SNS | <p>研究ジャーナルや人材育成活動などの情報を発信するため、Facebook を開設し、研究成果等の情報を公開するとともに、研究者コミュニティや一般ユーザからのレスポンス把握に利用している。この取り組みにより、共同研究における申請件数の大幅な増加や共同利用・共同研究拠点の活動内容の研究者コミュニティへの周知拡大に繋がった。</p> |
| パンフレットの作成 | <p>毎年センター概要や研究活動を紹介したリーフレット（日本語版・英語版）を作成し、国内外の関係機関への送付や公共施設への設置、市民が来場するイベントでの配布等により、センターの活動について広く周知している。この取り組みにより、共同研究における申請件数の大幅な増加や共同利用・共同研究拠点の活動内容の一般市民への周知拡大に繋がった。</p> |

8. 分野等の研究活動

節足動物衛生工学分野

-----◆----- 准教授 福本晋也
(Shinya Fukumoto)

1. 研究テーマの概要

節足動物によって媒介される感染症には、マラリア・眠り病・日本脳炎・フィラリアなどがあります。これらの感染症の原因となる寄生虫・ウイルス・細菌の伝播には媒介節足動物、すなわち“ベクター”が必須となります。言い換えれば、病原体のベクターステージを断ち切ることで、動物やヒトへの感染を防ぐことができます。このコンセプトに基づき、病原体がベクターの中でどのように振る舞っているのか？ベクターと病原体の間にはどのような相互作用があるのか？はたしてベクターにとって病原体とは何物なのか？このような事象について、病原体とベクター昆虫がおりなす特有の生命現象を、実験室レベルでの基礎的実験データから、感染症アウトブレイク地域での国内外フィールド調査までを有機的に統合し、そして徹底的に解析することで、ベクターステージコントロールによる原虫病の制御を実現するため研究を行っています。また、近年問題となっているエゾシカなどの野生動物について、人獣共通感染症や家畜感染症のレゼルボアとしての意義を明らかにするため、地元根ざした調査研究を実施しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ 媒介蚊における病原体感染分子機構
- ・ タイ王国における節足動物媒介性寄生虫感染症の疫学調査
- ・ 沖縄県における蚊媒介性寄生虫感染症の包括的調査
- ・ エゾシカ保有病原体叢の網羅的解析

3. 2019 年度研究の総括

- ・ マラリア原虫は昆虫と哺乳動物の生物学的に異なる2宿主間を渡り歩き、感染を成立させます。マラリア原虫の感染メカニズム解析には、遺伝子組換え原虫が必須のツールとなってきています。ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* は全生活環を実験室で再現可能であることから、マラリアのモデルとして研究に用いられています。本原虫における遺伝子操作では、*in vivo* ピリメタミン、WR99210 薬剤選択システムが常用されています。しかしながらそれらの併用が難しいことに加え、宿主毒性薬剤を使用できないという制約から、他の選択システムがなく、遺伝子操作の制限が大きいです。この問題を解決し、より自由度の高い遺伝子操作を可能にするため、我々は *P. berghei* における *in vitro* 薬剤選択法の開発を進めました。その結果、薬剤存在下の人工合成による薬剤耐性マーカー遺伝子の利用を考案し、本法を用いピューロマイシン・プラストサイジン選択システムの確立に成功しました。この研究成果は、より自由度の高い組換えネズミマラリア原虫作製の機会を提供するものであり、マラリア研究の進展に寄与することが期待されます(論文リスト3)。

- ・ 近年の野生鳥獣被害と捕獲必要性の増加を受け、野生鳥獣肉の食利用への期待が高まっています。しかしながら、その安全性の担保については理想的状態とは言えず、公衆衛生上のリスク要因であると懸念されています。そこで、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を調査モデル地域として研究を実施しました。エゾシカサンプルの収集・微生物叢について次世代シーケンサーを用いた解析を実施しデータの集積を行いました。その結果、肝蛭、腸管出血性大腸菌、クリプトスポリジウム、住肉胞子虫、住血原虫など、多様な食中毒に関連する病原体をエゾシカが保有していることが明らかになりました。令和元年度においては、その中でもタイレリア、クリプトスポリジウムについて調査を行いました。タイレリアについては高度に蔓延していること、クリプトスポリジウム Deer Genotype がエゾシカの優性種であることが確認されました。(論文リスト 1,6,8,9)。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本衛生動物学会幹事
- ・ 日本分子生物学会
- ・ 日本寄生虫学会評議員
- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 日本食品微生物学会

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（* 責任著者）

1. Takahiro Shirozu, Akira Soga, Yuki Morishita, Nobuaki Seki, Mami Ko-ketsu, **Shinya Fukumoto***. Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* infections in Yezo sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in the Tokachi sub-prefecture of Hokkaido, Japan. **Parasitology International**. 2020, 76:102064. PMID: 31978598
2. Yenni Yusuf, Tatsuya Yoshii, Mitsuhiro Iyori, Hiroaki Mizukami, **Shinya Fukumoto**, Daisuke S. Yamamoto, Talha Bin Emran, Fitri Amelia, Ashekul Islam, Intan Syafira, and Shigeto Yoshida. A viral-vectored multi-stage malaria vaccine regimen with protective and transmission-blocking efficacies. **Frontiers in Immunology**. 2019, 10:2412. PMID: 31681301
3. Akira Soga, Takahiro Shirozu, Mami Ko-ketsu & **Shinya Fukumoto***. Improvement of an in vitro drug selection method for generating transgenic *Plasmodium berghei*

- parasites. **Malaria Journal**. 2019, 18(1):215. PMID: 31238932
4. Hironori Bando, Ariel Pradipta, Shiroh Iwanaga, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Shun Tanaka, Joel Vega-Rodríguez, Youngae Lee, Ji Su Ma, Naoya Sakaguchi, Akira Soga, **Shinya Fukumoto**, Miwa Sasai, Yoshiharu Matsuura, Masao Yuda, Marcelo Jacobs-Lorena, Masahiro Yamamoto. CXCR4 regulates *Plasmodium* development in mouse and human hepatocytes. **The Journal of Experimental Medicine**. 2019, 216(8):1733-48. PMID: 31189656
 5. Yenni Yusuf, Tatsuya Yoshii, Mitsuhiro Iyori, Kunitaka Yoshida, Hiroaki Mizukami, **Shinya Fukumoto**, Daisuke S Yamamoto, Asrar Alam, Talha Bin Emran, Fitri Amelia, Ashekul Islam, Hiromu Otsuka, Eizo Takashima, Takafumi Tsuboi and Shigeto Yoshida. Adeno-Associated Virus as an Effective Malaria Booster Vaccine Following Adenovirus Priming. **Frontiers in Immunology**. 2019, 10:730. PMID: 31024558
 6. Tokio Hoshina, **Shinya Fukumoto**, Hiroka Aonuma, Erisha Saiki, Seiji Hori, Hirotaka Kanuka. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild sika deer in Japan. **Parasitology International**. 2019, 71:76-9. PMID: 30940609
 7. Aboubacar Sombié, Erisha Saiki, Félix Yaméogo, Tatsuya Sakurai, Takahiro Shirozu, **Shinya Fukumoto**, Antoine Sanon, David Weetman, Philip J. McCall, Hirotaka Kanuka and Athanase Badolo. High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgande (Ouagadougou), Burkina Faso. **Tropical Medicine and Health**. 2019, 47:2. PMID: 30787670
 8. Seung-Hun Lee, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Mingming Liu, Byamukama Benedicto, Maria Agnes Tumwebaze, Damdinsuren Boldbaatar, Rika Umemiya-Shirafuji, **Shinya Fukumoto***, Xuenan Xuan. Differential diagnosis and molecular characterization of *Theileria spp.* in sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido, Japan. **Parasitology International**. 2019, 70:23-6. PMID: 30664981
 9. Jamsransuren Dulamjav, Yoshii Kentaro, Kariwa Hiroaki, Asakawa Mitsuhiko, Okuda Kei, Fujii Kei, **Fukumoto Shinya**, Umemiya-Shirafuji Rika, Sasaki Motoki, Matsumoto Kotaro, Yamaguchi Emi, Ogawa Haruko, Imai Kunitoshi. Epidemiological survey of tick-borne encephalitis virus infection in wild animals on Hokkaido and Honshu islands, Japan. **Japanese Journal of Veterinary Research**. 2019, 67(2):163-72.

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

1. ベクターステージにおける犬糸状虫伝播制御への試み 第 75 回日本寄生虫学会西日本支部大会、金沢市金沢大学、令和元年 9 月 22 日

9. 獲得研究費

1. 平成 31 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省) ベクター蚊におけるフィラリア媒介能獲得機構の遺伝学的分子基盤の解明 (19H03121)、代表、平成 31 年度～令和 3 年度
2. 平成 31 年度 挑戦的萌芽研究 (文部科学省) 殺ベクター型原虫による病原体媒介蚊制御法の開発 (19K22355)、代表、平成 31 年度～令和 2 年度
3. 平成 26 年度 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化(B)) (文部科学省) フィラリアを媒介しない蚊作出に向けたタイ王国における犬糸状虫の生態疫学調査 (19KK0175)、代表、令和元年度～令和 5 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞者：曾賀 晃 (当時大学院生)
受賞名：第 10 回日本獣医寄生虫学奨励賞 (日本獣医寄生虫学会)
受賞テーマ：齧歯類マラリア原虫における宿主毒性抗生剤を用いた効率的薬剤選択法の確立
受賞年：令和元年 9 月 10 日

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. Antoine Sanon : University of Ouagadougou, MEMORANDUM OF AGREEMENT, BETWEEN UFR LIFE AND EARTH SCIENCE, UNIVERSITE OUAGA I PR JOSEPH KI-ZERBO, BURKINA FASO AND NATIONAL RESEARCH CENTER FOR PROTOZOAN DISEASES, OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE, JAPAN、2016 年 6 月～2021 年 5 月、学術協定
2. 篠井 宏実：北里大学獣医学部、マラリア原虫の媒介蚊体内ステージのオーシスト形成機構の解明、平成 31 年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

当研究室では、バベシア症やトキソプラズマ症における宿主免疫機構の解明と新規予防・治療法の開発に関する研究を行っています。バベシアやトキソプラズマに感染し、回復した動物は同じ種または近縁種の原虫の再感染に抵抗性を示すが、その抵抗性免疫獲得の機構はまだよく分かっていません。この感染防御免疫機構が解明できれば、新規ワクチン開発につながります。バベシア症は重度の溶血性貧血を主徴としますが、この溶血性貧血の原因には、赤血球内における原虫増殖による直接的破壊によるものと、未感染赤血球に対する自己抗体による間接的破壊（自己免疫性）によりものがあります。自己免疫性溶血性貧血機構の解明は、新規治療法の開発につながります。一方、バベシアを媒介するマダニ体内における虫体の発育ステージの解明と伝播阻止ワクチンの開発にも取り組んでいます。また、国内外におけるマダニ媒介感染症の流行実態の調査と制御戦略の確立に関する研究も展開しています。

2. 主な研究テーマ

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

3. 2019 年度研究の総括

- ・ バベシア属の原虫の中、*Babesia microti* はネズミ由来のバベシアですが、人にも感染する人獣共通感染症の病原原虫としても知られています。近年、ヒトのバベシア症例の報告は増加の傾向にあり、その予防対策が求められています。バベシア属には、*B. microti* を含め 100 種類以上特定されていますが、いまのところ遺伝子操作ができるのは牛バベシアや犬バベシアに限られています。そこで、*B. microti* の遺伝子操作系の確立を試みました。*B. microti* のゲノムデータベースよりアクチン、伸長因子、HSP70 のプロモーター領域を特定し、ルシフェラーゼ (Luc) をレポーターとした遺伝子発現プラスミドを構築しました。これらのプラスミドを *B. microti* に導入したところ、Luc 遺伝子の一過性発現に成功しました。なお、プロモーター活性比較では、アクチン由来のプロモーターが最も高い活性を示しました。これらの結果により、今後 *B. microti* の薬剤標的解析や組換えワクチン開発への進展が期待されます。(論文リスト 2)
- ・ 犬バベシア症は、バベシア (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni*) の赤血球内寄生によって引き起こされるマダニ媒介性疾患であります。バベシアに感染した犬は、重度な溶血性貧血を引き起こし、死に至る場合も多いです。日本を含む世界中に発生が認められ、その被害は深刻とさ

れるが、いまだに副作用の少ない有効な治療法が開発されていないのが現状であります。そこで、当研究室では特に日本を含むアジア地域で流行が深刻とされる犬バベシア (*B. gibsoni*) 症に対する治療法やワクチン開発の研究に注力してきました。今回は、サイバーグリーン (核酸染色用色素) を用いたハイスループットスクリーニング方法を確立しました。この方法を活用することで、今後種々の化合物ライブラリーの抗 *B. gibsoni* の効果測定を効率的に行うことができるようになりました。(論文リスト4)

- ・ トキソプラズマは、妊婦が初感染すると流産や異常産を引き起こし、免疫不全者には重篤な脳症などを引き起こす、人獣共通感染症の原因原虫であります。現行の治療法には副作用などの問題があり、より安全な治療法の確立が求められています。本研究では、トキソプラズマのアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AAT) 遺伝子を標的とした治療法の確立を試みました。AAT のインヒビターとしてしられるヒドロキシルアミン (HYD) とカルボキシメトキシルアミン (CAR) のトキソプラズマ虫体増殖への抑制効果を調べたところ、これらの化合物が試験管内とマウス体内で、何れも殺原虫作用が認められました。。しかしながら、AAT 遺伝子欠損原虫においても、これらの原虫増殖抑制作用は顕著には減弱されなかったことから、HYD と CAR の殺トキソプラズマ作用には、AAT 非依存的経路も存在することが示唆されました。今後、AAT の他のインヒビターの探索や HYD・CAR の殺原虫作用機序のさらなる解明が求められます。(論文リスト6)
- ・ 中国、フィリピン、ケニア、南アフリカなどにおける家畜 (牛・水牛・ヤク・羊・山羊) におけるマダニ媒介感染症の流行実態調査を広範囲に渡り実施しました。調査した地域において、バベシア属、タイレリア属、アナプラズマ属、エーリキア属、リケッチア属などが、家畜生産に被害を与えるマダニ媒介感染症であることがそれぞれ明らかになりました。これらの結果は、調査した地域におけるマダニ媒介感染症制御対策の重要性を強く問題提起するものであります。(論文リスト1、8、10、11、14、15)

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

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

② 主催した学会、研究会等

- ・ 国際シンポジウム「マダニとマダニ媒介感染症の制御戦略」(日本学術振興会拠点形成事業-アジア・アフリカ学術基盤形成型) (2019年9月25日、当センター)
- ・ モンゴルにおける原虫病研究センター元 JICA 研修員・大学院生・共同研究者らによる研究集会 (2019年6月20日、モンゴル獣医学研究所)

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 長崎大学熱帯医学研究所運営協議会委員

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Yingna Jian, Jixu Li, Paul Franck Adjou Moumouni, Xueyong Zhang, Maria Agnes Tumwebaze, Geping Wang, Qigang Cai, Xiuping Li, Guanghua Wang, Mingming Liu, Yongchang Li, Liqing Ma, Xuenan Xuan*. Human spotted fever group *Rickettsia* infecting yaks (*Bos grunniens*) in the Qinghai-Tibetan plateau area. **Pathogen**. 2020; 9: e249. PMID: 32231020
2. Mingming Liu, Shengwei Ji, Mohamed Abdo Rizk, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Jixu Li, Yongchang Li, Weiqing Zheng, Byamukama Benedicto, Maria Agnes Tumwebaze, Masahito Asada, Xuenan Xuan*. Transient transfection of the zoonotic parasite *Babesia microti*. **Pathogens**. 2020; 9: e108. PMID: 32050586
3. Afraa Elata, Ehab Mossaad, Rawan Satti, Nadia Matar, Yuma Ohari, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma. Serological and molecular detection of selected hemoprotozoan parasites in donkeys in West Omdurman, Khartoum State, Sudan. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82: 286-293. PMID: 31969541
4. Mohamed Abdo Rizk, Shengwei Ji, Mingming Liu, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Yongchang Li, Benedicto Byamukama, Aaron Sdmond Ringo, Xuenan Xuan*, Ikuo Igarashi. Closing the empty anti-*Babesia gibsoni* drug pipeline in vitro using fluorescence-based high throughput screening assay. **Parasitology International**. 2020; 75: 102054. PMID: 31927139
5. Yongchang Li, Mingming Liu, Mohamed Abdo Rizk, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Huanping Guo, Yang Gao, Jixu Li, Amani Magdy Beshbishy, Arifin Budiman Nugraha, Shengwei Ji, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi I, Xuenan Xuan*. Drug screening of food and drug administration-approved compounds against *Babesia bovis* in vitro. **Experimental Parasitology**. 2020; 210: 107831. 31926147
6. Jixu Li, Huanping Guo, Eloiza May Galon, Yang Gao, Seung-Hun Lee, Mingming Liu, Yongchang Li, Shengwei Ji, Honglin Jia, Xuenan Xuan*. Hydroxylamine and carboxymethoxylamine can inhibit *Toxoplasma gondii* growth through an aspartate aminotransferase-independent pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2020; 64: e01889. PMID: 31907178
7. Ehab Mossaad, Ahmed Ali Ismail, Abdalla Mohame Ibrahim, Peter Musinguzi, Tama-dor Angara, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma. Prevalence of different trypanosomes in livestock in Blue Nile and West Kordafan States, Sudan. **Acta**

- Tropica.** 2020; 203: 105302. PMID: 31857080
8. Jixu Li, Yongchang Li, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Maria Agnes Tumwebaze, Hongxia Yang, Huercha, Mingming Liu, Huangping Guo, Yang Gao, Benedicto Byamukama, Wei Zhang, Xinli Fan, Bayin Chahan, Xuenan Xuan*. First description of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. infection and molecular detection of piroplasma co-infecting horses in Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. **Parasitology International.** 2020; 76: 102028. PMID: 31759172
 9. Yuna Kurokawa, Tatsunori Masatani, Rikako Konishi, Kanna Tomioku, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita. Nanoscale analysis reveals no domain formation of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein SAG1 in the plasma membrane of living *Toxoplasma gondii*. **Histochemistry and Cell Biology.** 2019; 152: 365-375. PMID: 31542792
 10. Adrian Ybañez, Orgil Arrabis, Dennis Justin Alvarez, Eloiza May Galon, Rhea mae Jayag, Elmie Delan, Rochelle Haidee Ybañez, Xuenan Xuan*. Evaluation on the presence of *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and *Babesia* spp. in goats (*Capra hircus*) in Cebu, the Philippines. **Veterinary World.** 2019; 12: 774-777. PMID: 31439992
 11. Aaron Ringo, Gabriel Aboge, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Charoonluk Jirapattharasate, Mingming Liu, Yang Gao, Huangping Guo, Weiqing Zheng, Artemis Efstratiou, Eloiza May Galon, Jixu Li, Oriel Thekiso, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan*. Molecular detection and genetic characterisation of pathogenic *Theileria*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species among apparently healthy sheep in central and western Kenya. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research.** 2019; 86: e1-e8. PMID: 31291731
 12. Eloiza May Galon, Paul Franck Adjou Moumouni, Rochelle Haidee Ybañez, Adrian Miki Macalanda, Mingming Liu, Artemis Efstratiou, Aaron Ringo, Seung-Hun Lee, Yang Gao, Huanping Guo, Jixu Li, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Yongchang Li, Adrian Ybañez AP, Xuena Xuan X*. Molecular evidence of hemotropic mycoplasmas in goats from Cebu, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science.** 2019; 81: 869-873. PMID: 31061273
 13. Ehab Mossaad, Bashir Salim, Keisuke Suganuma, Mohammed Hassan, Batdorj Davasuren, Elgailani Elamin, Amel Bakhiet, Rawan Satti, Xuenan Xuan, Simon Peter Musinguzi, Noboru Inoue. Utilization of crude and recombinant ELISAs for serodiagnosis of camel trypanosomosis in Sudan. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports.** 2019; 16:100278. PMID: 31027599
 14. Huanping Guo, Paul Franck Adjou Moumouni, Oriel Thekiso, Yang Gao, Mingming Liu, Jixu Li, Eloiza May Galon, Artemis Efstratiou, Gunbo Wang, Charoonluk Jirapattharasate, Aaron Edmond Ringo, Khethiwe Mtshali, Noboru Inoue, Hiroshi Su-

- zuki, **Xuenan Xuan***. Genetic characterization of tick-borne pathogens in ticks infesting cattle and sheep from three South African provinces. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 2019; 10: 875-882. PMID: 31010732
15. Eloiza May Galon, Paul Franck Adjou Moumouni, Rochelle Haidee Ybañez, Asron Ringo, Artemis Efstratiou, Seung-Hun Lee, Mingming Liu, Huanping Guo, Yang Gao, Jixu Li, Caro Salces, Bon Christian Maurillo, Damdinsuren Boldbaatar, Adrian Ybañez, **Xuenan XuanX***. First molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in water buffaloes in Bohol, Philippines. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 2019; 10: 815-821. PMID: 30952580
 16. Huanping Guo, Yang Gao, Honlin Jia, Paul Franck Adjou Moumouni, Tasunori Masatani, Mingming Liu, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Jixu Li, Yongchang Li, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, **Xuenan Xuan***. Characterization of strain-specific phenotypes associated with knockout of dense granule protein 9 in *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biochemical Parasitology**. 2019; 229:53-61. PMID: 30849416
 17. Nthatisi I Molefe, Peter S Musinguzi, Daisuke Kondoh, Kenichi Watanabe, Oriel M M Thekiso, **Xuenan Xuan**, Noboru Inoue, Keisuke Sukanuma. Short- and long-term effects of orally administered azithromycin on *Trypanosoma brucei brucei*-infected mice. **Experimental Parasitology**. 2019; 199: 40-46. PMID: 30840850
 18. Ybañez Adrian P, Ybañez Rochelle Haidee D, Armonia Reynald Klint M, Chico James Knowell E, Ferraren Kevin James V, Tapdasan Emerson P, Salces Caro B, Maurillo Bon Christian A, Galon Eloiza May S, Macalanda Adrian Miki C, Moumouni Paul Franck A., **Xuenan Xuan***. First molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and the ectoparasite biodiversity in dairy water buffalo and cattle in Bohol, Philippines. **Parasitology International**. 2019; 70: 77-81. PMID: 30776450
 19. Seung-Hun Lee, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Mingming Liu, Byamukama Benedicto, Maria Agnes Tumwebaze, Damdinsuren Boldbaatar, Rika Umemiya-Shirafuji, Shinya Fukumoto, **Xuenan Xuan***. Differential diagnosis and molecular characterization of *Theileria* spp. in sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido, Japan. **Parasitology International**. 2019; 70: 23-26. PMID: 30664981
 20. Mingming Liu, Tatsunori Masatani, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Yang Gao, Huanping Guo, Jixu Li, Yongchang Li, **Xuenan Xuan***. Inhibitory effects of the phytohormone inhibitors fluridone and inabenfide against *Babesia gibsoni* *in vitro*. **Veterinary Parasitology**. 2019; 265: 19-23. PMID: 30638516
 21. Weiqing Zheng, **Xuenan Xuan**, Renlong Fu, Huiying Tao, Rongman Xu, Yangqing Liu, Xiaoqing Liu, Jiafu Jiang, Haixia Wu, Hongmei Ma, Yi Sun, Haiying Chen. Preliminary

investigation of ixodid ticks in Jiangxi Province of Eastern China. **Experimental and Applied Acarology**. 2019; 77: 93-104. PMID: 30542968

総説

1. Mohamed Abdo Rizk, Shimaa Abd El-Sayed El-Sayed, Medhat Nassif, Juan Mosqueda, **Xuenan Xuan**, Ikuo Igarashi. Assay methods for *in vitro* and *in vivo* anti-*Babesia* drug efficacy testing: Current progress, outlook, and challenges. **Veterinary Parasitology**. 2020; 279: 109013. PMID: 32070899
2. Thankgod Onyiche, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Naoaki Yokoyama N, **Xuenan Xuan**, Oriel Thekisoe. A review on equine piroplasmiasis: Epidemiology, vector ecology, risk factors, host immunity, diagnosis and control. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 2019; 16: e1736. PMID: 31100920

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

FM-JAGA（ラジオ局）にて原虫病研究センターの国際協力活動を紹介（2019年10月26日）

9. 獲得研究費

1. 平成 31 年度 研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）、マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、代表、2018 年度～2019 年度
2. 平成 31 年度 基盤研究（B）（一般）（文部科学省）、マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発、代表、2018 年度～2021 年度
3. 平成 31 年度 国際共同研究強化（B）（文部科学省）、トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立、代表、2018 年度～2021 年度
4. 平成 31 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発、代表、2018 年度～2019 年度
5. 平成 31 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、バベシアの赤血球侵入を阻止する新規ナノチューブ遺伝子輸送システムの開発、代表、2018 年度～2019 年度
6. 平成 31 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、ネズミバベシア原虫：マダニ体内ステージ発育の分子基盤の解明と新規制御法の開発、代表、2018 年度～2020 年度
7. 令和 1 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、スーダンにおけるマダニ媒介原虫の流行実態の解明と制御対策の構築、代表、2019 年度～2021 年度

8. 令和1年度 挑戦的研究（萌芽）（文部科学省）、トキソプラズマ潜伏により誘導される抗ウイルス応答：原虫とウイルスの攻防を紐解く、代表、2019年度～2021年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

モンゴル国立生命科学大学から名誉教授の称号を授与（2019年6月21日）

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 藤田 秋一：鹿児島大学獣医学部、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ナノスケールレベルでの分布解析、2019年4月1日～2020年3月31日、平成31年度原虫病研究センター共同研究
2. 井口 愛子：鳥取大学獣医学部、*Babesia gibsoni* におけるアトバコン耐性関連遺伝子ならびに *B. odocoilei* 様原虫の疫学的調査、2019年4月1日～2020年3月31日、平成31年度原虫病研究センター共同研究
3. Ferda SEVINC：トルコ Selcuk 大学獣医学部、トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立、2018年10月1日～2022年3月31日、国際共同研究強化(B)（文部科学省）
4. Tawin INPAKAEW：タイ Kasetsart 大学獣医学部、マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2017年4月1日～2020年3月31日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
5. Dinh Thi Bich LAN：ベトナム Hue 大学獣医学部、マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2017年4月1日～2020年3月31日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
6. Adrian YBANEZ：フィリピン大学セブ校獣医学部、マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2017年4月1日～2020年3月31日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
7. Appudurai ARULKANTHAN：スリランカ Peradeniya 大学獣医学部、マダニ媒介原虫感染症の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2017年4月1日～2020年3月31日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）

1. 研究テーマの概要

医学分野で重要なマラリア原虫は、世界で年間 3~5 億人が罹患、年間 200 万人もの命を奪っています。わが国にも存在するトキソプラズマはその感染による流産や新生児の先天性トキソプラズマ症を引き起こし、少子化が進む現代社会には無視できない問題です。また畜産業界では、家畜原虫感染症による家畜の生産性の低下が問題視され、ネオスポラの感染による牛の流産例が全国的に見つかっており、被害の拡大が懸念されています。我々の研究室では、原虫感染による脳神経系の機能異常や宿主動物の行動変化、流産や垂直感染のメカニズムに関する研究を行っています。また、炎症反応や免疫抑制を制御する原虫因子の同定と解析を進めています。これら科学的な知見を基盤に、多機能性素材等を利用することでワクチン抗原を効率よくリンパ系組織へ輸送し、免疫担当細胞を効果的に刺激できる新型次世代ワクチンの開発を行っています。さらに、マウス感染モデルと自然宿主を対象にした感染実験により、ワクチンの実用化を目指しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トキソプラズマ感染による宿主動物の異常行動の解析と中枢神経系の機能破綻メカニズムの解明
- ・ トキソプラズマ、ネオスポラ由来因子による宿主免疫攪乱メカニズムの解明
- ・ マラリア原虫による貧血、トキソプラズマ及びネオスポラによる流産の病態発症メカニズムの解明
- ・ 多機能性素材を用いた病原性原虫に対するワクチン開発
- ・ 天然物からの抗原虫薬の探索
- ・ ウシの下痢症に起因する腸内細菌叢の解析

3. 2019 年度研究の総括

- ・ トキソプラズマは世界で最も一般的な寄生虫症の一つであるトキソプラズマ症を引き起こします。本原虫はその生存に必要なデンスグラニクル抗原を非常に多く分泌します。TgGR7 は、宿主細胞の細胞膜や細胞質、寄生胞膜やその内腔に多く存在します。急性感染期と慢性感染期において、TgGRA7 は抗体産生を強力に刺激します。TgGRA7 は酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) の抗原として利用されてきましたが、イムノクロマトテスト (ICT) への応用はブタでの使用が試されたのみです。今までに TgGRA を搭載した ICT (TgGRA7-ICT) がヒトのトキソプラズマ症に使用されたことはありません。今回、ヒト血清 8 8 検体を用いて TgGRA7-ICT の有効性を評価しました。TgGRA7 を搭載した ELISA、市販の ELISA キット、ラテックス凝集試験 (LAT) で得られた結果を比較し、感度、特異性、一致度から判断して TgGRA7-ICT は標準試験と同等の反応性を示すことが明らかとなりました。TgGRA7-ICT 上に検出されるバンドの濃さは ELISA の結果で得られる抗体レベルの値と性の相関を示しました。今回の結果は、TgGRA7-ICT がヒトのトキソプラズマ症の診断に効果を発揮し、本感染症の定期的な

検査に有効であることが示唆されました。本研究結果の一部は、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 (AMED: JP19fk0108047)の研究助成で実施しました。(論文リスト2)

- ・ トキソプラズマは世界で最も一般的な寄生虫症の一つであるトキソプラズマ症を引き起こします。トキソプラズマの GRA7 タンパク質 (TgGRA7) は寄生胞や寄生胞膜及びシスト壁に必要な構成要素です。TgGRA7 は酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) の抗原として利用されてきましたが、イムノクロマトテスト (ICT) への応用はブタでの使用が試されたのみです。今までに TgGRA を搭載した ICT (TgGRA7-ICT) がネコのトキソプラズマ感染の診断に使用されたことはありません。今回、ネコの血清 100 検体を用いて TgGRA7-ICT の有効性を評価しました。TgGRA7 あるいは原虫ライセートを搭載した ELISA、市販のラテックス凝集試験 (LAT) で得られた結果を比較し、感度、特異性、一致度から判断して TgGRA7-ICT は標準試験と同等の反応性を示すことが明らかとなりました。今回の結果は、TgGRA7-ICT がネコのトキソプラズマ症の診断に効果を発揮し、本感染症の定期的な検査に有効であることが示唆されました。本研究結果の一部は、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 (AMED: JP19fk0108047)の研究助成で実施しました。(論文リスト3)
- ・ ネオスポラ感染により引き起こされる流産や繁殖障害はウシなどの家畜産業に大きな経済的損失を与えます。これまでにネオスポラ感染による流産を調べることのできる血清診断方法は報告されていません。本研究では、各種ネオスポラ抗原のウシの流産に関連する診断への有効性を評価しました。5つの候補抗原 (NcGRA6, NcGRA7, NcGRA14, NcCyP, NcSAG1) を酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) へ搭載し、ネオスポラを実験感染させたマウス及びウシの血清を用いて比較解析を行いました。そこで選択された3つの抗原 (NcSAG1, NcGRA7, and NcGRA6) については、ネオスポラ症発症により流産を起こしたウシ由来の血清を用いて追加の解析を実施し、NcSAG1 と NcGRA7 の診断用抗原としての有効性が確認されました。ネオスポラ症による流産が発症した農家では、流産発生牛における NcSAG1 と NcGRA7 の抗体レベルは優位に高くなっていました。牛妊娠期における特異抗体レベルの変動を追跡したところ、分娩前後における NcSAG1 と NcGRA7 の抗体レベルの急上昇が確認されました。その一方で、子牛の神経症状の有無による NcSAG1 と NcGRA7 の抗体レベルの差は認められませんでした。以上の結果により、NcSAG1 と NcGRA7 はネオスポラ感染によるウシの流産に関与する何らかのマーカ分子であることが推測されました。本研究は J A 土幌町、北海道家畜保健衛生所、South Valley 大学 (エジプト) との共同研究の成果であり、基盤研究 (B) (一般) (日本学術振興会: 15H04589, 18H02335)、JST バリュープログラム (VP29117937665)、伊藤記念財団の研究助成で実施しました。(論文リスト4)
- ・ トキソプラズマ症はトキソプラズマ原虫の感染により引き起こされます。生肉や加熱不十分な食肉を摂取することは、ヒトにおける大きな感染要因となります。モンゴルでは、ヤギやヒツジ由来の肉製品が主に消費されますが、これら小型反芻獣におけるトキソプラズマ感染の疫学

調査は進んでいません。本研究では、トキソプラズマ抗原 TgGRA7 を搭載した酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)によりモンゴルにおけるヤギとヒツジのトキソプラズマ感染を調査しました。ヤギ (首都と 17 県から 1,078 検体) とヒツジ (首都と 21 県から 882 検体) の血清サンプルを解析したところ、トキソプラズマ抗体の陽性率はヤギで 32%、ヒツジで 34.8%でした。ヤギの感染率は西部 (42.7%) と東部 (45.6%) で高く、ヒツジの感染率は東部 (55.4%) で高い結果が得られました。ヤギにおける感染要因は年齢であることが推測されましたが、ヒツジでは年齢や性別は感染要因とはなりません。今回の結果はモンゴルの小型反芻獣においてトキソプラズマの感染が蔓延している可能性を示しており、全国レベルでの感染コントロールの必要性が示唆されました。本研究はモンゴル生命科学大学・獣医学研究所 (モンゴル) との共同研究の成果であり、the Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) (AMED/JICA : 17jm0110006h0005)、伊藤記念財団の研究助成で実施しました。(論文リスト 5)

- ・ トキソプラズマの感染により引き起こされるトキソプラズマ症は、胎内死亡、流産、網脈絡膜炎、小眼球症、水頭症などの原因となります。現在市販されている抗トキソプラズマ薬は治療効果が限定的であり、重篤な副反応が懸念されます。そのため新規の治療薬開発が必要とされ、今回我々は有望な候補化合物として Metarhizium 属糸状菌から産生されるメタサイトフィリン (MCF) を見出しました。MCF はトキソプラズマの宿主細胞侵入と増殖を阻害し、原虫自体を直接殺傷する効果を有していました (IC50: 1.2 μ M)。MCF の選択毒性は 139.8 であり、既存薬より高値を示しました。構造活性相関により、MCF のメトシキ基およびヒドロキシ基が抗原虫活性に重要であることが示唆されました。MCF の作用機序を解析するためにトキソプラズマ感染細胞を用いた RNAseq 解析を行ったところ、MCF は宿主細胞の遺伝子発現変化には影響せず、原虫の DNA 複製を阻害し RNA 分解を促進していることが示されました。実験マウスでの薬物動態試験を実施したところ、MCF の腹腔内投与および経口投与で、MCF の血中への移行が確認されました。急性期感染モデルでは MCF の腹腔内投与および経口投与でトキソプラズマ感染に対する治療効果を確認できました。そこで MCF の経口投与による妊娠期感染に対する治療効果を検証しました。妊娠マウスへの MCF の投与は催奇形性と胎児毒性は認められず、原虫感染が及ぼす流産あるいは垂直感染を効果的に抑制させることができました。今回の研究結果により MCF がトキソプラズマ感染症に対する新たな治療薬の候補になることが示され、今後の臨床応用的な研究が期待されます。本研究は微生物化学研究所、マヒドン大学・獣医学部 (タイ) との共同研究の成果であり、寿原記念財団、Research Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases (AMED : JP19fk0108047)、挑戦的萌芽研究 (日本学術振興会: 26670204)、帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究費 (27-joint-6, 28-joint-3, 29-joint-4) の研究助成で実施しました。(論文リスト 6)
- ・ CC ケモカイン受容体 5 (CCR5) を含むケモカイン系は、細胞の遊走や活性化だけでなく神経機能への作用も近年明らかになりつつあります。トキソプラズマ感染時、CCR5 欠損 (CCR5KO) マウスでは野生型 (WT) と比べ、死亡率や脳内シスト数の増加が報告されています。当研究室

でも、マウス脳組織の網羅的発現解析により、CCR5 とそのリガンド CCL5 の発現が感染に
応答して上昇することを報告しています。本研究では、原虫感染への CCR5 依存的応答の詳細を
調べるため、マウス胎仔脳からアストロサイト、ミクログリア、ニューロンを分化誘導し、原
虫感染後 24 時間で細胞種ごとに RNA-seq を実施しました。さらに、原虫感染マウスの脳組
織を用い、初代脳細胞の解析で見出された CCR5 依存的な感染応答遺伝子の発現、および脳内
原虫数の定量を行いました。RNA-seq では、ニューロンでは他の細胞種に比べその数は少な
かったものの、各細胞種とも免疫関連遺伝子を含む遺伝子群に CCR5 依存的な発現上昇が認めら
れました。これらの遺伝子のほとんどは、脳組織の解析では感染による発現変動はあっても
CCR5 欠損の影響は見られず、脳内原虫数にもマウス系統間で有意差は見られませんでした。
その中で、炎症性タンパク質の一種、血清アミロイド A3 (Saa3) のみ CCR5 依存的な発現上
昇を示しました。これは脳内の炎症が CCR5 の欠損によって一部抑制されたことを示唆してい
ます。また、その他の遺伝子で、初代脳細胞に見られた CCR5 依存的な発現変動が脳組織で見
られなかったことは、脳細胞種同士や末梢からの浸潤細胞の作用により細胞種特異的な反応が
隠蔽されたことを示唆しています。これらは局所的な病態の制御に CCR5 が一定の役割を果た
す可能性を示し、本研究によって原虫感染時の脳における CCR5 の機能の一端が明らかになり
ました。本研究は東京大学大学院新領域創成科学研究科などとの共同研究の成果であり、最先
端・次世代研究開発支援プログラム（日本学術振興会：2011/LS003）、挑戦的萌芽研究（日
本学術振興会：JP15K15118）、挑戦的研究（萌芽）（日本学術振興会：JP17K19538）、若
手研究(B)（日本学術振興会：JP17K17570）、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開
発推進研究事業（AMED、17fk0108120h0001）の研究助成で実施しました。（論文リスト 7）

- ・ 腸内環境は動物の健康に重要な働きをしますが、腸内環境の構成成分の変化は下痢症と関連し
ます。しかしながら、ウシの下痢症を引き起こすクリプトスポリジウム原虫の感染は腸内環境
を変化させるのかについては分かっていません。本研究では、クリプトスポリジウム・パルバ
ム (*Cryptosporidium parvum*) が感染した子牛の腸内細菌叢の変化を解析しました。クリプ
トスポリジウム感染群、ロタウイルス感染群、これら病原体非感染群の糞便サンプルをメタゲ
ノム解析により比較したところ、フソバクテリウム属細菌の割合がクリプトスポリジウム感染
により増加することが示されました。さらに、クリプトスポリジウムとフソバクテリウム属細
菌が共存することにより、下痢症状が悪化していました。地理的に離れている場所（北海道、
岩手、沖縄）からのサンプルを解析しても、フソバクテリウム属細菌とクリプトスポリジウム
感染の相関性が認められました。今回の結果により、腸内細菌叢内のフソバクテリウム属細
菌の増加はクリプトスポリジウム症の悪化要因になることが示唆されました。本研究は岩手大
学農学部、大阪大学微生物病研究所などとの共同研究の成果であり、帯広畜産大学原虫病研究
センター共同研究費（27-joint-2, 28-joint-6）、大阪大学微生物病研究所共同研究費の研究助
成で実施しました。（論文リスト 8）
- ・ 天然生物資源は感染症に対する様々な治療薬の源になっており、その中でも放線菌は土壌や海
に存在しています。本研究ではモンゴルの土壌サンプルから分離された 4 種類の放線菌を用い

て、抗原虫活性の解析を行いました。その中で、*Streptomyces canus* N25 株の粗抽出サンプルに抗トキソプラズマ活性と抗マラリア活性があることが明らかとなりました。高分解能 LC/MS を用いた解析により活性画分から phenazine-1-carboxylic acid (PCA) を同定し、トキソプラズマ (IC₅₀: 55.5 µg/ml) および熱帯熱マラリア原虫 (IC₅₀: 6.4 µg/ml) に対する増殖阻害効果を確認しました。本研究により、モンゴルでの土壌放線菌は抗原虫薬の有望な生物資源であることが示唆され、PCA の今後の詳細な解析が期待されます。本研究は微生物化学研究所との共同研究の成果であり、寿原記念財団の研究助成で実施しました。(論文リスト 9)

- ・ トキソプラズマの慢性感染は宿主の中樞神経系を障害し、さまざまな行動の変化を引き起こします。我々は最近、Toll-like receptor 2 (TLR2)が急性期の神経炎症の誘導に重要であることを報告しましたが、慢性期の脳病態への関与は依然不明です。そこで本研究では、野生型(WT)および TLR2 欠損(TLR2KO)マウスを用いて、トキソプラズマ感染によるマウスの脳病態や行動への影響を比較することで、慢性期における TLR2 の役割を明らかとすることを目的としました。WT および TLR2KO マウスに非感染群、トキソプラズマ(PLK 株)感染群を設定し、感染群における病理組織学的な病変、脳内原虫量、および脳組織中の炎症性サイトカイン類の遺伝子発現量を比較しました。次に、感染30日後からマウスの行動を評価する3種の行動実験を実施しました。病理学的な解析の結果、慢性期における脳組織の病変は WT と TLR2KO 間で同程度に観察されましたが、感染30日後の脳内原虫量は TLR2KO マウスで有意に増加していました。また、炎症性サイトカイン類(インターロイキン 12p40、iNOS など)の発現量に差は認められませんでした。行動実験の結果、非感染群間の比較では TLR2 の欠損により、不安の増強と恐怖記憶の亢進が示されました。一方、感染群間では TLR2KO マウスにおいて、感染による恐怖記憶障害の部分的な回復が認められました。以上のことから、TLR2 は慢性期の脳内の炎症レベルや組織障害への関与は少ないが、原虫数を抑制する働きを持つことが示されました。また、トキソプラズマ感染による宿主の恐怖記憶障害は部分的に TLR2 依存的な応答によることが示唆されました。慢性的な神経炎症は核内因子 κB 経路を活性化させ、恐怖記憶を阻害することから、トキソプラズマ感染による慢性期の神経障害に TLR2 が一定の役割を担っていることが考えられました。本研究は最先端・次世代研究開発支援プログラム(日本学術振興会:2011/LS003)、挑戦的萌芽研究(日本学術振興会:JP15K15118)、挑戦的研究(萌芽)(日本学術振興会:JP17K19538)、スタートアップ(日本学術振興会:24880006)、若手研究(日本学術振興会:15J03171, 18K14577, JP17K17570)、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業(AMED、17fk0108120h0001)の研究助成で実施しました。の研究助成で実施しました。(論文リスト 10)

- ・ ラクダに感染する寄生虫の多様性についてはほとんど分かっていないのが現状で、一般的には形態学的な解析がなされています。今回、エジプトのヒトコブラクダ由来の心臓組織と糞便から DNA を抽出し、寄生虫の検査を行いました。PCR 検査の結果、*Toxoplasma gondii* (1.1%)、*Sarcocystis* spp. (64.4%)、*Cryptosporidium* spp. (5.9%)、Trichostrongylidae nematodes

(22.7%)の感染が確認されました。線虫の中では、*Haemonchus* spp. (95.6%)、*Trichostrongylus axei* (26%)、*Trichostrongylus colubriformis* (65.2%)、*Cooperia oncophora* (60.8%)の感染が認められました。今回の結果により、ヒトコブラクダには様々な種類の寄生虫が感染していることが明らかになりました。本研究は Mansoura 大学獣医学部（エジプト）との共同研究の成果です。（論文リスト 11）

- ・ トキソプラズマの感染は世界中に広がっていますが、フィリピンでの感染の実態は分かっていません。今回、フィリピン・セブ島におけるトキソプラズマ感染の血清疫学調査を行いました。ヒト、ネコ、ブタを対象に疫学調査を実施し、トキソプラズマの感染実態を明らかにしました（抗体陽性率：ヒト（26.3%）、ネコ（42.3%）、ブタ（13.4%））。ヒトへの感染リスク要因として、ネコとの接触、豚肉など屋台の食べ物の摂食が推測されました。今回の結果はフィリピンにおけるトキソプラズマ感染のリスクを示しており、今後の公衆衛生的なコントロールの必要性が示されました。本研究はフィリピン大学・セブ校、セブ工科大学、Visayas 大学との共同研究の成果であり、寿原記念財団の研究助成で実施しました。（論文リスト 12）

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議委員
- ・ 日本寄生虫学会評議委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会常任理事・渉外・広報担当理事

② 主催した学会、研究会等

- ・ 第 162 回日本獣医学会学術集会・日本獣医寄生虫学会・寄生虫分科会シンポジウム「獣医寄生虫学における研究開発の最前線（The Cutting Edge of R&D in Veterinary Parasitology）」（2019年9月10日、つくば国際会議場）

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム世話人
- ・ The Journal of Protozoology Research 編集委員長
- ・ The Korean Journal of Parasitology, a member of Editorial Board

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Mio Maeta, Naoya Miura, Hiroki Tanaka, Takashi Nakamura, Ryo Kawanishi, **Yoshifumi Nishikawa**, Kenichi Asano, Masato Tanaka, Shinya Tamagawa, Yuta Nakai, Kota Tange, Hiroki Yoshioka, Hideyoshi Harashima, Hidetaka Akita. Vitamin E Scaffolds of pH-Responsive Lipid Nanoparticles as DNA Vaccines in Cancer and Protozoan

- Infection. **Molecular Pharmaceutics**. 2020; 17(4): 1237-1247. PMID: 32129629
2. Rochelle Haidee D Ybañez, Yoshifumi Nishikawa*. Serological detection of *T. gondii* infection in humans using an immunochromatographic assay based on dense granule protein 7. **Parasitology International**. 2020; 76: 102089. PMID: 32092466
 3. Rochelle Haidee D Ybanez, Hisako Kyan, Yoshifumi Nishikawa*. Detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats using an immunochromatographic test based on GRA7 antigen. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82: 441-445. PMID: 32037381
 4. Hanan H Abdelbaky, Maki Nishimura, Naomi Shimoda, Jun Hiasa, Ragab M Fereig, Hiromi Tokimitsu, Hisashi Inokuma, Yoshifumi Nishikawa*. Evaluation of *Neospora caninum* serodiagnostic antigens for bovine neosporosis. **Parasitology International**. 2020; 75: 102045. PMID: 31881363
 5. Baldorj Pagmadulam, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Naoaki Yokoyama, Badgar Battsetseg, Yoshifumi Nishikawa*. Seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii* in small ruminants (sheep and goat) in different provinces of Mongolia. **Parasitology International**. 2020; 74: 101996. PMID: 31634631.
 6. Arpron Leesombun, Masatomi Iijima, Kousuke Umeda, Daisuke Kondoh, Baldorj Pagmadulam, Ahmed M Abdou, Yutaka Suzuki, Shun-ichi Ohba, Kunio Isshiki, Tomoyuki Kimura, Yumiko Kubota, Ryuichi Sawa, Coh-ichi Nihei, Yoshifumi Nishikawa*. Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**. 2020; 221: 766-774. PMID: 31573038
 7. Kaoru Kobayashi, Kousuke Umeda, Fumiaki Ihara, Sachi Tanaka, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Yoshifumi Nishikawa*. Transcriptome analysis of the effect of C-C chemokine receptor 5 deficiency on cell response to *Toxoplasma gondii* in brain cells. **BMC Genomics**. 2019; 20: 705. PMID: 31506064
 8. Madoka Ichikawa-Seki, Daisuke Motooka, Aiko Kinami, Fumi Murakoshi, Yoko Takahashi, Junya Aita, Kei Hayashi, Atsushi Tashibu, Shota Nakamura, Tetsuya Iida, Toshihiro Horii, Yoshifumi Nishikawa*. Specific increase of Fusobacterium in the faecal microbiota of neonatal calves infected with *Cryptosporidium parvum*. **Scientific Reports**. 2019; 9: 12517. PMID: 31467354
 9. Baldorj Pagmadulam, Dugarsuren Tserendulam, Tserennadmid Rentsenkhand, Masayuki Igarashi, Ryuichi Sawa, Coh-ichi Nihei, Yoshifumi Nishikawa*. Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing *Streptomyces* species from Mongolian soils. **Parasitology International**. 2019; 74: 101961. PMID: 31437553
 10. Fumiaki Ihara, Sachi Tanaka, Ragab M Fereig, Maki Nishimura, Yoshifumi Nishikawa*. Involvement of Toll-like receptor 2 in the cerebral immune response and behavioral changes caused by latent *Toxoplasma* infection in mice. **PLoS One**. 2019; 14: e0220560. PMID: 31404078

11. El-Sayed El-Alfy, Salah Abu-Elwafa, Ibrahim Abbas, Moustafa Al-Araby, Yara Al-Kappany, Kousuke Umeda, **Yoshifumi Nishikawa***. Molecular screening approach to identify protozoan and trichostrongylid parasites infecting one-humped camels (*Camelus dromedarius*). **Acta Tropica**. 2019: 105060. PMID: 31194962
12. Rochelle Haidee D Ybañez, Chadinne Giralani R Busmeon, Alexa Renee G Viernes, Jorim Z Langbid, Johanne P Nuevarez, Adrian P Ybañez, **Yoshifumi Nishikawa***. Endemicity of *Toxoplasma* infection and its associated risk factors in Cebu, Philippines. **PLoS One**. 2019; 14: e0217989. PMID: 31188858

総説（*責任著者）

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 原虫病研究センター施設見学および寄生虫の標本展示、令和元年度帯広畜産大学オープンキャンパス、帯広畜産大学・原虫病研究センターPKホール、2019年8月3日
2. 寄生虫の観察の体験実習、令和元年度畜大ふれあいフェスティバル、北海道帯広市とかちプラザ、2019年12月1日

8. 招待講演等

1. Development of diagnosis, prophylactic, and treatment methods for protozoan diseases to improve productivity of livestock in Mongolia、特別セミナー、モンゴル生命科学大学・獣医学部、2019年10月10日

9. 獲得研究費

1. 平成30年度 基盤研究B（一般）（文部科学省）、家畜病原性原虫ネオスポラの感染による流産発症機構の解明（18H02335）、代表、平成30年度～令和2年度
2. 令和元年度外国人再招聘研究者の受け入れ（日本学術振興会）、代表、2019年度
3. 平成31年度 第1回 科学研究費助成事業（特別研究員奨励費）（外国人特別研究員）（文部科学省）、牛クリプトスポリジウム症の診断に適応可能な迅速イムノクロマト法の開発（19F19107）、代表、2019年度～2020年度
4. 2019年度 研究拠点形成費等補助金（卓越大学院プログラム事業費）「One Health フロンティア卓越大学院」に関するトライアル（予行演習・予備試験）等の実施（北海道大学）、分担、2019年度
5. 平成29年度 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業、トキソプラズマ症の総合的対策に向けた開発研究、分担、平成29年度～令和元年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞者：Ragab FERIEG（指導若手研究者）

受賞名：第10回日本獣医寄生虫学奨励賞（日本獣医寄生虫学会）

受賞テーマ：Development of potent and safe vaccine candidates against *Neospora caninum* infection

受賞年：2019年9月10日

12. 報道等

1. 十勝毎日新聞（2019年10月9日）トキソプラズマ治療薬候補を発見 帯畜大の西川教授ら
2. 北海道新聞（2019年10月16日）妊婦感染症に有効物質
3. 財経新聞（2018年10月8日）トキソプラズマを駆逐する新たな化合物を発見 帯広畜産大などの研究 <https://news.nifty.com/article/technology/techall/12214-534248/>

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Hadi Kuncoro: Mulawarman University, Screening of Anti-*Toxoplasma* Agent From East Borneo Natural Resource 2018年2月5日～、共同研究契約
2. 高橋 良和：（公財）微生物化学研究会・微生物化学研究所、病原性原虫に対する薬剤候補化合物および新規治療標的の探索、2016年4月1日～2020年3月31日、共同研究契約
3. ATTY. LIZA D. CORRO: UNIVERSITY OF THE PHILIPPINES CEBU、MEMORANDUM OF AGREEMENT BETWEEN UNIVERSITY OF THE PHILIPPINES CEBU AND OBIHIRO UNIVERSITY、2016年3月～2020年3月、学術協定
4. Ellen Joan Kumaat: SAM RATULANGI UNIVERSITY、Memorandum of Understanding BETWEEN SAM RATULANGI UNIVERSITY and OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE、2015年10月～2019年10月、学術協定
5. Charles L Kaunang: Animal Sciences Faculty, Sam Ratulangi University、RESEARCH AND ACADEMIC COLLABORATION BETWEEN ANIMAL SCIENCES FACULTY, SAM RATULANGI UNIVERSITY, INDONESIA AND NATIONAL RESEARCH CENTER FOR PROTOZOAN DISEASES, OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE, JAPAN、2015年2月～2019年2月、学術協定
6. 朴 龍洙：静岡大学・グリーン科学技術研究所、高免疫応答型多価ウイルス粒子を用いた原虫感染症治療用ワクチン開発基盤技術の構築、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究
7. 二瓶 浩一：（公財）微生物化学研究会・微生物化学研究所、新規抗アピコンプレクサ類原虫剤DKP誘導体の実用化、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター

ー共同研究

8. 渡慶次 学：北海道大学大学院工学研究院応用化学部門、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、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究
9. 関 まどか：岩手大学農学部共同獣医学科、クリプトスポリジウム症に対する初乳中の抗体による予防効果の検討、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

発生工学的応用による原虫感染機構の解明

発生工学とは、バイオテクノロジーの一分野で、動物の発生過程を人工的に制御して新しい動物を作り出すことを目指すものです。医学・薬学あるいは獣医学領域におけるこの発生工学の魅力は、興味ある遺伝子の機能を動物の個体レベルで解析可能にすることにあります。例えば、培養細胞を用いて血圧の制御にかかわる遺伝子の機能を観察することは不可能ですが、発生工学は生体の高次機構の中で遺伝子機能を直接的に解析可能な検定系を提供できますので、その解析結果の臨床研究への応用展開も容易にさせるといえます。これまでに発生工学から生み出されたたくさんの遺伝子改変マウスが、生活習慣病、癌あるいは感染症などの理解のために活用されています。これには、原虫関連疾患も例外ではありません。当研究分野では、宿主の生理機能を修飾することによる原虫感染症の予防・治療の可能性を探索しています。

これまでのビタミン E 転送タンパク欠損マウスを用いた解析から、宿主のビタミン E 欠乏が原虫感染症に効果的に働くことがわかってきました。循環中のビタミン E 濃度を規定するビタミン転送タンパクの機能不全は、脂溶性の抗酸化物質であるビタミン E 欠乏を招きますが、宿主の循環中のビタミン E 欠乏は、寄生マラリア原虫の DNA 障害を惹起し増殖を抑制させる効果が認められました。この効果は、マラリア原虫のみならずトリパノソーマ原虫感染においても観察されたことから、広く宿主の循環中に寄生する原虫の増殖抑制に働くことが期待されます。この効果を発揮する化合物を探したところ、すでに上市されている高脂血症薬プロブコールが循環中のビタミン E レベルの抑制、抗原虫効果を発揮することを発見しました。さらに、プロブコールと既存の抗マラリア薬である DHA (dihydroartemisinin)の併用効果が顕著であったことから、プロブコールの利用は薬剤耐性原虫の出現抑制にも寄与することや非流行地居住者の流行地への旅行の際の予防的利用が期待されます。臨床応用へ向けての研究成果が期待されます(総説1)。

これらに加えて、マラリア感染が雌雄の生殖能力に及ぼす影響についても研究しています。妊娠時にマラリアに感染すると、非妊娠時に感染した場合と比べて、症状が重篤になることが知られています。そこで、マウスモデルを使って、妊娠のどの時期に感染が成立すると重篤化が進むのか?その理由は?を検討しています。併せて、マラリア感染と雄の精子形成能力、妊孕能との関係についても研究課題としています。

発生・生殖工学の技術開発研究

バイオサイエンスの解析系を充実するためには、発生工学とそれを支える体外受精、胚移植、配偶子の凍結保存、凍結乾燥保存などの生殖工学の技術開発が不可欠です。当研究分野では、マウスを対象とした発生・生殖工学技術の深耕を図るとともに、この一連の技術は盲導犬をはじめとする補助犬の育成にも応用して、社会貢献を果たしています。我々は、世界で初めて凍結受精卵由来のイヌ産仔を得ることに成功しており、今後、盲導犬の普及への貢献が期待されています。

また、マウスの初期発生における卵割時間と発生能との関係をタイムラプスシネマトグラフィ

ーを用いて検討するとともに、ゲノム編集技術を用いた大型動物の遺伝子改変にも取り組んでおります。ウシの体外受精卵を用いてバベシア原虫受容体をゲノム編集技術によって欠損させ、バベシア耐性ウシの樹立を目指しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ ビタミン E 欠乏誘導による抗原虫効果の検討
- ・ 妊娠を伴うマラリアの病態メカニズムの解析
- ・ マラリア感染が雄の生殖能力に及ぼす影響の解析
- ・ イヌの生殖工学技術の開発、特に精子、胚、卵巣の凍結保存技術の開発
- ・ バベシア受容体欠損ウシの樹立

3. 2019 年度研究の総括

- ・ マラリアは、蚊が宿主動物を吸血することでマラリア原虫が感染する赤血球寄生性原虫感染症で、その患者は重度の貧血、脳マラリアや多臓器不全などの重篤な症状を呈することが知られていますが、いまだに十分な予防・治療法はなく、新たな予防・治療法の開発が必要とされている疾患です。昨年、ビタミン E の誘導体であるコハク酸トコフェロールの効果のマラリア原虫を用いて検証したところ、*P. yoelii* 17XL と *P. berghei* ANKA 感染のどちらにおいても、コハク酸トコフェロールの有意なマウス生存期間の延長とパラシテミアの低下を認めたことを報告しましたが、この一連の研究のなかで、ある種の植物性の油には抗原虫効果を有する物があることを見出しました（論文 1）。植物油は化合物を投与する際の溶媒として汎用されているので、実験の精度を維持するためには留意が必要と考えます。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本卵子学会常任理事（広報担当）
- ・ 日本熱帯医学会評議員
- ・ 日本繁殖生物学会評議員
- ・ 日本寄生虫学会評議員
- ・ 日本実験動物学会
- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本生殖医学会
- ・ 日本分子生物学会
- ・ 日本ゲノム編集学会
- ・ 日本身体障害者補助犬学会
- ・ Society for the Study of Reproduction (米国・正会員)

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 日本卵子学会 生殖補助医療胚培養士資格認定委員
- ・ 日本学術振興会 特別研究員等審査会専門委員
- ・ マラヤ大学（マレーシア） 学位論文審査外部審査委員

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Aiko Kume, Keisuke Suganuma, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki. Effect of vegetable oils on the experimental infection of mice with Trypanosom congolense. **Experimental Parasitology**. 2020; 210: 107845. PMID: 32004533
2. Shinji Harakawa, Takuya Hori, Takaki Nedachi, Hiroshi Suzuki. Gender and Age Differences in the Suppressive Effect of a 50 Hz Electric Field on the Immobilization-Induced Increase of Plasma Glucocorticoid in Mice. **Bioelectromagnetics**. 2020; 41(2): 156-163. PMID: 31833072
3. Aaron E Ringo, Gabriel O Aboge, Paul F Adjou Moumouni, Seung Hun Lee, Charoonluk Jirapattharasate, Mingming Liu, Yang Gao, Huanping Guo, Weiqing Zheng, Artemis Efstratiou, Eloiza M Galon, Jixu Li, Oriel Thekiso, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan. Molecular detection and genetic characterisation of pathogenic *Theileria*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species among apparently healthy sheep in central and western Kenya. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. 2019; 86(1): e1-e8. PMID: 31291731
4. Rika Umemiya-Shirafuji, Ryo Mihara, Kozo Fujisaki, Hiroshi Suzuki. Intracellular localization of vitellogenin receptor mRNA and protein during oogenesis of a parthenogenetic tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Parasites & Vectors**. 2019; 12(1): 205. PMID: 31060579
5. Huanping Guo, Paul Franck Adjou Moumouni, Oriel Thekiso, Yang Gao, Mingming Liu, Jixu Li, Eloiza May Galon, Artemis Efstratiou, Guanbo Wang, Charoonluk Jirapattharasate, Aaron Edmond Ringo, Khethiwe Mtshali, Noboru Inoue, Hiroshi Suzuki, XuenanXuan. Genetic characterization of tick-borne pathogens in ticks infesting cattle and sheep from three South African provinces. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2019; 10(4): 875-882. PMID: 31010732
6. Mototada Shichiri, Noriko Ishida, Yoshihisa Hagihara, Yasukazu Yoshida, Aiko Kume, Hiroshi Suzuki. Probucol induces the generation of lipid peroxidation products in erythrocytes and plasma of male cynomolgus macaques. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. 2019; 64(2): 129-142. PMID: 30936625

総説

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

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 共同研究 エーザイ株式会社、トコフェロール誘導体の抗原虫効果について
2. 平成31年度 二国間交流事業共同研究（中国） 日本学術振興会

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. エーザイ株式会社：トコフェロール誘導体の抗原虫効果について、共同研究

1. 研究テーマの概要

マダニは原虫、リケッチア、ウイルスといった様々な病原体を家畜や人に媒介する吸血性節足動物です。マダニは、卵、幼ダニ、若ダニ、成ダニ（雌・雄）と発育し、1世代を終えるまでに数か月～数年を要します。吸血行動は幼・若・成ダニ期に1回ずつ、計3回行われるだけであり、マダニは生活史の大半を未吸血・飢餓状態で過ごします。その一方で、成ダニ（雌）が吸血を終えて満腹状態（飽血）に達すると、その体重は吸血前の約100倍も増加し、獲得した栄養分のほとんどすべてを数千個におよぶ卵の発育に利用します。当研究室では、マダニの「栄養代謝（飢餓と飽血）」および「卵形成」に着目し、それらの分子機構に関する研究を推進しています。また、マダニ体内における媒介原虫の動態やマダニの栄養代謝関連分子・卵形成必須分子が原虫伝播に果たす役割、マダニ自身が保有する共生細菌の存在意義についての解析を進めています。多角的な視点でマダニという生物を理解し、新規のマダニ対策法開発に繋げることを目指しています。

さらに、2017年度よりスタートした「共同利用・共同研究拠点事業 マダニバイオバンク整備とベクターバイオロジーの新展開」の一環として、マダニの鑑別・繁殖・供給システムから遺伝子情報までを網羅した日本初のマダニバイオバンク整備を進めています。

2. 主な研究テーマ

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

3. 2019年度研究の総括

- ・ マダニが媒介する病原体の中には、雌ダニから次世代の卵、幼ダニへと移行するものがあり（介卵伝播）、その代表的な原虫にバベシアが挙げられます。例えばバベシア感染動物で雌ダニが吸血すると、バベシア感染幼ダニの発生に繋がります。これらの幼ダニは次の宿主動物に対する感染源となります。しかし、マダニにおいてバベシアの介卵伝播がどのようにして成立しているのか、分子機構はまだ明らかにされていません。マダニにおけるバベシア介卵伝播メカニズムの解明のためには、マダニ卵母細胞の発育過程（卵形成）を理解することが重要です。そこで、卵母細胞の発育に必要な不可欠の卵黄タンパク質前駆体（ビテロジェニン；Vg）に着目し、その受容体（VgR）の卵母細胞における mRNA 発現およびタンパク質の局在を解析しました。その結果、ステージ I～III 卵母細胞の細胞質内に VgR mRNA が検出され、また、VgR タンパク質はステージ I～III の細胞質内およびステージ IV、V の細胞質辺縁に局在することが明らかになりました。次に、RNA 干渉法により VgR 発現抑制雌ダニを作出し、その卵巣（飽血後 4 日目）を観察したところ、対照群と異なり、ステージ IV および V の卵母細胞が観察されませんでした。

した。以上のことから、フタトゲチマダニ単為生殖系の卵母細胞における VgR の発現と局在は、発育ステージにより異なるパターンを示すことが判明しました。また、卵母細胞は、急速吸血期にステージ I から II、飽血後にステージ II から III へと発育し、その後、VgR を介した Vg 取り込みが活発化することによりステージ III から IV へと移行し成熟することが明らかになりました。これらの知見は、マダニの卵形成およびバベシアの介卵伝播を分子・細胞レベルで理解する上での重要な基礎情報となります（論文リスト 5）。

- ・ マダニコロニーの維持管理および原虫感染マダニの作出は、マダニにおける原虫媒介機構の解明やワクチン候補分子の探索等において、極めて重要です。国外では、医学・獣医学上重要なマダニ種の遺伝子情報やセルバンクが公開されており、世界中の研究者にとって必要不可欠のツールとなっていますが、国内ではそのような体制は十分ではありません。原虫病研究センターでは、国内最重要マダニ種であるフタトゲチマダニを累代飼育しており、国内外の研究機関・民間企業等に供給し、研究・試験に活用されてきました。現在、フタトゲチマダニ以外のマダニ種の実験室順化を進めており、マダニの飼育および供給体制のさらなる拡充を目指しています。マダニのゲノム・トランスクリプトームなどのオミクス解析の国内外の現状、研究資源としてのマダニコロニーの重要性ならびに国内におけるマダニ研究の展望について、総説として発表しました（総説 1）。また、「共同利用・共同研究拠点事業 マダニバイオバンク整備とベクターバイオロジーの新展開」の一環として、野外採集マダニにおけるダニ媒介性脳炎ウイルスの検出を実施しました（論文リスト 4）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本獣医寄生虫学会 評議員、渉外・広報委員（兼 国際交流委員）
- ・ 日本寄生虫学会
- ・ 日本衛生動物学会
- ・ 日本ダニ学会 文献目録委員

② 主催した学会、研究会等

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

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（#Equally contributed authors; * 責任著者）

1. Emmanuel Pacia Hernandez, Kei Shimazaki, Hiroko Niihara, Rika Umemiya-

- Shirafuji**, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka. Expression analysis of glutathione S-transferases and ferritins during the embryogenesis of the tick *Haemaphysalis longicornis*. **Heliyon**. 2020; 6(3): e03644. PMID: 32258487
2. Aiko Kume, Keisuke Suganuma, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Hiroshi Suzuki. Effect of vegetable oils on the experimental infection of mice with *Trypanosoma congolense*. **Experimental Parasitology**. 2020; 210:107845. PMID: 32004533
 3. Thu-Thuy Nguyen, Minh-Anh Dang-Trinh, Luna Higuchi, Juan Mosqueda, Hassan Hakimi, Masahito Asada, Junya Yamagishi, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Shin-ichiro Kawazu. Initiated *Babesia ovata* sexual stages under *in vitro* conditions were recognized by anti-CCp2 antibodies, showing changes in the DNA content by imaging flow cytometry. **Pathogens**. 2019; 8: 104. PMID: 31319568.
 4. Dulamjav Jamsransuren, Kentaro Yoshii, Hiroaki Kariwa, Mitsuhiro Asakawa, Kei Okuda, Kei Fujii, Shinya Fukumoto, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Motoki Sasaki, Kotaro Matsumoto, Emi Yamaguchi, Haruko Ogawa, Kunitoshi Imai. Epidemiological survey of tick-borne encephalitis virus infection in wild animals on Hokkaido and Honshu islands, Japan. **Japanese Journal of Veterinary Research**. 2019; 67: 163-172. <http://doi.org/10.14943/jjvr.67.2.163>
 5. **Rika Umemiya-Shirafuji***, Ryo Mihara, Kozo Fujisaki, Hiroshi Suzuki. Intracellular localization of vitellogenin receptor mRNA and protein during oogenesis of a parthenogenetic tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Parasites & Vectors**. 2019; 12: 205. PMID: 31060579.
 6. Seung-Hun Lee, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Patrick Vudriko, Mingming Liu, Byamukama Benedicto, Maria Agnes Tumwebaze, Damdinsuren Boldbaatar, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Shinya Fukumoto, Xuenan Xuan. Differential diagnosis and molecular characterization of *Theileria spp.* in sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido, Japan. **Parasitology International**. 2019, 70:23-6. PMID: 30664981.

総説

1. **Rika Umemiya-Shirafuji***, Kozo Fujisaki, Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Naoaki Yokoyama, Hiroshi Suzuki, Noboru Inoue, Xuenan Xuan. Hard ticks as research resources for vector biology: from genome to whole-body level. **Medical Entomology and Zoology**. 2019; 70(4): 181-188. <https://doi.org/10.7601/mez.70.181>

著書

該当なし

特別寄稿文

1. 白藤（梅宮） 梨可*. 原虫介卵伝播メカニズムの解明に向けたマダニ卵形成の基礎的研究. 衛生動物 70 (3): 2019; 137-140.

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 原虫病研究センター施設見学および寄生虫の標本展示、平成 31 年度帯広畜産大学オープンキャンパス、帯広畜産大学・原虫病研究センターPK ホール、2019 年 8 月 3 日
2. 寄生虫観察の体験講座、第 9 回畜大ふれあいフェスティバル、北海道帯広市とかちプラザ、2019 年 12 月 1 日

8. 招待講演等

1. 第 71 回日本衛生動物学会大会・シンポジウム、「マダニにおける原虫の介卵伝播メカニズム」、山口大学吉田キャンパス（山口県山口市）、2019 年 4 月 20 日

9. 獲得研究費

1. 平成 31 年度 基盤研究 (C) (文部科学省)、バベシア原虫の介卵伝播におけるマダニ卵形成関連分子と原虫の分子間相互作用の解明 (19K06416)、代表、平成 31 年度～令和 3 年度
2. 公益財団法人天下財団 2019 年度研究助成、病原体伝播におけるマダニ卵黄タンパク質前駆体の機能解明、代表、平成 31 年度
3. 平成 30 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発 (18H02336)、分担、平成 30 年度～令和 3 年度
4. 平成 31 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、バベシアのマダニ体内発育ステージ抗原の網羅的解析：伝播阻止ワクチン開発の基盤整備 (19H03120)、分担、平成 31 年度～令和 3 年度
5. 平成 31 年度 国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B)) (文部科学省)、新たに発見された病原性牛バベシアに対する国際防疫体制強化に向けた基盤研究、分担、平成 31 年度～令和 3 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. DeMar Taylor : Identification, Characterization and Functional Analysis of the Vitellin Receptor in the soft tick *Ornithodoros moubata*、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究
2. 田仲 哲也 : 鹿児島大学共同獣医学部、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、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究
3. Haiyan Gong : Shanghai Veterinary Research Institute、Microbiome comparasion of the tick *Haemaphysalis longicornis* from the labs of China and Japan、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

マダニによって媒介されるピロプラズマ（タイレリアおよびバベシア）病は、牛や馬などの家畜動物に発熱や貧血などの消耗性疾患を引き起こし、世界中で深刻な経済的被害をもたらしています。しかしながら、いずれのピロプラズマ病に対しても有効な対応策が確立されていません。当研究室は、2007年より国際獣疫事務局（OIE）から、牛バベシア病と馬ピロプラズマ病に関するOIEリファレンスラボラトリーの認定を受けています。特に、動物ピロプラズマ病のリスク評価に主眼を置いて、具体的な疾病制御に向けた対応策ガイドラインの作成を目指しています。また、ピロプラズマ病の問題を抱える海外汚染国から若手研究者を受け入れて、研修と人材育成に努めるとともに、ピロプラズマ病の制圧に関する国際的共同研究ネットワークの構築にも取り組んでいます。

2. 主な研究テーマ

- ・ 牛及び馬のピロプラズマ病に関する国際疫学調査
- ・ 国内に蔓延する牛ピロプラズマの分子疫学および臨床病理学的研究
- ・ 野生シカが保有するピロプラズマの分子疫学的研究
- ・ 牛ピロプラズマの媒介マダニに関する疫学研究
- ・ 牛及び馬ピロプラズマ病の診断法、治療薬、及び予防ワクチンの開発に関する基礎研究

3. 2019年度研究の総括

- ・ 熱帯タイレリア (*Theileria annulata*) と近縁の新たな牛タイレリアの発見: *Theileria annulata* は、牛の熱帯タイレリアとして知られ、我が国では家畜法定伝染病の原因に指定されている高病原性の住血性原虫です。過去に *T. annulata* PCR 陽性であったスリランカのウシ血液 DNA サンプルから牛タイレリアの *tams1* 遺伝子、*tasp* 遺伝子、*18S rRNA*、及び *cob* 遺伝子を解析した結果、すべての遺伝子群から *T. annulata* と同一性が低い配列が得られました。系統解析でも、スリランカ由来の上記の遺伝子配列は共に同じクラスターを形成し、既知の *T. annulata* 及び *Theileria lestoquardi* の共通の祖先から姉妹クレードを形成していることも示されました。これらの成果より、スリランカで蔓延している牛タイレリアは *T. annulata* ではなく、*T. annulata* と近縁の新たな牛タイレリア種 (*Theileria* sp. Yokoyama と命名) であることが明らかとなりました。本論文は、スリランカ・獣医学研究所との国際共同研究の成果です (論文リスト 6)。
- ・ 臨床症状を引き起こす新たな牛バベシア種 (*Babesia* sp. Mymensingh) の国際分布と感染宿主の解明: 昨年度スリランカにて、牛に臨床症状 (貧血、発熱、血色素尿など) を誘起する新たな病原性バベシア (*Babesia* sp. Mymensingh) を発見したことを報告しました。その後の本研究では、スリランカ (牛と水牛)、フィリピン (牛)、ベトナム (牛、水牛、羊、及び山

羊)、モンゴル(牛)、ウガンダ(牛)、ブラジル(牛)、及びアルゼンチン(牛)の血液サンプルを用いて、*Babesia* sp. Mymensingh に対する PCR スクリーニング解析を行いました。その結果、ブラジル以外のすべての国から *Babesia* sp. Mymensingh が検出され、*Babesia* sp. Mymensingh はアジア、アフリカ、及び南米に広く分布していることが明らかになりました。また、牛、水牛、羊、及び山羊から検出され、*Babesia* sp. Mymensingh の宿主域の広さも示されました。本論文は、スリランカ・獣医学研究所、フィリピン・セブ工科大学、ベトナム・フエ大学、モンゴル・獣医学研究所、ウガンダ・マケレレ大学、ブラジル・バイア獣医協議会、及びアルゼンチン・農業技術研究所との国際共同研究の成果です(論文リスト 1、2)。

- ・ モンゴル国のピロプラズマとアナプラズマの疫学調査:モンゴルにおける牛バベシア(*Babesia bovis* と *Babesia bigemina*)、馬ピロプラズマ(*Theileria equi* と *Babesia caballi*)、及び小反芻獣アナプラズマ(*Anaplasma ovis*)の感染状況を、検出用 PCR と血清診断用 ELISA を用いて調査しました。その結果、*B. bovis* (PCR : 27.9%)、*B. bigemina* (PCR : 23.6%)、*T. equi* (ELISA : 33.0%)、*B. caballi* (ELISA : 14.2%)、*A. ovis* (PCR : 69.0% (羊)、71.3% (山羊))と高い感染率を示し、モンゴルにおけるそれぞれ病原体の汚染実態が明らかとなりました。本論文は、モンゴル・獣医学研究所との国際共同研究の成果です(論文リスト 1、9、21)。
- ・ スリランカ国のピロプラズマとアナプラズマの疫学調査:スリランカにおける牛バベシア(*Babesia bovis* と *Babesia bigemina*)、牛タイレリア(*Theileria annulata* と *Theileria orientalis*)、牛トリパノソーマ(*Trypanosoma theileri*)、及び牛アナプラズマ(*Anaplasma marginale*)の感染状況を、それぞれの検出用 PCR を用いて調査しました。その結果、*B. bovis* 以外の、*B. bigemina* (19.0%)、*T. annulata* (1.6%)、*T. orientalis* (100.0%)、*Tr. theileri* (20.6%)、及び *A. marginale* (32.7% (牛)と 57.5% (水牛))で高い感染率を示し、スリランカにおけるそれぞれ病原体の汚染実態が明らかとなりました。本論文は、スリランカ・獣医学研究所との国際共同研究の成果です(論文リスト 8、18)。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

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

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 国際獣医事務局 (OIE) リファレンスラボラトリー「牛バベシア病、馬ピロプラズマ病」専門家
- ・ OIE コラボレーティングセンター「動物原虫病のサーベイランスと防疫」代表者
- ・ 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 共同利用・共同研究拠点 共同研究委員会 委員
- ・ 日本中央競馬会畜産振興事業・家畜呼吸器疾患制御事業推進委員会 (東京大学) 委員
- ・ 北海道大学卓越大学院・One Health Ally Course 運営委員会 委員
- ・ モンゴル国獣医・畜産分野人材育成能力強化プロジェクト国内支援委員会 (北海道大学) 委員
- ・ プラズマ・核融合学会・「プラズマによる生体電荷制御の科学」専門委員会 委員

6. 2019 年度研究成果発表等 (原著論文、総説・著書)

原著論文 (*責任著者)

1. Davaajav Otgonsuren, Thillaiampalam Sivakumar, Tovuu Amgalanbaatar, Batsaikhan Enkhtaivan, Sandagdorj Narantsatsral, Bumduuren Tuvshintulga, Myagmar Zoljargal, Dalantai Munkhgerel, Batbold Davkharbayar, Purevdorj Baatarjargal, Batdorj Davaasuren, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Badgar Battsetsegb Banzragch Battur, **Naoaki Yokoyama***. Molecular epidemiological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Babesia* sp. Mymensingh infections in Mongolian cattle. **Parasitology International**. 2020; 77: 102107. PMID: 32205192
2. Thillaiampalam Sivakumar, Bumduuren Tuvshintulga, Hemal Kothalawala, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Dinh Thi Bich Lan, Phung Thang Long, Adrian Patalinghug Ybanez, Rochelle Haidee Daclan Ybanez, Daniel Francisco Benitez, Dickson Stuart Tayebwa, Alan Caine Costa DE Macedo, Leonhard Schnittger, **Naoaki Yokoyama***. Host range and geographical distribution of *Babesia* sp. Mymensingh. **Transboundary and Emerging Diseases**. 2020; doi: 10.1111/tbed.13546. PMID: 32166838
3. Amany Magdy Beshbishy Gaber El-Saber Batiha Luay Alkazmi Eman Nadwa, Eman Rashwan, Ahmed Abdeen, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Therapeutic Effects of Atranorin towards the Proliferation of *Babesia* and *Theileria* Parasites. **Pathogens**. 2020; 9(2): 127. PMID: 32079149
4. Gaber El-Saber Batiha, Amany Magdy Beshbishy, Oluyomi Stephen Adeyemi, Eman Nadwa, Eman Rashwan, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Safety and efficacy of hydroxyurea and eflornithine against most blood parasites *Babesia* and *Theileria*. **PLoS One**. 2020; 15(2): e0228996. PMID: 32053698
5. Yongchang Li, Mingming Liu, Mohamed Abdo Rizk, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Huanping Guo, Yang Gao, Jixu Li, Amani Magdy Beshbishy, Arifin Budiman Nugraha, Shengwei Ji, Maria Agnes Tumwebaze, Byamukama Benedicto, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan*. Drug screening of food and drug administration-approved compounds against *Babesia bovis* in

- vitro*. **Experimental Parasitology**. 2020; 210: 107831. PMID: 31926147
6. Thillaiampalam Sivakumar, Shiori Fujita, Bumduuren Tuvshintulga, Hemal Kothalawala, Seekkuge Susil Priyantha Silva, **Naoaki Yokoyama***. Discovery of a new *Theileria* sp. closely related to *Theileria anulata* in cattle from Sri Lanka. **Scientific Reports**. 2019; 9(1): 16132. PMID: 31695080
 7. Baldorj Pagmadulam, Punsantsogvoo Myagmarsuren, **Naoaki Yokoyama**, Badgar Battsetseg, Yoshifumi Nishikawa*. Seroepidemiological study of *Toxoplasma gondii* in small ruminants (sheep and goat) in different provinces of Mongolia. **Parasitology International**. 2020; 74: 101996. PMID: 31634631
 8. Atambekova Zhyldyz, Thillaiampalam Sivakumar, Ikuo Igarashi, Erandi Gunasekara, Hemal Kothalawala, Seekkuge Susil Priyantha Silva, **Naoaki Yokoyama***. Epidemiological survey of *Anaplasma marginale* in cattle and buffalo in Sri Lanka. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2019; 81(11): 1601-1605. PMID: 31548475
 9. Punsantsogvoo Myagmarsuren, Thillaiampalam Sivakumar, Batsaikhan Enkhtaivan, Batdorj Davaasuren, Myagmar Zoljargal, Sandagdorj Narantsatsral, Batbold Davkharbayar, Bayasgalan Mungun-Ochir, Banzragch Battur, Noboru Inoue, Ikuo Igarashi, Badgar Battsetseg, **Naoaki Yokoyama***. A Seroepidemiological Survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Horses in Mongolia. **The Journal of Parasitology**. 2019; 105(4): 580-586. PMID: 31414947
 10. Gaber El-Saber Batiha, Amani Magdy Beshbishy, Dickson Stuart Tayebwa, Oluyomi Stephen Adeyemi, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi. Evaluation of the inhibitory effect of ivermectin on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites *in vitro* and *in vivo*. **Tropical Medicine and Health**. 2019; 47: 42. PMID: 31337949
 11. Mst Ishrat Zerin Moni, Kei Hayashi, Thillaiampalam Sivakumar, Moizur Rahman, Lovely Nahar, Md Zakirul Islam, **Naoaki Yokoyama**, Katsuya Kitoh, Cornelia Appiah-Kwarteng, Yasuhiro Takashima*. First molecular detection of *Theileria annulata* in Bangladesh. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2019; 81(8): 1197-1200. PMID: 31292335
 12. Arifin Budiman Nugraha, Bumduuren Tuvshintulga, Azirwan Guswanto, Dickson Stuart Tayebwa, Mohamed Abdo Rizk, Sambuu Gantuya, GaberEl-Saber Batiha, Amany Magdy Beshbishy, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Screening the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box against piroplasm parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. 2019; 10: 84-90. PMID: 31254719
 13. Amani Magdy Beshbishy, Gaber El-Saber Batiha, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*, Ellagic acid microspheres restrict the growth of *Babesia* and *Theileria* *in vitro* and *Babesia microti* *in vivo*. **Parasites & Vectors**. 2019; 12(1): 269. PMID: 31138282
 14. Gaber El-Saber Batiha, Amany Magdy Beshbishy, Dickson Stuart Tayebwa, Oluyomi

- Stephen Adeyemi, Hazem Shaheen, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi*. The effects of trans-chalcone and chalcone 4 hydrate on the growth of *Babesia* and *Theileria*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2019; 13(5): e0007030. PMID: 31125333
15. Gaber El-Saber Batiha, Amany Magdy Beshbishy, Dickson Stuart Tayebwa, Hazem Mohammed Shaheen, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi*. Inhibitory effects of *Syzygium aromaticum* and *Camellia sinensis* methanolic extracts on the growth of *Babesia* and *Theileria* parasites. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2019; 10(5): 949-958. PMID: 31101552
 16. Bayasgalan Mungun-Ochir, Noriyuki Horiuchi, Adilbish Altanchimeg, Kenji Koyama, Keisuke Suganuma, Uranbileg Nyamdolgor, Ken-ichi Watanabe, Purevdorj Baatarjargal, Daiki Mizushima, Banzragch Battur, Naoaki Yokoyama, Badgar Battsetseg, Noboru Inoue, Yoshiyasu Kobayashi*. Polyradiculoneuropathy in dourine-affected horses. **Neuromuscular Disorders**. 2019; 29(6): 437-443. PMID: 31101461
 17. Keisuke Suganuma, Daisuke Kondoh, Thillaiampalam Sivakumar, Daiki Mizushima, Afra' a Tajelsir Mohamed Elata, Oriel M. M. Thekiso, Naoaki Yokoyama, Noboru Inoue*. Molecular characterization of a new *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. **Parasitology Research**. 2019; 118(6): 1927-1935. PMID: 31055671
 18. Erandi Gunasekara, Thillaiampalam Sivakumar, Hemal Kothalawala, Thuduwege Sanath Abeysekera, Amitha Sampath Weerasingha, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Ratnam Kanagaratnam, Palitha Rohana Yapa, Atambekova Zhyldyz, Ikuo Igarashi, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Naoaki Yokoyama*. Epidemiological survey of hemoprotozoan parasites in cattle from low-country wet zone in Sri Lanka. **Parasitology International**. 2019; 71: 5-10. PMID: 30858106
 19. Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi*. Development of unstable resistance to diminazene aceturate in *Babesia bovis*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. 2019; 9: 87-92. PMID: 30785049
 20. Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Mohamed Abdo Rizk, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi*. Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* inhibitory effect of thymoquinone on piroplasm parasites. **Parasites & Vectors**. 2019; 12(1): 37. PMID: 30651142
 21. Batsaikhan Enkhtaivan, Sandagdorj Narantsatsral, Batdorj Davaasuren, Davaajav Otgonsuren, Tovuu Amgalanbaatar, Erdenekhuu Uuganbayar, Myagmar Zoljargal, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Keisuke Suganuma, Nthatisi Innocentia Molefe, Thillaiampalam Sivakumar, Noboru Inoue, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, Naoaki Yokoyama*. Molecular detection of *Anaplasma ovis* in small ruminants and ixodid ticks from Mongolia. **Parasitology International**. 2019; 69: 47-53. PMID: 30458297

22. Keigo Takeda*, Hiromasa Yamada, Kenji Ishikawa, H Sakakita, Jaeho Kim, Masashi Ueda, Jun-ichiro Ikeda, Yoshihiro Akimoto, Yosky Kataoka, **Naoaki Yokoyama**, Yuzuru Ikehara, Masaru Hori. Systematic diagnostics of the electrical, optical, and physicochemical characteristics of low-temperature atmospheric-pressure helium plasma sources. **Journal of Physics D: Applied Physics**. 2019; 52: 165202. 10.1088/1361-6463/aaff44
23. Gaber E-S Batiha, Amani M Beshbishy, Dickson S Tayebwa, Oluyomi S Adeyemi, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Anti-piroplasmic potential of the methanolic *Peganum harmala* seeds and ethanolic *Artemisia absinthium* leaf extracts. **The Journal of Protozoology Research**. 2019; 29: 8-25. doi.org/10.32268/jprotozooolres.29.1-2_8
24. Tserendorj Munkhjargal, Gaber El-Saber Batiha, Amani Magdy Beshbishy, Mohamed Abdo Rizk, Azirwan Guswanto, Toshi Onikubo, Tayebwa Dickson, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Improvement of SYBR Green I-based fluorescence assay reading procedure for anti-babesial drugs screening *in vitro*. **The Journal of Protozoology Research**. 2019; 29: 26-43. doi.org/10.32268/jprotozooolres.29.1-2_26

総説

1. Mohamed Abdo Rizk, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Sabry El-Khodery, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi*. Discovering the *in vitro* potent inhibitors against *Babesia* and *Theileria* parasites by repurposing the Malaria Box: A review. **Veterinary Parasitology**. 2019; 274: 108895. PMID: 31494399
2. ThankGod E Onyiche, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, **Naoaki Yokoyama**, Xuenan Xuan, Oriol Thekisoe*. A Review on Equine Piroplasmosis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 2019; 16(10): 1736. PMID: 31100920
3. Rika Umemiya-Shirafuji*, Kozo Fujisaki, Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Mouni, **Naoaki Yokoyama**, Hiroshi Suzuki, Noboru Inoue, Xuenan Xuan. Hard ticks as research resources for vector biology: from genome to whole-blood level (Mini Review). **The Japan Society of Medical Entomology and Zoology**. 2019; 70: 181-188. doi.org/10.7601/mez.70.181

著書

1. **横山直明** (分担執筆) : バベシア症、p48-49、動物病院スタッフのための犬と猫の感染症ガイド、小沼 守、前田 健、佐藤 宏監修、緑書房、2019 年
2. **横山直明** (分担執筆) : 原虫類概説 (生態と発育) p9-10、アピコンプレックス類 (ピロプラズマ症) p65-82、動物寄生虫病学 (四訂版)、板垣 匡、藤崎幸蔵編著、朝倉書店、2019 年

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 「牛の放牧衛生」、家畜衛生講習会（牛疾病特殊講習会）、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門（つくば）、2019年6月16日
2. 「北海道における牛小型ピロプラズマ病の現状と対策について」、北海道公共牧場会 夏季研修会、十勝プラザ（帯広）、2019年8月21日
3. 「人獣共通感染症について～北海道に潜む人獣共通感染症の病原体とは～」、ジョイントセミナー（高校生への出前講義）、苫小牧東高校（苫小牧）、2019年11月15日

8. 招待講演等

1. 「Bovine babesiosis ~Role of OIE reference laboratory~」OIE special seminar、Hue University of Agriculture and Forestry, Vietnam. 2019年11月5日
2. 「Bovine babesiosis ~Role of OIE reference laboratory~」OIE special seminar、Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand. 2020年2月11日

9. 獲得研究費

1. 平成 31 年度 家畜衛生対策事業（農林水産省・消費・安全局）「我が国の OIE 認定施設活動支援事業」、代表、平成 31 年度
2. 平成 31 年度 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化 B）（文部科学省）「新たに発見された病原性牛バベシアに対する国際防疫体制強化に向けた基盤研究」（19KKO174）、代表、平成 31 年度～令和 3 年度
3. 平成 30 年度 挑戦的研究（萌芽）（文部科学省）「シカ小型ピロプラズマが牛小型ピロプラズマ病の発症に与える影響」（18K19257）、代表、平成 30 年度～令和元年度
4. 平成 28 年度 基盤研究 B（文部科学省）「牛バベシア病に対するオーダーメイド型サブユニットカクテルワクチンの開発研究」（16H05033）、代表、平成 28 年度～令和元年度（繰越）
5. 平成 29 年度 二国間交流事業オープンパートナーシップ共同研究（日本学術振興会）「スリランカで実装可能な牛バベシア病に対する簡易診断法の開発研究」、代表、平成 29 年度～令和元年度
6. 平成 29 年度 研究拠点形成事業-B.アジア・アフリカ学術基盤形成型（日本学術振興会）（代表 玄学南）、分担、平成 29 年度～令和元年度
7. 平成 30 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、既存薬剤が効かないヒトバベシア病にも対峙できる併用治療法の開発（外国人特別研究員 TUVSHINTULGA BUMDUUREN）、受入研究者、平成 30 年度～令和 2 年度
8. 平成 30 年 基盤研究（B）（文部科学省）「ピロプラズマ病に対するコンビネーション治療法の家畜への実用化を目指した研究開発」（18H02337）（代表者 五十嵐郁男）、分担、平成 30 年度～令和 2 年度
9. 平成 31 年度 研究活動スタート支援（文部科学省）「Determination of host range and global distribution of Babesia sp. Mymensingh, a recently discovered virulent Babesia capable of causing clinical babesiosis in cattle」（19K23704）（代表者 Thillaiampalam

Sivakumar) 、支援、平成 31 年度～令和 2 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Phung Thang Long: 「国際疫学調査（ベトナム）」 Hue University of Agriculture and Forestry, Vietnam, 2005 年 1 月～、大学間学術交流協定
2. Nattawooti Sthitmatee: 「国際疫学調査（タイ）」 Chiang Mai University, Thailand, 2012 年 12 月～, 大学間国際学術交流協定
3. Badgar Battsetseg: 「国際疫学調査（モンゴル）」 Institute of Veterinary Medicine, Mongolia, 2019 年 6 月～部局間国際学術交流協定
4. Seekkuge Susil Priyantha Silva: 「国際疫学調査（スリランカ）」 Veterinary Sesech Institute, Sri Lanka, 2019 年 7 月～、部局間国際学術協定

1. 研究テーマの概要

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

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

2. 主な研究テーマ

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

3. 2019 年度研究の総括

- ・ ヒトで問題となっているマラリアや睡眠病などの病原原虫では、生物学的特性の解明および原虫病の治療・予防に有効な遺伝子探索を目的としたポストゲノム研究が進展し、遺伝子改変技術を駆使したゲノム機能解析および従来のワクチンより有用性が期待される次世代原虫ワクチン＝遺伝子改変原虫（Genetically-attenuated parasite: GAP）を用いた弱毒生ワクチンの開発等が精力的に進められています。一方、家畜の小型および大型ピロプラズマ原虫（タイレリア オリエンタリス及びバベシア・オバタ）における遺伝子操作技術は、マラリア原虫やトキソプラズマで汎用されている技術のレベルにはほど遠く、次世代治療・予防技術開発のための基盤技術の整備が急務になっております。そこで私達は、ピロプラズマ原虫における「家畜病害原虫のゲノム改変技術」の基盤を確立することを目的として研究をおこなっています。今年度は、外国産のバベシア原虫（バベシア・ボビス *Babesia bovis*）での遺伝子改変原虫の作製にゲノム編集（CRISPR/Cas9 系）の技術を応用して、専門誌に公表いたしました。具体的には、CRISPR/Cas9 系を応用して、spherical body protein 3（SBP3）へのタグの付加や thioredoxine peroxidase 1（tpx-1）遺伝子への点変異の導入に成功いたしました。この技術を応用することで、バベシア原虫でのゲノム機能解析や GAP 開発研究が、更に進展することが期待できます（論文リスト 5）。一方、国産のバベシア原虫（バベシア・オバタ *Babesia ovata*）では、これまで詳細な研究がおこなわれていなかったマダニ体内での発育ステージの分子論に切り込むため、ウシ赤血球内での発育ステージからマダニ体内での発育ステージへの分化を試験管内培養系で誘導する手法を確立して、専門誌に公表いたしました。この技術を応用するこ

とで、バベシア原虫でのマダニ体内発育ステージ分化メカニズムの研究や伝播阻止型ワクチン (TBV) の開発研究が、進展することが期待できます (論文リスト4)。また、メキシコ合衆国ケレタコ自由大学との国際共同研究では、外国産のバベシア原虫(バベシア・ビゲミナ *Babesia bigemina*) のワクチン候補抗原の一つロプトリータンパク質 RON2 の性状を解析して、専門誌に公表いたしました (論文リスト1)。

- ・ フィリピンでは国内 28 州に日本住血吸虫症の流行地があり、住民 500 万人が感染の危険に曝されています。私達の研究室では、国内の各流行地に分布する寄生虫の DNA を用いて分子疫学調査をおこない、各感染症流行地での寄生虫症の特性と寄生虫株の関係を解析した成績を、感染症対策の現場に還元しようとしています。一方、日本住血吸虫症の診断法を開発する研究では、酵素抗体法 (ELISA) や POCT をはじめとする、この寄生虫病の排除・撲滅に向けて社会実装に適した適性診断技術の開発を目指しております。今年度は、日本住血吸虫セルカリア (感染型幼虫) が哺乳類宿主への経皮感染時に皮膚角質層を溶解するために分泌するタンパク質カテプシン B を ELISA での診断抗原に応用して、専門誌に公表いたしました (論文リスト3)。カテプシン B のように宿主が感染の極初期に暴露される抗原を血清診断法に応用することで、日本住血吸虫症の早期診断の開発が可能になります。また、私達がこれまでに、患者診断用の ELISA 抗原として有用であることを報告している thioredoxine peroxidase 1 (Tpx-1) が、保虫宿主イヌでの診断用抗原としても有用であることを見出し、専門誌に公表いたしました (論文リスト2)。この抗原を ELISA や POCT などの高感度・高特異性の診断法に応用することで、患者と保虫宿主の日本住血吸虫症の診断に共通して適応することができる、One-Health 診断法の開発が可能になります。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本寄生虫学会・理事 (倫理委員会・利益相反委員会担当)
- ・ 日本熱帯医学会・理事 (用語担当)
- ・ 日本獣医寄生虫学会・理事 (副理事長)
- ・ 日本獣医学会・評議委員

② 主催した学会、研究会等

- ・ "Special Lecture Series" on Molecular and Cellular biology of Trypanosomes: Prof. Dr. Mark Carrington University of CAMBRIDGE "How do trypanosome receptors for host macromolecules avoid the host immune response?" (令和 2 年 10 月 15 日、原虫病研究センター PK-Hall)
- ・ "Special Lecture Series" on Ticks and Tick-borne Diseases: Dr. Marie Jalovecka Institute of Parasitology, Biology Centre CAS "Establishment of *Babesia* laboratory model and its experimental application." Dr. Daniel Sojka Institute of Parasitology, Biology Centre CAS "Proteolytic targets in ticks and tick-borne diseases." (令和 2 年 11 月 14

日、原虫病研究センター PK-Hall)

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 長崎大学熱帯医学研究所・熱帯医学研究拠点運営協議会委員
- ・ 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程教育リーディングプログラム学術委員会委員
- ・ 千葉大学真菌医学研究センターNBRP 運営委員会委員
- ・ 日米医学協力計画寄生虫疾患部会パネル

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Juan Mosqueda*, Mario Hidalgo-Ruiz, Diana Alexandra Calvo-Olvera, Diego Josimar Hernandez-Silva, Massaro Wilson Ueti, Miguel Angel Mercado-Uriostegui, Angelina Rodriguez, Juan Alberto Ramos-Aragon, Ruben Hernandez-Ortiz, **Shin-ichiro Kawazu**, Ikuo Igarashi. RON2, a novel gene in *Babesia bigemina*, contains conserved, immunodominant B-cell epitopes that induce antibodies that block merozoite invasion. **Parasitology**. 2019; 146: 1646-1654. PMID: 31452491
2. Jose Ma M Angeles, Yasuyuki Goto, Masashi Kirinoki, Lydia R Leonardo, Kharleezelle J Moendeg, Adrian P Ybañez, Pilarita T Rivera, Elena A Villacorte, Noboru Inoue, Yuichi Chigusa and **Shin-ichiro Kawazu***. Detection of canine *Schistosoma japonicum* infection using recombinant thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 2019; 81: 1413-1418. PMID: 31391359
3. Adrian Miki C Macalanda, Jose Ma M Angeles, Kharleezelle J Moendeg, Minh-Anh Dang-Trinh, Luna Higuchi, Masashi Kirinoki, Yuichi Chigusa Lydia R Leonardo, Elena A Villacorte, Pilarita T Rivera, Yasuyuki Goto and **Shin-ichiro Kawazu***. *Schistosoma japonicum* cathepsin B as potential diagnostic antigen for Asian zoonotic schistosomiasis. **Parasitology Research**. 2019; 118: 2601-2608. PMID: 31377909
4. Thu-Thuy Nguyen, Minh-Anh Dang-Trinh, Luna Higuchi, Juan Mosqueda, Hassan Hakimi, Masahito Asada, Junya Yamagishi, Rika Umemiya-Shirafuji and **Shin-ichiro Kawazu***. Initiated *Babesia ovata* sexual stages under *in vitro* conditions were recognized by anti-CCp2 antibodies, showing changes in the DNA content by imaging flow cytometry. **Pathogens**. 2019; 8: pii: E104. PMID: 31319568
5. Hassan Hakimi, Takahiro Ishizaki, Yuto Kegawa, Osamu Kaneko, **Shin-ichiro Kawazu** and Masahito Asada*. Genome editing of *Babesia bovis* using the CRISPR/Cas9 system. **mSphere**. 2019; 4: pii: e00109-19. PMID: 31221627
6. Takeshi Q Tanaka, Suzumi M Tokuoka, Yuto Kegawa, Daichi Nakatani, Fumie Hamano, **Shin-ichiro Kawazu**, Thomas E Wellems, Kiyoshi Kita, Takao Shimizu and Fuyuki

- Tokumasu*. Polyunsaturated fatty acids promote *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. **Biology Open**. 2019; 8: pii: bio042259. PMID: 31189559
7. Raffy Jay C Fornillos, Ian Kendrich C Fontanilla, Yuichi Chigusa, Mihoko Kikuchi, Masashi Kirinoki, Naoko Kato-Hayashi, Shin-ichiro Kawazu, Jose Ma M Angeles, Ian Kim B Tabios, Kharleezelle J Moendeg, Yasuyuki Goto, Pebbles G Tamayo, Eloina F Gampoy, Imelda Pates, James C Chua and Lydia R Leonardo*. *Schistosoma japonicum* in the snail *Oncomelania hupensis quadrasi* in endemic villages in the Philippines: Need for snail surveillance technique. **Tropical Biomedicine**. 2019; 36: 402-411.

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

1. One Health: Diagnostics in Zoonotic Schistosomiasis, The 1st International Forum on Collaborative Researchs in Parasitic Diseases, Parasitology Beyond Microscopy, (1st IFCR) : シンポジウム、Manila, Philippines、2019年5月23日
2. 住血吸虫症対策における Reservoir Host の検査法の開発 -フィリピンにおける住血吸虫症対策での経験から-、世界的な対策の中で、今後求められる Neglected Tropical Diseases の診断技術の開発 : シンポジウム、東京都、2019年11月5日
3. Molecular Techniques in the Study of *Babesia* Parasites, Open Lecture Series: Advanced Techniques in Parasitic Diseases Research : シンポジウム、Los Baños, Philippines、2019年12月10日

9. 獲得研究費

1. 平成 30 年度 挑戦的研究（萌芽）（文部科学省）、サイトカイン発現住血原虫の開発研究（18K19258）、代表、平成 30 年度～令和 2 年度
2. 共同研究 ネオファーマジャパン株式会社、5-ALA（5-アミノレブリン酸）の日本住血吸虫症治療効果の検証（K18051）、代表、平成 30 年度～令和 2 年度
3. 共同研究 ネオファーマジャパン株式会社、5-ALA（5-アミノレブリン酸）のピロプラズマ病治療効果の検証（K18087）、代表、平成 30 年度～令和 2 年度
4. 平成 31 年度 基盤研究（B）（一般）（文部科学省）、バベシアのマダニ体内発育ステージ抗原の網羅的解析:伝搬阻止ワクチン開発の基盤整備（19H03120）、代表、平成 31 年度～令和

3年度

5. 令和元年度 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）（文部科学省）、バマイクロサテライトマーカーを応用した日本住血吸虫症対策の創出を目指した研究（19KK0173）、代表、令和元年度～令和4年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Memorandum Of Understanding (MOU) for academic cooperation and exchange between College of Public Health, University of the Philippines Manila, Philippines and National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、2008年1月～2023年11月（2018年11月に延長）、学術交流協定、フィリピン大学マニラ校・公衆衛生学部
2. Memorandum Of Understanding (MOU) between The College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Cavite State University, Philippines and National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、2019年5月～2022年5月、学術交流協定、カビテ州立大学・生物獣医科学部
3. Memorandum Of Understanding (MOU) on academic cooperation between Philippines Carabao Center and National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、2019年7月～2022年7月、学術交流協定、フィリピンカラバオセンター
4. Daniel Sojka : nstitute of Parasitology, Biology Centre CAS、The development of a DiCre recombinase-expressing strain of *Babesia* for the creation of conditional gene knockouts、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究（2019-joint-2）
5. 川合 覚：獨協医科大学熱帯病寄生虫病学講座、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、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究（2019-joint-3）
6. 麻田 正仁：長崎大学熱帯医学研究所、*Babesia bovis* 感染赤血球における宿主血管内皮細胞接着機構の解明、2019年4月1日～2020年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究（2019-joint-1）

1. 研究テーマの概要

動物トリパノソーマ症は国際獣疫事務局（OIE）が定める国際重要家畜疾患であり、またヒトアフリカトリパノソーマ症は世界保健機関（WHO）が定める「顧みられない熱帯病」であり、それぞれ対策が強く求められている原虫病です。我々の研究室では、トリパノソーマ症流行国での疫学調査を通じてその感染状況を明らかにするとともに、実際に流行国で被害をもたらしている“野外流行型トリパノソーマ”を感染動物から分離、実験室で実験を行えるように培養馴化させた株を独自に確立し、野外流行型トリパノソーマのゲノム解析、病原性解析、薬剤感受性試験などの基礎的研究を行っています。また、このようにして得られた野外流行型トリパノソーマの基礎研究成果をもとに、迅速かつ簡便にトリパノソーマ感染状態を把握可能な簡易診断技術の確立と社会実装に向けた研究及び新規トリパノソーマ症治療薬の探索と実用化に向けた研究を進めています。さらに OIE リファレンスラボラトリー（スーラ病（*Trypanosoma evansi* 感染症））として、動物トリパノソーマ症に関する各種診断業務を行っています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トリパノソーマ症の疫学調査
- ・ 野外流行型トリパノソーマの分離培養法の確立および分離株の性状解析
- ・ トリパノソーマ症の迅速診断法の開発および社会実装に向けた研究
- ・ 既存薬及び天然物からの抗トリパノソーマ活性物質の探索

3. 2019 年度研究の総括

- ・ *Trypanosoma equiperdum* はウマのトリパノソーマ症の一種である媾疫の病原体であり、主に血流中に寄生する他種トリパノソーマとは異なり生殖器粘膜に寄生し交尾によって感染が拡大します。媾疫（こうえき）は OIE の定める国際重要家畜疾患であるにもかかわらず、*Trypanosoma equiperdum* 寄生動態と臨床症状との関連（病態生理）は未解明であり、また媾疫の制御に重要である治療法は確立されていません。我々は *Trypanosoma equiperdum* の感染が顔面神経麻痺や運動障害などの神経症状を引き起こす機構を明らかにすることを目的として、モンゴル国で媾疫と診断された 4 症例を対象として病理学的探索を実施しました。その結果、広汎な多発性神経根ニューロパチーと、その神経に支配される領域に筋萎縮が認められました。本研究により媾疫の臨床症状の一つである神経麻痺が引き起こされる機構の一端が明らかとなりました（論文リスト 5）（モンゴル国立生命科学大学獣医学研究所、帯広畜産大学基礎獣医学部門との共同研究）。またモンゴルにおいてウマはその経済的な価値に加え、遊牧民のアイデンティティーとして精神的・文化的に非常に重要な家畜です。媾疫に対する有効な治療法が確立されていないため、OIE は媾疫罹患ウマの摘発淘汰による清浄化を推奨していますが、モンゴルを始めとする遊牧民族国家での実施は困難です。そこで媾疫治療法の確立を目的として、媾疫症例ウマの一例に対する実験的治療を試みました。その結果、

Trypanosoma equiperdum が脳脊髄液に寄生する前であれば、既存の動物トリパノソーマ治療薬によって治療が可能であることを明らかにしました。さらに本治療によって繁殖成績の改善も認められました（論文リスト2）。本研究により媾疫の早期診断とそれに引き続く投薬治療によって、媾疫が完治できる可能性が示唆されました（モンゴル国立生命科学大学獣医学研究所との共同研究）

- ・ 既存のトリパノソーマ症治療薬は毒性が強く、また限られた少数の薬剤を長く使用しているため、薬剤耐性トリパノソーマ症及び薬剤耐性トリパノソーマが多く報告されています。そのため新規トリパノソーマ症治療薬の開発が強く望まれています。そこで我々は新規トリパノソーマ症治療薬の候補となりうる化合物を探索するために、モンゴル国産薬用植物から抽出された各種化合物の抗トリパノソーマ活性を検証しています。本年度はゴビ砂漠などに自生する *Brachanthemum gobicum* から抽出された各種化合物の抗トリパノソーマ活性を検討した結果、アシル化リグナン類に抗トリパノソーマ活性を見出しました。（論文リスト9）（東北医科薬科大学、モンゴル国立大学との共同研究）
- ・ ロバはスーダン国をはじめとするアフリカ・中東諸国で重要な家畜です。ロバは一般的にトリパノソーマ症などの住血原虫病に対して耐性を示すため、これらの原虫の待機宿主として重要な役割を果たしていると考えられていますが、これまでにロバにおける動物トリパノソーマの調査は十分に行われていません。そこでスーダン国の首都（ハルツーム）近郊で飼養されているロバを対象に動物トリパノソーマに対する血清疫学及び分子疫学調査を行いました。血清疫学調査の結果、10%～28%のロバで抗トリパノソーマ抗体が検出され、これらのロバでトリパノソーマ感染が疑われました。さらに分子疫学調査の結果、38.9%のロバから *Trypanozoon* 亜属の遺伝子断片を検出しました。さらにアフリカトリパノソーマを生物学的に媒介するツェツェバエ (*Glossina* spp.) の生息域から遠く離れているハルツームで飼養されているロバにおいて、ツェツェバエによって生物学的に媒介される *Trypanosoma congolense* の遺伝子断片が9.1%のロバから検出されました。この結果は、アフリカ諸国での動物トリパノソーマ症制御を考える上で、ツェツェバエ生息域外でも、ツェツェバエ媒介性アフリカトリパノソーマの存在を考慮に入れなければならないことを示唆しています（論文リスト3）（スーダン科学技術大学との共同研究）。
- ・ *Trypanosoma theilrei* は日本のウシにも広く感染している大型のトリパノソーマです。本年度は畜産フィールド科学研究センターで飼養しているウシに感染していた *Trypanosoma theilrei* の分離培養と、形態学的・遺伝学的な解析を行いました。形態学的な解析の結果、全長が $60 \pm 7.8 \mu\text{m}$ 長大であるとともに多形性を示すなど、これまでに報告されている *Trypanosoma theilrei* (*Megatrypanum* 亜属) の特徴と一致しました。また遺伝学的な解析の結果、北海道から分離された *Trypanosoma theilrei* 株と同一の TthII クレードに属することがわかりました。（論文リスト8）（ノースウエスト大学（南ア）、帯広畜産大学基礎獣医学部門との共同研究）

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本獣医寄生虫学会
- ・ 日本寄生虫学会

② 主催した学会、研究会等

The 4th International Conference on NTTAT of the OIE NTTAT Network, Hustai National Park, Ulaanbatar, Mongolia, 2019/8/14,15 (モンゴル獣医学研究所との共催)

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Aiko Kume, Keisuke Suganuma, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki, Effect of vegetable oils on the experimental infection of mice with *Trypanosoma congolense*. **Experimental Parasitology**. 2020; 210: 107845. PMID: 107845
2. Batbold Davkharbayar, Batdorj Davaasuren, Sandagdorj Narantsatsral, Banzragch Battur, Myagmarsuren Punsantsogvoo, Badgar Battsetseg, Daiki Mizushima, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma*. Treatment efficiency of combination therapy with Diminazene Aceturate and Quinapyramine Sulfate in a horse with Dourine. **Journal of Equine Veterinary Science**. 2020; 87: 102905. PMID: 102905
3. Afraa Elata, Ehab Mossaad, Rawan Satti, Nadia Matar, Yuma Ohari, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma*. Serological and molecular detection of selected hemoprotozoan parasites in donkeys in West Omdurman, Khartoum State, Sudan. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82(3):286-293 PMID: 31969541
4. Ehab Mossaad, Ahmed Ali Ismail, Abdalla Mohamed Ibrahim, Peter Musinguzi, Tama-dor E E Angara, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma*. Prevalence of different trypanosomes in livestock in Blue Nile and West Kordofan States, Sudan. **Acta Tropica**. 2019; 203:105302. PMID: 31857080
5. Bayasgalan Mungun-Ochir, Noriyuki Horiuchi, Adilbish Altanchimeg, Kenji Koyama, Keisuke Suganuma, Uranbileg Nyamdolgor, Ken-ichi Watanabe, Purevdorj Baatar-jargal, Daiki Mizushima, Banzragch Battur, Naoaki Yokoyama, Badgar Battsetseg, Noboru Inoue, Yoshiyasu Kobayashi. Polyradiculoneuropathy in dourine-affected horses. **Neuromuscular Disorders**. 2019; 29:437 – 443. PMID: 31101461

6. ThankGod E Onyiche, **Keisuke Suganuma**, Ikuo Igarashi, Naoaki Yokoyama, Xuenan Xuan, Oriel M M Thekiso. A Review on Equine Piroplasmiasis: Epidemiology, Vector Ecology, Risk Factors, Host Immunity, Diagnosis and Control. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 2019; 16:1736. PMID: 31100920
7. Philippe Büscher, Mary Isabel Gonzatti, Laurent Hébert, Noboru Inoue, Ilaria Pascucci, Achim Schnauffer, **Keisuke Suganuma**, Louis Touratier, Nick Van Reet. Equine trypanosomiasis: enigmas and diagnostic challenges. **Parasites & Vectors**. 2019; 12:234. PMID: 31092285
8. **Keisuke Suganuma***, Daisuke Kondoh, Thillaiampalam Sivakumar, Daiki Mizushima, Afraa Elata, Oriel M M Thekiso, Naoaki Yokoyama, Noboru Inoue. Molecular characterization of a new *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. **Parasitology Research**. 2019; 118:1927-1935. PMID: 31055671
9. Batsukh Odonbayar, Toshihiro Murata, **Keisuke Suganuma**, Yoshinobu Ishikawa, Buyanmandakh Buyankhishig, Javzan Batkhuu, Kenroh Sasaki. Acylated Lignans Isolated from *Brachanthemum gobicum* and Their Trypanocidal Activity. **Journal of Natural Products**. 2019; 82: 774 – 784. PMID: 30896183

総説

該当なし

著書

動物寄生虫病学改定第4版、朝倉書店、分担執筆

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 帯広柏葉高校進学相談会模擬授業「寄生虫との戦い」、2019年6月20日
2. 帯広畜産大学オープンキャンパス「寄生虫研究のススメ」、2019年8月3日
3. 畜大ふれあいフェスティバル「寄生虫を観察してみよう!」、2019年12月1日

8. 招待講演等

1. Keisuke Suganuma. Equine trypanosomiasis (lecture and hands-on-training). Seminar on Equine Disease Testing (blood parasites), Hong Kong AFCD Tai Lung Veterinary Laboratory, Agriculture, Fisheries and Conservation Department, Hong Kong, 2020/1/13
2. Keisuke Suganuma. *In vitro* culture of *Trypanosoma*. Open lecture Series: Advanced Techniques in Parasitic Diseases Researches, University of the Philippines Los Banos, Faculty of Veterinary Medicine, The Philippines, 2019/12/10
3. Keisuke Suganuma *et al.*, Dourine (*Trypanosoma equiperdum* infection in equidae)

control campaign in Mongolia, Conference on the Cooperation and Collaboration on Prevention and Control of Animal Disease, Hangzhou, China, 2019/5/21-5/24

9. 獲得研究費

1. 2019 年度 若手研究 (B) (文部科学省)、抗トリパノソーマ作用機序評価系の確立と新規創薬への応用 (16K18793)、代表、2019 年度～2021 年度
2. 2014 年度 アフリカにおける顧みられない熱帯病 (NTDs) 対策のための国際共同研究プログラム (国立研究開発法人 日本医療研究開発機構)、迅速診断法の開発とリスク分析に基づいた顧みられない熱帯病対策モデルの創成、分担、2014 年度～2019 年度
3. 平和中島財団研究アジア地域重点学術研究助成、モンゴル国産薬用植物資源の家畜トリパノソーマ病治療への活用、代表、2019 年度
4. 共同研究 ネオファーマジャパン株式会社、5-ALA (5-アミノレブリン酸) のトリパノソーマ症治療効果の検証、代表、2018 年度～2020 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. 村田 敏拓：東北医科薬科大学・生薬学教室、モンゴル国薬用植物による現地家畜トリパノソーマ症・ピロプラズマ症対策、2019 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日、2019 年度原虫病研究センター共同研究
2. 中尾 洋一：早稲田大学・先進理工学学部・ケミカルバイオロジー研究室、抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と作用メカニズム解析、2019 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日、2019 年度原虫病研究センター共同研究
3. 堀内 雅之：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、小型動物を用いた膵膵トリパノソーマ感染モデルの構築と病理学的解析、2019 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日、2019 年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

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

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

2. 主な研究テーマ

- ・ トキソプラズマオーシスト壁の生化学的解析
- ・ トキソプラズマ症に対するワクチン開発
- ・ トキソプラズマ原虫の急性感染から慢性感染への移行過程の解析
- ・ 渡り鳥のクリプトスポリジウム感染疫学調査

3. 2019年度研究の総括

- ・ 渡り鳥は様々な病原体を外部から持ち込むことが知られています。北方からの渡り鳥であるカモにおけるクリプトスポリジウム属の感染状況の調査を行いました。鳥類に感染性のある *Cryptosporidium avian genotype III* の10%および *Cryptosporidium baileyi* の1.5%の糞便中からオーシストが検出され、感染が確認されました（論文リスト1）。
- ・ 樹木からの抽出物にはある種の病原体に対する抑制効果を示すことはよく知られています。我々はミズナラの外樹皮にトキソプラズマ原虫の増殖抑制効果があることを見出し、抑制物質の本体の同定に成功しました（論文リスト2）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議委員
- ・ 日本寄生虫学会評議委員

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Rehab Youssef Salama, Abdelbaset E Abdelbaset, Yohei Takeda, Kunitoshi Imai, Haruko Ogawa, **Makoto Igarashi**. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from migratory ducks around Tokachi subprefecture, Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; doi: 10.1292/jvms.19-0586. PMID: 32224553
2. Marina Endo, Kengo Shigetomi, Shinya Mitsuhashi, **Makoto Igarashi**, Makoto Ubukata. Isolation, structure determination and structure–activity relationship of anti-toxoplasma triterpenoids from *Quercus crispula* Blume outer bark. **Journal of Wood Science**. 2019; 65: 3. <https://doi.org/10.1186/s10086-019-1782-8>
3. Albertus Eka Yudistira Sarwono, Shinya Mitsuhashi, Mohammad Hazzaz Bin Kabir, Kengo Shigetomi, Tadashi Okada, Fumina Ohsaka, Satoko Otsuguro, Katsumi Maenaka, **Makoto Igarashi**, Kentaro Kato, Makoto Ubukata. Repurposing existing drugs: identification of irreversible IMPDH inhibitors by high-throughput screening. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. 2019; 34: 171–178. PMID: 30451014

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

該当なし

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

該当なし

1. 研究テーマの概要

当研究室では地球規模で問題となっている原虫病であるバベシア症並びにマラリアを対象に、新規予防・治療法の開発に向け、その赤血球寄生機構の解明を行っています。バベシア原虫、マラリア原虫はアピコンプレクサ門に属する赤血球寄生原虫であり、赤血球寄生ステージにおいて哺乳類宿主に病気を引き起こします。これらの原虫は巧妙なメカニズムで宿主赤血球に侵入し、赤血球内で増殖すると共に、赤血球内での生存の維持や宿主免疫の回避のため、能動的に赤血球の改変を行いますが、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていません。そこで、当研究室では、ゲノム機能解析のための遺伝子改変技術を確認すると共に、イメージング解析やオミクス解析といった手法を組み合わせることで原虫の寄生メカニズムを明らかにしています。

2. 主な研究テーマ

- ・ ピロプラズマ原虫の宿主赤血球修飾機構の解明
- ・ ピロプラズマ原虫やマラリア原虫の赤血球侵入機構の解明
- ・ 偶蹄類マラリア原虫の疫学及び病原性の解明

3. 2019 年度研究の総括

- ・ *Babesia bovis* はウシのバベシア原虫の中で最も病原性の高い原虫です。*B. bovis* 感染赤血球はウシの脳毛細血管内皮細胞に接着することで血管を栓塞し、ウシに致命的な神経症状を引き起こしますが、そのメカニズムについては感染赤血球表面に局在する原虫由来の分子 VESA が関わるという知見しかありません。そこで、*B. bovis* 感染赤血球表面のプロテオーム解析を行い、同定された分子についてその機能解析を行っています。また、その過程で新たなバベシア原虫遺伝子改変手法として CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法を確立しました。ゲノム編集法の確立により、高効率にバベシア原虫遺伝子を改変する事が可能となりました(論文リスト 8)。その他にもセンター内外の研究者と共同研究を行い、バベシア原虫における遺伝子改変技術の開発やバベシア原虫有性世代の解析を行いました(論文リスト 1,5,6)。
- ・ ヒトのマラリアは年間 2 億人の患者と 40 万人以上もの死者を出す感染症ですが、スイギュウやヤギといった偶蹄類家畜のマラリアは病原性、分布域を含め、その疫学は謎に包まれています。そこで、偶蹄類マラリア原虫の病原性を明らかにする一環として、イランのヤギについてマラリア原虫と他の住血微生物との混合感染状況を調査し、マラリア原虫とアナプラズマ・タイレリア感染が負の相関を示すことを明らかにしました(論文リスト 7)。また、スイギュウのマラリア原虫 *Plasmodium bubalis* のゲノム解読を北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターの山岸潤也博士と共同で行い、核ゲノム及びアピコプラストゲノムの一部塩基配列を明らかにしました。さらに、ネパール科学技術アカデミーの Kishor Pandey 博士が行っている、

ネパールにおける偶蹄類マラリア原虫の疫学調査に協力し、ネパールのスイギュウにも *P. bu-balis* が感染していることを初めて明らかにしました（論文リスト4）。

- ・ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* はヒトに感染するマラリア原虫に比べ、遺伝子組換え原虫の作出が容易なため、マラリア原虫のゲノム機能を解析する上で有用なツールとなっています。近年、リン酸化シグナルが原虫の赤血球侵入に重要な役割を担っていることが明らかになったため、長崎大学・熱帯医学研究所の金子修博士との共同研究を進め、*P. yoelii* のキナーゼ及びシユードキナーゼ遺伝子を網羅的にノックアウトする実験を行いました。その中で、シユードキナーゼの一つ、PypPK1 がマラリア原虫の赤血球侵入だけでなく、ベクターである蚊体内での有性生殖においても重要な役割を果たしていることを明らかにしました（論文リスト2）。さらに、金子博士の推進するヒトの三日熱マラリア原虫における遺伝子組換え法の確立に協力し、*P. vivax* の推定遺伝子プロモーター配列やセントロメア配列を *P. yoelii* に遺伝子導入することで、その機能評価を行いました（論文リスト3）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・日本寄生虫学会
- ・日本獣医学会
- ・日本獣医寄生虫学会 評議員、渉外・広報委員
- ・日本熱帯医学会
- ・米国微生物学会

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2019 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Mingming Liu, Shengwei Ji, Mohamed Abdo Rizk, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Jixu Li, Yongchang Li, Weiqing Zheng, Byamukama Benedicto, Maria Agnes Tumwebaze, **Masahito Asada**, and Xuenan Xuan. Transient Transfection of the Zoonotic Parasite *Babesia microti*. **Pathogens**. 2020; 9(2). E108. PMID: 32050586
2. Takahiro Ishizaki, Nattawat Chaiyawong, Hassan Hakimi, **Masahito Asada**, Mayumi Tachibana, Tomoko Ishino, Kazuhide Yahata, Osamu Kaneko. A novel *Plasmodium yoelii* pseudokinase, PypPK1, is involved in erythrocyte invasion and exflagellation center formation. **Parasitology International**. 2020; 76:102056. PMID: 31953169

3. Kittisak Thawnashom, Miho Kaneko, Phonepadith Xangsayarath, Nattawat Chaiyawong, Kazuhide Yahata, **Masahito Asada**, John H Adams, Osamu Kaneko. Validation of *Plasmodium vivax* centromere and promoter activities using *Plasmodium yoelii*. **PLoS One**. 2019; 14(12): e0226884. PMID: 31860644
4. Ram Chandra Kandel, Mitesh Shrestha, Amir Sadaula, Medha Kc, Jyoti Maharjan, Ghan Shyam Solanki, Mukesh Kumar Chalise, **Masahito Asada**, Osamu Kaneko, Ram Chandra Poudel, Kishor Pandey. First report of malaria parasites in water buffalo in Nepal. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2019; 100348. PMID: 31796186
5. Catarina Rosa, **Masahito Asada**, Hassan Hakimi, Ana Domingos, Madalena Pimentel, Sandra Antunes. Transient Transfection of *Babesia Ovis* Using Heterologous Promoters. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2019; 10(6): 101279. PMID: 31481343
6. Thu-Thuy Nguyen, Minh-Anh Dang-Trinh, Luna Higuchi, Juan Mosqueda, Hassan Hakimi, **Masahito Asada**, Junya Yamagishi, Rika Umemiya-Shirafuji and Shin-ichiro Kawazu. Initiated *Babesia ovata* Sexual Stages under In Vitro Conditions Were Recognized by Anti-CCp2 Antibodies, Showing Changes in the DNA Content by Imaging Flow Cytometry. **Pathogens**. 2019; 8(3): 104. PMID: 31319568
7. Hassan Hakimi, Ali Sarani, Mika Takeda, Osamu Kaneko, **Masahito Asada***. Epidemiology, Risk Factors, and Co-Infection of Vector-Borne Pathogens in Goats from Sistan and Baluchestan Province, Iran. **PLoS One**. 2019; 14(6): e0218609. PMID: 31220153
8. Hassan Hakimi, Takahiro Ishizaki, Yuto Kegawa, Osamu Kaneko, Shin-ichiro Kawazu, **Masahito Asada***. Genome Editing of *Babesia bovis* Using the CRISPR/Cas9 System. **mSphere**. 2019; 4(3). pii: e00109-19. PMID: 31189559.

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 平成 31 年度 基盤研究 (C) (一般研究) (文部科学省)、脳性バベシア症解明に向けたバベシア・ボビス感染赤血球の血管内皮細胞接着機構解析 (19K06384)、代表、平成 31 年度～令和 3 年度
2. 平成 31 年度 基盤研究 (B) (一般研究) (文部科学省)、バベシアのマダニ体内発育ステージ抗原の網羅的解析：伝搬阻止ワクチン開発の基盤整備 (19H03120)、分担、平成 31 年度～令和 3 年度
3. 平成 31 年度 基盤研究 (B) (一般研究) (文部科学省)、マラリア原虫メロゾイト細胞内小器官からの分子分泌シグナル機構の解明 (19H03461)、分担、平成 31 年度～令和 3 年度
4. 平成 31 年度 挑戦的研究(萌芽) (文部科学省)、サイトカイン発現住血原虫の開発研究 (18K19258)、分担、平成 30 年度～平成 31 年度
5. 平成 31 年度 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究 (帯広畜産大学)、*Babesia bovis* 感染赤血球における宿主血管内皮細胞接着機構の解明、代表、平成 31 年度
6. 平成 31 年度 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター共同研究 (北海道大学) ヤギマラリア原虫 *Plasmodium caprae* のゲノム解読、代表、平成 31 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

該当なし

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

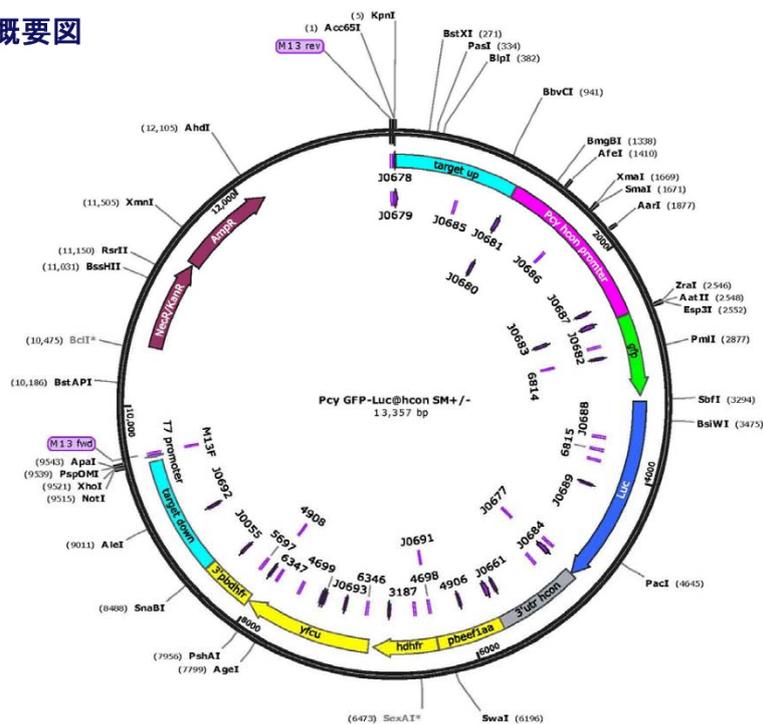
令和2年5月29日

| | | | |
|-------|--|------------------------|--------|
| 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 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) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | かわい さとる 川合 覚 | 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 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 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 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> | | |

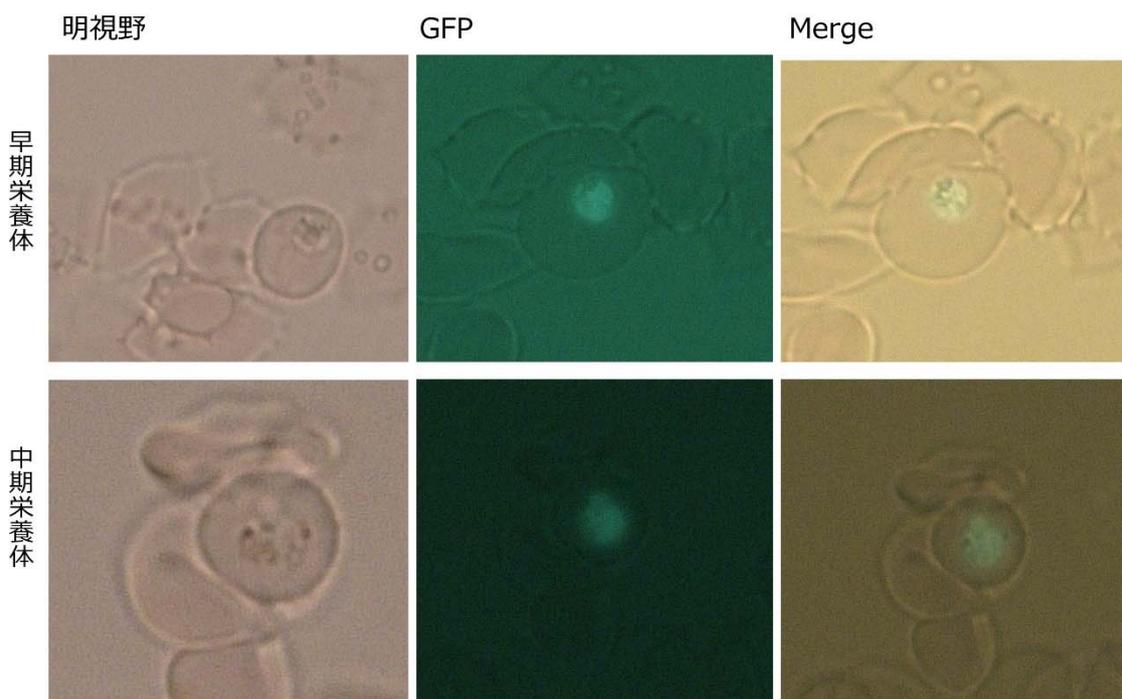
| | |
|----------------|---|
| <p>研究経過の概要</p> | <p>2019年 9/19-10/10: 京都大学霊長類研究所(愛知県犬山市)から基盤研・霊長類医学科学研究センター(茨城県つくば市)へ、実験用アカゲザル 4 頭を移送。導入検疫による経過観察。 11/6: 脾臓摘出、アカゲザル 4 頭(No. 1, 2, 3, 4)。 2020年 1/20: サル 1 頭(No.1)へ、<i>P. cynomolgi</i> (Pcy)を静脈内接種。 1/30: No.1(day 10)より血液塗抹標本による寄生率の算出開始。 2/4-6: No.1 より採血→約 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。 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。 2/10-24: サル No. 2 に対して、ピリメサミンを経鼻投与。 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。 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。 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> |
| <p>研究成果の概要</p> | <p>1) 遺伝子導入ベクターの設計と作製: 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>2) Pcy 分裂体感染赤血球の回収: 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>3) Pcy に対する遺伝子導入と可視化株の確立: 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> |
| <p>研究成果の発表</p> | <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 ・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 α* (EF-1 α , 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.

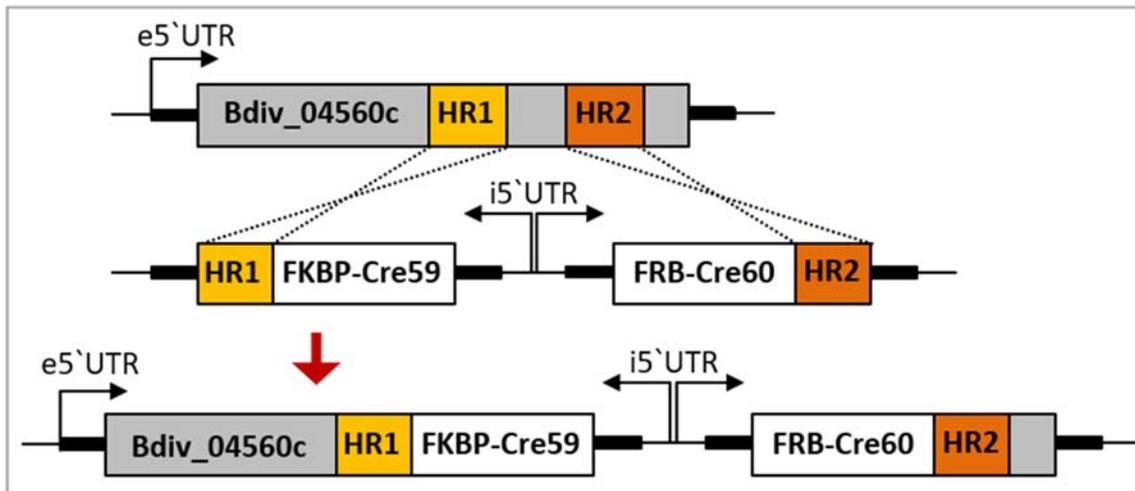


Figure 1. Establishment of the inducible knock-out DiCre system in *B. divergens*.

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 = promoter 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 内共同研究担当教員 | 河津 信一郎 |
| 研究課題名 | <i>Babesia bovis</i> 感染赤血球における宿主血管内皮細胞接着機構の解明 | | |
| 研究代表者 | (ふりがな) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | あさだ まさひと 麻田 正仁 | 長崎大学熱帯医学研究所・助教 | |
| 研究分担者 | かねこ おさむ 金子 修 | 長崎大学熱帯医学研究所・教授 | |
| | やはた かずひで 矢幡 一英 | 長崎大学熱帯医学研究所・助教 | |
| | | | |
| | 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> によるウシのパ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「脳性パベシア症」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> | | |

| | |
|----------------|---|
| <p>研究成果の概要</p> | <p>・<i>ves-1</i> 遺伝子座破壊の試み 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> α, β 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 クローンでは予想通り接着性の低下がみられたが、1 クローンで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 昨年度は主にエピソーム上で <i>ves-1</i> (α ないし β) 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 <i>myc</i> 配列を融合した <i>ves-1</i> α 遺伝子を <i>ef-1</i> α 遺伝子座に挿入する形で、<i>ves-1</i> α 過剰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> α を過発現させた原虫株が得られた。<i>ef-1</i> α 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> α の過発現は抗 <i>myc</i> 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> α 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> |
| <p>研究成果の発表</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 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 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 開発基盤技術の構築 | | |
| 研究代表者 | (ふりがな) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | ぼく よんす 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 徐 剣 | 静岡大学・グリーン科学技術研究所学術研究員 (<i>N. caninum</i> の抗原提示 VLP の作製) | |
| | | | |
| | | | |
| | にしかわ よしふみ 西川 義文 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 | |
| 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> |
| <p>研究成果の概要</p> | <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> |
| <p>研究成果の発表</p> | <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 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) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | むらた としひろ 村田 敏拓 | 東北医科薬科大学・薬学部・講師 (役割分担)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 成田 紘一 | 東北医科薬科大学・薬学部・助教 (役割分担)オキサゾールの化学合成 | |
| | ブヤンヒシグ Buyankhishig B. | 東北医科薬科大学生薬学教室・博士課程(後期)大学院生 (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 (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、1. 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 2. 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 A」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 I. 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 II. 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、I と II 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> | | |

| | |
|----------------|---|
| <p>研究経過の概要</p> | <p>I. 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>II. 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 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 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>III. 上記の I と II 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。 また細胞毒性 (MDBK ウシ腎臓細胞株) を評価した (菅沼)。</p> |
| <p>研究成果の概要</p> | <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> |
| <p>研究成果の発表</p> | <p><原著論文> 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. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104608</p> <p><学会発表> 1) モンゴル国有用植物 Yargui: <i>Pulsatilla flavescens</i> 花の成分薬効研究。 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 内共同研究担当教員 | 福本 晋也 |
| 研究課題名 | マラリア原虫の媒介蚊体内ステージにおけるオーシスト形成機構の解明 | | |
| 研究代表者 | (ふりがな) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | いかだい ひろみ 筏井 宏実 | 北里大学獣医学部・准教授・研究総括 | |
| 研究分担者 | | | |
| | | | |
| | | | |
| | ふくもと しんや 福本 晋也 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授 | |
| 研究期間 | 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 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 発 表</p> | <p>(2019 年学会発表) 中山和彦、北原優、木村勇太、箱崎純、福本晋也、筏井宏実 <i>Plasmodium berghei</i> の PbCap494 タンパク質は ookinete の移動運動に関与する 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 <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 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 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 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 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) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | いより みつひろ 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 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 Mohammad Shanaij | 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科創薬科学専攻・ 大学院生 | |
| | | | |
| | ふくもと しんや 福本 晋也 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授 | |
| 研究期間 | 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> | | |

| | |
|----------------|---|
| <p>研究経過の概要</p> | <p>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</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>マラリアチャレンジ感染実験</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>マラリア伝播阻止実験</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> |
| <p>研究成果の概要</p> | <p>AAV と Ad を用いた熱帯熱マラリア2価ワクチンの作製</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>マラリアチャレンジ感染実験</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>マラリア伝播阻止実験</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>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
発表

【原著論文】

1. Yusuf Y, Yoshii T, Iyori M, Mizukami H, Fukumoto S, Yamamoto DS, Emran TB, Amelia F, Islam A, Syafira I, Yoshida S. A Viral-Vectored Multi-Stage Malaria Vaccine Regimen With Protective and Transmission-Blocking Efficacies. *Front Immunol.*, 10:2412, 2019.

【学会発表】

1. ○伊従光洋、Yenni Yusuf、吉井達也、Mohammad Shahnij、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.
2. ○Mitsuhiro Iyori, Fitri Amelia, Yenni Yusuf, Daisuke S. Yamamoto, Shinya Fukumoto, Kunitaka Yoshida, Kento Genshi, Tatsuya Yoshii, Hiroaki Mizukami, Shigeto Yoshida. 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.
3. ○伊従光洋, 小川良平, 新倉保, Talha Bin Emran, 丹保秀太, 井上信一, 小林富美恵, 吉田栄人. 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.
4. ○大塚広夢, 伊従光洋, 吉田栄人. 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.
5. ○Mohammad Shahnij, Mitsuhiro Iyori, Ashekul Islam, Intan Syafira, Iroha Yamagoshi, Mayu Kajino, Shigeto Yoshida. 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.
6. ○Yenni Yusuf, Tatsuya Yoshii, Mitsuhiro Iyori, Hiroaki Mizukami, Shigeto Yoshida. 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.
7. ○Mitsuhiro Iyori, Fitri Amelia, Kento Genshi, Yutaro Onoue, Talha Bin Emran, Shigeto Yoshida. Full-length *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein administrated with Imject Alum elicits complete protection in mice against the transgenic *P. berghei* sporozoites. PROTEIN ISLAND MATSUYAMA 2019 松山, 2019.9.10-11.

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 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) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | たなか てつや 田仲 哲也 | 鹿児島大学 共同獣医学部・教授 | |
| 研究分担者 | へるなんですえまにゆえるぼっしや Hernandez 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 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 転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>【背景】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 転スフェラーゼ(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>【材料と方法】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> |
| <p>研究成果の概要</p> | <p>【結果と考察】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>【結論】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> |
| <p>研究成果の発表</p> | <p>【学会発表】 島崎 慧, Emmanuel Pacia Hernandez, 新原博子, 藤崎幸蔵, 田中哲也, 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>【論文発表】 Emmanuel Pacia Hernandez, Kei Shimazaki, Hiroko Niihara, Rika Umemiya-Shirafuji, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, 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 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) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | とけし まなぶ 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 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 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。薬物の送達効率は、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> | | |

| | |
|----------------|---|
| <p>研究経過の概要</p> | <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>①10 nm の DDS キャリア粒子の作製</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>②抗トキソプラズマ薬内包粒子の作製</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>③作製した粒子の活性評価</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> |
| <p>研究成果の発表</p> | <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*.

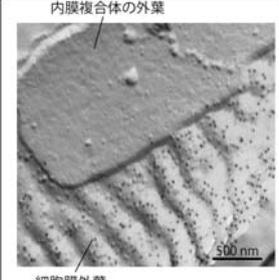
Plans to present the results at the 10th Tick and Tick-Borne Pathogen Conference were postponed until August 2021.

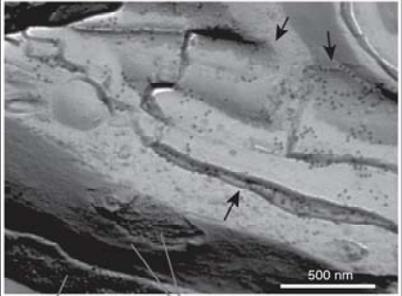
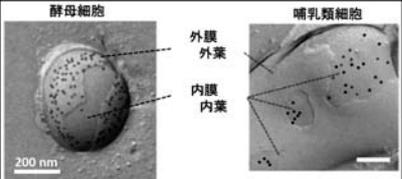
References

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 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 ナノスケールレベルでの分布解析 | | |
| 研究代表者 | (ふりがな) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | ふじた あきかず 藤田 秋一 | 鹿児島大学共同獣医学部・教授 | |
| 研究分担者 | まさたに たつり 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・凍結割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・凍結割断レプリカ標識(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>図1. トキソプラズマ虫体細胞膜外葉に局在するSAG1 (電顕写真)</p> |

| | | |
|----------------|---|---|
| <p>研究成果の概要</p> | <p>(藤田秋一ら, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>, 2009; <i>Nat. Protocol</i>, 2010; 程, 藤田秋一, 大隈良典ら, <i>Nat. Commun.</i> 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> |  <p>細胞膜 Inner membrane complex 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>  <p>酵母細胞 外膜 外葉 内膜 内葉 哺乳類細胞 図3. オートファゴソームでのPI(3)Pの分布(電顕写真) 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> |
| <p>研究成果の発表</p> | <ol style="list-style-type: none"> 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>. <i>Histochem Cell Biol.</i> 2019, 152: 365-375. doi: 10.1007/s00418-019-01814-3. 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. | |

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 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) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | なかお よういち 中尾 洋一 | 早稲田大学理工学術院・教授 | |
| 研究分担者 | いとう しゅん 伊藤 駿 | 早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士2年 | |
| | たくぐち ありさ 滝口 ありさ | 早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士1 | |
| | すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・助教 | |
| | | | |
| 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ヅルモヅルから、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。 |
| 研究成果の概要 | <p>2019年度の研究成果概要</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 鹿児島県大島新曾根産未同定海綿 (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> IC₅₀ 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) 2. 鹿児島県大島新曾根産未同定海綿 (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 (IC₅₀ 0.079 μg/mL) を示した。他の原虫種に対する IC₅₀ 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) 3. 鹿児島県大島新曾根産海綿 <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 (IC₅₀ 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) 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) |
| 研究成果の発表 | <ol style="list-style-type: none"> 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. 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. |

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 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) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | にへい こういち 二瓶 浩一 | (公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・ 研究総括と実験の実施 | |
| 研究分担者 | いじま まさとみ 飯島 正富 | (公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・ 抗原虫剤の生産方法の開発 | |
| | どい ひろやす 土井 宏育 | (公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・ 抗原虫剤の生産方法の開発 | |
| | | | |
| | にしかわ よしふみ 西川 義文 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授・(役割分担)抗原虫活 性を持つ化合物の判定および検出系の開発 | |
| 研究期間 | 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alaria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クトピペラジン(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> | | |

| | |
|----------------|---|
| <p>研究経過の概要</p> | <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> |
| <p>研究成果の概要</p> | <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 sp.</i>)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 sp.</i> 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ェーマターを用いた 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> |
| <p>研究成果の 発 表</p> | <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> <i>J Infect Dis.</i> 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

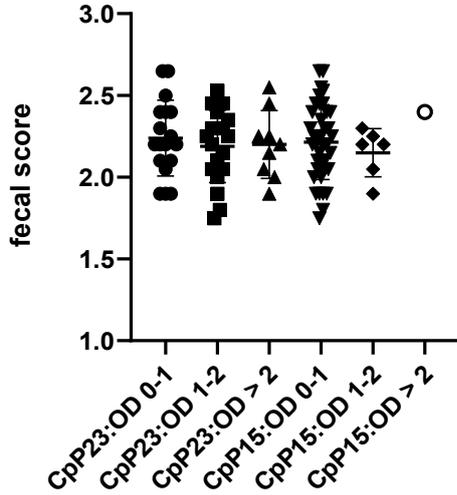
| | | | |
|---------|--|------------------------|-------|
| 採択番号 | 2019-共同-14 | | |
| 研究部門 | 感染免疫研究部門 | 原虫病研究センター 内共同研究担当教員 | 西川 義文 |
| 研究課題名 | クリプトスポリジウム症に対する初乳中の抗体による予防効果の検討 | | |
| 研究代表者 | (ふりがな) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | せき まどか 関 まどか | 岩手大学・農学部共同獣医学科・助教 | |
| 研究分担者 | | | |
| | | | |
| | にしかわ よしふみ 西川 義文 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・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】 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> | | |

【結果および考察】

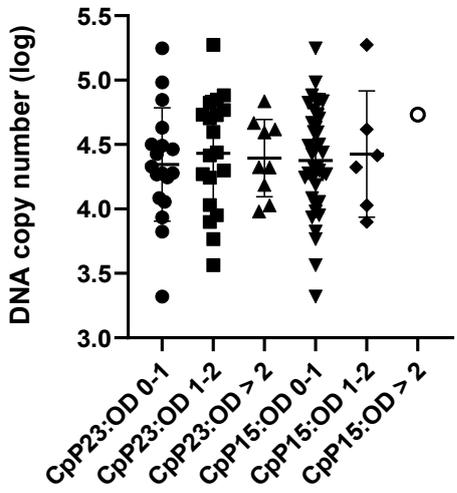
検体を採取したすべての子牛で *C. parvum* の感染が確認された。

(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。

(1)糞便スコアと(3)出生後血清 ELISA の関係



(2) *C. parvum* DNA コピー数と(3) 出生後血清 ELISA の関係



研究成果の
概要

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 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ー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) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | こばやし よしやす 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 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 ・大学院生 | |
| | | | |
| | | | |
| | すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・助教 | |
| 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 1×10^7 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 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、媾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媾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、1×10^7 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、媾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。scid 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 scid 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>媾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。この変性病変が媾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媾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、媾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 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媾疫(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。 (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 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> 様原虫の疫学的調査 | | |
| 研究代表者 | (ふりがな) 氏 名 | 所属部局等・職名 | |
| | いぐち あいこ 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</p> <p>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> | | |

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.

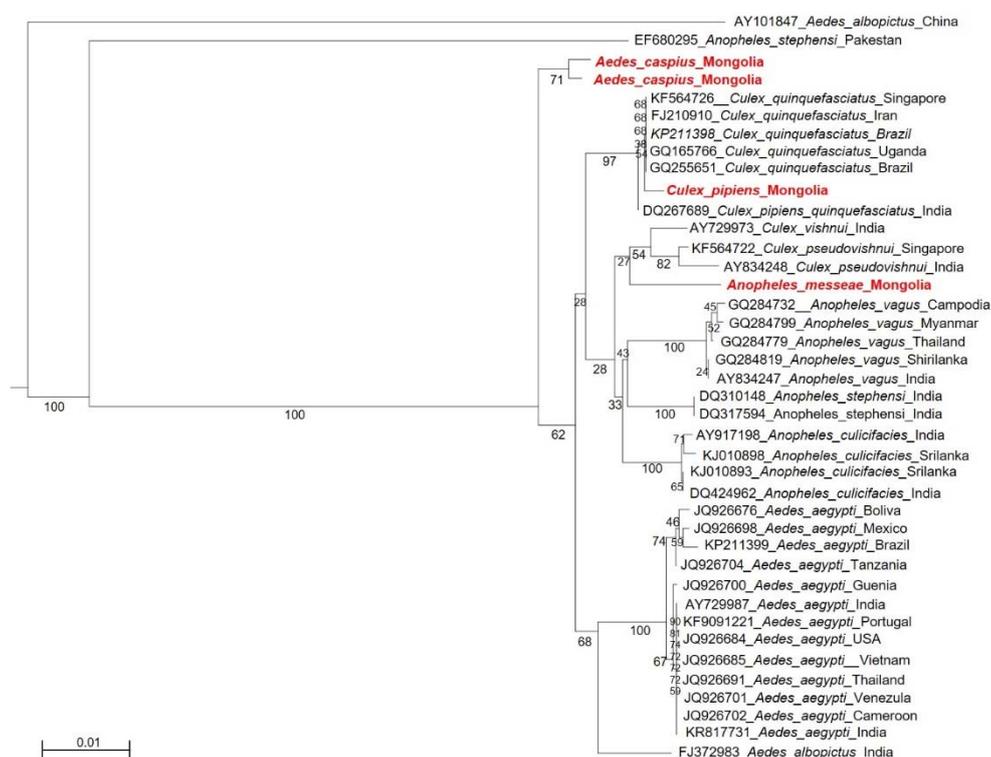
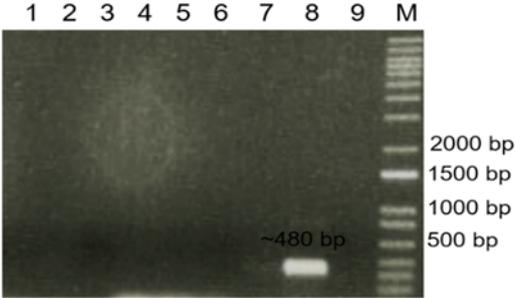


Figure 2. PCR result. M, Marker; Lanes 1-6, gDNA of fly; Lanes 7-9, gDNA of mosquitoes.



NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 9th, 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 cooperate 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.

令和2年7月1日発行

帯広畜産大学 原虫病研究センター

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線13番地

TEL (0155) 49-5642 (事務室)

FAX (0155) 49-5643



 帯広畜産大学 原虫病研究センター

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

