

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 2020 | 令和2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	9
①共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む）	9
②共同研究課題採択一覧	9
③共同利用・共同研究の参加状況	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	14
③国際的な研究プロジェクトへの参加状況	15
④研究者の海外派遣状況・外国人研究者の招へい状況（延べ人数）	19
⑤その他・国際研究協力活動の状況	19
6. 教育活動・人材養成	20
①大学院生等の受入状況	20

②留学生の受入状況	20
③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数	20
④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧	21
7. 情報発信・広報活動等	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	45
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
マダニのコア共生細菌の介卵伝播機構の解明	81
フタトゲチマダニの胚発生におけるフェリチンの局在と鉄の動態	84
トキソプラズマ感染による宿主・ミトコンドリアの形態変化および その生理機能への影響	86
Establishment transgenic manipulation of <i>Trypanosoma</i> <i>equiperdum</i> using of CRISPR/Cas9 and RNAi	88
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	89
Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration	91
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	92
Pathogenicity of the buffalo malaria parasites	94
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	100
酵母ワンハイブリッド法によるトキソプラズマステージ 変換関連転写因子の同定と機能解析	103
雄ハマダラカ-マラリア原虫易感染モデルによるベクターコンピテンシー 制御機構の解明	105

非固有宿主馴化バベシア原虫を用いた宿主域決定因子の同定	107
モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾールをシード化合物 とした安全性の高い新規トリパノソーマ症治療薬の開発	109
新規抗アピコンプレクサ類原虫薬 DKP 誘導体の実用化	111
ネズミマラリア原虫における Brca2 による雌ガメートサイトへの分化	114
Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmosis	116
Investigation on the emergence of resistance among commonly used trypanocidal drugs in the Philippines	117
メタゲノム解析によるエゾシカ体内における寄生性原虫叢の解明	118
Isolation and <i>In vitro</i> cultivation of <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>Babesia</i> sp. Mymensingh, and <i>Babesia</i> sp. Hue-1 from cattle in Vietnam	120
International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories	122

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 原虫進化生物学分野、遺伝生化学分野、国際獣疫疫学分野の新設

2006 年 3 月 研究棟増設（1,520 m²）

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

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

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

2012 年 11 月 寄付講座「生命平衡科学講座（白寿）」を開設

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

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

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

2018 年 1 月 OIE/ISO 業務担当分野として、国際獣疫分野新設

②設置目的等

大 学 名	帯広畜産大学
研 究 所 等 名	原虫病研究センター
所 在 地	北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地
設 置 目 的	我が国の獣医・農畜産系大学で唯一の家畜原虫病に関する研究拠点として、大学、OIE などの国際機関ならびに関連省庁との研究連携により、人獣共通感染症としての原虫の制圧と、動物生産性向上によるタンパク質資源の確保に努め、我が国は勿論、世界人類の健康福祉に学術的貢献をなし得る原虫病に関する総合的研究を推進する事。
研 究 内 容	原虫感染症は、地球規模でヒトおよび動物に大きな被害を与えているが、細菌やウイルスに比べて、有効な治療薬やワクチンが少なく、その制圧は困難を極めている。本研究センターは、原虫ゲノムの解析や原虫感染に対する免疫反応、および原虫を媒介するダニや蚊等のベクターの生物学的解析を行うことにより、新たな診断、治療、予防法の開発を推進する。
責 任 者	センター長 河 津 信 一 郎
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 2 年度 (R02.12.31 現在)					
	現 員 数	任期制導入状況				
		女 性 数	外 国 人 数	任 期 付 教 員 数	女 性 数	外 国 人 数
教 授	6	0	1	0	0	0
准教授	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

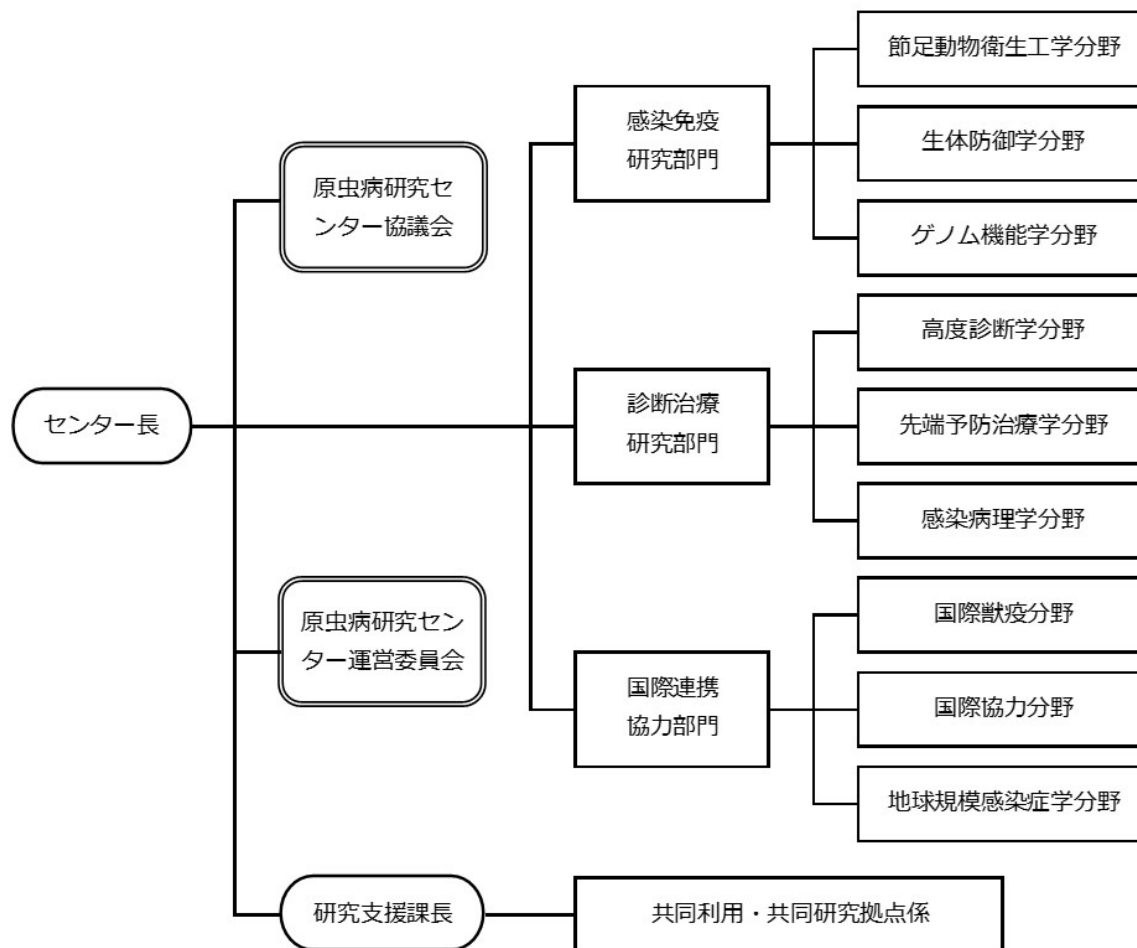
区 分		令和 2 年度 (人)	
技術系職員数		16	
	うち常勤	11	
	うち非常勤	5	

③事務系職員数

区 分		令和 2 年度 (人)	
事務系職員数		3	
	うち常勤	1	
	うち非常勤	2	

④組織図

【令和 2 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	
河津 信一郎	原虫病研究センター	教授	センター専任の教授
鈴木 宏志	原虫病研究センター	教授	
玄 学南	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	令和 2 年度（単位：百万円）	
	決算額	うち運営費交付金
人 件 費	145	131
物 件 費	142	30
計	287	161

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)
令和 2 年度 (単位：百万円)	10	253	153	25	15

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)	19H03120	継 続	教授・河津 信一郎	4,100
基盤研究 (B)	19H03121	継 続	准教授・福本 晋也	3,900
基盤研究 (B)	18H02335	継 続	教授・西川 義文	3,900
基盤研究 (B)	18H02336	継 続	教授・玄 学南	2,800
基盤研究 (B)	18H02337	継 続	名誉教授・ 五十嵐 郁男	4,300
挑戦的研究 (萌芽)	20K21359	新 規	教授・西川 義文	1,500
挑戦的研究 (萌芽)	19K22354	継 続	教授・玄 学南	1,500

挑戦的研究（萌芽）	19K22355	継 続	准教授・福本 晋也	2,500
国際共同研究強化 (B)	20KK0152	新 規	教授・西川 義文	1,100
国際共同研究強化 (B)	19KK0173	継 続	教授・河津 信一郎	4,300
国際共同研究強化 (B)	19KK0174	継 続	教授・横山 直明	4,700
国際共同研究強化 (B)	19KK0175	継 続	准教授・福本 晋也	4,600
国際共同研究強化 (B)	18KK0188	継 続	教授・玄 学南	3,000
基盤研究（C）	19K06384	継 続	准教授・麻田 正仁	1,200
基盤研究（C）	19K06416	継 続	助教・白藤 梨可	1,100
若手研究	20K15656	新 規	特任研究員・ 白水 貴大	1,600
若手研究	19K15972	継 続	助教・菅沼 啓輔	800
若手研究	19K15983	継 続	特任研究員・ 晴希生 ハッサン	1,700
特別研究員奨励費	20J20134	新 規	特別研究員・ ガロン エロイザ メ イ	1,100
特別研究員奨励費	20J40296	新 規	特別研究員・ 谷口 委代	1,300
特別研究員奨励費	20F20402	新 規	特別研究員・ ARIEFTA NANANG	800
特別研究員奨励費	19J00148	継 続	特任研究員・ 梅田 剛佑	1,300
特別研究員奨励費	19F19107	継 続	特任研究員・ FEREIG RAGAB	1,100
特別研究員奨励費	19F19403	継 続	特任研究員・ MOSSAAD EHAB	1,100
特別研究員奨励費	18F18399	継 続	特任研究員・ TUVSHINTULGA BUMDUUREN	500
特別研究員奨励費	18F18403	継 続	特任研究員・ LIU MINGMING	500
研究活動スタート 支援	19K23704	継 続	特任研究員・ ティルラセンバラム シヴァクマール	1,100

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	新興・再興感染症 に対する革新的 医薬品等開発推 進研究事業	新 規	教授・西川 義文	1,500
農林水産省	日中二国間共同 研究事業	新 規	教授・玄 学南	2,700
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	11,742
A (株)	共同研究 1	継 続	教授・河津 信一郎	1,300
A (株)	共同研究 2	継 続	教授・河津 信一郎	1,600
B (株)	共同研究	新 規	教授・玄 学南	500
C (株)	共同研究	新 規	准教授・福本 晋也	3,770
一般財団法人旗影 会	旗影会研究助成	新 規	教授・西川 義文	1,000
一般財団法人畜産 ニューテック協会	研究助成事業研 究調査助成金	新 規	教授・西川 義文	1,000
一般社団法人日本 競走馬協会	競走馬生産育成 研究助成事業	新 規	教授・横山 直明	2,700
公益財団法人大下 財団	大下財団研究助 成	新 規	特任研究員・ 白水 貴大	1,000
公益財団法人内藤 記念科学振興財団	内藤記念女性研 究者研究助成	新 規	共同研究員・ 谷口 委代	2,000
(株)白寿生化学研 究所	寄附講座	継 続	教授・鈴木 宏志	10,000
D (株)	寄附金	新 規	教授・鈴木 宏志	1,980

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）	20
うち国際的な共同利用・共同研究数	7
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	7
うち国内での共同利用・共同研究数	13
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	13

② 共同研究課題採択一覧

研究代表者	研 究 課 題 名（20 件）	センター内 共同研究者
中尾 亮	マダニのコア共生細菌の介卵伝播機構の解明	白藤 梨可
田仲 哲也	フタトゲチマダニの胚発生におけるフェリチンの局在と鉄の動態	白藤 梨可
小柴 琢己	トキソプラズマ感染による宿主・ミトコンドリアの形態変化およびその生理機能への影響	西川 義文
Mark Carrington	Establishment transgenic manipulation of <i>Trypanosoma equiperdum</i> using of CRISPR/Cas9 and RNAi	菅沼 啓輔
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
Jack Sunter	Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration	菅沼 啓輔
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
Morakot KAEWTH-AMASORN	Pathogenicity of the buffalo malaria parasites	麻田 正仁
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
正谷 達磨	酵母ワンハイブリッド法によるトキソプラズマステージ変換関連転写因子の同定と機能解析	玄 学南
筏井 宏実	雄ハマダラカ-マラリア原虫易感染モデルによるベクターコンピテンシー制御機構の解明	福本 晋也

山岸 潤也	非固有宿主馴化バベシア原虫を用いた宿主域決定因子の同定	麻田 正仁
成田 紘一	モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾールをシード化合物とした安全性の高い新規トリパノソーマ症治療薬の開発	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
吉川 泰永	ネズミマラリア原虫における Brca2 による雄ガメートサイトへの分化	福本 晋也
Sanjay Kumar	Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmosis	横山 直明
Marvin Ardeza VILLANUEVA	Investigation on the emergence of resistance among commonly used trypanocidal drugs in the Philippines	菅沼 啓輔
彦坂 健児	メタゲノム解析によるエゾシカ体内における寄生性原虫叢の解明	福本 晋也
Phung Thang Long	Isolation and <i>In vitro</i> cultivation of <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>Babesia</i> sp. Mymensingh, and <i>Babesia</i> sp. Hue-1 from cattle in Vietnam	横山 直明
Zhe Hu	International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories	菅沼 啓輔

③共同利用・共同研究の参加状況

区 分	令和2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	44 (22)	26 (10)	27 (12)	13 (7)	950 (360)	659 (121)	688 (159)	358 (134)
国立大学	3	17 (0)	0 (0)	8 (0)	3 (0)	22 (0)	0 (0)	12 (0)	6 (0)
公立大学	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
私立大学	1	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (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	8	12 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
民間機関	10	17 (3)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	17 (3)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
外国機関	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
その他	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	30	91 (27)	26 (10)	36 (13)	16 (7)	1002 (365)	659 (121)	701 (160)	364 (134)

※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 2 年度	
論 文 数		85	
うち国際学術誌に掲載された論文数		85	

⑤出版物の発行部数

出 版 物 の 名 称	発 行 部 数
The Journal of Protozoology Research	221

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
晴希生 ハッサン	第 11 回 日本獣医寄生虫学奨励賞	R2 年 9 月	The expression of a novel multigene family is correlated with channel activity in <i>Babesia bovis</i> -infected erythrocytes

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
0	0	0	0	3	77	0	0	3	77

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 2 年度	
主催件数		4	
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	R2.5.30-31	第 89 回日本寄生虫学会大会（集会中止・誌上開催）	233 27
2	R2.10.28	Special seminar on a project for joint usage/research center “Establishment of tick biobank and its application to vector biology research”	54 (38)
3	R3.3.16	Special Lecture on Tick Project (NRCPD) “RNAi-based control of spider mites”	14 (4)
4	R3.3.27	Philippine-NRCPD annual alumni and scientific meeting	22 (17)

(2)参加状況

区 分	令和 2 年度		
参加件数	4		
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	R2.9.10.	SCH Stakeholder's Forum (Webinar)	1
2	R2.9.20-24	Molecular Parasitology Meeting XXXI (Webinar)	1
3	R2.10.28.	5th International Livestock Biotechnology Symposium. (Webinar)	1
4	R3.3.5.	5th Workshop on The Present and Future of One Health (human, animal and environment), (Webinar)	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	0
2010年 9月	2025年 9月	中国	中国農業科学院上海獣医学研究所	MOU	原虫病	0	0
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	0	0
2016年 6月	2021年 6月	ブルキナファソ	ワガドゥーグー大学	MOA	原虫病	0	0
2017年 2月	2022年 2月	エジプト	マンスーラ大学	MOA	原虫病	0	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	0	0
2017年 11月	2022年 11月	中国	中国青海獣医学研究所	MOA	原虫病	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	0	0
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	0
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	0	0
2019年 10月	2022年 10月	フィリピン	カビテ州立大学	MOU	原虫病	0	0
合 計						0	0

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 30 年度～令和 2 年度	トルコ・セルチュック大学	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）・トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立 プロジェクト概要：バベシア原虫はマダニにより媒介される住血寄生虫である。家畜に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死感染を引き起こし、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。 参加国：日本・トルコ 予算見込み額：1,780 万円	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	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 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. Mymensingh）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。 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	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	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 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。 参加国：日本・ウガンダ 予算見込み額：10,000 万円	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	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 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貝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。 参加国：日本・フィリピン 予算見込み額：1,410 万円	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	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 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症疫学調査を行い、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。 参加国：日本・タイ 予算見込み額：1,410万円	福本 晋也
令和2年度～令和6年度	モンゴル・モンゴル生命科学大学	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）・モンゴルにおける小型反芻獣トキソプラズマ症のワクチン開発研究 プロジェクト概要：モンゴルでは様々な家畜感染症が発生しており、家畜疾病に対する予防・対策のニーズは高く、早急な対応が必要となっている。特に家畜における繁殖障害は経済的な損害が大きく、これに関連する病原性原虫としてトキソプラズマの存在が示唆されている。そこで本研究では、モンゴルの重要な家畜資源である小型反芻獣に着目し、トキソプラズマ感染に対する新しいワクチンの開発を目指す。モンゴル由来原虫株を分離し、細胞スクリーニング法による免疫刺激型抗原の同定、プロテオームによる自然感染動物で認識される感染認識抗原の同定を進め、これら抗原を組み合わせたカクテルワクチンの開発を進める。さらに、遺伝子破壊原虫の解析で新規ワクチン抗原の機能を理解し、小型反芻獣への感染実験を通じて新規ワクチンの効果と防御免疫反応の詳細を明らかにする。 参加国：日本・モンゴル 予算見込み額：1,560万円	西川 義文

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2年度～令和4年度	インドネシア・ムラワルマン大学	プロジェクト名：特別研究員奨励費・植物内生真菌を用いたケミカルバイオロジーによる抗トキソプラズマ薬の探索 プロジェクト概要：本研究ではインドネシア産および日本産植物の内生菌を利用し、インドネシアのヒト及び家畜動物で感染が蔓延しているトキソプラズマ原虫を含む原虫感染症を対象にした大規模な抗原虫活性のスクリーニングを実施する。有望な菌株については、産生化合物の同定を行い、作用機序の解明を進める。インドネシア天然資源から創薬シーズが発見されれば自国課題解決型疾病対策の構築に繋がり、同国の科学技術の発展に資することが期待される。 参加国：日本・インドネシア 予算見込み額：230万円	西川 義文 アリエフタナナン

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

⑤その他・国際研究協力活動の状況

事業名等	概要	受入人数	派遣人数
Evaluation of Recombinant Schistosoma japonicum Antigen ELISA for the detection of Schistosoma mekongi human infection	メコン住血吸虫診断法開発にかかる WHO 特別プロジェクト。原虫病の診断技術を応用。フィリピン大学、獨協医科大学、ベトナム国立マラリア・寄生虫病害動物研究所、WHO 西太平洋事務局との共同研究協力活動		
合 計			

6. 教育活動・人材養成

①大学院生等の受入状況

区 分	令和2年度	
		うち外国人
博士後期課程	13	13
うち社会人 DC	0	0
修士・博士前期課程	3	0
うち社会人 MC	1	0
学 部 生	20	0
合 計	36	13

②留学生の受入状況

区 分	令和2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	2
合 計	16

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2年度	
	学内	学外
博士号取得者数	6	1

④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧

1	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	R2 年 9 月 30 日
	氏 名	アブデルバキ ハナ ハッサン マフムド ABDELBAKY Hanan Hassan Mahmoud (エジプト)	担当教員	西川 義文
	学位論文 の題名	Identification of antigenic proteins from <i>Neospora caninum</i> and characterization of the surface antigen, NcSAG		
	日本語訳	ネオスポラ・カニナム由来抗原タンパク質の同定と表面抗原 NcSAG1 の解析		
2	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	R2 年 9 月 30 日
	氏 名	イバニズ ロシェル ハイデーダ克蘭 YBANEZ Rochelle Haidee Daclan (フィリピン)	担当教員	西川 義文
	学位論文 の題名	Seroepidemiological study of <i>Toxoplasma</i> infection in the Philippines and the application of an immunochromatographic test for its diagnosis		
	日本語訳	フィリピンにおけるトキソプラズマ感染の血清疫学調査とイムノクロマトテストの診断への応用		
3	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	R2 年 9 月 30 日
	氏 名	エラタ アフラ タジェルス モハメド ELATA Afraa Tajelsir Mohamed (スーダン)	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Studies on the roles of livestock reservoirs in the epidemic of trypanosomosis and piroplasmosis		
	日本語訳	トリパノソーマ症とピロプラズマ症の流行において家畜の待機宿主が果たしている役割に関する研究		
4	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	R2 年 9 月 30 日
	氏 名	ビン カビル モハメド ハズザズ BIN KABIR Md. Hazzaz (バングラデシュ)	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Studies on molecular epidemiology of cryptosporidiosis in poultry and young ruminants		
	日本語訳	家禽及び幼若反芻動物におけるクリプトスポリジウム症の分子疫学に関する研究		

5	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	R2 年 9 月 30 日
	氏 名	リ ジーシ LI Jixu (李 積旭) (中国)	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Functional characterization of aspartate aminotransferase from <i>Toxoplasma gondii</i>		
	日本語訳	トキソプラズマのアスパラギン酸アミノ基転移酵素の機能解析		
6	専攻分野名	畜産衛生学	学位授与 年月日	R2 年 9 月 30 日
	氏 名	リ ヨンチャン LI Yongchang (李 永暢) (中国)	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in cattle, horses and sheep in Xinjiang Uygur Autonomous Region, China		
	日本語訳	中国新疆ウイグル自治区におけるウシ, ウマ, ヒツジのマダニ媒介病原体の分子検出および性状解析		
7	専攻分野名		学位授与 年月日	R2 年 9 月 30 日
	氏 名	テイ イエイ ZHENG Weiqing (鄭 衛青) (中国)	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Epidemiological survey of ticks and tick-borne <i>Babesia</i> species in Jiangxi, China and identification of differentially expressed genes from <i>Haemaphysalis longicornis</i> in response to <i>Babesia</i> infection		
	日本語訳	中国江西省におけるマダニ相とマダニ媒介性バベシアの検出およびバベシア感染フタトゲチマダニにおける発現変動遺伝子の同定		

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
0	0	4	112	0	0	4	112
○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	
R2.8.1	公開講座	一般	帯広の森サポーターの 会 とかちのマダニ現 地研修会	帯広の森ボランティア活動 者への啓蒙（マダニの生態 についての講義およびマダ ニ採集）		20	
R2.10.28	研究会	国際	Special seminar on a project for joint us- age/research center	Special seminar on a pro- ject for joint usage/re- search center “Establishment of tick bi- obank and its application to vector biology re- search”		54	
R3.3.16	研究会	国際	Special Lecture on Tick Project (NRCPD)	演題：RNAi-based control of spider mites 講師：東京農工大学 准教授 鈴木丈詞先生 鈴木先生は、植物寄生性の ハダニ(吸汁型)を用い、 RNAi の農薬としての応 用、化学物質等の効率的な 取り込ませ方などを研究 し、それらの研究内容につ いての講演。		16	
R3.3.27	研究会	国際	フィリピンとのセンタ ー同窓生ミーティング	Announcement of Philip- pine-NRCPD annual alumni and scientific meeting		22	

② 定期刊行物やホームページによる一般社会に対する情報発信の取組

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

8. 分野等の研究活動

節足動物衛生工学分野

◆-----准教授 福 本 晋 也
(Shinya Fukumoto)

1. 研究テーマの概要

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

2. 主な研究テーマ

- ・ 媒介蚊における病原体感染分子機構
- ・ 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
- ・ エゾシカ保有病原体叢の網羅的解析

3. 2020 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。我々のグループでは現在までに、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。この研究成果応用し、三重遺伝子変異体による *Glyoxalase* 遺伝子機能解析を行いました。本研究により、*Glyoxalase* はマラリア原虫のハマダラカから哺乳動物宿主への感染に重要な役割を持つことを明らかにしました。(論文リスト1)。
- ・ 近年の野生鳥獣被害と捕獲必要性の増加を受け、野生鳥獣肉の食利用への期待が高まっています。しかしながら、その安全性の担保については理想的状態とは言えず、公衆衛生上のリスク要因であると懸念されています。そこで、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を調査モデル地域として研究を実施し

ました。エゾシカサンプルの収集・微生物叢について次世代シーケンサーを用いた解析を実施しデータの集積を行いました。その結果、肝蛭、腸管出血性大腸菌、クリプトスポリジウム、住肉孢子虫、住血原虫など、多用な食中毒に関連する病原体をエゾシカが保有していることが明らかになりました。令和2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、などについて調査を行いました。タイレリアについては特異的検出法を開発、クリプトスポリジウム Deer Genotype がエゾシカの優性種であり現在のところ公衆衛生リスクが低いことが確認されました。（論文リスト 3,5,6）。

- ・ 犬糸状虫は獣医学上、イヌで最も重大な問題となっている寄生虫感です。定期的に駆虫を行う予防法はあるものの、生涯に渡る寄生虫薬投与の必要性や薬が効かない耐性寄生虫出現の問題があります。また、寄生虫薬の投与はペットオーナーの医師に依存するため、効果的な予防法が有るにも関わらず今も蔓延が続く深刻な寄生虫であり、抜本的な対策の提案が望まれています。我々のグループでは犬糸状虫およびフィラリアを媒介しない蚊の作出を目指して基礎研究を行っています。令和2年度についてはその一貫として、媒介ベクター蚊での感染実験および獣医学教育への効果的な生体標本提供を目指し、犬糸状虫ミクロフィラリアの汎用的凍結保存法の開発に成功しました。また、タイ王国でチェンマイ大学との共同研究により、犬糸状虫症の疫学調査を行い、犬糸状虫症のタイにおける気候・地理構造分布の相関を明らかにしました。（論文リスト 2,4）

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・北日本支部長
- ・ 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. 2020 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（* 責任著者）

1. Akira Soga, Takahiro Shirozu, Shinya Fukumoto*. Glyoxalase pathway is required for normal liver-stage proliferation of *Plasmodium berghei*. **Biochemical and biophysical research communications**. 2021; 549: 61-66. PMID: 33667710

2. Manusvee Kaikuntod, Orapun Arjkumpa, Doolyawat Kladkempetch, **Shinya Fukumoto**, Kiangkrai Thongkorn, Chavalit Boonyapakorn, Veerasak Punyapornwithaya, Saruda Tiwananthagorn. Geographic Spatial Distribution Patterns of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* Infection in Community Dogs in Chiang Mai, Thailand. **Animals (Basel)**. 2020; 11(1): 33. PMID: 33375359
3. Hironobu Sato, Hiroki Hiraya, Takutoshi Sugiyama, **Shinya Fukumoto**, Ryota Matsuyama, Yojiro Yanagawa, Ryo Nakao, Takao Irie, Kensuke Taira, Akiko Yamazaki, Katsuro Hagiwara, Ayako Yoshida, Yoichi Kamata, Madoka Ichikawa-Seki. Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) from Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1. **Parasitology international**. 2021; 80: 102222. PMID: 33137508
4. Takahiro Shirozu, Akira Soga, **Shinya Fukumoto***. Identification and validation of a commercial cryopreservation medium for the practical preservation of *Dirofilaria immitis* microfilaria. **Parasites & vectors**. 2020; 13(1): 383. PMID: 32727546
5. Takahiro Shirozu, Athanase Badolo, Akira Soga, Aya Yoshimura, Yu-ki Morishita, Mami Koketsu, Rika-Umemiya Shirafuji, Hisashi Inokuma, Naoaki Yokoyama, **Shinya Fukumoto***. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *Theileria* parasites infecting Yezo sika deer. **Parasitology international**. 2020; 77: 102130. PMID: 32325118
6. Takahiro Shirozu, Akira Soga, Yuki Morishita, Nobuaki Seki, Mami Koketsu, **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

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. 令和2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、令和元年度～令和3年度

2. 令和2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

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. 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、チェンマイ大学
2. マラリアの媒介メカニズムに関する研究（北里大学）
3. 野生動物感染症に関する網羅的解明（千葉大学）
4. マラリアワクチンの開発（金沢大学）

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. 2020 年度研究の総括

- ・ トキソプラズマにはデンスグラニュール（濃縮顆粒）という小器官が存在しますが、虫体が宿主細胞に侵入した後この小器官からは多くのタンパク質が分泌され（デンスグラニュールタンパク質（GRAs））、寄生体胞の形成や宿主への病原性に関与するとされています。本研究では CRISPR/Cas9 系を用いて PLK 株（遺伝子型 II）の TgGRA9 ノックアウト虫体（PLKΔGRA9）を作出しました。PLKΔGRA9 は親株（野生型）より、病原性が著しく低下していることが判明しました。この弱毒化された PLKΔGRA9 を接種したマウスでは、PLK 親株のみならず強毒の RH 株（遺伝子型 I）の再感染に対しても完全防御免疫が成立することが判明しました。（論文リスト 1）
- ・ マダニ類の転写制御因子の一種であるスポレシンはマダニワクチン候補分子としても注目されていますが、日本の優占種ではフタトゲチマダニにおいてはまだ検証されていません。そこで、本研究ではフタトゲチマダニよりスポレシン遺伝子を特定し、組換えスポレシンを作製しました。組換えスポレシンを免疫したウサギにフタトゲチマダニ吸血させところ、吸血・産卵阻止などの効果が認められました。（論文リスト 13）

- ・ 当研究室ではこれまでにマウスのバベシア症モデルにおいて、*Babesia microti* の感染後に自然治癒した場合（弱毒のため 100%自然治癒する）、強毒の *Babesia rodhaini*（未処置の場合 100%致死する）の再感染に対して完全防御免疫が成立することを示してきました。今回の研究では、*Babesia microti* の感染後に自然治癒したマウスでは、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium chabaudi* の再感染にも強い交差防御免疫が成立することを突き止めました。（論文リスト 27）
- ・ 中国、トルコ、ウガンダ、タンザニアなどにおける家畜（牛・水牛・ヤク・羊・山羊）の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、家畜に被害を与える主な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。これらの調査地域においてはマダニの積極的な駆除対策の推進が提案されました。（論文リスト 3、9、11、14、17、18、20、24、28、30、37）

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
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議員
- ・ 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

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2020 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. Jixu Li, Eloiza May Galon, Huanping Guo, Mingming Liu, Yongchang Li, Shengwei Ji, Iqra Zafar, Yang Gao, Weiqing Zheng, Paul Franck Adjou Moumouni, Mohamed Abdo Rizk, Maria Agnes Tumwebaze, Byamukama Benedicto, Aaron Edmond Ringo, Tatsunori Masatani, **Xuenan Xuan***. *PLK:Δgar9* live attenuated strain induces protective immunity against acute and chronic toxoplasmosis. **Frontiers in Microbiology**. 2021; 12: 619335. PMID: 33776955
2. Hang Li, Bingyi Yang, Mingming Liu, Shaowei Zhao, Suzhu Xie, Hao Wang, Shuang Zhang, **Xuenan Xuan**, Lijun Jia. Reproductive injury in male BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. **Parasites & Vectors**. 2021; 14: 151. PMID: 33726783

3. Onur Ceylan, Benedicto Byamukama, Ceylan Ceylan, Eloiza May Galon, Mingming Liu, Tastunori Masatani, **Xuenan Xuan**, Ferda Sevinc. Tick-borne hemoparasites of sheep: A molecular research in Turkey. **Pathogens**. 2021; 10: 162. PMID: 33546428
4. Remigiusz Galecki, Jerzy Jaroszewski, Tadeusz Bakula, **Xuenan Xuan**. Molecular characterization of *Lipoptena cervi* from environmental samples collected in Poland. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. 2021; 14: 41-47. PMID: 33425678
5. Rikako Konishi, Yuna Kurokawa, Kanna Tomioku, **Xuenan Xuan**, Akikazu Fujita. Raft microdomain localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Cell Biology**. 2021; 100(2): 151149. PMID: 33421842
6. Shima Abd El-Salam El-Sayed, Mohamed Abdo Rizk, Aaron Edmond Ringo, Yongchang Li, Mingming Liu, Shengwei Ji, Jixu Li, Benedicto Byamukama, Maria A Tumwebaze, **Xuenan Xuan***, Ikuo Igarashi*. Impact of using pyronaridine tetraphosphate-based combination therapy in the treatment of babesiosis caused by *Babesia bovis*, *B. caballi*, and *B. gibsoni* in vitro and *B. microti* in mice. **Parasitology International**. 2021; 81: 102260. PMID: 33139594
7. Yanan Wang, Houshuang Zhang, Li Luo, Yongzhi Zhou, Jie Cao, **Xuenan Xuan**, Hiroshi Suzuki, Jinlin Zhou. ATG5 is instrumental in the transition from autophagy to apoptosis during the degeneration of tick salivary glands. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2021; 15: e0009074. PMID: 33513141
8. Chinatsu Nakamura, Mingming Liu, Youn-Kyoung Goo, Guohong Zhang, Honlin Jia, Akiko Kumagai, Houshuang Zhang, Jinlin Zhou, Yoshifumi Nishikawa, **Xuenan Xuan***. Construction of a recombinant vaccinia virus expressing *Babesia gibsoni* thrombospondin-related anonymous protein and evaluation of its immunogenicity in mice. **Tropical Biomedicine**. 2020; 37: 1029-1037. PMID: 33612755
9. Yongchang Li, Eloiza May Galon, Qingyong Guo, Mohamed Abdo Rizk, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Jixu Li, Shengwei Ji, Bayin Chahan, **Xuenan Xuan***. Molecular detection and identification of *Babesia* spp., *Theileria* spp., and *Anaplasma* spp. in sheep from border regions, northwestern China. **Frontiers in Veterinary Science**. 2020; 7: 630. PMID: 33195501
10. Remigiusz Galecki, Jerzy Jaroszewski, **Xuenan Xuan**, Tadeusz Bakula. Temporal-microclimatic factors affect the phenology of *Lipoptena fortisetosa* in central European forests. **Animals (Basel)**. 2020; 10:2012. PMID: 33139594
11. Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, Aaron Edmond Ringo, Paul Franck Adjou Moumouni, Jixu Li, Yongchang Li, Shengwei Ji, Patrick Vudriko, **Xuenan Xuan***. First molecular detection of *Babesia*

- ovis*, *Theileria* spp., *Anaplasma* spp., and *Ehrlichia ruminantium* in goats from western Uganda. **Pathogens**. 2020; 9: 895. PMID: 33121172
12. Yang Gao, Huanping Guo, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Jixu Li, Artemis Efstratiou, Eloiza May Galon, Rochelle Haidee Ybanez, Tatsunori Masatani, Takehisa Soma, Xuenan Xuan*. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant TgSRS2 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82: 1662-1665. PMID: 33071252
 13. Seung-Hun Lee, Jixu Li, paul Franck Adjou Moumouni, Kiyoshi Okado, Weiqing Zheng, Mingming Liu, Shengwei Ji, Soochong Kim, Rika Umemiya-Shirafuji*, Xuenan Xuan*. Subolesin vaccination inhibits blood feeding and reproduction of *Haemaphysalis longicornis* in rabbits. **Parasites & Vectors**. 2020; 13: 478. PMID: 32948229
 14. Benedicto Byamukama, Maria Agnes Tumwebaze, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, Martin Kamilo Angwe, Jixu Li, Eloiza May Galon, Mingming Liu, Yongchang Li, Shengwei Ji, Paul Frank Adjou Moumouni, Aaron Ringo, Seung-Hun Lee, Patrick Vudriko, Xuenan Xuan*. First molecular detection and characterization of hemotropic *Mycoplasma* species in cattle and goats from Uganda. **Animals (Basel)**. 2020; 10: 1624. PMID: 32927890
 15. Aiko Iguchi, Takehisa Soma, Xuenan Xuan. Further epidemiological survey for atovaquone resistant related gene of *Babesia gibsoni* in Japan during 2015-2018. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82: 1700-1703. PMID: 32908117
 16. Afraa Elata, Eloiza May Galon, Paul Franck Adjou Moumouni, Rochelle Haidee Ybanez, Ehab Mossaad, Caro Salces, Guindolino Bajenting, Adrian Ybanez, Xuena Xuan, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma. First molecular detection and identification of *Trypanosoma evansi* in goats from Cebu, Philippines using a PCR-based assay. **Veterinary Parasitology: regional Studies and Reports**. 2020; 21: 100414. PMID: 32862917
 17. Jixu Li, Yingna Jian, Lijun Jia, Eloiza May Galon, Benedicto Byamukama, Geping Wang, Qigang Cai, Mingming Liu, Yongchang Li, Shengwei Ji, Maria Agnes Tumwebaze, Liqing Ma, Xuenan Xuan*. Molecular characterization of tick-borne bacteria and protozoans in yaks (*Bos grunniens*), Tibetan sheep (*Ovis aries*) and Bacterian camels (*Camelus bactrianus*) in the Qinghai-Tibetan Plateau Area, China. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2020; 11: 101466. PMID: 32723655
 18. Yongchang Li, Xiuxiu Wen, Min Li, Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Qingyong Guo, Mohamed Abdo Rizk, Mingming Liu, Jixu Li, Shengwei Ji, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Bayin Chahan, Xuenan Xuan*. Molecular detection of tick-borne pathogens harbored by ticks collected from livestock in the Xinjiang Uygur Autonomous region, China. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2020; 11:

101478. PMID: 32723638
19. ThankGod E Onyiche, Moeti O Taioe, Ndudim I Ogo, Thillaiampalam Sivakumar, Abdullahi A Bui, Albert W Mbaya, Xuenan Xuan, Naoaki Yokoyama, Oriel thekiso. Molecular evidence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in equines and ticks in Nigeria: prevalence and risk factors analysis. **Parasitology**. 2020; 147: 1238-1248. PMID: 32605687
 20. Aaron Ringo, Mahamed Abdo Rizk, Paul Franck Adjou Moumouni, Mingming Liu, Eloiza May Galon, Yongchang Li, Shengwei Ji, Maria Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Oriel Thekiso, Xuenan Xuan*. Molecular detection and characterization of tick-borne haemoparasites among cattle on Zanzibar Island, Tanzania. **Acta Tropica**. 2020; 211: 105598. PMID: 32592686
 21. Mohammad Hazzaz Bin Kabir, Onur Ceylan, Ceylan Ceylan, Ayman Ahmed Shehata, Hironori Bando, Mohamed Ibrahim Essa, Xuenan Xuan, Ferda Sevinc, Kentaro Kato. Molecular detection of genotypes and subtypes of *Cryptosporidium* infection in diarrheic calves, lambs, and goat kids from Turkey. **Parasitology International**. 2020; 79: 102163. PMID: 32589940
 22. Weiqing Zheng, Rika Umemiya-Shirafuji*, Qian Zhang, Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Hiroshi Suzuki, Haiying Chen, Mingming Liu, Xuenan Xuan*. Porin expression profiles in *Haemaphysalis longicornis* infected with *Babesia microti*. **Frontiers in Physiology**. 2020; 11: 502. PMID: 32508681
 23. Mohammad Hazzaz Bin Kabir, Megumi Itoh, Ayman Ahmed Shehata, Hironori Bando, Yasuhiro Fukuda, Fumi Murakoshi, Atsushi Fujikura, Hiroaki Okawa, Takuto Endo, Akira Goto, Masayuki Kachi, Toshie Nakayama, Yuto Kano, Shoko Oishi, Konosuke Otomaru, Mohamed Ibrahim Essa, Kei Kazama, Xuenan Xuan, Kentaro Kato. Distribution of *Cryptosporidium* species isolated from diarrhoeic calves in Japan. **Parasitology International**. 2020; 78: 102153. PMID: 32504804
 24. Maria Agnes Tumwebaze, Seung-Hun Lee, Paul Franck Adjou Moumouni, Khaled Mohammed-Geba, Sherin K Sheir, Asmaa Galal-Khallaf, Heba M Abd El Latif, Dalia S Morsi, Nora M Bishr, Eloiza May Galon, Benedicto Byamukama, Mingming Liu, Jixu Li, Yongchang Li, Shengwei Ji, Aaron Edmond Ringo, Mohamed Abdo Rizk, Hiroshi Suzuki, Hany M Ibrahim, Xuenan Xuan*. First detection of *Anaplasma ovis* in sheep and *Anaplasma platys*-like variants from cattle in Menoufia governorate, Egypt. **Parasitology International**. 2020; 78: 102150. PMID: 32485226
 25. Weiqing Zheng, Rika Umemiya-Shirafuji*, Shengen Chen, Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Hiroshi Suzuki, Shu Yang, Mingming Liu, Xuenan Xuan*. Identification of *Haemaphysalis longicornis* genes differentially expressed in response to *Babesia microti* infection. **Pathogens**. 2020; 9: 378. PMID: 32423088
 26. Eloiza May Galon, Rochelle Haidee Ybanez, Paul FrackAdjou Moumouni, Maria Agnes

- Tumwebaze, Ralph Joselle A Fabon, Mary Ruth R Callanta, Kim Joseph E Labutong, Gloria B Salazar, Mingming Liu, Jixu Li, Benedicto Byamukama, Yongchang Li, Shengwei Ji, Seung-Hun Lee, Adrian P Ybanez, Florencia G Claveria, Xuenan Xuan*. Molecular survey of tick-borne pathogens infecting backyard cattle and water buffaloes in Quezon province, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82: 886-890. PMID: 32418944
27. Artemis Efstratiou, Eloiza May Galon, Guanbo Wang, Kousuke Umeda, Daisuke Kondoh, Mohamad Alaa Terkawi, Aiko Kume, Mingming Liu, Aaron Edmond Ringo, Huanping Guo, Yang Gao, Seung-Hun Lee, Jixu Li, Paul Franck Adjou Moumouni, Yoshifumi Nishikawa, Hiroshi Suzuki, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan*. *Babesia microti* confers macrophage-babed cross-protective immunity against murine malaria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2020; 10: 193. PMID: 32411624
 28. Benedicto Byamukama, Onur Ceylan, Paul Frank Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Maria Agnes Tumwebaze, Jixu Li, Eloiza May Galon, Mingming Liu, Yongchang Li, Shengwei Ji, Aaron Ringo, Mohamed Rizk, Ferda Sevinc, Xuenan Xuan*. Molecular detection and assessment of risk factors for tick-borne diseases in sheep and goats from Turkey. **Acta Parasitologica**. 2020; 65: 723-732. PMID: 32378157
 29. Mohammad Hazzaz Bin Kabir, Yongmei Han, Seung-Hun Lee, Arifin Budiman Nugraha, Frances Recuenco, Fumi Murakoshi, Xuenan Xuan, Kentaro Kato. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* species in poultry in Bangladesh. **One Health**. 2020; 9: 100122. PMID: 32368610
 30. 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
 31. 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
 32. 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
 33. Mohamed Abdo Rizk, Shengwei Ji, Mingming Liu, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Yongchang Li, Benedicto Byamukama, Aaron Edmond 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
34. 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
 35. 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
 36. Ehab Mossaad, Ahmed Ali Ismail, Abdalla Mohame Ibrahim, Peter Musinguzi, Tamar Angara, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma. Prevalence of different trypanosomes in livestock in Blue Nile and West Kordofan States, Sudan. **Acta Tropica**. 2020; 203: 105302. PMID: 31857080
 37. Jixu Li, Yongchang Li, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Eloiza May Galon, Maria Agnes Tumwebaze, Hongxia Yang, Huercha, Mingming Liu, Huanping 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

総説

1. Onur Ceylan, Xuenan Xuan, Ferda Sevinc. Primary tick-borne protozoan and rickettsial infections of animals in Turkey. **Pathogens**. 2021; 10(2): 231. PMID: 33669573
2. 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

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. 令和 2 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）、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、代表、令和 2 年度～令和 4 年度
2. 令和 2 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、平成 30 年度～令和 3 年度
3. 令和 2 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、平成 30 年度～令和 3 年度
4. 令和 2 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、令和元年度～令和 3 年度
5. 令和 2 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、平成 30 年度～令和 2 年度
6. 令和 2 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病の流行実態の解明と制御対策の構築、代表、令和元年度～令和 3 年度
7. 令和 2 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、東南アジアにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と制御戦略の確立、指導教員、令和 2 年度～令和 4 年度
8. 令和 2 年度 日中二国間共同研究事業（農林水産省）、マダニ媒介原虫病制圧に向けた日中共同アプローチ、代表、令和 2 年度～令和 6 年度
9. 令和 2 年度 家畜下痢症の感染制御のための事業（全国競馬・畜産振興会）、代表、令和元年度～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. 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、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究

2. 正谷 達膳：鹿児島大学獣医学部、酵母ハイブリッド法によるトキソプラズマステージ変換関連転写因子の同定と機能解析、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
3. Ferda SEVINC：トルコ・セルチューク大学獣医学部、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. Patrick VUDRIKO：ウガンダ・マケレレ大学獣医学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 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. Gabriel ABOGE：ケニア・ナイロビ大学獣医学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 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. Elikira KIMBITA：タンザニア・ソコイネ農業大学獣医学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 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. Athanase BADOLO：ブルキナファソ・ワガドゥーグー大学理学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
8. Oriel THEKISOE：南アフリカ・ノースウェスト大学環境科学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 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）
9. Hany IBRAHIM：エジプト・メノフィア大学理学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 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、世界で年間約2億人が罹患、年間40万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
- ・ 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、遺伝子編集原虫、免疫賦活抗原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
- ・ トキソプラズマ、ネオスポラ、クリプトスポリジウムの診断方法の開発と疫学調査

3. 2020 年度研究の総括

・ トキソプラズマによる流産の病態発症メカニズムの解明

トキソプラズマ症は偏性細胞内寄生性原虫であるトキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) によって引き起こされる人獣共通感染症であり、世界中で発生しています。先天性トキソプラズマ症の症状は胚死・吸収から不顕性感染まで多岐に渡りますが、発症機序は不明です。C-X-Cモチーフのケモカイン受容体3 (CXCR3) は主に Th1 関連免疫細胞に高発現し、免疫細胞の遊走と活性化や妊娠維持にも関与しています。しかし、トキソプラズマの妊娠期感染における CXCR3 の役割や分子機構についてはまだ十分に理解されていません。本研究では CXCR3 欠損マウス (CXCR3^{-/-}) を用いて、妊娠初期のトキソプラズマ感染に対する CXCR3 の役割を調べました。妊娠3.5日目 (Gd3.5) に CXCR3^{-/-}マウスと野生型マウスへトキソプラズマを腹腔内接種しました。両感染群ともに妊娠日の進行とともに壊死を呈する胚が増加し妊娠率が低下しましたが、CXCR3^{-/-}感染マウスではより顕著な胚の喪失が認められました。また Gd10.5 において、胎盤組織の原虫感染量は CXCR3^{-/-}マウスで有意に増加しました。更に Gd13.5 の胎盤組織では、野生型感染マウスと比較し CXCR3^{-/-}感染マウスにおいて誘導性一酸化窒素合成

酵素 (iNOS)と CD8 の mRNA 発現量が有意に減少しました。これらの結果は、妊娠初期の CXCR3 依存的な宿主免疫応答がトキソプラズマ感染に対する妊娠維持に重要な役割を果たしていることを示唆しています。本研究結果は、科学雑誌 Infection and Immunity の Spotlight Selection に選出されました。本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED)の研究助成 (19fk0108047h0003, 20fk0108137h0001)で実施しました。(論文リスト 6)

- ・ **トキソプラズマ由来因子による宿主免疫攪乱メカニズムの解明**

トキソプラズマは、宿主細胞に侵入するとロプトリー(ROP)またはデンスグラニル(GRA)と呼ばれる細胞小器官から様々なタンパク質を分泌し、その一部は宿主の免疫応答を攪乱することが知られています。寄生虫分子による宿主免疫の制御メカニズムを明らかにすることで、新たな治療法の開発につながることが期待されています。本研究では、Th1 型免疫応答を誘導する NFκB 経路に焦点を当て、レポータープラスミドを用いて NFκB を活性化する分子のスクリーニングを行い、II 型原虫の GRA7、GRA14、GRA15 の過剰発現が強い活性を示すことを見出しました。そこで本研究では、これら 3 つの分子の比較分析を行い、トキソプラズマ症の病態における NFκB の関与を理解することを目的としました。トキソプラズマの GRA7、GRA14、GRA15 は NFκB を活性化することで宿主免疫応答を活性化し、寄生虫の増殖を抑制的に制御することが明らかとなりました。また、II 型原虫での GRA14 の寄与は限定的なものでしたが、活性型 GRA15 を持たない I 型 RH 株を用いて、マウスに原虫を足蹠内接種したところ、親株では 80%以上のマウスが生存したのに対して GRA14 欠損株で全てのマウスが 4 週間以内に死亡しました。トキソプラズマの病原性は遺伝子型によって大きく異なりますが、その違いは免疫攪乱分子の遺伝子多型性によって規定されます。このことから、GRA15 の活性の低い株では、GRA14 による免疫活性化が宿主の生存に必要であることが示唆されました。トキソプラズマは、感染慢性期に宿主の脳や筋肉内にシストを形成し潜伏感染へと移行します。感染初期に宿主免疫を活性化させ宿主の死を阻止することは、新たな宿主へ伝播する機会の拡大に役立つことから、GRA7、GRA14、GRA15 による NFκB 経路活性化はトキソプラズマの寄生戦略に重要な役割を持つことが示されました。本研究は大阪大学微生物病研究所、エジプト・South Valley 大学との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構 (AMED)の研究助成 (19fk0108047h0003, 20fk0108137h0001)で実施しました。(論文リスト 6)

- ・ **免疫賦活抗原を用いた病原性原虫に対するワクチン開発**

ワクチンは様々な感染症を制御するための重要な手法になります。ネオスポラの感染はウシやヒツジに流産を引き起こすため、畜産業会に経済的な損失をもたらします。我々は、ネオスポラのデンスグラニルタンパク質 6 (NcGRA6) は免疫賦活能を有していること、非妊娠マウスへの免疫で感染防御効果を誘導できることを確認しています。今回は、妊娠マウスを用いて NcGRA6 ワクチンが原虫の垂直感染を抑制できるか検証しました。PBS あるいは対照抗原を接種したマウスと比較して、NcGRA6 を免疫した母マウスは臨床症状が抑えられ、生まれた子マウスは生存率が高く、脳内原虫数も低く抑えられていました。以上の結果により、NcGRA6 の単独投与で妊娠期のネオスポラ感染を制御できる可能性が示唆されました。本研究は 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)(文部科学省:18H02335)、挑戦的研究(萌芽)(文部科学省:20K21359)の研究助成で実施しました。(論文リスト1)

- ・ **天然物からの抗原虫薬の探索**

メタサイトフィリンは昆虫病原糸状菌メタリジウムから分離され、我々の研究によりトキソプラズマ感染に対する治療効果が確認されています。今回、メタサイトフィリンのマラリア原虫に対する阻害作用を検証しました。メタサイトフィリンは熱帯熱マラリア原虫 3D7 株とクロロキン耐性 K-1 株に対して増殖抑制効果を示し(それぞれの IC₅₀ 値: 666 nM、605 nM)、特にリング期の原虫に効果的でした。以上より、メタサイトフィリンはマラリア治療薬のリード化合物になる可能性が示されました。本研究は微生物科学研究所、タイ・マヒドン大学との共同研究の成果であり、公益財団法人・寿原記念財団、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4)

- ・ **天然物からの抗原虫薬の探索**

近年、ハーブ抽出物は創薬にとって重要な天然資源となっています。今回エジプトの植物に着目し、それら抽出物のトキソプラズマに対する阻害効果を検証しました。コロシント(*Citrullus colocynthis*)とゲッケイジュ(*Laurus nobilis*)のメタノール抽出物、レモングラス(lemon grass)とマジョラム(marjoram)の天然油は in vitro における抗トキソプラズマ効果を示しましたが選択毒性は 10 未満でした(それぞれの IC₅₀ 値: 22.86 µg/ml、31.35 µg/ml、4.6 µg/ml、26.24 µg/ml)。一方で、カモミール(*Matricaria chamomilla*)のメタノール抽出物とシトロネラ油(citronella oil)は選択的にトキソプラズマ増殖を阻害しました(それぞれの IC₅₀ 値: 3.56 µg/ml、2.54 µg/ml、それぞれの選択毒性: 130.33、15.02)。以上により、カモミールやシトロネラは抗トキソプラズマ薬の創薬に有用な天然資源になることが示唆されました。本研究はエジプト・マンスーラ大学との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構(AMED)の研究助成(JP19fk0108047)で実施しました。(論文リスト5)

- ・ **ネオスポラの診断方法の開発**

ネオスポラの感染は病態が慢性化するため、感染急性期に診断する手法の開発が重要となります。今回、尿サンプルからネオスポラ感染を判定できるかを検証しました。ネオスポラ抗原 NcGRA7 と NcSAG1 を用いた ELISA では、急性感染期と慢性感染期のマウスの尿サンプルから特異的な IgG1 や IgG2 を検出することができました。今回の結果により、血液サンプルに加え、尿サンプルもネオスポラ抗体検査に有用であることが示されました。本研究は 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)(文部科学省:18H02335)、JST バリユープログラム(VP29117937665)、伊藤記念財団の研究助成で実施しました。(論文リスト8)

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議委員
- ・ 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
- ・ 日本獣医寄生虫学会常任理事・ 学術担当理事・ 学術委員会委員長

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

- ・ 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
- ・ 北海道地区大学等安全保障貿易管理ネットワーク幹事

6. 2020 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（＊責任著者）

1. Ragab M Fereig, Hanan H Abdelbaky, Yoshifumi Nishikawa*. Vaccination with *Neospora* GRA6 interrupts the vertical transmission and partially protects dams and offsprings against *Neospora caninum* infection in mice. **Vaccines (Basel)**. 2021; 9(2): 155. PMID: 33671937.
2. Shotaro Nakagun, Masao Amano, El-Sayed N El-Alfy, Yoshifumi Nishikawa, Akira Shiozaki, Yuko Tajima, Tadasu K Yamada, Yoshiyasu Kobayashi. Disseminated Toxoplasmosis in a Narrow-Ridged Finless Porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis*) with Transplacental Embryonal Transmission. **Journal of Wildlife Diseases**. 2021; 57(1): 205-210. PMID: 33635977.
3. Chinatsu Nakamura, Mingming Liu, Youn-Kyoung Goo, Guohong Zhang, Honlin Jia, Akiko Kumagai, Houshuang Zhang, Jinlin Zhou, Yoshifumi Nishikawa, Xuenan Xuan. Construction of a recombinant vaccinia virus expressing *Babesia gibsoni* thrombospondin-related anonymous protein and evaluation of its immunogenicity in mice. **Tropical Biomedicine**. 2020; 37(4): 1029-1037. PMID: 33612755
4. Arpron Leesombun, Masatomi Iijima, Baldorj Pagmadulam, Banzragchgarav Orkhon, Hiroyasu Doi, Kunio Issiki, Ryuichi Sawa, Coh-Ichi Nihei, Yoshifumi Nishikawa*. Metacytofilin has potent anti-malarial activity. **Parasitology International**. 2021; 81: 102267. PMID: 33307212.
5. Sara T Elazab, Amal F Soliman, Yoshifumi Nishikawa*. Effect of some plant extracts from Egyptian herbal plants against *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 2021; 83(1): 100-107. PMID: 33268605.

6. Akari Nishida, Rina Ikeda, Hidefumi Furuoka, Yoshifumi Nishikawa*. CXCR3-Dependent Immune Pathology in Mice following Infection with *Toxoplasma gondii* during Early Pregnancy. **Infection and Immunity**. 2021; 89(2): e00253-20. PMID: 33199353, **Editor's select**
7. Fumiaki Ihara, Ragab M Fereig, Yuu Himori, Kyohko Kameyama, Kosuke Umeda, Sachi Tanaka, Rina Ikeda, Masahiro Yamamoto, Yoshifumi Nishikawa*. *Toxoplasma gondii* Dense Granule Proteins 7, 14, and 15 Are Involved in Modification and Control of the Immune Response Mediated via NF-κB Pathway. **Frontiers in Immunology**. 2020; 11: 1709. PMID: 32849602.
8. Ragab M Fereig, Yoshifumi Nishikawa*. Urological detection of specific antibodies against *Neospora caninum* infection in mice: A prospect for novel diagnostic approach of *Neospora*. **Experimental Parasitology**. 2020; 216: 107942. PMID: 32598889
9. Meng-Hsuan Lin, Tsun-Ai Yu, Chi-Fon Chang, Yoshifumi Nishikawa, Chun-Hua Hsu. NMR Resonance Assignments of the Programmed Cell Death Protein 5 (PDCD5) From *Toxoplasma Gondii*. **Biomolecular NMR Assignments**. 2020; 14(2): 277-280. PMID: 32578164.
10. Artemis Efstratiou, Eloiza May S. Galon, Guanbo Wang, Kousuke Umeda, Daisuke Kondoh, Mohamad Alaa Terkawi, Aiko Kume, Mingming Liu, Aaron Edmond Ringo, Huanping Guo, Yang Gao, Seung-Hun Lee, Jixu Li, Paul Franck Adjou Moumouni, Yoshifumi Nishikawa, Hiroshi Suzuki, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan. *Babesia microti* Confers Macrophage-Based Cross-Protective Immunity Against Murine Malaria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2020; 10: 193. PMID: 32411624.

総説（*責任著者）

1. El-Sayed El-Alfy, Yoshifumi NishikawaY*. *Cryptosporidium* Species and Cryptosporidiosis in Japan: A Literature Review and Insights Into the Role Played by Animals in Its Transmission. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82(8): 1051-1067. PMID: 32536636.
2. Rochelle Haidee D Ybañez, Adrian P Ybañez, Yoshifumi Nishikawa*. Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2020; 10: 204. PMID: 32457848
3. Ragab M Fereig, Yoshifumi Nishikawa*. From Signaling Pathways to Distinct Immune Responses: Key Factors for Establishing or Combating *Neospora caninum* Infection in Different Susceptible Hosts. **Pathogens**. 2020; 9(5): E384. PMID: 32429367

著書

1. 西川義文：トキソプラズマ症、p218-219、家畜伝染病ハンドブック、朝倉書店、2020年11

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 講師として動画を配信した。「すぐにわかる原虫病～世界の原虫病を監視・制圧する～」、国立大学共同利用・共同研究拠点協議会 知の拠点【すぐわかアカデミア】、WEB 公開、https://www.youtube.com/watch?v=iN3IRus_3PQ、2020 年 5 月 15 日

8. 招待講演等

1. Lesson from parasite and ecosystem, 特別講演、5th Workshop on The Present and Future of One Health (human, animal and environment), 日韓研究者交流協会, 日本学術振興会(JSPS)、WEB 公開、2021 年 3 月 5 日

9. 獲得研究費

1. 令和 2 年度 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）、植物内生真菌を用いたケミカルバイオロジーによる抗トキソプラズマ薬の探索（20F20402）、代表、令和 2 年度～令和 4 年度
2. 令和 2 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）、モンゴルにおける小型反芻獣トキソプラズマ症のワクチン開発研究（20KK0152）、代表、令和 2 年度～令和 6 年度
3. 令和 2 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」に関する授業、実習、および演習等の実施及び令和 3 年以降に実施する授業、実習、および演習のトライアル（予行演習・予備試験）等の実施、代表、令和 2 年度
4. 令和 2 年度(2020 年度) 挑戦的研究（萌芽）（文部科学省）、ネオスポラ症に対する次世代ワクチン株の開発と原虫ベクター化への応用展開（20K21359）、代表、令和 2 年度～令和 4 年度
5. 2020 年度 旗影会研究助成、免疫プロテオームによる家畜病原性原虫ネオスポラの新規診断方法の開発、代表、令和 2 年度
6. 令和 2 年度（一財）畜産ニューテック協会研究助成事業・研究調査助成金、ウシの流産の原因となる病原性原虫ネオスポラの防疫方法の開発、代表、令和 2 年度
7. 令和 2 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（AMED）、日本のトキソプラズマ症の感染実態把握とその制御に向けた協創的研究開発、先天性トキソプラズマ症モデル動物の開発と診断用抗原の同定（20fk0108137h0001）、分担、令和 2 年度～令和 4 年度
8. 令和 2 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
9. 令和 2 年度 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、令和元年度～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. 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. 小柴 琢己：福岡大学 理学部化学科、トキソプラズマ感染による宿主・ミトコンドリアの形態変化およびその生理機能への影響、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
3. 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、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 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を明らかにしてきました。肝臓からのビタミン E のエフラックスを制御することで循環中のビタミン E 濃度を規定するビタミン E 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を認めます。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。肝からのビタミン E のエフラックス抑制効果を発揮する化合物を探索したところ、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。今後の臨床応用へ向けての研究成果が期待されます。

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。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。また、サプリメントとしての植物油の投与は効果的かもしれません。

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

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. 2020 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。いわゆる、ミトカンとして機能し、抗ガン作用を持つことが報告されているビタミン E の誘導体である α -tocopheryloxy acid の効果をマウスマラリア原虫 *P. yoelii* 17XL を用いて検証したところ宿主の生存率を有意に上昇させ、パラシテミアを有意に減少させる効果を確認した。また、この効果は、トリパノソーマ原虫においても確認された。この化合物は、経口投与が可能であること、血中濃度の持続性が高いこと、および副作用が少ない（ほとんどない）ことが知られており、他の既存薬との併用による、より効果的な治療法、予防法の開発に寄与することが期待される。
- ・ 盲導犬を始めとするイヌの効率的繁殖にとって、凍結精子による人工授精は重要なツールのひとつである。これまでにイヌ精子の凍結保存法の改良について、幾つかの報告をしてきたが、今年度は、凍結抵抗性を示す木々に含まれているフラボノイドのひとつであるケルセチンを凍結保存液に加えて、その効果を検討したところ、凍結融解後の精子の運動性に有意な向上を認め、これを人工授精に供したところ高い受胎能を有することを見出した。
- ・ 以前より、マウス胚の初期発生において、胚盤胞への発生が速い、すなわち胞胚腔の形成が速い胚に雄の胚が有意に多いことが報告されていた。そこで、初期発生のより早い段階で、発生の雌雄差が認められるか否かを検討したところ、精子添加後 47 時間までに第 3 卵割を開始した胚の 90%が雄の胚であることを見出し、有効な雌雄産み分けの方法としての可能性を示した。

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. 2020 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. Yosuke Kawase, Takanori Tachibe, Nobuo Kamada, Kou-Ichi Jishage, Hiroyuki Watanabe, Hiroshi Suzuki. Male advantage observed for in vitro fertilization mouse embryos exhibiting early cleavage. **Reproductive Medicine and Biology**. 2020; 20(1): 83-87. PMID: 33488287.
2. Shinji Harakawa, Takaki Nedachi, Hiroshi Suzuki. Extremely low-frequency electric field suppresses not only induced stress response but also stress-related tissue damage in mice. **Scientific Reports**. 2020; 10(1): 20930. PMID: 33288776.
3. Yuta Kawasaki, Daichi Sakurai, Tatsuya Yoshihara, Mei Tsuchida, Shinji Harakawa, Hiroshi Suzuki. Effect of quercetin on the motility of cryopreserved canine spermatozoa. **Cryobiology**. 2020; 96: 50-54. PMID: 32841644.
4. Yasuyuki Abe, Tomoyoshi Asano, Ichiko Wakasa, Aiko Kume, Sakimi Yokozawa, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki. Cryopreservation of canine spermatozoa using

- a skim milk-based extender and a short equilibration time. **Reproduction in Domestic Animals**. 2020; 55(11): 1548-1553. PMID: 32799370.
5. Weiqing Zheng, Rika Umemiya-Shirafuji, Qian Zhang, Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Hiroshi Suzuki, Haiying Chen, Mingming Liu, Xuenan Xuan. *Porin* Expression Profiles in *Haemaphysalis longicornis* Infected with *Babesia microti*. **Frontiers in Physiology**. 2020; 11: 502. PMID: 32508681.
 6. Maria Agnes Tumwebaze, Seung-Hun Lee, Paul Franck Adjou Moumouni, Khaled Mohammed-Geba, Sherin K Sheir, Asmaa Galal-Khallaf, Heba M Abd El Latif, Dalia S Morsi, Nora M Bishr, Eloiza May Galon, Benedicto Byamukama, Mingming Liu, Jixu Li, Yongchang Li, Shengwei Ji, Aaron Edmond Ringo, Mohamed Abdo Rizk, Hiroshi Suzuki, Hany M Ibrahim, Xuenan Xuan. First detection of *Anaplasma ovis* in sheep and *Anaplasma platys*-like variants from cattle in Menoufia governorate, Egypt. **Parasitology International**. 2020; 78: 102150. PMID: 32485226.
 7. Weiqing Zheng, Rika Umemiya-Shirafuji, Shengen Chen, Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Hiroshi Suzuki, Shu Yang, Mingming Liu, Xuenan Xuan. Identification of *Haemaphysalis longicornis* Genes Differentially Expressed in Response to *Babesia microti* Infection. **Pathogens**. 2020; 9(5): 378. PMID: 32423088.
 8. Artemis Efstratiou, Eloiza May S Galon, Guanbo Wang, Kousuke Umeda, Daisuke Kondoh, Mohamad Alaa Terkawi, Aiko Kume, Mingming Liu, Aaron Edmond Ringo, Huanping Guo, Yang Gao, Seung-Hun Lee, Jixu Li, Paul Franck Adjou Moumouni, Yoshifumi Nishikawa, Hiroshi Suzuki, Ikuo Igarashi, Xuenan Xuan. *Babesia microti* Confers Macrophage-Based Cross-Protective Immunity Against Murine Malaria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2020; 10: 193. PMID: 32411624.
 9. 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.
 10. 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.

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. 「Basic and Applied Techniques of Reproductive Biotechnology」 Guest Lecture at Department of Biology. Lambung Mangkurat University, Indonesia. 2020 年 12 月 4 日

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

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、雌ダニ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

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

3. 2020年度研究の総括

- ・ マダニにおける原虫伝播の分子メカニズム解明を目的として、フタトゲチマダニと *Babesia microti* を解析用モデルとして用い、原虫感染時に発現変動するマダニ遺伝子の同定を試みしました。*B. microti* 感染動物または非感染動物で吸血させたフタトゲチマダニより抽出した Total RNA をサンプルとして、cDNA ライブラリーを構築し Suppression subtractive hybridization (SSH) 法を行いました。ランダムに選択した 302 クローンについて塩基配列解析を行い、*B. microti* 感染により発現が変動したと考えられる遺伝子を選抜し、次いでリアルタイム PCR 法による定量的遺伝子発現解析を実施しました。その結果、Obg-like ATPase 1 (*ola1*)、Calreticulin (*crt*)、vitellogenin 1 (*Vg-1*)、*Vg-2* を含む 8 遺伝子の発現が吸血時に増大すること、*ola1*、*crt*、*Vg-2* を含む 6 遺伝子が *B. microti* 感染時に増大することが明らかになりました。そこで、これらの遺伝子について RNA 干渉法による遺伝子発現抑制を行い、*B. microti* 感染動物で吸血させたフタトゲチマダニについて解析したところ、*Vg-2* 遺伝子発現抑制マダニにおける *B. microti* DNA 量が、対照群のマダニに比べ有意に減少しました（論文リスト 5）。

- ・ 吸血性節足動物における病原体感染に関与する分子の一つに、porin（電位依存性アニオンチャネルタンパク質（VDAC））が知られています。フタトゲチマダニの porin に関する研究はほとんど行われていないことから、本研究では *porin* 遺伝子を単離同定し、バベシア感染における *porin* の関与について検証しました。得られた *porin* cDNA は、849 bp であり、その推定産物は 282 アミノ酸から構成され、推定分子量は 30.4 kDa でした。次に、上記と同様に作出した *B. microti* 感染マダニを用い、*porin* 遺伝子の発現を解析しました。その結果、*B. microti* 感染動物で吸血させた若ダニでは、飽血後 2 および 3 日目において *porin* 遺伝子発現が増大することが分かりました。さらに、*porin* 遺伝子発現抑制マダニでは、飽血後の *B. microti* DNA 量が対照群に比べ有意に減少しました（論文リスト 4）。
- ・ アジア・オセアニア地域を主な生息地とするフタトゲチマダニが近年米国で発見され、米国内におけるフタトゲチマダニの生息域の拡大と媒介疾病発生の懸念が高まっています。米国において発見されたフタトゲチマダニの起源を解析するため、アジア・オセアニア地域由来のフタトゲチマダニとの比較解析が行われました。今回の研究では、日本産フタトゲチマダニ（単為生殖系）の解析サンプルとして、当センターのマダニが用いられました。その結果、現在までに米国で見出されたフタトゲチマダニは単為生殖系であり、東アジアに由来することが示唆されました。現時点では、フタトゲチマダニはウマやイヌなどの動物の輸送によって長距離を移動し、東アジアより米国に侵入したと考えられています。フタトゲチマダニの宿主域は広く、多くの脊椎動物で吸血可能であり、また、原虫・リケッチア・ウイルスといった様々な病原体を動物とヒトに媒介することから、国境・大陸を越えた動物の移動に関し、関連業務従事者、旅行者等へのさらなる注意喚起が世界各地で必要不可欠です（論文リスト 3）。
- ・ 抗マダニワクチンの候補分子として Subolesin に着目し、フタトゲチマダニに対するワクチン効果を検証しました。フタトゲチマダニ Subolesin の組換えタンパク質を作製し、ウサギ（日本白色種）に免疫し、抗体価の上昇を確認した後、フタトゲチマダニ（単為生殖系；雌）の吸血試験を行いました。ワクチン効果検証のパラメーターとして、雌ダニの吸血期間、産卵準備期間、飽血時体重、卵重量を測定し、対照群との比較を行いました。その結果、Subolesin 接種群のマダニでは、飽血時体重および卵重量が対照群に比べて優位に減少しました。また、雌ダニの産下卵については、Subolesin 接種群において卵期間（孵化に至るまでの期間）の有意な延長が認められました。これまで他のマダニ種において Subolesin のワクチン効果が報告されていましたが、今回の研究により、フタトゲチマダニに対しても Subolesin は有効なワクチン候補分子の一つになることが明らかになりました（論文リスト 1）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議員・渉外・広報委員（兼 国際交流委員）・教育委員
- ・ 日本寄生虫学会

- ・ 日本衛生動物学会
- ・ 日本ダニ学会文献目録委員

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2020 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. Seung-Hun Lee, Jixu Li, Paul Franck Adjou Moumouni, Kiyoshi Okado, Weiqing Zheng, Mingming Liu, Shengwei Ji, Soochong Kim, Rika Umemiya-Shirafuji*, Xuenan Xuan*. Subolesin vaccination inhibits blood feeding and reproduction of *Haemaphysalis longicornis* in rabbits. **Parasites & Vectors**. 2020; 13: 478. PMID: 32948229.
2. Yasuyuki Abe, Tomoyoshi Asano, Ichiko Wakasa, Aiko Kume, Sakimi Yokozawa, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki. Cryopreservation of canine spermatozoa using a skim milk-based extender and a short equilibration time. **Reproduction in Domestic Animals**. 2020; 55: 1548-1553. PMID: 32799370.
3. Andrea Egizi, Leslie Bulaga-Seraphin, Erika Alt, Waheed I Bajwa, Joshua Bernick, Matthew Bickerton, Scott R Campbell, Neeta Connally, Kandai Doi, Richard C Falco, David N Gaines, Telleasha L Greay, Vanessa L Harper, Allen C G Heath, Ju Jiang, Terry A Klein, Lauren Maestas, Thomas N Mather, James L Occi, Charlotte L Oskam, Jennifer Pendleton, Marissa Teator, Alec T Thompson, Danielle M Tufts, Rika Umemiya-Shirafuji, Meredith C VanAcker, Michael J Yabsley, Dina M Fonseca. First glimpse into the origin and spread of the Asian longhorned tick, *Haemaphysalis longicornis*, in the United States. **Zoonoses and Public Health**. 2020; 67: 637-650. PMID: 32638553.
4. Weiqing Zheng, Rika Umemiya-Shirafuji*, Qian Zhang, Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Hiroshi Suzuki, Haiying Chen, Mingming Liu, Xuenan Xuan*. *Porin* expression profiles in *Haemaphysalis longicornis* infected with *Babesia microti*. **Frontiers in Physiology**. 2020; 11: 502. PMID: 32508681
5. Weiqing Zheng, Rika Umemiya-Shirafuji*, Shengen Chen, Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Hiroshi Suzuki, Shu Yang, Mingming Liu, Xuenan Xuan*. Identification of *Haemaphysalis longicornis* genes differentially expressed in response to *Babesia microti* infection. **Pathogens**. 2020; 9: 378. PMID: 32423088
6. Takahiro Shirozu, Athanase Badolo, Akira Soga, Aya Yoshimura, Yu-Ki Morishita,

Mami Koketsu, Rika-Umemiya Shirafuji, Hisashi Inokuma, Naoaki Yokoyama, Shinya Fukumoto. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *Theileria* parasites infecting Yezo sika deer. **Parasitology International**. 2020; 77: 102130. PMID: 32325118.

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 帯広の森サポーターの会 とかちのマダニ現地研修会、帯広の森 H9H10 年植樹区、2020 年 8 月 1 日
2. 原虫病研究センターの紹介およびとかちマダニじてんの公開、畜大 Web フェスティバル、2020 年 12 月 15 日

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 令和 2 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、令和元年度～令和 3 年度
2. 令和 2 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
3. 令和 2 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、令和元年度～令和 3 年度
4. 令和 2 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、令和元年度～令和 3 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

1. 北海道新聞（2020 年 5 月 18 日 11 面）、「共同利用・共同研究拠点事業 マダニバイオバンク整備とベクターバイオロジーの新展開」において作成したリーフレット「とかちマダニじてん」英語版についての記事掲載
2. 十勝毎日新聞（2020 年 5 月 27 日第 2 社会 14 面）、「共同利用・共同研究拠点事業 マダニバイオバンク整備とベクターバイオロジーの新展開」において作成したリーフレット「とかちマダニじてん」英語版についての記事掲載

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 中尾 亮：北海道大学大学院獣医学研究院、マダニのコア共生細菌の介卵伝播機構の解明、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 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フェリチンの局在と鉄の動態、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究

◆-----教授 横山 直明
(Naoaki Yokoyama)

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研究
- ・ 国内に蔓延する牛ピロプラズマの分子疫学および臨床病理学的研究
- ・ 野生シカが保有するピロプラズマの分子疫学的研究
- ・ 牛ピロプラズマ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. 2020 年度研究の総括

- ・ *Babesia* sp. Mymensingh の宿主範囲と地理的分布: 牛バベシア病を引き起こすのは、*Babesia bovis*、*B. bigemina*、および *B. divergens* だけでした。しかし私たちの最近の研究から、新しく発見された *Babesia* sp. Mymensingh も牛バベシア病を引き起こすことが明らかになりました。そこで本研究では、*Babesia* sp. Mymensingh の宿主範囲と世界規模での地理的分布を確認するために、1) スリランカ、フィリピン、ベトナム、ウガンダ、ブラジル、およびアルゼンチンの計 2,263 頭の牛、2) スリランカとベトナムの計 419 頭の水牛、3) ベトナムの 127 頭の山羊、および 4) ベトナムの 51 頭の羊を含めた合計 2,860 の DNA サンプルに対して *Babesia* sp. Mymensingh に特異的な PCR スクリーニングを行いました。その結果、*Babesia* sp. Mymensingh の感染は、すべての反芻動物で確認されました。また、ブラジルを除くすべての国々の牛から、本バベシア種が検出されました。本研究の成果により、本バベシア種が牛、水牛、羊、および山羊に感染し、かつアジア、アフリカ、南アメリカに広く分布していることが明らかになりました。本論文は、スリランカ (Veterinary Research Institute)、ベトナム (Hue University)、フィリピン (Cebu Technological University)、ウガンダ (Makerere University)、アルゼンチン (Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria)、およびブラジル (Conselho Regional de Medicina Veterinária da Bahia) との国際共同研究の成果です (論文リスト 15)。

- ・ モンゴルにおける牛バベシアの疫学調査：牛バベシア病は、経済的被害の大きい家畜の感染症で、アジアでは *B. bovis*、*B. bigemina*、および *Babesia* sp. Mymensingh の感染によって引き起こされます。そこで、モンゴルの 21 州のうち 16 州で飼育されていた計 725 頭の牛の血液 DNA サンプルに対して、それぞれのバベシア種を標的とした PCR スクリーニングを行いました。そこ結果、*B. bovis*、*B. bigemina*、および *Babesia* sp. Mymensingh の全体陽性率が、それぞれ 27.9%、23.6%、および 5.4%であることが明らかになりました。これらの結果より、モンゴルにおける牛バベシアの深刻な汚染実態が明らかとなりました。特に、モンゴルにおける *Babesia* sp. Mymensingh の検出は初めての報告となります。本論文は、モンゴル (Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences) との国際共同研究の成果です (論文リスト 14)。
- ・ バベシア病に対する新たな併用療法の探索：バベシア病は獣医学上ならびに医学上の脅威であり、新薬の開発が求められています。Artesunate ベースの併用療法はマラリアに対して有効であることから、本研究ではその併用療法がバベシア病に対しても有効であるかを検証しました。そこで、Mefloquine、Tafenoquine、Primaquine、Methylene blue、もしくは Lumefantrine を単独で、あるいは Artesunate と組み合わせて、*B. bovis* を用いた試験管内培養法にて評価しました。さらに、*B. microti* に感染したマウスに対して、Mefloquine または Tafenoquine を単独で、あるいは Artesunate と組み合わせて投与し、その治療効果を検証しました。その結果、Lumefantrine を除くすべての薬剤は *B. bovis* に対して有意な増殖阻害活性を示し、さらに Artesunate との組み合わせによりさらにその阻害活性が増加することが分かりました。また、Tafenoquine と Artesunate との併用療法が *B. microti* に対して効果的な治療効果を誘導することも判明しました。本論文は、ブラジル (Laboratory of Malaria Research, Oswaldo Cruz Institute) との国際共同研究の成果です (論文リスト 8)
- ・ *Phyllanthus emblica* 果実由来抽出物による抗ピロプラズマ効果の発見：牛バベシア病と馬ピロプラズマ病は、家畜産業に多大な経済的負担をもたらしています。本研究では、薬用植物として知られている *Phyllanthus emblica* の果実からのエタノール抽出物と水抽出物を調製し、*B. bovis*、*B. bigemina*、*B. divergens*、*B. caballi*、および *T. equi* の *in vitro* 培養評価系にてその活性を評価しました。エタノール抽出物および水抽出物の *in vitro* 培養評価系による IC₅₀ は、それぞれ 6.6~18.3 µg / ml および 18.0~66.6 µg / ml の範囲と、有用な効果を示しました。本研究の成果により、*P. emblica* の果実には抗ピロプラズマ活性を示す因子が含まれることが明らかとなりました。本論文は、スリランカ (Veterinary Research Institute) との国際共同研究の成果です (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「公務員獣医師および民間獣医師実践能力強化プロジェクト」国内支援委員会（JICA/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
- ・ 日本獣医寄生虫学会・教育委員会 委員長

6. 2020 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. Tran Nhat Thang, Thillaiampalam Sivakumar, Hemal Kothalawala, Seekkuge Susil Priyantha Silva, **Naoaki Yokoyama**, Madoka Ichikawa-Seki. Geographic origin of *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847) Fukui, 1929 detected from domestic water buffaloes in Sri Lanka. **Infection, Genetics and Evolution**. 2021; 91:104806. PMID: 33722696
2. **Naoaki Yokoyama**, Thillaiampalam Sivakumar, Sanae Ikehara, Yoshihiro Akimoto, Takashi Yamaguchi, Ken Wakai, Kenji Ishikawa, Masaru Hori, Tetsuji Shimizu, Hajime Sakakita, Yuzuru Ikehara. Growth inhibition effect on *Trypanosoma brucei gambiense* by the oxidative stress supplied from low-temperature plasma at atmospheric pressure. **Japanese Journal of Applied Physics**. 2021; 60: 020601.
3. Bumduuren Tuvshintulga, Reiko Kawaguchi, Enkhbaatar Batmagnai, Hemal Kothalawala, Erandi Guanasekara, Orkhon Banzragchgarav, Arifin Budiman Nugraha, Davajav Otgonsuren, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama***. Effects of ethanol and water extracts from *Phyllanthus emblica* fruits on the growth of bovine *Babesia* and equine piroplasma parasites *in vitro* and *Babesia microti* in mice. **Japanese Journal of Veterinary Parasitology**. 2020; 19:

21-29.

4. Gaber El-Saber Batiha, Amany Magdy Beshbishy, Luay M Alkazmi, Eman H Nadwa, Eman K Rashwan, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi. *In vitro* and *in vivo* growth inhibitory activities of cryptolepine hydrate against several *Babesia species* and *Theileria equi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2020; 14: e0008489. PMID: 32853247
5. Yusuke Tanaka, Altanchimeg Adilbish, Kenji Koyama, Mungun-Ochir Bayasgalan, Noriyuki Horiuchi, Nyamdolgor Uranbileg, Kenichi Watanabe, Baatarjargal Purevdorj, Soyolmaa Gurdorj, Battur Banzragch, Battsetseg Badgar, Keisuke Suganuma, **Naoaki Yokoyama**, Noboru Inoue, Yoshiyasu Kobayashi. Immunohistochemical phenotyping of macrophages and T lymphocytes infiltrating in peripheral nerve lesions of dourine-affected horses. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82: 1502-1505. PMID: 32788501
6. ThankGod E Onyiche, Moeti O Taioe, Nthatisi I Molefe, Abdullahi A Biu, Joshua Luka, Isaac J Omeh, **Naoaki Yokoyama**, Oriel Thekisoe. Equine piroplasmiasis: an insight into global exposure of equids from 1990 to 2019 by systematic review and meta-analysis. **Parasitology**. 2020; 147: 1411-1424. PMID: 32741382.
7. Dickson Stuart Tayebwa, Amany Magdy Beshbishy, Gaber El-Saber Batiha, Mariam Komugisha, Byaruhanga Joseph, Patrick Vudriko, Ramadan Yahia, Luay Alkazmi, Helal F Hetta, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi. Assessing the Immunochromatographic Test Strip for Serological Detection of Bovine Babesiosis in Uganda. **Microorganisms**. 2020; 8: E1110. PMID: 32722070
8. Leonardo J M Carvalho, Bunduurem Tuvshintulga, Arifin B Nugraha, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama**. Activities of artesunate-based combinations and tafenoquine against *Babesia bovis* *in vitro* and *Babesia microti* *in vivo*. **Parasites & Vectors**. 2020; 13:362. PMID: 32690081
9. Gaber El-Saber Batiha, Dickson Stuart Tayebwa, Amany Magdy Beshbishy, David D N'Da, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi. Inhibitory effects of novel ciprofloxacin derivatives on the growth of four *Babesia* species and *Theileria equi*. **Parasitology Research**. 2020; 119: 3061-3073. PMID: 32677000
10. Daiki Mizushima, Tovuu Amgalanbaatar, Batdorj Davaasuren, Mitsunori Kayano, Sandagdorj Naransatsral, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Davaajav Otgonsuren, Batsaikhan Enkhtaivan, Batbold Davkharbayar, Bayasgalan Mungun-Ochir, Purevdorj Baatarjargal, Uranbileg Nyamdolgor, Gurdorj Soyolmaa, Adilbish Altanchimeg, Myagmar Zoljargal, Thu-Thuy Nguyen, Badgar Battsetseg, Banzragch Battur, Noboru Inoue, **Naoaki Yokoyama**, Keisuke Suganuma. Nationwide Serological Surveillance of Non-Tsetse-Transmitted Horse Trypanosomoses in Mongolia. **Parasite Epidemiology and Control**. 2020; 10:e00158. PMID: 32642568

11. ThankGod E Onyiche, Moeti O Taioe, Ndudim I Ogo, Thillaiampalam Sivakumar, Abdullahi A Biu, Albert W Mbaya, Xuenan Xuan, **Naoaki Yokoyama**, Oriel Thekisoe. Molecular Evidence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Equines and Ticks in Nigeria: Prevalence and Risk Factors Analysis. **Parasitology**. 2020; 17:1-11. PMID: 32605687
12. Takahiro Shirozu, Athanase Badolo, Akira Soga, Aya Yoshimura, Yu-ki Morishita, Mami Koketsu, Rika-Umemiya Shirafuji, Hisashi Inokuma, **Naoaki Yokoyama**, Shinya Fukumoto. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method Targeting *Theileria* Parasites Infecting Yezo Sika Deer. **Parasitology International**. 2020; 77: 102130. PMID: 32325118
13. Bumduuren Tuvshintulga, Edouard Vannier, Dickson S Tayebwa, Sambuu Gantuya, Thillaiampalam Sivakumar, Azirwan Guswanto, Peter J Krause, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi. Clofazimine, a Promising Drug for the Treatment of *Babesia Microti* Infection in Severely Immunocompromised Hosts. **The Journal of Infectious Diseases**. 2020; 222: 1027-1036. PMID: 32310272
14. 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
15. Thillaiampalam Sivakumar, Bumduuren Tuvshintulga, Hemal Kothalawala, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Dinh Thi Bich Lan, Phung Thang Long, Adrian Patalinghug Ybañez, Rochelle Haidee Daclan Ybañez, 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; 67: 2233-2239. PMID: 32166838
16. Amany Magdy Beshbishy Gaber El-Saber Batiha Luay Alkazmi Eman Nadwa, Eman Rashwan, Ahmed Abdeen, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi, B. Therapeutic Effects of Atranorin towards the Proliferation of *Babesia* and *Theileria* Parasites. **Pathogens**. 2020; 9: E127. PMID: 32079149
17. 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: e0228996. PMID: 32053698
18. 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
19. 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

総説

- 1 ThankGod E Onyiche, Moeti O Taioe, Nthatisi I Molefe, Abdullahi A Biu, Joshua Luka, Isaac J Omeh, **Naoaki Yokoyama**, Oriel Thekiso. Equine piroplasmiasis: an insight into global exposure of equids from 1990 to 2019 by systematic review and meta-analysis. **Parasitology**. 2020; 147: 1411-1424. PMID: 32741382

著書

1. **横山直明**（分担執筆）（2020）：タイレリア、バベシア、p61-68、獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠 寄生虫病学 第3版、日本獣医寄生虫学会 監修、緑書房、2020年。

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

- OIE 診断依頼の受託「馬のピロプラズマ病」（令和2年度）：中国、アメリカ、ニュージーランド、オーストラリア、イギリス、ドイツより計16件（75検体）
- OIE 診断依頼の受託「牛の小型ピロプラズマ病」（令和2年度）：国内より計4件（104検体）
- OIE 診断試料の提供「馬のピロプラズマ病用の IFAT スライド」（令和2年度）：アルゼンチン、イギリス、フランスへ計5件（1,700枚）
- OIE 診断に関するコンサルタント・情報提供「馬のピロプラズマ病、牛のバベシア病」（令和2年度）：アメリカ、イギリス、アイルランド、スペイン、オランダ、スイス、イタリア、ベトナム、ニュージーランド、メキシコ、アルゼンチン、日本、OIE へ計22件
- 「牛のバベシア病」と「馬のピロプラズマ病」に関する OIE technical disease cards を、OIE に提出。2021年1月14日
- OIE Reference Centres による OIE 活動に関する HP の公開
(<https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/en/oie-reference-centres>)

8. 招待講演等

- 「Bovine babesiosis ~Role of OIE reference laboratory~」 OIE special seminar、Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand、2020年2月11日
- 「A success story of SATREPS project: Control of protozoan diseases to improve live-

stock production in Mongolia」The 89th Annual Meeting of the Japanese Society of Parasitology、Obihiro、2020 年 5 月 30-31 日（誌上開催）

3. 「An introduction to our collaboration with OIE」AAVS-OIE-UGM Session on Collaboration between VEEs and International Organizations in Asia、The 1st International Conference of Advanced Veterinary Science and Technologies for Sustainable Development、Faculty of Veterinary Medicine、Universitas Gadjah Mada、Indonesia、2021 年 3 月 29 日

9. 獲得研究費

1. 平成 2 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、令和 2 年度
2. 令和 2 年度 競走馬生産育成研究助成事業（（一社）日本競走馬協会）「競走馬の円滑な国際流通に向けた馬ピロプラズマ病の学術整備」、代表、令和 2 年度～令和 3 年度
3. 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）「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、令和元年度～令和 3 年度
4. 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 2 年度（繰越）
5. 令和 2 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）「スリランカ国で発見された新牛バベシア病に対する簡易診断法の開発研究」、代表、令和 2 年度～令和 3 年度
6. 令和 2 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）「アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築」（代表 玄学南）、分担、令和 2 年度～令和 5 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 五十嵐郁男）、分担、平成 30 年度～令和 3 年度（繰越）
9. 令和元年度 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、令和元年度～令和 3 年度（繰越）

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 Seseerch Institute, Sri Lanka, 2019 年 7 月～、部局間国際学術協定
5. Phung Thang Long: 「Isolation and *In vitro* cultivation of *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Babesia* sp. Mymensingh, and *Babesia* sp. Hue-1 from cattle in Vietnam」 Hue University of Agriculture and Forestry, Vietnam, 2020 年度原虫病研究センター共同研究
6. Sanjay Kumar: 「Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmiasis」 ICAR-National Research Centre on Equines, India, 2020 年度原虫病研究センター共同研究

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. 2020 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、バベシア原虫（バベシア・ボービス *Babesia bovis*）での遺伝子改変技術を応用して、原虫由来の宿主赤血球修飾分子を網羅的に解析しました。この解析では、チャネルと推定される多重遺伝子にコードされた分子のほか、原虫感染赤血球に存在する、ウシ血管内皮細胞への接着分子 VESA を赤血球表面へと輸送するのに機能すると推定される分子を同定し、専門誌に公表いたしました（論文リスト2）。この研究で開発、使用した遺伝子ノックダウン技術やオミクス解析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。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、昨年度に確立した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

ージへの分化を誘導する試験管内培養系法を応用して、RNA シーケンス (RNA-seq) をおこない予備データを取得いたしました。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。

- ・ 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、日本住血吸虫の抗酸化タンパク質ペルオキシレドキシン 4 (Prx-4) 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)。Prx-4 と、私達がこれまでに、患者診断用の抗原として有用であることを報告している thioredoxine peroxidase 1 (Tpx-1) を ELISA に併用することで、さらに高感度・高精度の日本住血吸虫症診断法の開発が可能になります。また、Tpx-1 およびタンデムリピート抗原 1TR を応用した ELISA が、保虫宿主スイギュウでの診断用抗原としても有用であることを野外調査で確認し、さらに、ヒトでの症例が既に認められなくなった地域においても保虫宿主での寄生虫感染が持続していることを見出しました。これら一連の成果は専門誌に公表いたしました (論文リスト 1)。これらの抗原を 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用することができる、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 (会計担当)
- ・ 日本獣医寄生虫学会理事 (理事長)
- ・ 日本獣医学会評議委員

② 主催した学会、研究会等

- ・ 第 89 回日本寄生虫学会大会 (令和 2 年 5 月 30 - 31 日、とかちプラザ : 大会長 : 五十嵐郁男、事務局 : 河津信一郎 : 大会集会中止・誌上開催)

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
- ・ 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. 2020 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. Jose Ma M Angeles*, Yasuyuki Goto, Masashi Kirinoki, Elena A Villacorte, Kharleezelle J Moendeg, Pilarita T Rivera, Yuichi Chigusa, Shin-ichiro Kawazu. Field evaluation of recombinant antigen ELISA in detecting zoonotic schistosome infection among water buffaloes in endemic municipalities in the Philippines. **Frontiers in Veterinary Science**. 2020; 7: 592783. PMID: 33195631
2. Hassan Hakimi*, Thomas J Templeton, Miako Sakaguchi, Junya Yamagishi, Shinya Miyazaki, Kazuhide Yahata, Takayuki Uchihashi, Shin-ichiro Kawazu, Osamu Kaneko, Masahito Asada*. Novel Babesia bovis exported proteins that modify properties of infected red blood cells. **PLOS Pathogens**. 2020; 16(10): e1008917. PMID: 33017449
3. Minh-Anh Dang-Trinh, Jose Ma M Angeles, Kharleezelle J Moendeg, Adrian Miki C Macalanda, Thu-Thuy Nguyen, Luna Higuchi, Shotaro Nakagun, Masashi Kirinoki, Yuichi Chigusa, Yasuyuki Goto, Shin-ichiro Kawazu*. Analyses of the expression, immunohistochemical properties and serodiagnostic potential of *Schistosoma japonicum* peroxiredoxin-4. **Parasites & Vectors**. 2020; 13(1): 436. PMID: 32867818

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. Schistosomiasis Multi-Stakeholder's Forum to Achieve Transmission Interruption by 2025 in the Philippines : Web シンポジウム、Manila, Philippines、2020 年 9 月 10 日
2. 5th International Livestock Biotechnology Symposium : Web シンポジウム、Manila, Philippines、2020 年 10 月 28 日

9. 獲得研究費

1. 共同研究 ネオファーマージャパン株式会社、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 3 年度
2. 令和元年度 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、令和元年度～令和 3 年

度

3. 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

1. 受賞者：晴希生 ハッサン（特任研究員）

受賞名：第11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：The expression of a novel multigene family is correlated with channel activity in *Babesia bovis*-infected erythrocytes.

受賞年：2020年9月14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. 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 knock-outs、2019年4月1日～2021年3月31日、2019年度原虫病研究センター共同研究(2019-joint-2 継続)
5. 川合 寛：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 (2020-joint-9)

◆-----助教 菅 沼 啓 輔
(Keisuke Suganuma)

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コンサルティング、診断、診断用材料の提供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. 2020 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、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、媾疫の流行状況や *T. equiperdum* 寄生動態と臨床症状との関連（病態生理）は未解明です。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。モンゴルは媾疫重度汚染国であると考えられていますが、全国規模での疫学調査は実施されておらず、媾疫の流行状況は不明でした。そこで我々はモンゴル全県を対象とした媾疫を含むウマトリパノソーマ症の血清疫学調査を実施しました。その結果、モンゴル国で飼養されているウマの約 5% にウマトリパノソーマの感染が疑われました。特に他地域に比べてウランバートル首都圏を含むモンゴル中央諸県では血清陽性率が有意に高値を示したため、ウマトリパノソーマ症を効率よく制御するために、同地域を中心とした清浄化対策の必要性が示唆されました（論文リスト 3）（モンゴル国立生命科学大学獣医学研究所との共同研究）。さらに媾疫罹患馬は感染末期ステージに顔面や後肢の麻痺を呈することが知られており、その原因は末梢神経炎に起因するとされていました。その神経炎の機序を探るために様々なステージの媾疫罹

患馬の末梢神経に浸潤する炎症細胞サブタイプを解析したところ、感染初期の症状を示さない馬でもすでに慢性炎症の病態であることが明らかになりました。したがって、感染後のかなり早い段階で末梢神経炎が起きていたことが示唆されました（論文リスト2）（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）。

- ・ 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 *Artemisia sieversiana* 及び *Oxytropis lanata* 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、Chrysoeriol などの含有化合物に抗トリパノソーマ活性を見出しました（論文リスト4, 6）（東北医科薬科大学、モンゴル国立大学との共同研究）。さらにこれまでに抗トリパノソーマ活性を探索した各種化合物について病原ウイルスに対する不活化活性を検証した結果、モンゴル国産薬用植物の一種である *Saxifraga spinulosa* が含有する化合物が新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を含む複数のウイルスを高率に不活化することを明らかにしました（論文リスト5）（帯広畜産大学獣医学研究部門、東北医科薬科大学、モンゴル国立大学との共同研究）。
- ・ スーラ病は *T. evansi* がアブなどの吸血昆虫の吸血によって感染する動物トリパノソーマ症であり、世界各地で流行しています。中でもフィリピンをはじめとする東南アジア諸国はスーラ病の流行地域で、家畜の移入に伴うスーラ病のアウトブレイクが度々報告されています。これまでにフィリピン各地で *T. evansi* の感染が報告されていますが、フィリピン中部の要衝であるセブ島では何度かの家畜原虫病の疫学調査にもかかわらず *T. evansi* は検出されていませんでした。今回我々がセブ島で飼養されているヤギを対象に PCR 法による分子疫学調査を実施した結果、*T. evansi* の遺伝子断片が、約 34%のヤギから検出されました。一般的にヤギは *T. evansi* 感染に耐性を示し不顕性感染状態が持続するため、一見健康なヤギを別地域に移送することでスーラ病のアウトブレイクが引き起こされる可能性があることを示唆しています（論文リスト1）（フィリピンセブ大学、スーダン科学技術大学との共同研究）。

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

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2020 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. Afraa Elata, Eloiza May Galon, Paul Franck Adjou Moumouni, Rochelle Haidee D Ybanez, Ehab Mossaad, Caro B Salces, Guindolino P Bajenting, Adrian P Ybanez, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma*. First molecular detection and identification of *Trypanosoma evansi* in goats from Cebu, Philippines using a PCR-based assay. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2020; 21: 100414. PMID: 32862917
2. Yusuke Tanaka, Altanchimeg Adilbish, Kenji Koyama, Mungun-Ochir Bayasgalan, Noriyuki Horiuchi, Nyamdolgor Uranbileg, Kenichi Watanabe, Baatarjargal Purevdorj, Soyolmaa Gurdorj, Battur Banzragch, Battsetseg Badgar, Keisuke Suganuma, Naoaki Yokoyama, Noboru Inoue, Yoshiyasu Kobayashi. Immunohistochemical phenotyping of macrophages and T lymphocytes infiltrating in peripheral nerve lesions of dourine-affected horses. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2020; 82(10): 1502-1505. PMID: 32788501
3. Daiki Mizushima, Tovuu Amgalanbaatar, Batdorj Davaasuren, Mitsunori Kayano, Sandagdorj Naransatsral, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Davaajav Otgonsuren, Batsaikhan Enkhtaivan, Batbold Davkharbayar, Bayasgalan Mungun-Ochir, Purevdorj Baatarjargal, Uranbileg Nyamdolgor, Gurdorj Soyolmaa, Adilbish Altanchimeg, Myagmar Zoljargal, Thu-Thuy Nguyen, Badgar Battsetseg, Banzragch Battur, Noboru Inoue, Naoaki Yokoyama, Keisuke Suganuma*. Nationwide serological surveillance of non-tsetse-transmitted horse trypanosomoses in Mongolia. **Parasite Epidemiology and Control**. 2020; 10: e00158. PMID: 32642568
4. Stipan Nurbek, Toshihiro Murata, Keisuke Suganuma, Yoshinobu Ishikawa, Buyanmandakh Buyankhishig, Takashi Kikuchi, Tseasuren Byambajav, Bekh-Ochir Davaapurev, Kenroh Sasaki, Javzan Batkhuu. Isolation and evaluation of trypanocidal activity of sesquiterpenoids, flavonoids, and lignans in *Artemisia sieversiana* collected in Mongolia. **Journal of Natural Medicines**. 2020; 74: 750-757. PMID: 32621255
5. Yohei Takeda, Toshihiro Murata, Dulamjav Jamsransuren, Keisuke Suganuma, Yuta Kazami, Javzan Batkhuu, Duger Badral, Haruko Ogawa, *Saxifraga spinulosa*-derived components rapidly inactivate multiple viruses including SARS-CoV-2. **Viruses**. 2020; 12(7): 699. PMID: 32605306
6. Buyanmandakh Buyankhishig, Toshihiro Murata, Keisuke Suganuma, Javzan Batkhuu, Kenroh Sasaki. Hyaluronidase inhibitory saponins and a trypanocidal isoflavonoid from the aerial parts of *Oxytropis lanata*. **Fitoterapia**. 2020; 145: 104608.

PMID: 32387375

7. 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: 32172907

総説

該当なし

著書

1. 家畜伝染病ハンドブック、朝倉書店、分担執筆
2. 寄生虫病学第3版、緑書房、分担執筆

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. 令和2年度 第46回学術研究助成金（大山健康財団）、ニトロフランチン誘導体のアフリカトリパノソーマ症新規治療薬としての薬効評価及び作用機序の解析、代表、令和元年度
2. 令和元年度 若手研究（B）（文部科学省）、ゲノム情報に立脚した臨床現場で使用可能なウマトリパノソーマ症鑑別診断法の開発（19K15972）、代表、令和元年度～令和3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）のトリパノソーマ症治療効果の検証、代表、平成30年度～令和3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）のモンゴルウマ調教効率改善の検証、代表、令和2年度～令和3年度

10. 特許申請・取得

1. 特願 2020-081936 「トリパノソーマ症の治療薬及び予防薬」

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. 成田 紘一：東北医科薬科大学・医薬合成化学教室、モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニル オキサゾールをリード化合物とした安全性の高い新規トリパノソーマ症治療の開発、2019 年 4 月 1 日～2020 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
2. Mark Carrington: University of Cambridge, Establishment transgenic manipulation of *Trypanosoma equiperdum* using of CRISPR/Cas9 and RNAi, 2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
3. Jack Sunter: Oxford Brookes University, Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration, 2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
4. Marvin Ardeza Villanueva: Philippine Carabao Center, Investigation on the emergence of resistance among commonly used trypanocidal drugs in the Philippines, 2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
5. Zhe Hu: Harbin Veterinary Research Institute, International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories, 2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 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症疫学調査

3. 2020 年度研究の総括

- ・ 十勝地方の飼い猫から新規トキソプラズマ原虫株を単離し、その性状を解析しました（論文リスト 1）。
- ・ スーダンの一部地方の家畜におけるトキソプラズマ陽性率の検討を行いました（論文リスト 2）。
- ・ 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 3）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本分子生物学会会員
- ・ 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. 2020 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. Doaa Salman, Motamed E. Mahmoud, Wilawan Pumidonming, Tolubaeva Mairamku, Eiji Oohashi, Makoto Igarashi. Characterization of a spontaneous cyst-forming strain of *Toxoplasma gondii* isolated from Tokachi subprefecture in Japan. **Parasitology International**. 2021; 80: 102199. PMID: 32961305
2. Abdelbaset Eweda Abdelbaset, Ehab Mossaad, Ahmed Ali Ismail, Abdalla Mohamed Ibrahim, Xuenan Xuan, Keisuke Suganuma, Tamador E.E. Angara, Makoto Igarashi. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Farm Animals in West Kordofan, and Blue Nile states, Sudan. **The Journal of protozoology research**. 2020; 30: 21-26.
3. 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; 82(5): 571-575. PMID: 32224553

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. 2020 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、ウシに致死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、新規宿主赤血球改変分子を同定しました。（論文リスト 1）。本研究では、2 種類のバベシア・ボビス新規赤血球改変分子を発見し、そのうちの 1 つは、脳性バベシア症に繋がる、原虫感染赤血球の血管内皮細胞接着に関与することが明らかとなりました。今後更なる解析を行うことで、脳性バベシア症発症機構の全容が明らかとなり、バベシア・ボビス感染による重症化を防ぐ方法を開発することが期待されます。また、もう 1 つの分子は感染赤血球表面に存在し、原虫の栄養取り込みに関与することが推定され、同分子を標的としたピロプラズマ病治療薬の開発が期待されます。
- ・ 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。今年度は COVID-19 の影響により現地を訪問しての調査はできませんでした。その替わりとして、タイの共同研究者とオンラインにて連絡を取りながら疫学調査を継続し、定量的 PCR 法にてスイギュウにおけるマラリア原虫の経時的な感染率を解析しました。
- ・ 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* のキナーゼ及びシュ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、シュ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3）。さらに、以前診断に協力した、日本人のマラリア症例について報告を行いました（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

- ・ 第 89 回日本寄生虫学会（2020 年 5 月 30、31 日）誌上開催。大会事務局担当。
- ・ Philippine-NRCPD annual alumni and scientific meeting (2021 年 3 月 27 日) オンライン開催

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2020 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. Hassan Hakimi, Thomas J Templeton, Miako Sakaguchi, Junya Yamagishi, Shinya Miyazaki, Kazuhide Yahata, Takayuki Uchihashi, Shin-Ichiro Kawazu, Osamu Kaneko, **Masahito Asada***. Novel *Babesia bovis* exported proteins that modify properties of infected red blood cells. **PLOS Pathogens**. 2020; 16(10): e1008917. PMID: 33017449
2. Takashi Sugimoto, Kensuke Takahashi, Kosuke Matsui, **Masahito Asada**, Osamu Kaneko, Koya Ariyoshi. A Japanese man with malaria tests negative for fever after spending 6 months in rural Kenya. **Tropical Medicine and Health**. 2020; 48:52. PMID: 32587463
3. 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

総説

該当なし

著書

1. 永宗 喜三郎, 脇 司, 常盤 俊大, 島野 智之編. 寄生虫のはなし. 朝倉書店. 2020. 佐倉孝哉博士と共著でピロプラズマの項目を執筆.

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. リーシュマニア症. 長崎大学熱帯医学研究所 熱帯医学研修課程 2020 年 4 月 17 日 オンライン配信

8. 招待講演等

1. バベシアによる宿主赤血球改変. 岩手大学大学院獣医学研究科 学際領域特別講義 2020 年 11 月 16 日 オンライン配信

9. 獲得研究費

1. 令和元年度 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、令和元年度～令和 3 年度
2. 令和元年度 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、令和元年度～令和 3 年度
3. 農林水産省 日中二国間共同研究事業、マダニ媒介感染症の征圧に向けた日中協同アプローチ、分担、令和 2 年度～令和 6 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

1. 十勝毎日新聞 (2020 年 11 月 6 日) 牛の難病解明へ前進 帯畜大研究者分子 2 種発見.

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 山岸 潤也; 北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター : バベシア原虫宿主域決定因子の同定、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
2. Morakot Kaewthamasorn; Chulalongkorn University : Pathogenicity of the buffalo malaria parasites、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究

9. 共同研究成果報告書

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月27日

採択番号	2020-共同-1		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	マダニのコア共生細菌の介卵伝播機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なかお りょう 中尾 亮	北海道大学大学院獣医学研究院・准教授	
研究分担者	モハメド ムスタファ Mohamed Moustafa	北海道大学大学院獣医学研究院・外国人特別研究員	
	おがた しょうへい 小方 昌平	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	たや ゆりえ 田谷 友里恵	北海道大学獣医学部・学部学生	
	白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教	
研究期間	2020年4月1日 ～ 2021年3月31日		
目的・趣旨	マダニは様々な微生物を保有し、その一部は共生体としてマダニの生理活動にとって重要な役割を持つことが認識されつつある。研究代表者らはこれまで、国内外のマダニが保有する微生物叢プロファイルの同定を進め、マダニ集団内で広く維持されているコア共生微生物が存在することを突き止めた。特に、本邦のマダニでは <i>Coxiella</i> および <i>Spiroplasma</i> がコア共生微生物として特定された。これらのコア共生細菌がどの様にしてマダニ集団内で維持・伝播されているのかを理解することは、それぞれの共生菌の役割を知る上で必須である。そこで、本共同研究ではマダニより分離した <i>Spiroplasma</i> を用いて、その水平および垂直伝播様式の解明を目的とした。		
研究経過の概要	1. 所属研究機関での準備 シュルツェマダニ (<i>Ixodes persulcatus</i>) より分離された <i>Spiroplasma</i> 分離株をマダニ細胞 (ISE6) に接種した。培養上清から菌体を精製し、帯広畜産大学実験施設へ持参し実験に用いた。 2. 帯広畜産大学での実験 PBS 接種群、<i>Spiroplasma</i> 接種群 (低濃度菌体接種群、高濃度菌体接種群) の3群の比較群を準備した。各群 25 個体のフタトゲチマダニ (原虫研累代飼育株) 成ダニに対し、マイクロインジェクションにより PBS または <i>Spiroplasma</i> を接種した。被接種マダニはウサギへの吸血試験に供し、産卵期まで飼育して採卵した。また、吸血前、飽血時、飽血後 2 日、飽血後 4 日に各群のマダニ (それぞれ5個体) を解剖し、卵巣を摘出した。 3. 所属研究機関での解析 マダニ卵、産卵後のマダニ、吸血に試験に供したウサギ血液から DNA を抽出し、<i>Spiroplasma</i> の検出を特異的 PCR により試みた。		

研究成果の
概 要

【マダニ吸血源動物への *Spiroplasma* 伝播について】

Spiroplasma を接種したマダニの吸血試験に用いたウサギから血液を採取し DNA を抽出した。*Spiroplasma* 特異的 PCR を用いて試験したが、いずれのウサギ個体からも *Spiroplasma* は検出されなかった。このことから、マダニ吸血を介した吸血源動物への *Spiroplasma* の水平伝播の可能性を示す知見は得られなかった。

【*Spiroplasma* の介卵伝播について】

Spiroplasma 接種個体より得られた卵から DNA を抽出し、同様に PCR により *Spiroplasma* の検出を試みたが、試験に供したすべての卵で *Spiroplasma* の伝播が確認できなかった。また、産卵終了後の雌個体より DNA を抽出したが、*Spiroplasma* を検出できなかった。以上のことから、今回用いた *Spiroplasma* 株では、産卵後までに何かの機構でマダニ体内より排除されたことが推察された。

【まとめと今後の方針】

最近の研究代表者らの調査で、本邦の野外で採集されるマダニ 20 種約 700 個体を用いて *Spiroplasma* の保有状況を調べたところ、*Spiroplasma mirum* 近縁種と *Spiroplasma ixodetis* 近縁種の大きく二つのグループが分布することがわかった(図1)。今年度の共同研究では初めて、幅広いマダニ種から検出される *S. ixodetis* 近縁種分離株を用いて接種試験を行った。しかしながら、*S. mirum* 近縁種と同様に、抗生物質無添加条件では *Spiroplasma* の介卵伝播を観察することはできなかった。今後は、抗生物質処理によりマダニ細菌叢を攪乱した後に、*S. ixodetis* 近縁種を接種することで、*S. mirum* 近縁種と同様の知見、すなわち水平伝播した *Spiroplasma* が介卵伝播するかどうかの検証を行いたい。

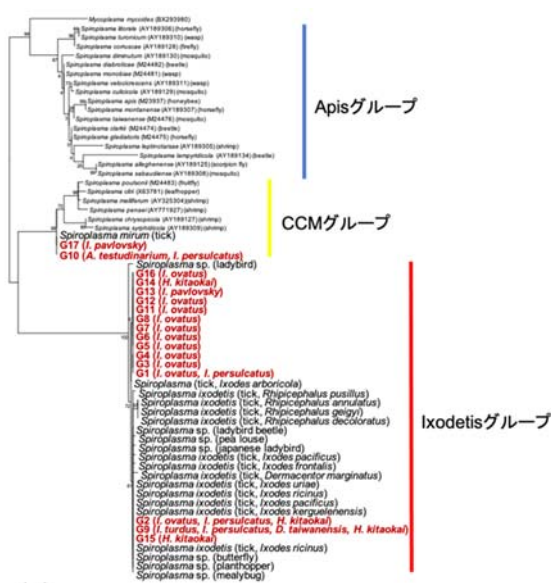


図1. 本邦のマダニから検出される *Spiroplasma* の多様性

表1. これまでの *Spiroplasma* 接種実験に用いた菌株と伝播試験の結果

菌株	抗生物質処理	介卵伝播	幼ダニへの伝播	実施年度
<i>Spiroplasma mirum</i> 近縁株	無	×	×	2018年度共同研究
<i>Spiroplasma mirum</i> 近縁株	有	○	○	2017年度共同研究
<i>Spiroplasma ixodetis</i> 近縁株	無	×	×	2020年度共同研究

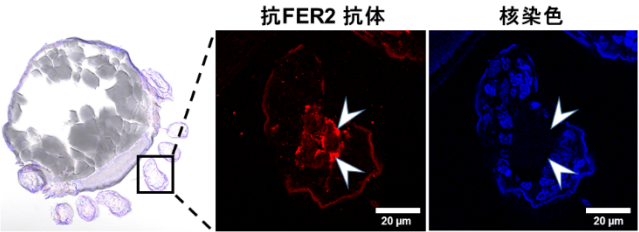
一方で、上述の調査では、各マダニ種の *Spiroplasma* 保有率も算出されており、ヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) が約 80% という高い *Spiroplasma* 保有率を有することがわかった。そこで、今後野外で採集したヤマトマダニを用いて、今回の共同研究で計画した介卵伝播機序の解析、すなわち吸血開始直後から経時的にマダニ卵巣を摘出して、FISH 法および遺伝子発現解析により、介卵のタイミングとその機構を明らかにしたい。

研究成果の 発 表	なし
--------------	----

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月10日

採択番号	2020-共同-2		
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フェリチンの局在と鉄の動態		
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			
	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	2020年4月1日 ～ 2021年3月31日		
目的・趣旨	マダニにとって必須の生存基盤は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がマダニ体内に放出される。鉄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鉄は卵にも影響し、その鉄代謝の制御にはフェリチンが関与している可能性が考えられる。我々はその鉄代謝の制御を担う分子として、フェリチンに着目し、卵形成および胚発生におけるフェリチンの局在を、胚発生のステージごとに検証した。また、鉄濃度を測定することによって、胚発生におけるフェリチンの局在と鉄の動態との相互関係を明らかにした。		
研究経過の概要	【背景】マダニによる感染症を制御するためには、マダニの生体機能を理解することが不可欠である。しかし、マダニ胚発生における鉄代謝の制御を担うフェリチン(FER)などの発現動態は不明な点が多い。そこで本共同研究では、胚発生における鉄イオンの動態と分泌型 FER2 タンパク質の局在を調べることによって、胚発生における両者の機能を明らかにすることを目的とした。 【材料と方法】Quantichrome™ iron assay kit を用いて、ホモジナイズした各経過日の卵(Day 1、Day 5、Day 10、Day 15、Day 20)に含まれる二価鉄イオンならびに三価鉄イオンの濃度を測定した。また、胚発生における各経過日の卵の凍結切片を作製した後、間接蛍光抗体法を実施して、FER2 の局在を観察した。		

研究成果の 概 要	【結果】全ての経過日の卵において、胚に含まれる二価鉄イオンならびに三価鉄イオンの割合に有意な差は認められなかった。また、間接蛍光抗体法によって FER2 の発現を観察したところ、すべての経過日の卵において、胚細胞の細胞質内に蛍光がみられ、特に Day 20 において、胚の脚中心部分に強い蛍光が観察された。 【考察】卵に含まれる鉄濃度は低く、二価鉄イオンならびに三価鉄イオンの割合に変化がみられなかったことから、胚発生の過程でフェントン反応による酸化ストレスが起きている可能性は低く、細胞内型 FER1 の翻訳が鉄制御タンパク質によって制御されている可能性が示唆された。間接蛍光抗体法の結果より、FER2 は雌成ダニから卵に移行し、胚発生後期になると胚細胞で FER2 合成後、分泌されることが予想された(右図参照)。 FER2は20日目の胚において脚の中心部に強い蛍光が観察された  20日目 FER2は脚の中心部に分泌されて、胚発生に必要な鉄を輸送している なお、これらの研究成果は、メールでのやりとりに基づき、共同研究を進めることができた。
研究成果の 発 表	【学会発表】 島崎 慧, Emmanuel Pacia Hernandez, 新原博子, 白藤(梅宮)梨可, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニ胚発生における鉄イオンの動態と抗酸化分子の局在, 第 163 回日本獣医学会学術集会, 山口大学, 2020 年 9 月(山口)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月17日

採択番号	2020-共同-3		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	トキソプラズマ感染による宿主・ミトコンドリアの形態変化およびその生理機能への影響		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	こしば たくみ 小柴 琢己	福岡大学 理学部化学科・教授	
研究分担者	にし しょうへい 西 翔平	福岡大学 大学院理学研究科・大学院生	
	西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2020年4月1日 ～ 2021年3月31日		
目的・趣旨	細胞内におけるエネルギー産生工場(ミトコンドリア)は、真核生物の代謝系を中心に生命機能の維持には不可欠なオルガネラである。近年、ミトコンドリアの新たな役割として抗ウイルス自然免疫におけるプラットフォームとして機能していることが明らかになってきた。代表者は、これまでミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫について一貫した研究を進め、その生理的な重要性を世界に先駆けて明らかにしてきた(<i>Sci. Signal.</i> 2009, 2011; <i>PNAS</i> 2013; <i>Nat. Commun.</i> 2014, 2019; <i>Sci. Rep.</i> 2017; <i>iScience</i> 2019; <i>JBC</i> 2020)。 本研究の目的は、トキソプラズマ原虫に感染した宿主(細胞)内でミトコンドリアがどのような振る舞いをするのか、その際の新たな相互作用についての学術的知見を得ることにある。これまで抗ウイルス自然免疫との共通点や相違点を発掘することにある。そこで、本研究期間では、トキソプラズマが感染細胞内で分泌する GRA ファミリータンパク質群のミトコンドリアへの局在に関する生化学的な解析を行った。		

研究経過の概要	先行研究において、トキソプラズマ感染細胞内において一部のミトコンドリアがタキゾイド周辺に集まり、特異的な相互作用が行われている様子が顕微鏡像により確認された (PLoS Biol. 2014)。その生理的な意義を明らかにするために、以下のような実験を行った。 1) 西川研究室にて作製されたトキソプラズマゲノムの相補遺伝子 (GRA ファミリー) をクローニングした発現ライブラリー (FLAG タグ付加) を哺乳動物細胞 (HeLa) にトランスフェクションし、発現細胞内のミトコンドリア形態を免疫染色法 (抗 COX IV) にて観察した。 2) 上記、プラスミドを哺乳動物細胞 (HEK293) にもトランスフェクションし、発現細胞よりミトコンドリア分画を行い、ミトコンドリア画分をウエスタンブロット法 (抗 FLAG) により解析した。 3) 上記の実験により、ミトコンドリアへの局在が示された GRA タンパク質の安定発現株 (HEK293) を樹立した。
研究成果の概要	西川研究室にて作製された計 17 種類の GRA 遺伝子 (FLAG タグ付加) を HeLa 細胞に導入し、免疫染色法により、発現した各 GRA タンパク質の細胞内局在解析を行った。その結果、GRA8 及び GRA25 において綺麗なミトコンドリアへの局在が確認できた。 次に、GRA8 及び GRA25 の発現プラスミドをそれぞれ HEK293 細胞へトランスフェクションし、その後に細胞からミトコンドリア分画を行い、得られたミトコンドリア画分をウエスタンブロット法 (抗 FLAG) により解析した。その結果、GRA25 においては非常に高い割合でミトコンドリア画分に局在していることが明らかになった一方で、GRA8 は発現量がそれほど多くはなく検出されたタンパク質も比較的その多くが細胞質中に存在していた。以上の結果から、トキソプラズマの GRA25 は宿主内ミトコンドリアと高い親和性を示すことが示唆された。 次に、GRA25 の詳細なミトコンドリア局在様式を調べるために、このタンパク質の安定発現株を HEK293 細胞にて樹立した。樹立した安定発現株は、GRA25 を発現している以外は特に大きな細胞への影響は見られずに、成長速度もコントロール細胞と大差はなかった。そこで、この安定発現株を用いて GRA25 と相互作用する宿主細胞内タンパク質を調べた。実験方法としては、免疫沈降法を用いて行い、細胞抽出液に抗 FLAG 抗体を添加し、Protein A アガロース樹脂にて共免疫沈降を確認した。その結果、複数のミトコンドリア外膜タンパク質が沈殿していることがプロテオーム解析により明らかになった。今後、これらの相互作用候補因子を個別に詳しく調べる予定である。
研究成果の発表	該当年度は、特になし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 28 日

採択番号	2020-共同-4		
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	Establishment transgenic manipulation of <i>Trypanosoma equiperdum</i> using of CRISPR/Cas9 and RNAi		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Mark Carrington	Department of Biochemistry, University of Cambridge, Professor	
研究分担者	Oliva Macleod	Department of Biochemistry, University of Cambridge, Post-Doctoral Research Assistant	
	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・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<i>Trypanosoma equiperdum</i> は他種トリパノソーマとは異なり交尾により感染伝播する。さらに感染哺乳類体内で血中ではほとんど検出されず、生殖器粘膜や皮膚など組織に高い親和性を示す。そこで本トリパノソーマを対象として、<i>T. equiperdum</i> の特異な寄生動態に関わる遺伝子の機能解析を試みた。本研究では <i>T. equiperdum</i> の培養系を有する原虫研先端予防治療学分野に、研究代表者が CRISPR/Cas9 をもちいた遺伝子組換え原トリパノソーマ作製用プラスミドの構築と提供を行う。研究分担者は分与プラスミドをもちいた遺伝子組換え <i>T. equiperdum</i> の樹立を目指した。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開および遺伝子組換えトリパノソーマ作製用プラスミド提供後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者はトリパノソーマの維持に努めた。		
研究成果の概要	関連研究の成果として、<i>T. equiperdum</i> での遺伝子組換え原虫の作製を目指して、候補遺伝子を検討した。結果、同原虫で特異的に発現する数種類の遺伝子を特定することが出来た。現在、それらの中から遺伝子組換え原虫を用いた機能解析を行う標的遺伝子の検討を進めている。		
研究成果の発表	特になし。		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月26日

採択番号	2020-共同-5		
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	またたに たつり 正谷 達膳	岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 人獣共通感染症学 研究室・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	2020年4月1日 ～ 2021年3月31日		
目的・趣旨	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。		
研究経過の概要	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糖脂質の GM3 が <i>Toxoplasma gondi</i> の細胞膜には全く存在せず、inner membrane complex の外葉に局在することを明らかにした(図1の金コロイド,研究成果の1)。本研究では、単離精製した <i>T. 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。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う予定にしている。		



研究成果の 概 要	我々は脂質の超微局在を明らかにすることが、膜脂質の機能を解明するために必須であると考え、そのための方法開発に注力してきた。その結果、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法(QF-FRL: Quick Freezing & Freeze-fracture Labeling)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た。本研究では、この QF-FRL 法を用いることにより、脂質ラフトの主成分である糖脂質の GM1 および GM3 の微細分布を明らかにし、<i>T. gondii</i> における脂質ラフトの機能関与の解明を目指した。本来、哺乳類細胞では、脂質ラフトは細胞膜の外葉に存在するが、<i>T. gondii</i> においては、糖脂質の GM3 は細胞膜に存在せず、細胞内の inner membrane complex (IMC)の外葉に局在することが明らかとなった(図1)。このことは、<i>T. gondii</i> の運動に関与するグライドソームが IMC に局在し、その局在には IMC のラフトドメインが重要な役割を担うことが示唆されており、今回明らかになった、ラフトの主成分である GM3 が細胞膜でなく、IMC の外葉に存在することとよく一致する。一方、ヒト線維芽細胞 HFF-1 に感染した <i>T. gondii</i> においては、もう一つの GM1 は全く局在していなかった。また、HFF-1 細胞の細胞膜においては、GM1 は発現せず、GM3 のみが発現していた。一方、マウス線維芽細胞 MF においては、細胞膜に GM1 と GM3 の両方が発現していた。MF 細胞に感染した <i>T. gondii</i> においては、IMC の外葉には、GM3 が局在すると同時に、少量ながら GM1 も局在することが明らかとなった。これらのことから、哺乳類細胞に感染した <i>T. gondii</i> において、糖脂質 GM1 および GM3 は感染宿主細胞から搾取していることが示唆された。 本研究では、単離精製した <i>T. 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。 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)
研究成果の 発 表	1. Rikako Konishi, Yuna Kurokawa, Yuna Kurokawa, Kanna Tomioku, Tatsunori Masatani, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita. Raft microdomains localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living <i>Toxoplasma gondii</i>. Eur. J. Cell Biol. 100, 151149, 2021. 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おける脂質分子の微細局在. 第93回 日本生化学大会、横浜(web 開催)、2020 年 9 月 14 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 3 年 5 月 28 日

採択番号	2020-共同-6		
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	Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Jack Sunter	Oxford Brookes University, David Fell Research Fellow	
研究分担者			
	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・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<i>Trypanosoma congolense</i> を対象として、トリパノソーマ原虫の哺乳類およびベクター組織移行動態の解析を目的とする。本研究では <i>T. congolense</i> の全ステージ培養系を有する原虫研先端予防治療学分野に、研究代表者が遺伝子組換え原トリパノソーマ作製用プラスミドの構築と提供を行う。研究分担者は分与プラスミドをもちいた遺伝子組換え <i>T. congolense</i> の樹立を目指す。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開および遺伝子組換えトリパノソーマ作製用プラスミド提供後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者はトリパノソーマの維持に努めた。		
研究成果の概要	関連研究の成果として、<i>T. congolense</i> での遺伝子組換え原虫の作製を目指して、候補遺伝子を検討した。結果、同原虫で特異的に発現する数種類の遺伝子を特定することが出来た。現在、それらの中から、遺伝子組換え原虫作製の標的とする遺伝子の特定を進め、同時に使用するプラスミドコンストラクトの設計も予定している。		
研究成果の発表	特になし。		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 30 日

採択番号	2020-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	
	あべ ゆういち 阿部 優一	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	
	いたに けい 井谷 慧	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	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	遺伝子治療用ベクターとしてすでに臨床試験が行われているアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて熱帯熱マラリア原虫の抗原遺伝子 (Pfs25 および PfCSP) を導入した組換え AAV を作製し、感染防御効果と伝搬阻止効果の両者を誘導可能なマラリアワクチンを開発することを目的とした。 マウスモデルによりマラリア伝搬阻止実験を行い、ワクチンにより伝播阻止効果を誘導できるか検証することを具体的な目的とした。前年度までの共同研究によって感染防御効果を明らかにした 1 型 AAV (AAV1) ならびに AAV8 に加え、新たに作出した AAV5 を基盤としたワクチンについても評価を行った。		
研究経過の概要	マラリアチャレンジ感染実験 開発したプライム・ブースト免疫法を利用し、AAV1 及び AAV5 を基盤としたマラリアワクチンの感染防御効果を検証した。免疫したマウスに 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。 マラリア伝搬阻止実験 ワクチンを免疫したマウスの血清を原虫病研究センターに持参し蚊への吸血試験を行う予定であったが、COVID-19 の影響を考慮し、金沢大学でマウスに直接蚊を吸血させる伝搬阻止実験 (Direct feeding assay) に変更し検証された。なお、蚊の育成と本実験に関連する実験機器については本共同研究費より拠出した。熱帯熱マラリア原虫に対する伝搬阻止効果については、英国研究協力者 Dr. Blagborough に血清を送付し、感染者血液を用いた Membrane feeding assay によって検証された。		

研究成果の 概 要	マラリアチャレンジ感染実験の結果 AAV1 及び AAV5 を基盤としたマラリア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の結果、いずれのワクチンでも 70%～100%の感染防御効果を示した。 抗 PfCSP 抗体価はチャレンジ前(免疫 1 ヶ月後)で、AAV1 免疫群では約 272 万倍、ならびに、AAV5 免疫群では約 236 万倍であり、共に上昇した。 マラリア伝搬阻止実験の結果 (i) Direct feeding assay: 赤血球期の Pfs25 発現型組換え原虫 PbPfs25DR3 を AAV1 及び AAV5 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 AAV1 では 98%以上、AAV5 では 95%以上であり、蚊への伝搬を強力に抑制した。各蚊におけるオオシスト形成数をカウントした結果、いずれの場合でも平均オオシスト数は 99.99%抑制された。抗 Pfs25 抗体価は、AAV1 免疫群では約 72 万倍、AAV5 免疫群では約 46 万倍であった。 (ii) Membrane feeding assay: 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)を英国に送付し、ブルキナファソの熱帯熱マラリア原虫感染血を用いて伝搬阻止効果を検証した。血清対感染血比の各希釈率(1:5、1:10 及び 1:100)に依存した伝搬阻止効果(100%～88%)が示された。各蚊において形成されたオオシスト数も希釈率に依存して 100%～66%の抑制効果が確認された。 展 望 AAV を基盤とした熱帯熱マラリア2価ワクチンにおいては、接種された個体を感染から防御できるだけでなく、感染者からハマダラカへの熱帯熱マラリア原虫の伝搬を防げることが立証された。このことから、スポロゾイト期の抗原変異によって感染防御効果が減少した場合でも、感染者から地域住人への伝搬を阻止することが可能と考えられる。本ワクチンの臨床応用に向けた開発研究を継続して行う予定である。
研究成果の 発 表	【原著論文】 1. Iyori M., Ogawa R., Emran TB., Tanbo S, Yoshida S. Characterization of the gene expression patterns in the murine liver following intramuscular administration of baculovirus. <i>Gene Expression</i>, vol.20, 2020.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 13th, 2021

Project no: 2020-joint-8

1. Principal investigator

Name: Morakot KAEWTHAMASORN

Position: associate professor

Affiliation: Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

2. Project title:

Pathogenicity of the buffalo malaria parasites

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Masahito ASADA

Position: associate professor

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

From 4/1/2020 to 03/31/2021 (The research project is continuing in FY2022)

5. Purposes and objectives

This study aimed to study pathogenicity of *Plasmodium bubalis* infection in buffaloes and its mosquito vector.

6. Outline of research process

A total of 110 blood samples were collected from the jugular vein of buffaloes and kept in ACD solution for further blood smear examination and PCR diagnosis. Among these, 45 samples were collected during June to July of 2020 from Chachoengsao and 65 samples were from Nan province in December 2020. Nested PCRs using *Plasmodium* cytochrome b specific primers DW2-DW4 were performed to investigate the presence of *Plasmodium bubalis* in the buffalo's blood samples. At least two thin blood smears per buffalo were made on-site, fixed with methanol, and stained by 10% (v/v) Giemsa. Co-infection with piroplasms and *Anaplasma* spp. was evaluated using PCR assays, followed by sequencing. Body temperature was monitored twice a day in the morning and evening for 14 consecutive days. Blood sample collection was conducted daily for 14 consecutive days and continued every week until 56 days in Chachoengsao Buffalo farm (two infected buffaloes). Blood samples from infected buffaloes were examined by nested PCR and qPCR for each day. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using PpubCox1-F32 and PpubCox1-4B3 primers. Parasitemia levels were counted from thin blood smears under a microscope. We collected 55 female anopheline mosquitoes

from infected buffaloes' barn using either CDC light traps and aspirators for 14 nights. Female anopheline mosquitoes were initially identified based on morphology according to the mosquito identification key in Thailand (Rattanarithikul, 2006). Species of anopheline mosquitoes was confirmed by PCR and sequencing using cytochrome c oxidase I (COX1) and internal transcribed spacer 2 (ITS2) genes. Nested PCRs targeting cytochrome b, COX1, and 18S rRNA genes of *Plasmodium* genus was carried out to detect the presence of malaria parasite DNA from mosquitoes' pool samples. The positive PCR products were further subjected to sequencing.

7. Outline of research achievements

Natural infection of *P. bubalis* was detected in 2 out of 45 buffaloes (4%) from Chachoengsao (buffalo names hereafter referred to as Muk and Spa). A total of 6 out of 65 (9%) buffaloes from Nan province were PCR positive. No follow up was made for malaria infected buffaloes in Nan due to logistic reason. Two malaria infected buffaloes in Chachoengsao provinces were observed for 14 consecutive days. Afterwards, the infected buffaloes were followed up on a weekly basis until day 56. Buffalo Muk was a 6 years and 9 months old female with estimated body condition score (BCS) of 2 (1=skinny, 5= fat) and approximately 300 Kg body weight. Spa was a 8 years and 8 months old female with 4 months of her pregnancy (BCS = 2.5 and approx. 350 Kg body weight). No fever or other clinical signs were observed in both infected buffaloes within the entire observation period. Both buffaloes were clinically healthy during observation period and body temperature values were in the normal ranges. From day 1 to day 49, the malaria parasite in buffalo Spa was PCR positive and remained undetectable by PCR until day 56. *P. bubalis* in buffalo Muk was detected from day 1 to day 35, continuously and remained undetectable by PCR at days 42, 49, and 56. Parasitemia levels were counted on every day basis. We observed low parasitemia (<0.01-0.10%) in both infected buffaloes for the entire observation period. The highest parasitemia level was observed at day 9 at 0.09% and 0.1% in Muk and Spa, respectively (see Figures 1 and 2). It should be noted that only trophozoite stage was found in the thin blood smears during the observation days. Neither gametocyte nor schizont was observed. Co-infection with *Theileria* sp. was detected in buffalo Spa, while *Theileria* sp. and *Anaplasma marginale* were detected in buffalo Muk. Real-time quantitative PCR results showed that number of malaria parasite was from 26 to 140,506 copy per microlitre of genomic DNA in buffalo Spa and 14 to 3,516 copy per microlitre in buffalo Muk with standard curved $R^2 = 0.9656$. The highest copy number of malaria parasite was measured at day 6 and day 8 for Spa and Muk, respectively (see Figures 3 and 4). Female anopheline mosquitoes were identified as *Anopheles barbirostris* (27/55 or 49.10%), *A. vagus* (13/55 or 23.64%), *A. peditaeniatus* (12/55 or 21.81%), *A. varuna* 1/55 or 1.81%), and unidentifiable anopheline mosquitoes in Maculatus group (probably *A. stephensi*) (2/55 or 3.64%). It is important to note that anopheline mosquitoes in Maculatus group has only 91% similarity to *A. stephensi* according to a BLASTn search. We detected *Plasmodium* positive results in 3 pools of mosquitoes based on cytb, cox1, and 18S rRNA genes. Sequencing results of cytb, cox1 genes showed 98% similarity to *P. bubalis*, while 18S rRNA gene showed 90% match with *P. falciparum*. *P. bubalis* DNA was detected in *A. barbirostris* mosquitoes (Table 1).

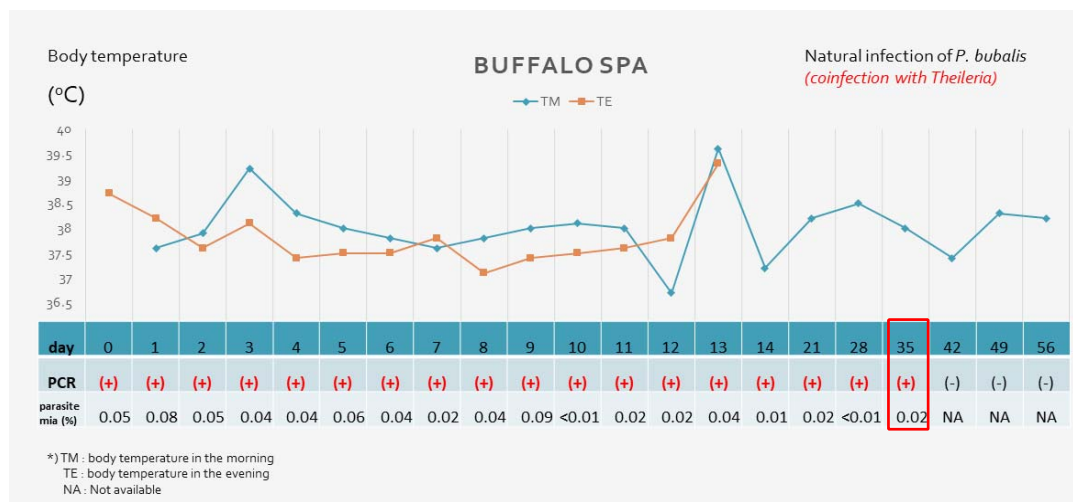


Figure 1. Observation of body temperature and positivity of malaria parasites in buffalo Spa. Red box indicate last day of PCR positive for malaria parasite during the observation period.

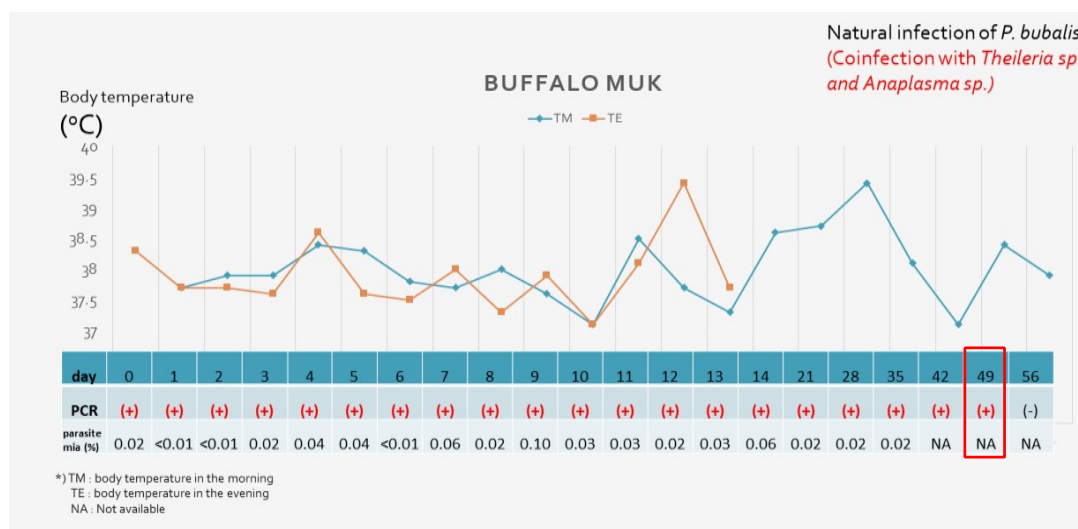


Figure 2. Observation of body temperature and positivity of malaria parasites in buffalo Muk. Red box indicate last day of PCR positive for malaria parasite during the observation period.

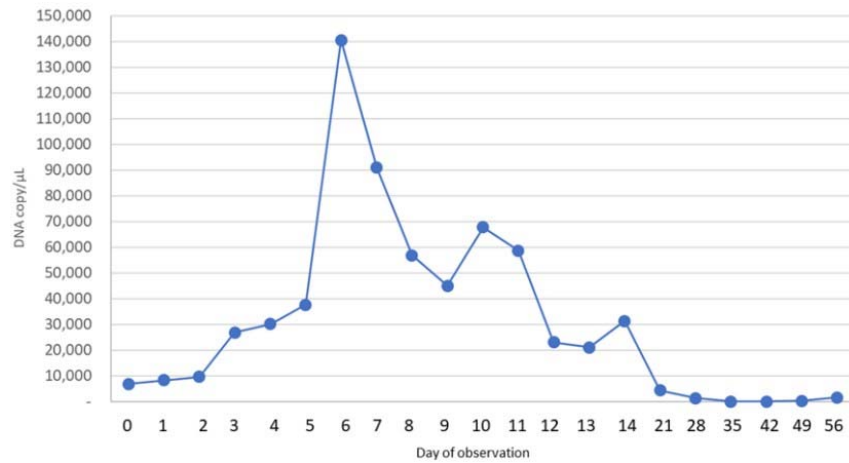


Figure 3. Malaria parasite's copy nuber in buffalo (Spa) during observation period

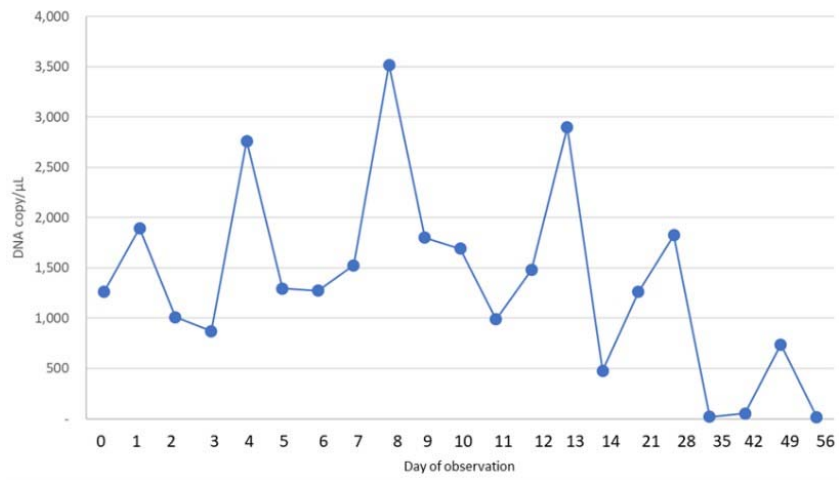


Figure 4. Malaria parasite's copy nuber in buffalo (Muk) during observation period

Table 1. Species confirmation of anopheline mosquitoes and *Plasmodium bubalis* detection in infected mosquitoes

No. of mosquitoes	Sample ID	BLASTn search result		Plasmodium positive by PCR		
		Cox1	ITS2	cytb	cox1	18S rRNA
3	THMos_Buff_BarP2	<i>A. barbirostris</i> *	<i>A. barbirostris</i> **	+	+	+
2	THMos_Buff_BarP4	NA	<i>A. barbirostris</i> **	+	+	-
3	THMos_Buff_UmbP4	NA	NA	+	-	-
1	TH_Mos_Buff_2	<i>A. barbirostris</i> *	<i>A. barbirostris</i> **	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_5	<i>A. vagus</i> *	<i>A. vagus</i> *	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_7	<i>A. barbirostris</i> *	NA	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_8	<i>A. varuna</i> *	<i>A. varuna</i> *	-	-	-
3	TH_Mos_Buff_Bar_P3	NA	NA	-	-	-
3	TH_Mos_Buff_Pyr_P1	<i>A. vagus</i> *	<i>A. vagus</i> *	-	-	-
2	TH_Mos_Buff_Pyr_P2	NA	NA	-	-	-
2	TH_Mos_Buff_Pyr_P3	NA	NA	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_Cul1	<i>A. barbirostris</i> *	NA	-	-	-
3	TH_Mos_Buff_Cul_P2	NA	NA	-	-	-
3	TH_Mos_Buff_Cul_P3	NA	NA	-	-	-
3	TH_Mos_Buff_Cul_P4	NA	NA	-	-	-
2	TH_Mos_Buff_Cul2	NA	NA	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_Umb1	<i>A. peditaeniatus</i> *	<i>A. peditaeniatus</i> *	-	-	-
3	TH_Mos_Buff_Umb_P2	NA	NA	-	-	-
3	TH_Mos_Buff_Umb_P3	NA	NA	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_Umb5	NA	NA	-	-	-
2	TH_Mos_Buff_TesP1	<i>A. vagus</i> *	<i>A. vagus</i> *	-	-	-
2	TH_Mos_Buff_NeocP1	<i>A. stephensi</i> *	NA	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_Koc1	<i>A. vagus</i> *	<i>A. vagus</i> *	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_Aitk1	<i>A. barbirostris</i> *	NA	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_Lin1	<i>A. barbirostris</i> *	NA	-	-	-
2	TH_Mos_Buff_NeomP1	<i>A. vagus</i> *	<i>A. vagus</i> *	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_Myzom1	<i>A. peditaeniatus</i> *	<i>A. peditaeniatus</i> *	-	-	-
1	TH_Mos_Buff_Myzor1	<i>A. barbirostris</i> *	NA	-	-	-
2	TH_Mos_Buff_FunP2	<i>A. barbirostris</i> *	NA	-	-	-
Total 55						

* Sequencing result, ** PCR result with specific primer, NA: Not available/not sequenced

8. Publication of research achievements

None (manuscript in preparation).

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 28 日

採択番号	2020-共同-9		
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 寛	獨協医科大学熱帯病寄生虫病学講座・教授・研究の統括および サルマラリア感染実験の実施	
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・遺伝子組換え原虫 株の作製および保存、サルマラリア感染実験の実施	
	おかもと むねひろ 岡本 宗裕	京都大学霊長類研究所・教授・実験用サルを選定、導入、サル マラリア感染実験の実施	
	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・培養肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 感染実験	
研究期間	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	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、肝臓内で休眠体を形成する。休眠体は肝細胞内で数日～数年間経過したのちに活性化し、再増殖を繰り返すことが知られている。したがって、三日熱マラリアの撲滅には、休眠体に対する適切な処置が重要なカギとなる。しかし Pv の休眠体は、培養による再現が難しく、一般的な動物実験に使われるネズミマラリア原虫でも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 のゲノム配列と 90%以上の相同性があり、休眠体の形成や赤内期の増殖サイクル等、生物学的性状も極めて類似している。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(Parasitol Int,76,2020,102096)。本研究では先行研究をさらに発展させ、肝臓休眠体の休眠期および再活性期に必須の分子メカニズムを明らかにすることを目的に、Pcy 可視化株の樹立を試みた。		

研究経過の概要	本研究は 2019 年度からの継続研究のため、前年度に DNA コンストラクトの設計と作製を完了しており、実験用アカゲザル 4 頭も前もって実験施設(基盤研・霊長類医学科学研究センター、茨城県つくば市)へ導入済みであった。実験用アカゲザル No.1(No.R1)に対して、凍結保存した Pcy B 株(ATCC No.3029)を静脈内接種し、接種 15 日後、感染血液の採血を実施した。採取した感染血液はインキュベータ内で 12 時間振とう培養し、原虫の赤血球内ステージを早期栄養体から分裂体へ発育させたうえで、GFP,ルシフェラーゼおよびピリメサミン耐性遺伝子を電気穿孔法により導入した。遺伝子導入した Pcy は、直ちにサル No.R2 に静脈内接種し、接種 4 日後から 15 日間ピリメサミンを経鼻投与した。接種 20 日後以降、No.R2 の末梢血液中に GFP シグナルを有した原虫の増殖がみられ、これらを Pcy 遺伝子導入株 (Pcy, GFP::Luci 株)として凍結保存した。さらに Pcy, GFP::Luci 株感染血液を人工膜吸血法でハマダラカに吸血させ、媒介蚊体内における原虫の GFP シグナルを観察した。
研究成果の概要	1)赤血球内ステージにおける GFP シグナル: 早期栄養体には細胞質全域に強い GFP シグナルが認められた(別紙図 1-A)。また、さらに発育した後期栄養体や分裂体においても、一定の蛍光シグナルが検出された(別紙図 1-B)。 2)媒介蚊内ステージにおける GFP シグナル: Pcy, GFP::Luci 株を人工膜吸血法でハマダラカに吸血させて 15 日後、蚊の中腸外側には、多数のオーシストが形成されており、いずれも強い GFP シグナルが認められた(別紙図 2-A)。吸血 22 日後、蚊の唾液腺内にスポロゾイトの形成が認められ、個々のスポロゾイトに強い GFP シグナルが認められた(別紙図 2-B)。 3) Pcy, GFP::Luci 株の感染性と増殖性: Pcy, GFP::Luci 株のスポロゾイト 5×10^5 個を、未感染の実験用サルの静脈内へ接種した。接種 9 日後より抹消血液中に原虫が出現し、接種 14 日後には寄生率約 2%に達した。これにより、本株が遺伝子導入前の株(野生株)と同様の感染性を有し、宿主の肝細胞内および赤血球内で増殖することが明らかとなった。
研究成果の発表	荒木球沙、川合 寛、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝 一、案浦 健: 電子顕微鏡 3D 構造解析を用いたマラリア原虫のオーシスト期・核分裂様式の解明、第 90 回日本寄生虫学会大会、2021 年 4 月、奈良市

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）

図1、Pcy, GFP::Luci 株における赤血球内ステージのGFPシグナル（CLMによる解析像）

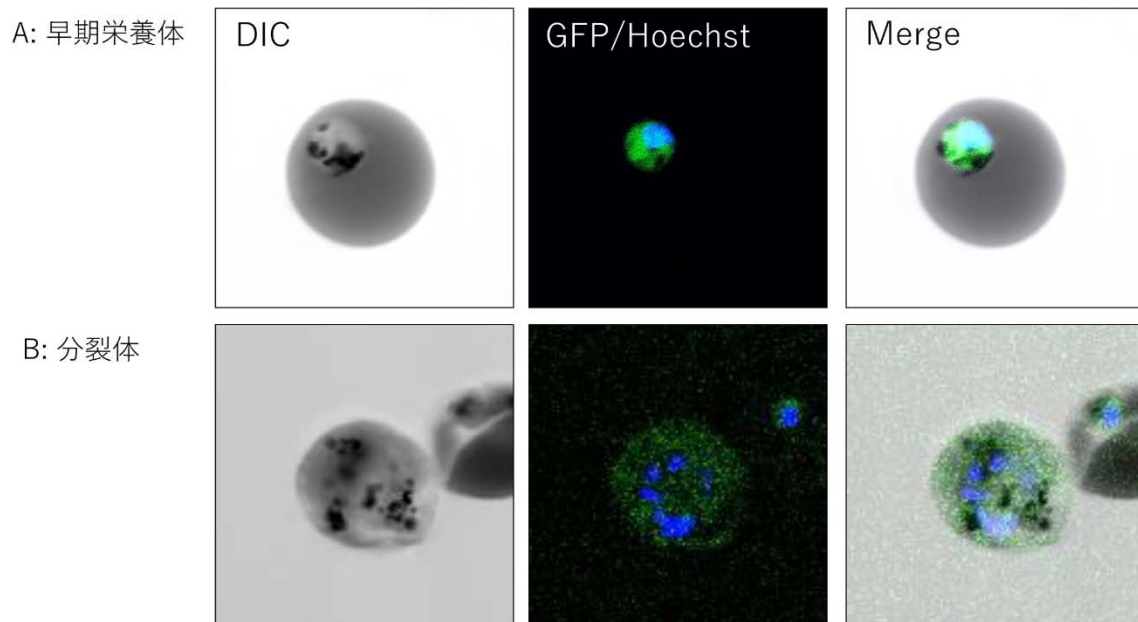
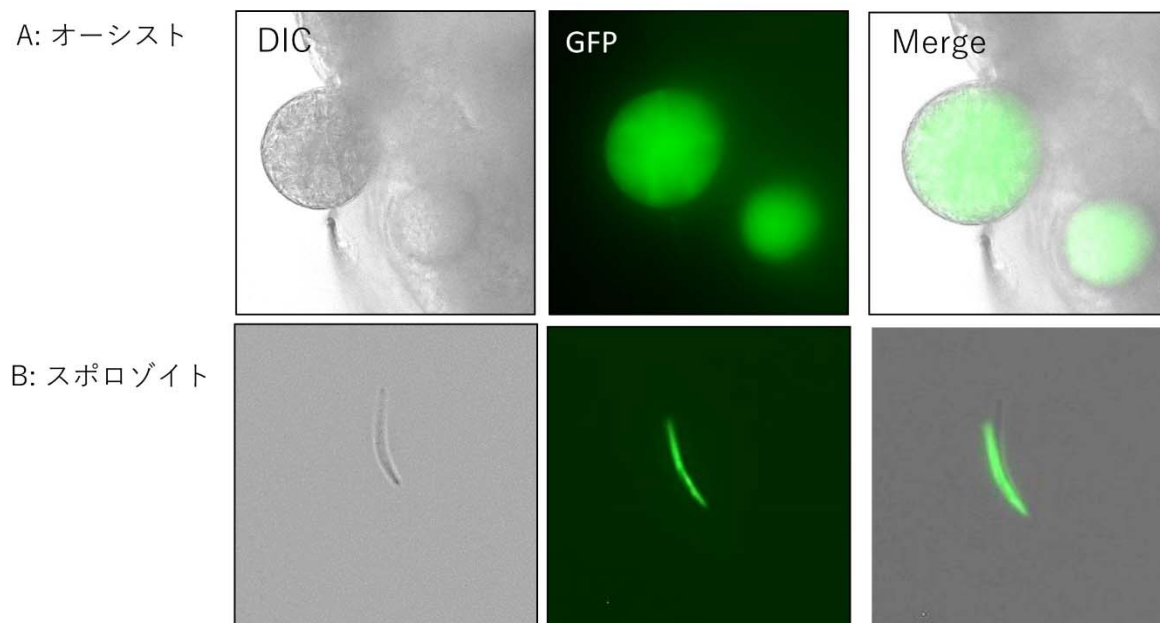


図2、Pcy, GFP::Luci 株における媒介蚊内ステージのGFPシグナル（蛍光顕微鏡像）



帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月7日

採択番号	2020-共同-10		
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	酵母ワンハイブリッド法による トキソプラズマステージ変換関連転写因子の同定と機能解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	まさたに たつのり 正谷 達磨	鹿児島大学共同獣医学部附属越境性疾病制御研究センター・ 准教授(現 岐阜大学応用生物科学部・准教授) 実験の総括と実施	
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	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トキソプラズマ(<i>Toxoplasma gondii</i>)とは、ネコ科動物を終宿主とし、ヒトや他の動物を中間宿主とする人獣共通感染原虫である。<i>T.gondii</i>は、生体に初感染した時にタキゾイトと呼ばれる急速に増殖する虫体として侵入したのちブラディゾイトと呼ばれる緩慢に増殖する虫体にステージ変換する。ブラディゾイトはシストと呼ばれる壁によって免疫を回避し、宿主が生涯を終えるまで体内に潜伏する。玄学南教授及び北大・人獣センター・山岸准教授は、トキソプラズマ原虫遺伝子の各ステージにおけるトランスクリプトーム解析を行い、約 200 種類の原虫遺伝子がブラディゾイト期にのみ強く発現することを見いだした。さらにそれら遺伝子の upstream に存在する共通配列を解析した結果、ブラディゾイト期シスエレメント配列(Bz-cis)と予測される 6 塩基の共通配列を発見している。そこで申請者らは、①タキゾイト期の原虫に免疫応答などのストレスが加わり、②原虫体内において、未知の転写関連因子群が活性化されて Bz-cis に結合し、③ブラディゾイト特異的遺伝子の転写が開始され、④原虫のステージ変換が開始されると予想している。そこで本研究では、この仮説を実証する上で重要なブラディゾイト特異的遺伝子の転写を司る、ステージ変換関連転写因子の同定を目的とする。		

研究経過の概要	酵母ワンハイブリッド法は、酵母にあらかじめ人為的に特異的塩基配列を組み込み、さらにこの酵母に 遺伝子ライブラリを導入・発現させることで、特異的塩基配列に結合する蛋白質遺伝子を同定することが出来るシステムである。Bz-<i>cis</i>と予想される塩基配列に相互作用するトキソプラズマ遺伝子を同定するため、Bz-<i>cis</i> 配列をゲノム中にもつ酵母株を作出した。アラビアゴム溶液を用いてブラディゾイトのみを精製し、RNA を抽出した。精製ブラディゾイト RNA より作出した cDNA ライブラリを形質転換した酵母株より、ステージ変換関連シスエレメント配列に結合する遺伝子をもつ酵母を Aureobasidin A による薬剤スクリーニングにより選抜した。得られた酵母株より、組み込まれた cDNA 配列を PCR で増幅し、遺伝子配列を決定した。 本研究では、当初、帯広畜産大学へ共同研究として来訪する予定であったが、COVID-19 による移動制限のため、メール・電話での連絡・経過報告を行うことで、センター教員との連絡を実施した。
研究成果の概要	全部で 112 個の Aureobasidin A 耐性酵母(陽性クローン)を得ることができた。これらクローンに組み込まれた cDNA 配列を PCR で増幅し、遺伝子配列を決定した結果、大多数がヒト由来の遺伝子配列またはコンタミネーションと考えられる未知配列(由来生物不明)であった。今後、同様のスクリーニングを行うためには二重に精製をかけるなど、より純度の高いブラディゾイト虫体を得た上で再度 Y1H 法を実施する必要がある。 一方、トキソプラズマ配列由来の遺伝子も 5 種類見出された。うち 4 種類は機能未知の遺伝子であり、アノテーションはなされていない。今後、これら分子の詳細を検討していく一方、一種類は X 遺伝子として登録されている遺伝子と高い相同性を示した。しかし最近、トキソプラズマのステージ変換を司る原虫蛋白質として(Myb-like transcription factor)BFD1 が同定され(Waldman et al., Cell, 2020)、その結合配列は今回着目した 6 塩基配列と同一であることが報告されている。今回の我々のスクリーニングでは BFD1 はヒットしてこなかったが、スクリーニングの精度が十分でなかった可能性が考えられた。今後、上記 5 種類の遺伝子産物と Bz-<i>cis</i> 配列との結合能や、これらと BFD1 の関連性を検討していく必要がある。
研究成果の発表	なし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月20日

採択番号	2020-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	福本 晋也
研究課題名	雄ハマダラカ・マラリア原虫易感染モデルによるベクターコンピテンシー制御機構の解明		
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 後井 宏実	北里大学獣医学部・准教授	
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	2020年4月1日 ～ 2021年3月31日		
目的・趣旨	ハマダラカがマラリア原虫の感染を受けるオーカイネートからオーシスト形成期は原虫数が最も減少し、原虫感染に対して最も重要な防御免疫応答を起こす時期である。 様々な節足動物において、病原微生物に対する感受性雌雄差が報告されている。申請者はハマダラカにもマラリア原虫感受性の雌雄差があるとの仮説を立て、その立証を試みた。オーカイネートのマイクロインジェクションにより、本来吸血をしない雄に対しマラリア原虫を感染させることに成功した。次にオーシスト数を指標として雌雄ハマダラカのマラリア原虫感染表現型を解析した。その結果、雄ハマダラカが雌と比較し、高いマラリア原虫感受性を持つことを明らかにした。 以上の結果を踏まえ、本研究では原虫感染時の雌雄ハマダラカ遺伝子シグナル応答を比較解析し、マラリア原虫の感受性を規定する因子を同定、そのメカニズムを解明することを目的とする。		

研究経過の概要	マイクロインジェクション感染モデルにより、雄ハマダラカが雌と比較し高い感受性を示すこと、オーシストの形成部位に組織特異性が無いことが明らかになった。次に、オーカイネートインジェクション後、24・72 時間後の遺伝子発現を次世代シーケンサーによる RNA-Seq 法を用いて比較解析した。その結果、雌雄双方においてインジェクション後 24 時間で最も有意な遺伝子転写変動が認められた。 以上の結果を基盤として、ハマダラカのマalaria原虫ベクターコンピテンシー制御因子の同定を目指す。発現量増加遺伝子については RNAi による遺伝子機能阻害、減少したものはバキュロウイルスによる過剰発現を行い、マalaria原虫を吸血もしくはインジェクション法により感染、表現型の解析を行う。オーシスト形成数の変動を指標として、マalaria原虫感受性因子の同定を目指す。さらにはその分子メカニズムの解明を試みる。 以下の主な計画に沿って実施されている。 ① dsRNA の作製(福本)および RNAi ハマダラカの作製 (筏井) ② RNAi ハマダラカを用いたマalaria原虫感染試験(筏井) ③ 遺伝子過剰発現(OE)ハマダラカの作製(福本) およびマalaria原虫感染試験(筏井) ④ 原虫排除機構の解析(筏井・福本)
研究成果の概要	マalaria原虫オーカイネートのインジェクション感染モデルにより、雄ハマダラカが雌より高い感受性を持つことを明らかにした。また、次世代シーケンサー解析においてインジェクション後 24 時間で最も有意な遺伝子転写変動が認められた。これらの結果より本年度は、オーカイネートインジェクション 24 時間後に雌ハマダラカが原虫抵抗性因子を発現していると仮説を立て、雌蚊の発現増加がみられた上位 20 遺伝子について、① dsRNA の作製および RNAi ハマダラカの作製、② RNAi ハマダラカを用いたマalaria原虫感染試験を行い、原虫感受性因子のスクリーニングを実施した。 #18-RNAi 雌蚊は陰性コントロールの GFP-RNAi 雌蚊と比べて明らかにオーシスト形成数が多くなり感受性を示す結果となった (図)。 2020 年度は、20 遺伝子中 15 遺伝子について dsRNA の作製が行なわれた。その内 8 遺伝子について、RNAi 雌ハマダラカの作製を試み、マalaria原虫感染(オーシスト形成)試験を実施した。 スクリーニング途中ではあるが、左に結果の一部を示す。 雌蚊(抵抗性)において発現量が増加した No.18 遺伝子を RNAi することにより抵抗性が減弱し、オーシスト形成数が多くなったと推察される結果が得られた。 今後は、残りの遺伝子および雄蚊の発現量増加遺伝子など様々な仮説に基づいた候補遺伝子についても順次スクリーニングを実施し、マalaria原虫感受性因子の同定をおよびその分子メカニズムの解明を試みる予定である。 本年度は来所できながったが、Web およびメールでのディスカッションを実施し、旅費に関する経費を研究課題遂行に必要な、試薬および研究用消耗品の購入に変更した。
研究成果の発表	

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月27日

採択番号	2020-共同-12		
研究部門	国際連携研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	麻田 正仁
研究課題名	非固有宿主馴化バベシア原虫を用いた宿主域決定因子の同定		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	やまぎしじゅんや 山岸 潤也	北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授	
研究分担者			
	あさだ まさひと 麻田 正仁	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2020年4月1日 ～ 2021年3月31日		
目的・趣旨	一般的にバベシア原虫の宿主特異性は高く、ウシのバベシア原虫 <i>Babesia bovis</i> がヒツジやヒトに感染することはない。しかしながら、げっ歯類のバベシア原虫 <i>B. microti</i> はヒトにも感染することが知られており、薬剤にて変異導入した <i>B. bovis</i> がヒト赤血球に馴化することも知られている。すなわち、バベシア原虫は宿主域の壁を超えるポテンシャルを有している。非固有宿主に馴化した原虫の宿主転換に関わる責任遺伝子は、ゲノム、トランスクリプトームを高精度に解析することで明らかにできる。そこで、1) ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> の再創出に加え、2) ヒツジ赤血球馴化 <i>B. bovis</i> の創出、3) ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の創出を試み、ゲノム・トランスクリプトームを行うことで、その分子メカニズムの解明を試みることを目的に、研究を行った。		
研究経過の概要	本研究では、バベシア原虫の宿主特異性に関わる分子機構を明らかにし、当該原虫が人獣共通感染症を引き起こしうるかを見積もるために、<i>B. bovis</i>、<i>B. microti</i>、<i>B. ovis</i> をモデルに、化学物質によるゲノム変異の導入、ヒト赤血球への馴化、ゲノム・トランスクリプトーム解析を行う。その第一段階として、本年度は、私信にとどまっていた <i>B. bovis</i> のヒト赤血球への馴化の再現に成功した。さらに、馴化株4クローンと親株のゲノム解析を行い、ほぼ染色体に近いゲノムアセンブルの取得に成功した。そこで、4株の馴化株に共通する変異の特定を行ったが、該当する一塩基多型は見つからなかった。そこで、エピジェネティックな、あるいは、ゲノムの構造変化に伴う遺伝子発現変化がヒト赤血球への馴化に関与すると考え、馴化株4クローンと親株のトランスクリプトームを取得した。その結果、馴化株で発現してる VESA 遺伝子および周辺遺伝子の配列と発現量に多様性が認められた。		

研究成果の概要	ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> の再創出と、馴化に関わる分子機構の解明 1) <i>B. bovis</i> クローン株の準備 <i>B. bovis</i>Texas 株クローンを利用し、MinION とイルミナを用いた Hybrid-assembly によりゲノムを確定した。最終 contig は長いものから、2.7M bp、2.6M bp、1.9M bp、1.1 Mbp であり、それぞれ4本の染色体数に相当すると考えられる。ただし、上記以外の断片的な contig も認められ、3 年前に樹立したクローンのゲノム構造変化が既に起こっている可能性が考えられた。 2) ヒト赤血球への馴化 <i>B. bovis</i> クローン株を独立に N-ニトロソ-N-エチル尿素で処理し、ウシ・ヒト混合赤血球で培養することで、4株のヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> の取得に成功した。 3) ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> のゲノム解析 上記4クローンの re-sequencing を行い、想定通りゲノム当たり数百か所の変異が確認された。さらに、4株の馴化株に共通する変異の特定を行ったが、該当する一塩基多型は見つからなかった。そこで、一塩基多型ではなく、ゲノム構造変化に起因する可能性を考え、4株のうち1株について、Hybrid-assembly による <i>de novo</i> ゲノム解析を行った。その結果、アピコプラスト、ミトコンドリアを含む6本のコンティグからなる完全なゲノム配列の再構成に成功した。 4) ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> のトランスクリプトーム解析 親株および4株の馴化株のトランスクリプトームを取得し、Trynity で転写産物を再構成した結果、VESA 遺伝子および周辺遺伝子の配列と発現量に多様性がある可能性が示唆された。現在、<i>de novo</i> ゲノム解析で得た配列を参照ゲノムとして利用することで、その確認を進めている。 ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の創出 <i>B. bovis</i> でヒト赤血球への馴化に成功したことをうけ、<i>B. microti</i> のヒト赤血球への馴化にも着手した。この <i>B. microti</i> のヒト赤血球を用いた <i>in vitro</i> 培養は成功していないが、<i>B. microti</i> が人獣共通感染症を引き起こすことは広く知られており、ヒト赤血球に感染する潜在能力は十分に有していると考えられる。そこで最初に、赤血球の一部をヒト赤血球に置換した SCID-Bo-RBC マウスに <i>B. microti</i> を感染させることで、<i>B. bovis</i> と同様に馴化が起こるか確認する実験を予定しており、その準備を進めている。
研究成果の発表	特記事項なし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月6日

採択番号	2020-共同-13		
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 2,5-ジフェニルオキサゾールをシード化合物とした 安全性の高い新規トリパノソーマ症治療薬の開発		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なりた こういち 成田 紘一	東北医科薬科大学・薬学部・助教	
研究分担者	むらた としひろ 村田 敏拓	東北医科薬科大学・薬学部・講師	
	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	2020年4月1日 ～ 2021年3月31日		
目的・趣旨	これまでの共同研究の成果としてモンゴル国薬用植物より抗トリパノソーマ活性を示す2,5-ジフェニルオキサゾールを見出している。さらに本化合物の水酸基をメチル化することで得られる派生物 A1 では <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することを明らかにしている。 そこで、本申請では派生物 A1 を基に類縁化合物を設計し、その合成を行うことで活性増強および最適な薬物動態を示す化合物の創製を目指す。また、構造最適化のヒントを得るため、天然からの候補化合物の探索も並行して行う。これらの研究を通して安全性の高いトリパノソーマ症治療薬の開発を目指す。		
研究経過の概要	1. 新規類縁化合物の設計と合成 これまでの類縁体合成から得られた構造活性相関に関する知見を基に更なる構造修飾が可能な部位として B 環部 5 位を選択し、置換基導入法の確立に向けた検討を行った(成田)。 2. 天然資源からの新規物質の探索 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(村田)。 上記 1 および 2 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)。 COVID-19 パンデミックのため、サンプルは郵送でやり取りをし、その結果についてメールにてディスカッションを行った。		

研究成果の概要	1. 2,5-ジフェニルオキサゾール類の構造活性相関の解析 モンゴル国薬用植物由来の 2,5-ジフェニルオキサゾールを基に、これまでに設計および合成した類縁化合物の抗トリパノソーマ活性の結果について詳細な構造活性相関の解析を行った。その結果、<i>Trypanosoma congolense</i> に対する高い選択毒性を発現するためにはオキサゾール骨格およびメトキシ基の位置が重要であることが明らかとなった。(特許出願済み。論文投稿中。)また、更なる構造修飾のために許容される位置は B 環部 4 位あるいは 5 位であることが示唆された。 2,5-ジフェニルオキサゾールの化学構造 2. B 環部 5 位の構造修飾に焦点を当てた類縁化合物の創製 上記 1 で得られた知見を基に、基質の入手および合成の容易性の観点から 5 位を選択し、新たな類縁化合物創製に向けた検討を行った。5 位にベンジルオキシ基を有するアセトフェンを出発物質として用い、2,5-ジフェニルオキサゾールへと誘導した。次いで、ベンジルオキシ基を除去し、対応するフェノールを得た。得られたフェノールに対し、①ジメチルアミノ基、②アリール基の導入という2つの異なる系統の側鎖導入について検討を行った。①ジメチルアミノ基の導入では対応するハロゲン化アルキルとともにヨウ化テトラブチルアンモニウムを共存させることで、良好な収率で目的の化合物を得ることができた。②アリール基の導入ではトリフラート体へと変換後、鈴木-宮浦クロスカップリング反応によりフェニル基の導入が可能であった。現在、種々のボロン酸を用いた多様なアリール基の導入について検討を行っている。 3. 合成した化合物の抗トリパノソーマ活性評価 上記 2 で得られた新規類縁化合物について抗トリパノソーマ活性を評価した。ジメチルアミノ基を有する化合物では <i>T. congolense</i> に対してのみならず、他のトリパノソーマに対しても抗トリパノソーマ活性を示し、抗トリパノソーマスペクトルの拡大が見られた。しかし、MDBK 細胞に対し比較的強い細胞毒性を示し、選択毒性が低下する結果となった。フェニル基を有する類縁化合物では <i>T. congolense</i> に対する選択毒性が維持されたが、派生物 A1 の活性を上回ることはできなかった。一方で合成中間体であるベンジルオキシ基を有する化合物が派生物 A1 を上回る抗トリパノソーマ活性および選択毒性を示した。 現在、上記知見を基に更なる類縁化合物の創製および活性評価を行っている。
研究成果の発表	<特許> 1) トリパノソーマ症の治療薬及び予防薬 菅沼啓輔、成田紘一、村田敏拓、特願 2020-081936 <論文> 1) Synthesis and evaluation of trypanocidal activity of derivatives of naturally occurring 2,5-diphenyloxazoles, Koichi Narita, Keisuke Suganuma, Toshihiro Murata, Ryutaro Kondo, Hiroka Satoh, Kazuhiro Watanabe, Kenroh Sasaki, Noboru Inoue, Yuichi Yoshimura, <i>Bioorg. Med. Chem.</i>, under review.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 25 日

採択番号	2020-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	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	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	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 1/3 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種の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。さらに世界三大感染症の一つマラリアもアピコンプレクサ類原虫の感染により発症し、年間 3～5 億人が罹患し、その内、約 200 万人もの命を奪う医療で重要な疾患である。我々はトキソプラズマをはじめとするアピコンプレクサ類原虫症に対して極めて有効と考えられるジケトピペラジン(DKP)誘導体のメタサイトフィリン(MCF)を発見した(特願 2017-243872)。アピコンプレクサ類原虫に対して <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> 系において優れた抗原虫活性を示す MCF は現存の方法では生産性が低いため実用化に向けて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。		

研究経過の概要	原虫病薬は、市場規模が新規薬剤の開発費を下回る。したがって大手製薬企業がその開発に着手しないのが現状である。利潤に左右されない大学とわれわれ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。 これまでに、われわれ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。さらに、MCF が抗ネオスポラ、抗マラリア活性を示すことも確認した。今後の MCF の実用化に向けて種々の動物実験による解析を行う必要があり、化合物量を担保することが必要不可欠である。現状の糸状菌によって産生される抗原虫剤 MCF は、生産効率が低く、化合物の生産性の向上化させる必要がある。MCF の生産性向上化、実用化に向けて、育種方法の開発、生合成経路解明に向けた解析、MCF の抗原虫作用機構の解析を実施した。
研究成果の概要	DKP 誘導体の MCF 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し、MCF がマラリアの既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性を持つ。MCF は、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次世代のマラリア薬として、もしくは、新規アピコンプレクサ類原虫薬剤にない化学構造を持つ MCF が新規の抗原虫活性を示す薬剤として発展することが期待できる。既存の MCF 生産菌の育種による生産方法では、MCF の原虫に対する作用機序解析、種々の実験動物による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った。この現状を打開するために、われわれは、低コストで且つ効率的な MCF の生産方法の開発における基盤構築を行っている。 従来方法では、MCF 生産菌 (<i>Metarhizium</i> sp.) をリッター培養当たり MCF 収量が数 mg 程度の生産効率であったが、前年までの研究成果において、MCF 生産糸状菌への紫外線照射による突然変異導入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、リッター培養当たり 80mg オーダーの収量を得る条件を構築した。目標値のリッター培養当たり 100mg オーダー以上に向けて順調に推移している。昨年度より継続し、培養における酸素供給効率の制御が可能なジャーファーマンターを用いた MCF の生産方法の条件検討を行っている。フラスコ培養とファーマンター培養との間で、MCF 生産菌の培養生産物のパターンが異なるなど、その原因について解析を進めている。各々に対応した高収率の精製方法を構築し、MCF の生産の効率化は上昇している。 MCF の生合成経路解明とその遺伝子情報を基にした MCF 生産方法開発を行うことを考慮し、その予備実験、解析を開始した。MCF は、Leu と Phe とのジペプチドを環状化した基盤骨格を持つジケトピペラジンであるものの、その生物学的な証拠は得ていなかった。今回、われわれは、生合成経路の中間体としてジケトピペラジン各々 L 体の cyclo[Leu-Phe]を経由して MCF が合成されていることを改変フィッシャー法にて確認し、その生合成経路において、ジケトピペラジンの形成が律速段階でない可能性について突きとめた。さらに、培養条件において、エピジェネティクに変化を与えて、MCF 生産上昇に働く化合物を探索した。その結果、ニコチン類などの添加物が MCF 生産量の向上化に働くことが明らかとなった。一方、MCF の抗原虫作用において、これまでにトランスク립トーム解析から原虫の小胞体および核に作用している可能性を予想されていたものの、その証拠が得られていなかった。MCF が原虫のストレス応答機構を経て殺原虫効果を示すことが明らかになってきた。原虫のストレス応答、とりわけ小胞体ストレス応答機構は、哺乳類や酵母で解っている従来の機構と大きく異なる分子機構と考えられている。したがって、その解明に向けた基礎研究が今後の本プロジェクトの発展に必要となる。 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り、本研究成果は、DKP 誘導体の MCF がアピコンプレクサ類原虫症に対する新たな治療薬または予防薬としての開発に繋がる。

研究成果の 発 表	○ 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> 2020 Feb 18;221(5):766-774. doi: 10.1093/infdis/jiz501. ○ 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. ○ Lessombun A, Iijima M, Iijima M, Pagmadulam B, Orkhon B, Doi H, Issiki K, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin has potent anti-malarial activity. <i>Parasitol Int.</i> 2021 Apr;81:102267. doi: 10.1016/j.parint.2020.102267. ○ <u>Nihei C</u>, Nakanishi M. Cargo selection in the early secretory pathway of African trypanosomes. <i>Parasitol Int.</i> 2021 May 14;84:102379. doi:10.1016/j. parint. 2021. 102379.
----------------------	--

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月27日

採択番号	2020-共同-15		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	ネズミマラリア原虫における Brca2 による雌ガメートサイトへの分化		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	よしかわ やすなが 吉川 泰永	北里大学獣医学部・講師	
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	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マラリア原虫における雌雄ガメートサイトへの分化は、マラリア原虫の生活環において必須のステージである。我々は相同組換え修復に関係する Brca2 の研究を行ってきた。ネズミマラリア原虫においても Brca2 の特徴をもつタンパク質がデータベース上に存在したので、ノックアウト原虫を作製した。予想外なことに、ノックアウト原虫において雌雄ガメートサイト比率が変化し、雌ガメートサイトへの分化が抑制される結果が得られた。そこで本研究では、ネズミマラリア原虫において Brca2 がどの様に雌ガメートサイトへの分化に貢献しているのかを解明することを目的とした。		
研究経過の概要	貴研究センターの福本先生に Brca2 のノックアウト原虫を作製していただき、吉川がこのノックアウト原虫の解析を行ってきた。2020 年度はコロナウイルス感染症流行のため、貴研究センターを訪問する事が難しかったので、適宜、メールによりディスカッションにより共同研究を遂行した。その結果、以下の研究成果の概要に示すようにマラリア原虫における Brca2 の重要性が徐々に明らかになり始めた。 貴研究センターへの旅費を計上していたが、前述のように訪問することが出来なかったため、その分の予算は共同研究の遂行に必要な消耗品の購入に充てた。		

研究成果の概要	(1) 病原性に対する影響 Brca2 ノックアウト原虫の病原性を調べるために、原虫を投与したマウスにおける生存率を野生株と比較した。その結果、ノックアウト原虫において有意に生存率が低下しており、マラリア原虫の病原性も低下することが示された。 (2) ガメートサイトに対する影響 蚊に吸血された後に接合を行うガメートに分化する雌雄ガメートサイトの形成数についても詳しく調査した結果、Brca2 ノックアウト原虫においてガメートサイトの形成数が有意に減少していた。すなわち Brca2 は雌ガメートサイトだけでなく、雄ガメートサイトの分化に影響を与えていることが考えられた。 (3) オーカイネートに対する影響 Brca2 ノックアウト原虫においてガメートサイトの形成数の低下にともない、接合体であるオーカイネートの形成数も有意に減少した。しかし、ノックアウト原虫においてもオーカイネートの運動性は保持されており、オーカイネートが減少することでオーシストも減少すると考えられた。 (4) X 線感受性に対する影響 野生株では増殖率が低下しない X 線量において Brca2 ノックアウト原虫は X 線を照射した後の赤血球内の増殖率が低下する個体が存在した。
研究成果の発表	なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月20日

採択番号	2020-共同-16		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	横山 直明
研究課題名	Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmosis		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	サンジャイ クマール Sanjay Kumar	ICAR-National Research Centre on Equines Principal Scientist	
研究分担者	ラジェンダ クマール Rajender Kumar	ICAR-National Research Centre on Equines Principal Scientist	
	よこやま なおあき 横山 直明	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2020年4月1日 ～ 2021年3月31日		
目的・趣旨	<i>Theileria equi</i>と<i>Babesia caballi</i>の感染によって引き起こされる馬ピロプラズマ病は世界で深刻な問題となっている。そこで、その急性感染を現場で迅速に診断できる“抗原検出用馬ピロプラズマ感染診断システム”を開発する。本システムを開発できれば、馬の国際移動時の感染馬の摘発や臨床現場での迅速な治療が可能となる。		
研究経過の概要	馬ピロプラズマの急性感染を迅速に診断できる“抗原検出用診断システム”を開発するために、以下の研究を実施した。 1) 標的となる診断用原虫抗原の選抜 2) 免疫抗原用の遺伝子組換え抗原の大量発現と精製 3) マウスへの抗原免疫と各種モノクローナル抗体の作製		
研究成果の概要	現在までの研究推進状況は以下の通りである。 1) <i>Theileria equi</i>と<i>Babesia caballi</i>由来の標的となる診断用原虫抗原を、既知の文献や種々のデータベースを参考に、それぞれ決定した。 2) その後、世界の野外株でよく保存され、かつ親水性の領域を選抜し、その遺伝子断片を活用して免疫抗原用の遺伝子組換え抗原を大腸菌にて大量発現・精製を行った。 3) 現在その遺伝子組換え抗原をマウスに免疫している。		
研究成果の発表	なし		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 28 日

採択番号	2020-共同-17		
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	Investigation on the emergence of resistance among commonly used trypanocidal drugs in the Philippines		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Marvin Villanueva	Philippine Carabao Center, Senior Science Research Specialist	
研究分担者	Claro Mingala	Philippine Carabao Center, Scientist III	
	Gabriel Alexis Tubalinal	Livestock Biotechnology Center, Science Research Specialist II	
	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・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	フィリピン国内の家畜において、 <i>Trypanosoma evansi</i> 感染症（スーラ病）のアウトブレイクが多数報告されている。本疾病の制御はフィリピンにおける家畜生産性の向上のために必須である。制御法の一案として、定期的な薬剤投与が考えられるが、そのためにはフィリピンで流行している <i>T. evansi</i> 株の薬剤感受性の解析が必須である。本研究課題では研究分担者の構築した薬剤感受性解析系を研究代表者の研究室に技術移転させることを目的とした。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者は薬剤感受性試験を技術移転するためにトリパノソーマの培養維持に努めた。		
研究成果の概要	関連研究の成果として、フィリピンにおけるスイギュウ、山羊およびウシにおける <i>T. evansi</i> の感染状況についての疫学情報を収集した。結果、ビサヤ地域のセブ州セブ島で使用されている山羊の血液サンプルから <i>T. evansi</i> の遺伝子をはじめて検出することに成功し、山羊が感染巣として機能している可能性が示唆された。フィリピンにおいて、同原虫が広範な地域においてスイギュウ以外の家畜にも感染していることが解り、 <i>T. evansi</i> 株の薬剤感受性の解析が急務であると考察できた。		
研究成果の発表	Elata A., et al., First molecular detection and identification of <i>Trypanosoma evansi</i> in goats from Cebu, Philippines using a PCR-based assay, <i>Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports</i> , 2020, 21, 100414		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 28 日

採択番号	2020・共同-18		
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	メタゲノム解析によるエゾシカ体内における寄生性原虫叢の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ひこさか けんじ 彦坂 健児	千葉大学大学院医学研究院 感染生体防御学・講師	
研究分担者	たちばな しんいちろう 橘 真一郎	千葉大学医学研究院 感染生体防御学・特任助教	
	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	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	北海道には貴重な野生生物が多く生息し、その中にはヒトの社会活動に影響を及ぼすものが存在する。エゾシカは、その生息数の増加により農林業への被害が問題となっているが、家畜伝染病病原体(住肉孢子虫など)を有していることから重要視されている。また、近年のジビエブームにより、ヒト原虫感染症の感染源にもなりうるため、公衆衛生上も無視できない。本研究では、エゾシカを対象に、「どのような寄生性原虫」が「どの程度」感染しているのかを可視化することを目的とした。		
研究経過の概要	十勝地方のエゾシカ 24 頭から採集した血清、筋肉、肝臓、および糞便を採取し、それぞれ DNA 及び RNA を抽出し核酸解析に供した。このうち血清、筋肉、および肝臓から抽出した 24 頭分の DNA 及び RNA をそれぞれプールし網羅的解析(DNA-seq 及び RNA-seq)を実施した。糞便は、24 頭のうち 8 頭については 1 個体ずつ、16 頭については 2 個体ずつの DNA 試料を調製し、18S メタゲノム解析を実施した。DNA-seq 及び RNA-seq では、低品質リードを取り除いた後、エゾシカ近縁種のゲノムデータを用いて宿主ゲノム由来のリードを除去し、塩基配列を用いた原虫類の同定を行った。DNAseq では残ったリードの各原虫ゲノム参照配列へのマッピング、RNAseq では系統学的分類を行い、18S メタゲノム解析では Blast による相同配列検索を行った。		

研究成果の 概 要	エゾシカの DNA-seq 解析の結果、血清からは根足虫類および住肉胞子虫類、筋肉からは根足虫類、鞭毛虫類、住血胞子虫類および住肉胞子虫類、そして肝臓からは住肉胞子虫類の DNA 塩基配列がそれぞれ検出された。RNA-seq では、血清と肝臓から <i>Babesia</i> 属、肝臓からは <i>Trypanosoma</i> 属、筋肉からは複数種の <i>Sarcocystis</i> 属の原虫が検出された。野生のエゾシカは蠕虫、原虫ともに多様な寄生体を保有していることが明らかになった。糞便の 18S メタゲノム解析では、<i>Blastocystis</i> 属、<i>Entamoeba</i> 属、<i>Hexamastix</i> 属 (トリコモナス類)、<i>Cryptosporidium</i> 属、<i>Eimeria</i> 属、および <i>Theileria</i> 属の原虫が検出された。このうち、<i>Entamoeba</i> 属の <i>E. insolita</i> は全ての糞便試料から検出されており、共生原生生物である可能性も考えられた。また、同糞便試料より検出された <i>Hexamastix</i> 属の <i>H. mitis</i> は、エゾシカから分離された報告はなく、感染と病原性との関係性について調べる必要がある。以上のように、本研究の核酸網羅的解析によって検出されたエゾシカに存在する寄生性原虫は、予想以上に多様であった。本研究の結果は、北海道に生息する野生生物の原虫感染状況を調査する際の基盤情報となる。今後は得られたデータをもとに、分子診断法を開発する予定である。
研究成果の 発 表	なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 20 日

採択番号	2020-共同-19		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	横山 直明
研究課題名	Isolation and <i>In vitro</i> cultivation of <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>Babesia</i> sp. Mymensingh, and <i>Babesia</i> sp. Hue-1 from cattle in Vietnam		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ブン タン ロン Phung Thang Long	Hue University of Agriculture and Forestry Associate Professor	
研究分担者	ディン チ ビッチ ラン Dinh Thi Bich Lan	Hue University of Agriculture and Forestry Associate Professor	
	よこやま なおあき 横山 直明	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	牛バベシア病は世界で広く発生が認められ、ベトナム国にはその原因原虫である 4 種類の牛バベシア (<i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>Babesia</i> sp. Mymensingh, and <i>Babesia</i> sp. Hue-1) の分布が明らかとなっている。そこで本研究では、それら牛バベシアのベトナム由来分離培養株を樹立することを目的とした。分離培養株が樹立できれば、各種牛バベシア病の診断、治療、及び予防に関する技術開発や、それぞれの病態の解明が飛躍的に加速することが期待される。		
研究経過の概要	牛バベシア病を引き起こすのは、これまで <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , 及び <i>B. divergens</i> だけであった。しかし最近の研究から、新しく発見された <i>Babesia</i> sp. Mymensingh もまた牛バベシア病を引き起こすことが明らかになった。そこで、 <i>Babesia</i> sp. Mymensingh の宿主範囲と世界規模での地理的分布を確認するために、1) スリランカ、フィリピン、 <u>ベトナム</u> 、ウガンダ、ブラジル、及びアルゼンチンの計 2,263 頭の牛、2) スリランカと <u>ベトナム</u> の計 419 頭の水牛、3) <u>ベトナム</u> の 127 頭の山羊、及び 4) <u>ベトナム</u> の 51 頭の羊を含めた合計 2,860 の DNA サンプルに対して、 <i>Babesia</i> sp. Mymensingh に特異的な PCR スクリーニングを行った。		

研究成果の 概 要	スクリーニング PCR の結果、<i>Babesia</i> sp. Mymensingh の感染は、すべての反芻動物で確認された。また、ブラジルを除くすべての国々の牛から、本バベシア種が検出された。本研究の成果により、本バベシア種が牛、水牛、羊、及び山羊に感染し、かつアジア、アフリカ、南アメリカに広く分布していることが明らかになった。 本論文は、スリランカ (Veterinary Research Institute)、ベトナム (<u>Hue University of Agriculture and Forestry</u>)、フィリピン (Cebu Technological University)、ウガンダ (Makerere University)、アルゼンチン (Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria)、及びブラジル (Conselho Regional de Medicina Veterinária da Bahia) との国際共同研究の成果である。
研究成果の 発 表	Thillaiampalam Sivakumar, Bumduuren Tuvshintulga, Hemal Kothalawala, Seekkuge Susil Priyantha Silva, <u>Dinh Thi Bich Lan</u>, <u>Phung Thang Long</u>, Adrian Patalinghug Ybañez, Rochelle Haidee Daclan Ybañez, Daniel Francisco Benitez, Dickson Stuart Tayebwa, Alan Caine Costa DE Macedo, Leonhard Schnittger, <u>Naoaki Yokoyama</u>: Host range and geographical distribution of <i>Babesia</i> sp. Mymensingh. <i>Transboundary and Emerging Diseases</i>. 2020; 67: 2233-2239. PMID: 32166838

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 28 日

採択番号	2020-共同-20		
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	International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Zhe Hu	Harbin Veterinary Research Institute, CAAS	
研究分担者	Cheng Du	Harbin Veterinary Research Institute, CAAS	
	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・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	研究代表者の所属する研究室はウマ伝染性貧血の OIE リファレンスラボラトリーであり、当該疾病以外にも多数のウマ疾病の制御を研究目的としている。原虫研先端予防治療学分野ではウマトリパノソーマ症の診断法の確立と評価を行っている。そこで本研究では、原虫研で確立したウマトリパノソーマ症の診断法の技術移転と中国におけるウマトリパノソーマ症の疫学調査を行うことを目的とした。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者は診断用抗原および標準 DNA の材料となるトリパノソーマの培養維持に努めた。		
研究成果の概要	関連研究の成果として、ウマトリパノソーマ症治療法の確立を目的として、モンゴルにおいて瘧疾罹患馬に対するジミナゼンとキナピラミンの混合療法の効果を検討した。ここ得られた成果を、次年度の共同研究事業において活用する予定でいる。		
研究成果の発表	Davkharbayar et al., Treatment efficiency of combination therapy with diminazene aceturate and quinapyramine sulfate in a horse with dourine, Journal of Equine Veterinary Science, 2020, 87, 10295		

令和 3 年 7 月 10 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/>

