

## **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<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 所属部局等・職名                |       |
|         | なかお りょう<br>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<br>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<br>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<br>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   | <p>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。</p>                                                                                                                                                                              |                         |       |
| 研究経過の概要 | <p>1. 所属研究機関での準備<br/>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。</p> <p>2. 帯広畜産大学での実験<br/>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。</p> <p>3. 所属研究機関での解析<br/>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。</p> |                         |       |

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。

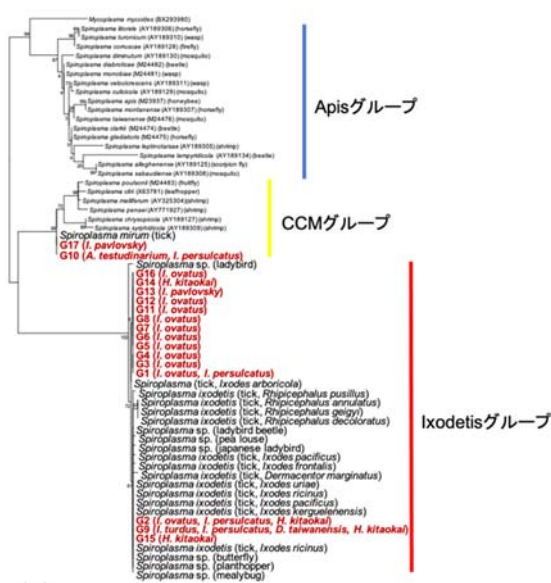


図1. 本邦のマダニから検出される *Spiroplasma* の多様性

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 |

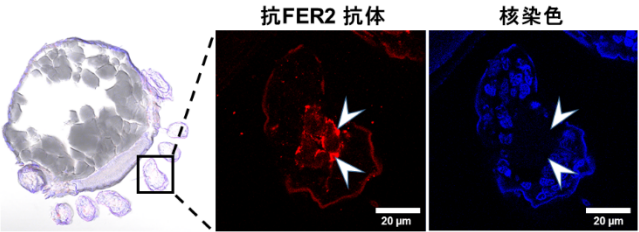
一方で、上述の調査では、各マダニ種の *Spiroplasma* 保有率も算出されており、ヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) が約 80% という高い *Spiroplasma* 保有率を有することがわかった。そこで、今後野外で採集したヤマトマダニを用いて、今回の共同研究で計画した介卵伝播機序の解析、すなわち吸血開始直後から経時的にマダニ卵巣を摘出して、FISH 法および遺伝子発現解析により、介卵のタイミングとその機構を明らかにしたい。

|              |    |
|--------------|----|
| 研究成果の<br>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<br>内共同研究担当教員 | 白藤 梨可 |
| 研究課題名   | フタトゲチマダニの胚発生におけるフェリチンの局在と鉄の動態                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                        |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 所属部局等・職名               |       |
|         | たなか てつや<br>田仲 哲也                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 鹿児島大学 共同獣医学部・教授        |       |
| 研究分担者   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                        |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                        |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                        |       |
|         | しらふじ りか<br>白藤 梨可                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 帯広畜産大学原虫病研究センター・助教     |       |
| 研究期間    | 2020年4月1日 ～ 2021年3月31日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                        |       |
| 目的・趣旨   | <p>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。</p>                                                                                            |                        |       |
| 研究経過の概要 | <p><b>【背景】</b>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。</p> <p><b>【材料と方法】</b>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。</p> |                        |       |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p>【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。</p> <p>【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)。</p> <p>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</p>  <p>20日目</p> <p>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</p> <p>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。</p> |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <p>【学会発表】<br/>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)</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和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<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 所属部局等・職名               |       |
|       | こしば たくみ<br>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<br>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 | <p>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)。</p> <p>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。</p> |                        |       |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 研究成果の概要 | <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> |
| 研究成果の発表 | <p>該当年度は、特になし。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |



帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 3 年 5 月 28 日

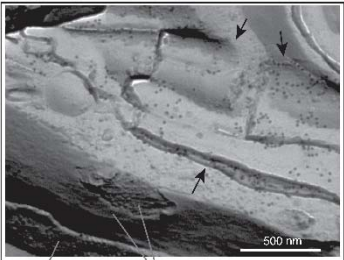
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                       |       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 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<br>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)<br>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<br>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   | <p><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。</p> |                                                                                       |       |
| 研究経過の概要 | <p>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。</p>                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                       |       |
| 研究成果の概要 | <p>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。</p>                                                                                                                                                                                             |                                                                                       |       |
| 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<br>内共同研究担当教員                  | 玄 学南 |
| 研究課題名   | トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質の<br>ナノスケールレベルでの分布解析                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                         |      |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 所属部局等・職名                                |      |
|         | ふじた あきかず<br>藤田 秋一                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 鹿児島大学 共同獣医学部・教授                         |      |
| 研究分担者   | またたに たつり<br>正谷 達膳                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 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<br>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   | <p>酵母の遺伝的解析研究によって動物細胞でもオートファジー制御機構の詳細が明らかにされてきた。最近、同じ真核生物であるトキソプラズマについても、ミトコンドリア維持あるいは細胞分裂にオートファジーの関与が示唆されているが、哺乳類細胞など一般生物との違いが多く、その詳細は不明である。本研究では、申請者らが開発した急速凍結・凍結割断レプリカ法および免疫電子顕微鏡技術を駆使し、トキソプラズマのオートファゴソームの微細構造およびそれを形成する脂質膜を破壊すること無く可視化し、さらに構成する脂質成分の特定を行う。その成果に基づき、原虫におけるオートファジーの機能解明を目指す。</p>                                                 |                                         |      |
| 研究経過の概要 | <p>申請者らは、急速凍結・凍結割断レプリカ標識(QF-FRL)法によって脂質ラフト成分である糖脂質の 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。</p> |                                         |      |



|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p>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 (<b>QF-FRL: Quick Freezing &amp; Freeze-fracture Labeling</b>) 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 <b>QF-FRL</b> 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 <b>GM1</b> および <b>GM3</b> 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 <b>GM3</b> 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 <b>GM3</b> 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 <b>HFF-1</b> に感染した <i>T. gondii</i> においては、もう一つの <b>GM1</b> は全く局在していなかった。また、<b>HFF-1</b> 細胞の細胞膜においては、<b>GM1</b> は発現せず、<b>GM3</b> のみが発現していた。一方、マウス線維芽細胞 <b>MF</b> においては、細胞膜に <b>GM1</b> と <b>GM3</b> の両方が発現していた。<b>MF</b> 細胞に感染した <i>T. gondii</i> においては、IMC の外葉には、<b>GM3</b> が局在すると同時に、少量ながら <b>GM1</b> 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 <b>GM1</b> および <b>GM3</b> は感染宿主細胞から搾取していることが示唆された。</p> <p>本研究では、単離精製した <i>T. gondii</i> の細胞内における <b>PI(3)P</b> 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 <b>PI(3)P</b> 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、<b>PI(3)P</b> 陽性のオートファゴソーム様構造を検索する予定である。</p> <div data-bbox="1075 929 1420 1243">  <p>細胞膜 Inner membrane complex<br/>図2. トキソプラズマ虫体の細胞内でのPI3Pの局在(電顕写真)</p> </div> |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <ol style="list-style-type: none"> <li>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>. <i>Eur. J. Cell Biol.</i> 100, 151149, 2021.</li> <li>2. 小西里可子、黒川夕奈、富奥甘奈、正谷達膳、藤田秋一、免疫電顕法を用いたヒト細胞感染トキソプラズマ生体膜に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.</li> </ol>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 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<br>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)<br>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<br>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   | <p><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。</p> |                                                       |       |
| 研究経過の概要 | <p>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。</p>                                                                                                                  |                                                       |       |
| 研究成果の概要 | <p>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。</p>                                                         |                                                       |       |
| 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<br>内共同研究担当教員       | 福本 晋也 |
| 研究課題名   | 臨床応用を目指したアデノ随伴ウイルスを用いた熱帯熱マラリア 2 価ワクチンの開発研究                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                              |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 所属部局等・職名                     |       |
|         | いより みつひろ<br>伊従 光洋                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授           |       |
| 研究分担者   | よしだ しげと<br>吉田 栄人                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授            |       |
|         | あべ ゆういち<br>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<br>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<br>福本 晋也                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授          |       |
| 研究期間    | 2020 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                              |       |
| 目的・趣旨   | <p>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。</p> <p>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。</p>                                                                                                                           |                              |       |
| 研究経過の概要 | <p>マラリアチャレンジ感染実験</p> <p>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。</p> <p>マラリア伝搬阻止実験</p> <p>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。</p> |                              |       |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p>マラリアチャレンジ感染実験の結果</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>マラリア伝搬阻止実験の結果</p> <p>(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。</p> <p>(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&gt;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。</p> <p>展 望</p> <p>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。</p> |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <p>【原著論文】</p> <p>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.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

## NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 13<sup>th</sup>, 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).



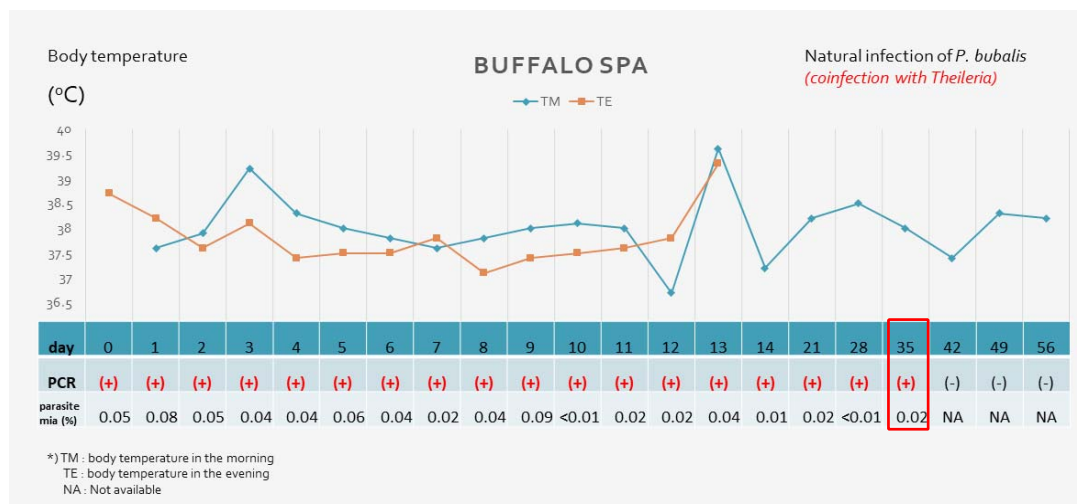


Figure 1. Observation of body temperature and positivity of malaria parasites in buffalo Spa. Red box indicate last day of PCR positive for malaria parasite during the observation period.

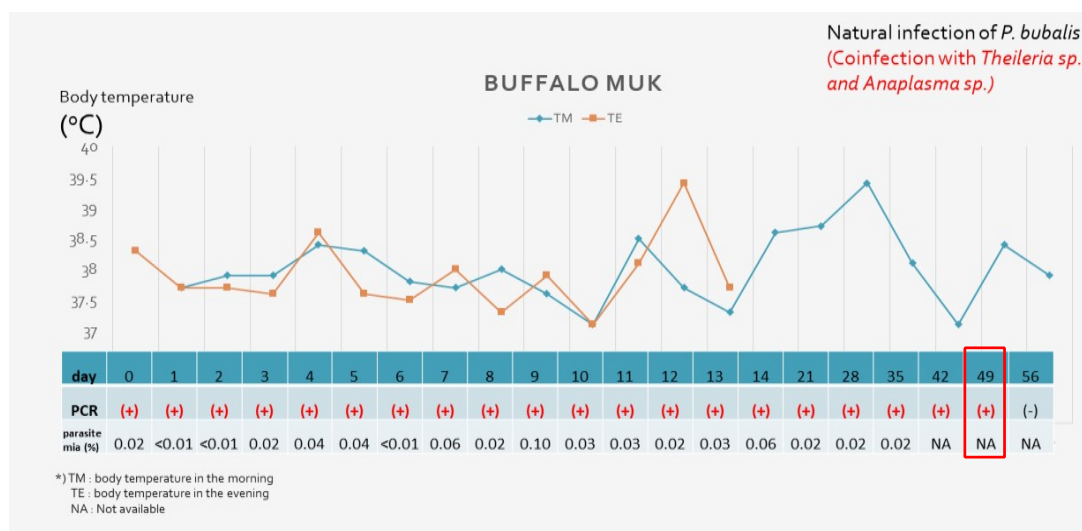


Figure 2. Observation of body temperature and positivity of malaria parasites in buffalo Muk. Red box indicate last day of PCR positive for malaria parasite during the observation period.

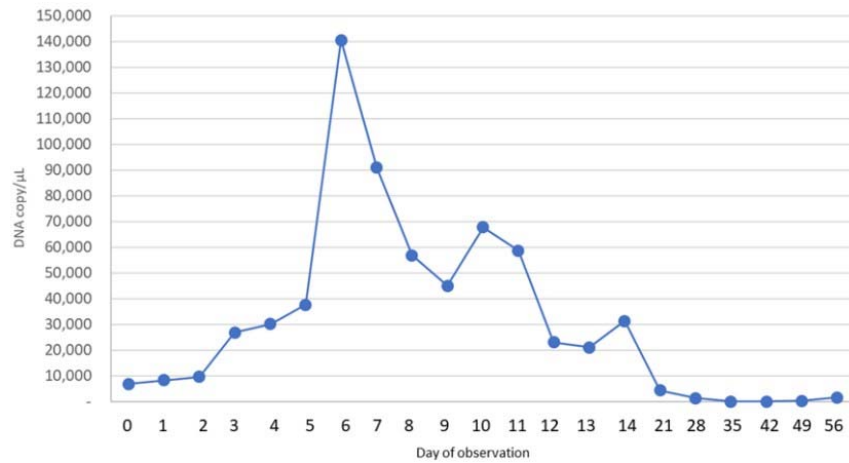


Figure 3. Malaria parasite's copy nuber in buffalo (Spa) during observation period

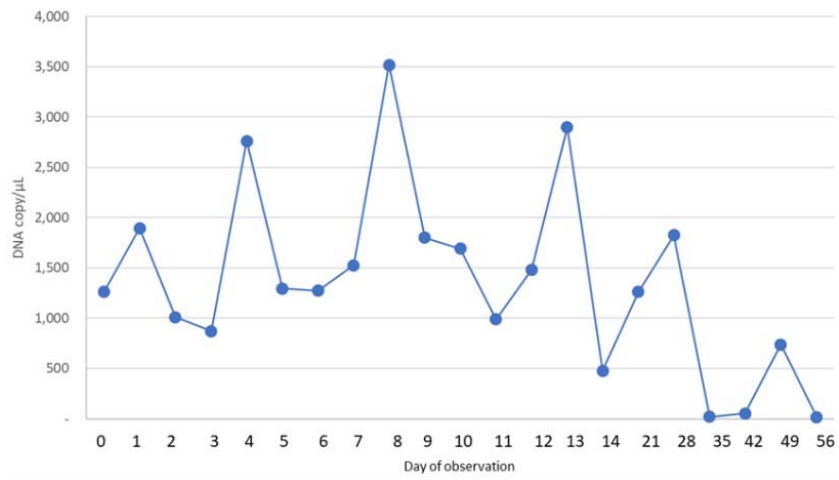


Figure 4. Malaria parasite's copy nuber in buffalo (Muk) during observation period

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<br>内共同研究担当教員                                  | 河津 信一郎 |
| 研究課題名 | サルマラリアの肝臓休眠体を標的とした可視化原虫株の作製                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                         |        |
| 研究代表者 | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 所属部局等・職名                                                |        |
|       | かわい さとる<br>川合 寛                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 獨協医科大学熱帯病寄生虫病学講座・教授・研究の統括および<br>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<br>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<br>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<br>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<br>マラリア感染実験の実施             |        |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                         |        |
|       | かわづ しんいちろう<br>河津 信一郎                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授・培養肝細胞を用いた<br><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 | <p>三日熱マラリア原虫(<i>Plasmodium vivax</i>,以下 Pv)は媒介蚊からヒトへ侵入後、肝臓内で休眠体を形成する。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。</p> |                                                         |        |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p>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。</p>                             |
| 研究成果の概要 | <p>1)赤血球内ステージにおける GFP シグナル:<br/> 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)。</p> <p>2)媒介蚊内ステージにおける GFP シグナル:<br/> 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)。</p> <p>3) Pcy, GFP::Luci 株の感染性と増殖性:<br/> Pcy, GFP::Luci 株のスポロゾイト <math>5 \times 10^5</math> 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。</p> |
| 研究成果の発表 | <p>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:<br/> 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</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

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

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）

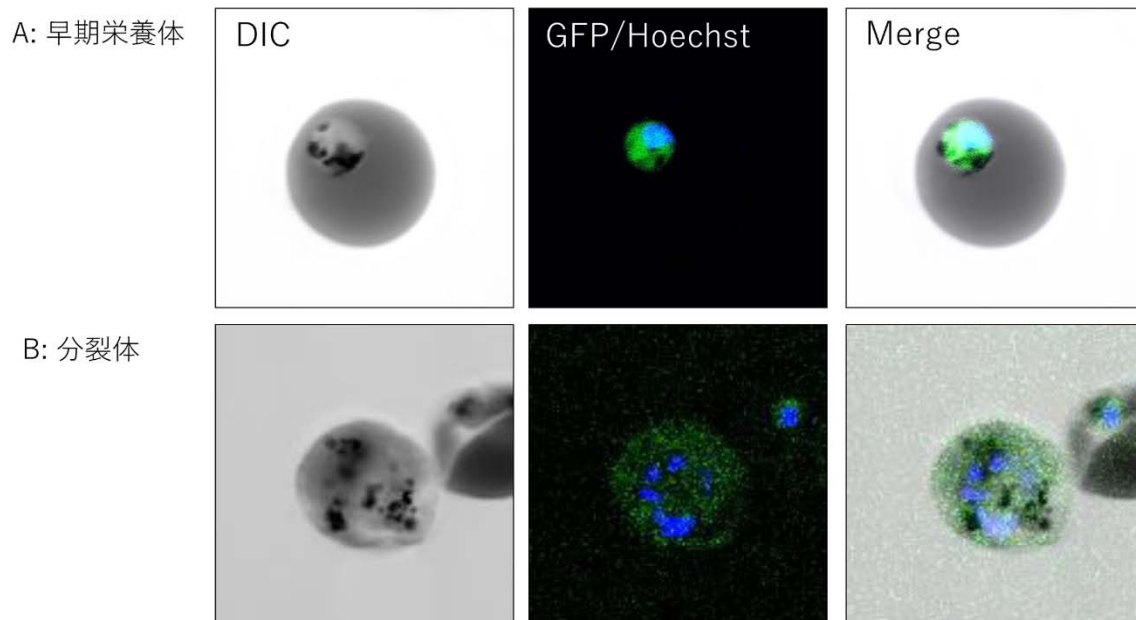
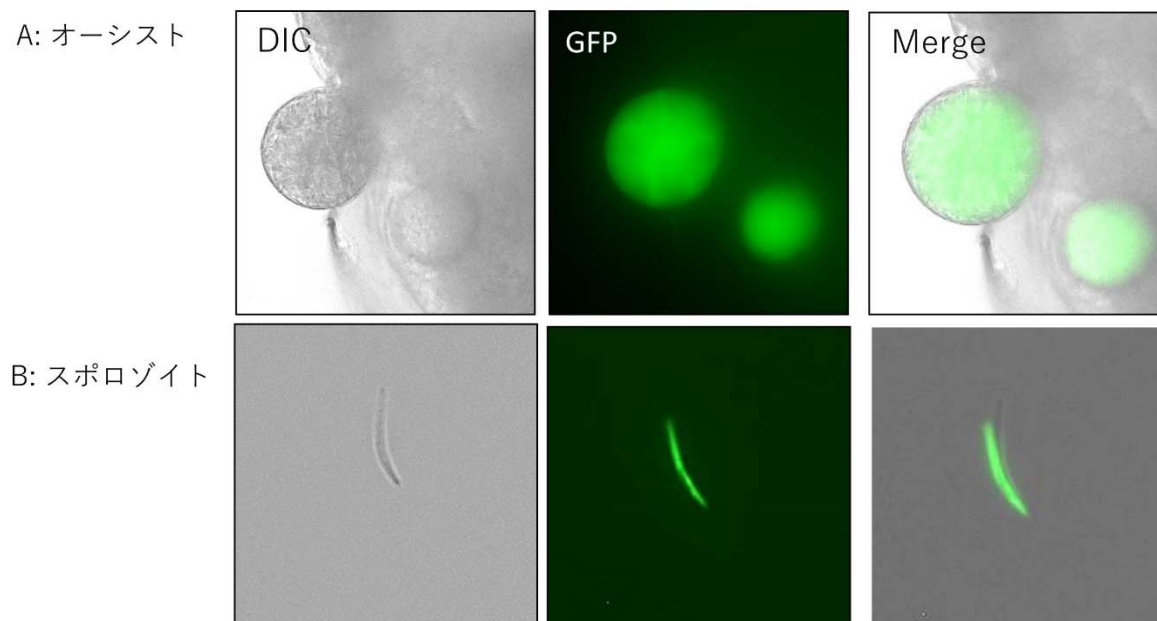


図2、Pcy, GFP::Luci 株における媒介蚊内ステージのGFPシグナル（蛍光顕微鏡像）



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<br>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<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 所属部局等・職名                                                          |      |
|       | まさたに たつのり<br>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・<br>准教授(現 岐阜大学応用生物科学部・准教授)<br>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 | <p>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。</p> |                                                                   |      |



|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p>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。</p> <p>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。</p>                                                                                                                                     |
| 研究成果の概要 | <p>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。</p> <p>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。</p> |
| 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<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 所属部局等・職名               |       |
|       | いかだい ひろみ<br>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<br>福本晋也                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授    |       |
| 研究期間  | 2020年4月1日 ～ 2021年3月31日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                        |       |
| 目的・趣旨 | <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> |                        |       |

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究経過の概要</p> | <p>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。</p> <p>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。</p> <p>以下の主な計画に沿って実施されている。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① dsRNA の作製(福本)および RNAi ハマダラカの作製 (筏井)</li> <li>② RNAi ハマダラカを用いたマalaria原虫感染試験(筏井)</li> <li>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)</li> <li>④ 原虫排除機構の解析(筏井・福本)</li> </ol>                                                                                                                                                                                                 |
| <p>研究成果の概要</p> | <p>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。</p> <div data-bbox="384 1149 622 1570"> <p>#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)。</p> </div> <p>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。</p> <p>スクリーニング途中ではあるが、左に結果の一部を示す。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> |
| <p>研究成果の発表</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和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<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 所属部局等・職名                 |       |
|         | やまぎしじゅんや<br>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<br>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   | <p>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。</p>                            |                          |       |
| 研究経過の概要 | <p>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。</p> |                          |       |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究成果の概要 | <p>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</p> <p>1) <i>B. bovis</i> クローン株の準備</p> <p><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。</p> <p>2) ヒト赤血球への馴化</p> <p><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。</p> <p>3) ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> のゲノム解析</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>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。</p> <p>ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の創出</p> <p><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。</p> |
| 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<br>内共同研究担当教員 | 菅沼 啓輔 |
| 研究課題名   | モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾールをシード化合物とした<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 所属部局等・職名               |       |
|         | なりた こういち<br>成田 紘一                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 東北医科薬科大学・薬学部・助教        |       |
| 研究分担者   | むらた としひろ<br>村田 敏拓                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 東北医科薬科大学・薬学部・講師        |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                        |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                        |       |
|         | すがぬま けいすけ<br>菅沼 啓輔                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 帯広畜産大学原虫病研究センター・助教     |       |
| 研究期間    | 2020年4月1日 ～ 2021年3月31日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                        |       |
| 目的・趣旨   | <p>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。</p> <p>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。</p>                                                                                                                                                                                      |                        |       |
| 研究経過の概要 | <p><b>1. 新規類縁化合物の設計と合成</b><br/>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)。</p> <p><b>2. 天然資源からの新規物質の探索</b><br/>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)。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> |                        |       |

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の概要</p> | <p><b>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</b></p> <p>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。</p> <div data-bbox="1129 342 1414 562" data-label="Chemical-Block"> <p>2,5-ジフェニルオキサゾールの化学構造</p> </div> <p><b>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</b></p> <p>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。</p> <p><b>3. 合成した化合物の抗トリパノソーマ活性評価</b></p> <p>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ではできなかった。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。</p> <p>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。</p> |
| <p>研究成果の発表</p> | <p>&lt;特許&gt;</p> <p>1) トリパノソーマ症の治療薬及び予防薬<br/>菅沼啓輔、成田紘一、村田敏拓、特願 2020-081936</p> <p>&lt;論文&gt;</p> <p>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.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 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<br>内共同研究担当教員                           | 西川 義文 |
| 研究課題名 | 新規抗アピコンプレクサ類原虫薬 DKP 誘導体の実用化                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                  |       |
| 研究代表者 | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 所属部局等・職名                                         |       |
|       | にへい こういち<br>二瓶 浩一                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | (公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・研究総括と実験の実施           |       |
| 研究分担者 | いいじま まさとみ<br>飯島 正富                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | (公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・抗原虫剤の生産方法の開発         |       |
|       | どい ひろやす<br>土井 宏育                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | (公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員・抗原虫剤の生産方法の開発         |       |
|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                  |       |
|       | にしかわ よしふみ<br>西川 義文                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授・(役割分担)抗原虫活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 | <p>アピコンプレクサ類原虫トキソプラズマは、世界人口の約 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。</p> |                                                  |       |



|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究経過の概要 | <p>原虫病薬は、市場規模が新規薬剤の開発費を下回る。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。</p> <p>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。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 研究成果の概要 | <p>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。</p> <p>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メンターを用いた 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メ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。</p> <p>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、エピジェネティックに変化を与えて、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。</p> <p>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。</p> |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <p>○ Lessombun A, Iijima M, Umeda K, Kondoh D, Pagmadulam B, Abdou AM, Suzuki Y, Ohba SI, Isshiki K, Kimura T, Kubota Y, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis. <i>J Infect Dis.</i> 2020 Feb 18;221(5):766-774. doi: 10.1093/infdis/jiz501.</p> <p>○ Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand T, Igarashi M, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing <i>Streptomyces</i> species from Mongolian soils. <i>Parasitol Int.</i> 2020 doi: 10.1016/j.parint.2019.101961.</p> <p>○ 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.</p> <p>○ <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.</p> |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和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<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                            | 所属部局等・職名               |       |
|         | よしかわ やすなが<br>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<br>福本 晋也                                                                                                                                                                                                                                                                        | 帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授    |       |
| 研究期間    | 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 | <p>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。</p> <p>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。</p> |                        |       |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究成果の概要 | <p>(1) 病原性に対する影響</p> <p><b>Brca2</b> 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。</p> <p>(2) ガメートサイトに対する影響</p> <p>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、<b>Brca2</b> 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 <b>Brca2</b> 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。</p> <p>(3) オーカイネートに対する影響</p> <p><b>Brca2</b> 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。</p> <p>(4) X 線感受性に対する影響</p> <p>野生株では増殖率が低下しない X 線量において <b>Brca2</b> 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。</p> |
| 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<br>内共同研究担当教員                                          | 横山 直明 |
| 研究課題名   | Development of antigen detection rapid diagnostics<br>for equine piroplasmosis                                                                                                                                                                          |                                                                 |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                           | 所属部局等・職名                                                        |       |
|         | サンジャイ クマール<br>Sanjay Kumar                                                                                                                                                                                                                              | ICAR-National Research Centre on Equines<br>Principal Scientist |       |
| 研究分担者   | ラジェンダ クマール<br>Rajender Kumar                                                                                                                                                                                                                            | ICAR-National Research Centre on Equines<br>Principal Scientist |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                 |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                 |       |
|         | よこやま なおあき<br>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   | <p><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。</p>                                                            |                                                                 |       |
| 研究経過の概要 | <p>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。</p> <p>1) 標的となる診断用原虫抗原の選抜<br/>2) 免疫抗原用の遺伝子組換え抗原の大量発現と精製<br/>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</p>                                                                                                   |                                                                 |       |
| 研究成果の概要 | <p>現在までの研究推進状況は以下の通りである。</p> <p>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。<br/>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。<br/>3) 現在その遺伝子組換え抗原をマウスに免疫している。</p> |                                                                 |       |
| 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<br>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)<br>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<br>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<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 所属部局等・職名                |       |
|         | ひこさか けんじ<br>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<br>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<br>福本 晋也                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授     |       |
| 研究期間    | 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。 |                         |       |

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p>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。</p> |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <p>なし</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |



帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 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<br>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)<br>氏 名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 所属部局等・職名                                                          |       |
|         | ブン タン ロン<br>Phung Thang Long                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Hue University of Agriculture and Forestry<br>Associate Professor |       |
| 研究分担者   | ディン チ ビッチ ラン<br>Dinh Thi Bich Lan                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Hue University of Agriculture and Forestry<br>Associate Professor |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                   |       |
|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                   |       |
|         | よこやま なおあき<br>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<br>概 要 | <p>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。</p> <p>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。</p>                                     |
| 研究成果の<br>発 表 | <p>Thillaiampalam Sivakumar, Bumduuren Tuvshintulga, Hemal Kothalawala, Seekkuge Susil Priyantha Silva, <b><u>Dinh Thi Bich Lan</u></b>, <b><u>Phung Thang Long</u></b>, Adrian Patalinghug Ybañez, Rochelle Haidee Daclan Ybañez, Daniel Francisco Benitez, Dickson Stuart Tayebwa, Alan Caine Costa DE Macedo, Leonhard Schnittger, <b><u>Naoaki Yokoyama</u></b>: Host range and geographical distribution of <i>Babesia</i> sp. Mymensingh. <i>Transboundary and Emerging Diseases</i>. 2020; 67: 2233-2239. PMID: 32166838</p> |

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 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<br>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)<br>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<br>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 |                                            |       |