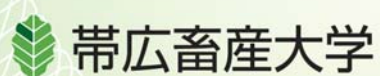


文部科学省認定 共同利用・共同研究拠点
OIEコラボレーティングセンター

原虫病研究センター 年報

NRCPD 2021 | 令和3年度



Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

National Research Center for Protozoan Diseases

OIE collaborating centre for surveillance and control of animal protozoan diseases

目 次

1. センターの概要	1
①沿革	1
②設置目的等	2
2. 組織等	3
①教員数	3
②技術系職員数	3
③事務系職員数	3
④組織図	4
⑤原虫病研究センター運営委員会委員	5
3. 予算、決算、外部資金等	6
①歳出決算額	6
②研究費総額、研究者 1 人当たりの研究費	6
③科学研究費等の採択状況	7
④その他の外部資金獲得状況	8
4. 研究活動	9
①共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む）	9
②共同研究課題採択一覧	9
③共同利用・共同研究の参加状況	11
④学会誌、学術雑誌、国際会議等に掲載された論文数	11
⑤出版物の発行部数	12
⑥受賞状況	12
⑦研究者を対象とした研究会、シンポジウム等の実施状況	12
5. 国際交流状況	13
①国際シンポジウム等の主催・参加状況	13
②国際学術交流協定の状況	14
③国際的な研究プロジェクトへの参加状況	15
④研究者の海外派遣状況・外国人研究者の招へい状況（延べ人数）	20
⑤その他・国際研究協力活動の状況	20
6. 教育活動・人材養成	21
①大学院生等の受入状況	21
②留学生の受入状況	21

③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数	21
④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧	22
7. 情報発信・広報活動等	23
①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）	23
②定期刊行物やホームページ等による一般社会に対する情報発信の取組	24
8. 分野等の研究活動	25
節足動物衛生工学分野	25
生体防御学分野	29
ゲノム機能学分野	47
高度診断学分野	57
先端予防治療学分野	65
感染病理学分野	75
地球規模感染症学分野	77
9. 共同研究成果報告書	81
介卵伝播性時における共生菌—マダニ間のクロストーク解析	82
トキソプラズマ分泌性タンパク質群の宿主ミトコンドリアとの相互作用解析	84
可視化マラリア原虫を用いたオルガネラの三次元構造解析	86
トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質の ナノスケールレベルでの分布解析	88
ポピュレーショントラックによるマウスでの潜伏感染に必要な トキソプラズマ原虫遺伝子の機能評価	90
分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるフタトゲチマダニの 胚発生に及ぼす影響	92
Pathogenicity of the buffalo malaria parasites	94
カブリダニの卵形成の分子機構解明と人工飼料開発への応用	99
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	101
トキソプラズマのプログラム細胞死メカニズム解明に向けた研究	105
Bar-seq を用いたウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定	107
Establishment transgenic manipulation of <i>Trypanosoma</i> <i>equiperdum</i> using of CRISPR/Cas9 and RNAi	109
安全性の高いトリパノソーマ症新規治療薬の開発を目指したモンゴル国薬用 植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾール誘導体の合成と活性評価	111

ネズミマラリア原虫における Brca2 による雌ガメートサイトへの分化	113
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	115
Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration	117
Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmosis	118
The development of a DiCre recombinase-expressing strain of Babesia for the creation of conditional gene knockouts	120
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	122
Investigation on the presence of trypanocidal drug resistance used for water buffaloes in the Philippines	124
I International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories	125

1. センターの概要

①沿革

I. 原虫病細胞免疫研究室（1983-1990）

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

II. 原虫病分子免疫研究センター（1990-2000）

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

1992 年 4 月 細胞病態生理学分野（客員研究分野）新設

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

1995 年 4 月 耐病性遺伝子工学分野新設

1997 年 4 月 節足動物衛生工学分野新設

1997 年 11 月 研究棟増設（970 m²）

III. 原虫病研究センター（2000～現在）

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

2002 年 3 月 研究棟増設（1,730 m²）

2002 年 10 月 「21 世紀 COE プログラム」に選定

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

2005 年 4 月 原虫進化生物学分野、遺伝生化学分野、国際獣疫疫学分野の新設

2006 年 3 月 研究棟増設（1,520 m²）

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

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

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

2012 年 11 月 寄付講座「生命平衡科学講座（白寿）」を開設

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

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

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

2018 年 1 月 OIE/ISO 業務担当分野として、国際獣疫分野新設

②設置目的等

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

2. 組織等

①教員数

	教 員 数 (単位：人)					
	令和 3 年度 (R03.12.31 現在)					
	現 員 数	任期制導入状況				
		女 性 数	外 国 人 数	任 期 付 教 員 数	女 性 数	外 国 人 数
教 授	6	0	1	0	0	0
准教授	3	1	0	0	0	0
講 師	0	0	0	0	0	0
助 教	1	0	0	1	0	0
助 手	0	0	0	0	0	0
合 計	10	1	1	1	0	0

②技術系職員数

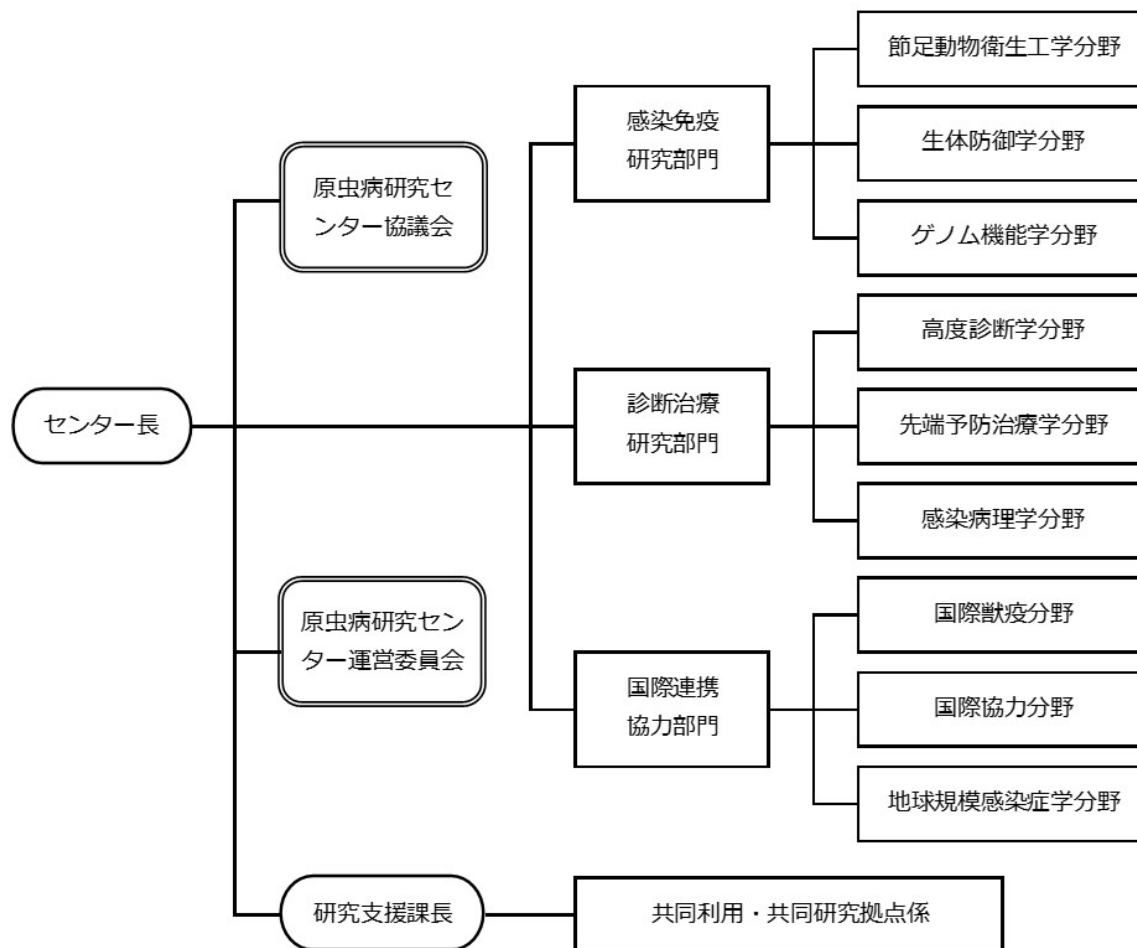
区 分		令和 3 年度 (人)	
技術系職員数		13	
	うち常勤	6	
	うち非常勤	7	

③事務系職員数

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

④組織図

【令和 3 年度】



⑤原虫病研究センター運営委員会委員

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

3. 予算、決算、外部資金等

①歳出決算額

区 分	令和 3 年度（単位：百万円）	
	決算額	うち運営費交付金
人 件 費	152	140
物 件 費	144	31
計	296	171

②研究費総額、研究者 1 人当たりの研究費

	教員数 (a)	研究費総 額(外部資 金を含む) (b)	研究費総 額(外部資 金を除く) (c)	教員 1 人当 たりの研究 費(外部資金 を含む) (b)/(a)	教員 1 人当 たりの研究 費(外部資金 を除く) (c)/(a)
令和 3 年度 (単位：百万円)	10	277	140	27.7	14

③科学研究費等の採択状況

研 究 種 目	研究課題番号	新 規 継 続	職 名 ・ 代 表 者	金 額 (直接経費) (単位：千円)
基盤研究 (B)	21H02353	新 規	教授・西川 義文	3,600
基盤研究 (B)	19H03121	継 続	准教授・福本 晋也	4,100
基盤研究 (B)	19H03120	継 続	教授・河津 信一郎	4,100
基盤研究 (B)	18H02336	継 続	教授・玄 学南	2,800
挑戦的研究 (萌芽)	20K21359	新 規	教授・西川 義文	1,500
挑戦的研究 (萌芽)	19K22354	継 続	教授・玄 学南	1,500
国際共同研究強化 (B)	21KK0121	新 規	准教授・麻田 正仁	1,500
国際共同研究強化 (B)	20KK0152	継 続	教授・西川 義文	3,600
国際共同研究強化 (B)	19KK0173	継 続	教授・河津 信一郎	4,200
国際共同研究強化 (B)	19KK0174	継 続	教授・横山 直明	4,700
国際共同研究強化 (B)	19KK0175	継 続	准教授・福本 晋也	2,800
国際共同研究強化 (B)	18KK0188	継 続	教授・玄 学南	3,000
基盤研究 (C)	19K06384	継 続	准教授・麻田 正仁	900
基盤研究 (C)	19K06416	継 続	准教授・白藤 梨可	1,100
若手研究	21K14914	新 規	特任研究員・ 渡邊 勇歩	1,400
若手研究	19K15972	継 続	助教・菅沼 啓輔	1,100
特別研究員奨励費	20J20134	継 続	特別研究員・ ガロン エロイザ メイ	1,100
特別研究員奨励費	20J40296	継 続	特別研究員・ 谷口 委代	1,200
特別研究員奨励費	20F20402	継 続	特別研究員・ ARIEFTA NANANG	1,100
特別研究員奨励費	19F19403	継 続	特別研究員・ Ehab Mossaad	500

④その他の外部資金獲得状況

予 算 種 目	番 号	新 規 継 続	職 名 ・ 代 表 者	金 額 (直接経費) (単位：千円)
国立研究開発法人 日本医療研究開発 機構	新興・再興感染症 に対する革新的 医薬品等開発推 進研究事業	継 続	教授・西川 義文	1,500
農林水産省	日中二国間共同 研究事業	継 続	教授・玄 学南	2,517
国立大学法人北海 道大学	卓越大学院プロ グラム	継 続	教授・西川 義文	2,250
A (株)	共同研究	継 続	教授・河津 信一郎	1,600
B (株)	共同研究	新 規	教授・玄 学南	220
C (株)	共同研究	継 続	准教授・福本 晋也	6,711
(株) 白寿生化学研 究所	寄附講座	継 続	教授・鈴木 宏志	9,000
公益財団法人伊藤 記念財団	伊藤記念財団研 究助成	新 規	助教・菅沼 啓輔	1,300
公益財団法人大下 財団	大下財団研究助 成	新 規	助教・菅沼 啓輔	1,000
公益財団法人 MSD 生命科学財団	MSD 生命科学財 団研究助成-感染 症領域-	新 規	助教・菅沼 啓輔	1,000
一般社団法人日本 卵子学会	寄附金	新 規	教授・鈴木 宏志	7,020
ファイテン株式会 社	寄附金	新 規	教授・鈴木 宏志	1,980

4. 研究活動

① 共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む）

共同利用・共同研究数（単位：件）	21
うち国際的な共同利用・共同研究数	8
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	8
うち国内での共同利用・共同研究数	13
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	13

② 共同研究課題採択一覧

研究代表者	研 究 課 題 名（21 件）	センター内 共同研究者
中尾 亮	介卵伝播性時における共生菌—マダニ間のクロストーク解析	白藤 梨可
小柴 琢己	トキソプラズマ分泌性タンパク質群の宿主ミトコンドリアとの相互作用解析	西川 義文
荒木 球沙	可視化マラリア原虫を用いたオルガネラの三次元構造解析	河津信一郎
藤田 秋一	トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質のナノスケールレベルでの分布解析	玄 学南
杉 達紀	ポピュレーショントラックによるマウスでの潜伏感染に必要なトキソプラズマ原虫遺伝子の機能評価	西川 義文
田仲 哲也	分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるフタトゲチマダニの胚発生に及ぼす影響	白藤 梨可
Morakot KAEWTH-AMASORN	Pathogenicity of the buffalo malaria parasites	麻田 正仁
鈴木 丈詞	カブリダニの卵形成の分子機構解明と人工飼料開発への応用	白藤 梨可
山岸 潤也	非固有宿主馴化バベシア原虫を用いた宿主域決定因子の同定	麻田 正仁
正谷 達膳	トキソプラズマのプログラム細胞死メカニズム解明に向けた研究	玄 学南
石崎 隆弘	Bar-seq を用いたウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定	麻田 正仁

Mark Carrington	Establishment transgenic manipulation of <i>Trypanosoma equiperdum</i> using of CRISPR/Cas9 and RNAi	菅沼 啓輔
成田 紘一	安全性の高いトリパノソーマ症新規治療薬の開発を目指したモンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾール誘導体の合成と活性評価	菅沼 啓輔
吉川 泰永	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	福本 晋也
筏井 宏実	雄ハマダラカ-マラリア原虫易感染モデルによるベクターコンピテンシー制御機構の解明	福本 晋也
Jack Sunter	Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration	菅沼 啓輔
Sanjay Kumar	Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmosis	横山 直明
Daniel Sojka	The development of a DiCre recombinase-expressing strain of Babesia for the creation of conditional gene knockouts	河津信一郎 麻田 正仁
Phung Thang Long	Isolation and <i>In vitro</i> cultivation of <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>Babesia</i> sp. Mymensingh, and <i>Babesia</i> sp. Hue-1 from cattle in Vietnam	横山 直明
Marvin Ardeza VILLANUEVA	Investigation on the presence of trypanocidal drug resistance used for water buffaloes in the Philippines	菅沼 啓輔
Zhe Hu	I International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories	菅沼 啓輔

③ 共同利用・共同研究の参加状況

区 分	令和 3 年度（単位：人）								
	機関数	受入人数				延べ人数			
			外国人	若手研究者(35 歳以下)	大学院生		外国人	若手研究者(35 歳以下)	大学院生
学 内 (法人内)	8	46 (26)	17 (7)	35 (21)	13 (7)	963 (414)	532 (158)	756 (353)	383 (186)
国立大学	8	18 (5)	0 (0)	7 (3)	3 (0)	54 (20)	0 (0)	27 (11)	15 (0)
公立大学	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
私立大学	2	4 (1)	0 (0)	2 (1)	2 (1)	7 (2)	0 (0)	4 (2)	4 (2)
大学共同利 用機関法人	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
独立行政法 人等公的研究機関	2	6 (3)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	6 (3)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
民間機関	3	4 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	4 (1)	0 (0)	1 (1)	0 (0)
外国機関	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
その他	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	23	78 (36)	17 (7)	46 (27)	18 (8)	1034 (440)	532 (158)	789 (368)	402 (188)

※下段には女性研究者数（内数）

④ 学会誌、学術雑誌、国際会議等に掲載された論文数

区 分	令和 3 年度
論 文 数	78
うち国際学術誌に 掲載された論文数	78

⑤出版物の発行部数

出 版 物 の 名 称	発 行 部 数
The Journal of Protozoology Research	ホームページに掲載

⑥受賞状況

受賞者氏名	賞 名	受賞年月	受賞対象となった研究課題名等
鈴木 宏志	第 114 回日本繁殖生物学会技術賞	R3 年 9 月	イヌの生殖工学技術開発に関する研究
水関実法子	第 67 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会大会長賞	R3 年 10 月	重症複合型免疫不全マウスを用いた犬糸状虫ミクロフィラリア血症移植モデルの開発
河津信一郎	第 62 回日本熱帯医学会大会相川正道賞	R3 年 11 月	マラリア原虫の抗酸化タンパク質に関する研究

⑦研究者を対象とした研究会、シンポジウム等の実施状況

シンポジウム		講演会 セミナー		研究会 ワークショップ		そ の 他		合 計	
件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数
2	66	0	0	1	14	2	74	5	154

5. 国際交流状況

①国際シンポジウム等の主催・参加状況

(1)主催状況

区 分		令和 3 年度	
主催件数		3	
主催した主な国際シンポジウム等			
	開催時期	国 際 シ ン ポ ジ ウ ム 等 名 称	参 加 人 数 (うち外国人数)
1	R3.10.28	Online symposium on joint usage/research center project “Establishment of tick biobank and its application to vector biology research”	24 (17)
2	R4.3.16	Online symposium on joint usage/research center project "Establishment of tick biobank and its application to vector biology research"	42 (32)
3	R4.3.16	Uganda-NRCPD annual alumni and scientific meeting	42 (32)

(2)参加状況

区 分		令和 3 年度	
参加件数		2	
参加した主な国際シンポジウム等			
	開催時期	国 際 シ ン ポ ジ ウ ム 等 名 称	参 加 人 数
1	R3.5.25	2 nd International Forum on Collaborative Researches in Parasitic Diseases	1
2	R3.11.18	The 60 th anniversary of the institute of veterinary medicine. INTERNATIONAL ONLINE CONFERENCE – 2021	3

②国際学術交流協定の状況

協定総数	15						
締結年月	終了予定年月	相手国	機 関 名	協定名	分 野	受入人数	派遣人数
2008年 11月	2023年 11月	フィリピン	フィリピン大学マニラ校公衆衛生学部	MOA	原虫病	0	0
2010年 9月	2025年 9月	中国	中国農業科学院上海獣医学研究所	MOU	原虫病	0	0
2011年 9月	2021年 9月	中国	延辺大学	MOU	原虫病	0	0
2015年 12月	2020年 12月	ウガンダ	マケレレ大学	MOA	原虫病	0	0
2016年 6月	2026年 6月	ブルキナファソ	ワガドゥーグー大学	MOA	原虫病	0	0
2017年 2月	2022年 2月	エジプト	マンスーラ大学	MOA	原虫病	0	0
2017年 6月	2022年 6月	南アフリカ	ノースウェスト大学	MOA	原虫病	0	0
2017年 11月	2022年 11月	中国	中国青海獣医学研究所	MOA	原虫病	0	0
2018年 1月	2023年 1月	ブルキナファソ	国際湿地帯畜産研究開発センター	MOA	原虫病	0	0
2018年 5月	2022年 5月	フィリピン	セブ工科大学	MOU	原虫病	0	0
2019年 6月	2024年 6月	モンゴル	モンゴル獣医学研究所	MOA	原虫病	0	0
2019年 7月	2022年 7月	フィリピン	フィリピンカラバオセンター	MOU	原虫病	0	0
2019年 7月	2024年 7月	スリランカ	スリランカ動物生産健康局	MOU	原虫病	0	0
2019年 10月	2022年 10月	フィリピン	カビテ州立大学	MOU	原虫病	0	0
2021年 10月	2026年 10月	中国	新疆農業大学獣医学部	MOA	原虫病	0	0
合 計						0	0

③国際的な研究プロジェクトへの参加状況

総 数	11		
参加期間	相手国・研究機関名	研究プロジェクト等の概要	関係研究者名
平成30年度～令和3年度	トルコ・セルチュック大学	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）、トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立 プロジェクト概要：バベシア原虫はマダニにより媒介される住血寄生虫である。家畜に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死感染を引き起こし、地球規模で畜産業の脅威となっている。本研究では、古来よりアジア・ヨーロッパ・中東などの家畜交易中継地として知られるトルコに着目した。当国における遺伝的に多様な原虫集団を対象とし、ゲノム疫学的手法に基づく家畜バベシア症の流行実態の解明と、ゲノム情報に立脚した現地即応型のバベシア症制御戦略の構築を目指す。 参加国：日本・トルコ 予算見込み額：1,780万円	玄 学南 五十嵐 慎
令和元年度～令和3年度	スリランカ・獣医学研究所、フィリピン・セブ工科大学、ベトナム・フエ大学、モンゴル・獣医学研究所、ウガンダ・マケレレ大学、ブラジル・バイア獣医協議会、アルゼンチン・農業技術研究所	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）、新たに発見された病原性牛バベシアに対する国際防疫体制強化に向けた基盤研究 プロジェクト概要：牛バベシア病とは、マダニによって媒介され、赤血球に寄生して牛に発熱、貧血、血色素尿を呈し、多大な経済的被害をもたらす海外悪性伝染病である。我々がスリランカ国で発見した新バベシアは、我が国で家畜法定伝染病の病原体に指定されている既知の <i>Babesia bovis</i> と <i>Babesia bigemina</i> に続く、第3の病原性牛バベシア（<i>Babesia</i> sp. Mymensingh）である。本研究では、海外研究機関と連携して、現地調査、分離培養、牛感染試験などを実施し、新たに発見された病原性牛バベシアに対する国際防疫体制強化に資する学術基盤を構築していく。 参加国：日本・スリランカ・フィリピン・ベトナム・モンゴル・ウガンダ・ブラジル・アルゼンチン 予算見込み額：1,410万円	横山 直明 白藤 梨可 ティルラセン バラム シヴァクマール

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

参加期間	相手国・研究機関名	研究プロジェクト等の概要	関係研究者名
令和元年度～令和5年度	タイ・チェンマイ大学・プリンスオブソンクラーク大学	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）、フィラリアを媒介しない蚊作出に向けたタイ王国における犬糸状虫の生態疫学調査 プロジェクト概要：蚊は病原体の媒介者として、人類に最も脅威を与えている生物(Top Deadliest Animal)である。殺虫剤耐性、生態系への影響などへの問題から、殺虫剤による蚊の撲滅は困難である。そこで病原体を媒介しない蚊へと置換することで、感染症を制圧できないかとの概念が浮上してきた。近年のゲノム編集技術の進歩により、病原体を媒介しない蚊の実現が技術的に可能となってきた。そこで本研究では、犬糸状虫を媒介しない蚊の作出実現にむけた基礎的知見を得るために、タイ王国で犬と蚊における犬糸状虫症疫学調査を行い、どのような遺伝子応答が蚊による犬糸状虫の媒介に重要なのかフィールドレベルで解析を行うことを目指す。 参加国：日本・タイ 予算見込み額：1,410万円	福本 晋也
令和2年度～令和6年度	モンゴル・モンゴル生命科学大学	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）、モンゴルにおける小型反芻獣トキソプラズマ症のワクチン開発研究 プロジェクト概要：モンゴルでは様々な家畜感染症が発生しており、家畜疾病に対する予防・対策のニーズは高く、早急な対応が必要となっている。特に家畜における繁殖障害は経済的な損害が大きく、これに関連する病原性原虫としてトキソプラズマの存在が示唆されている。そこで本研究では、モンゴルの重要な家畜資源である小型反芻獣に着目し、トキソプラズマ感染に対する新しいワクチンの開発を目指す。モンゴル由来原虫株を分離し、細胞スクリーニング法による免疫刺激型抗原の同定、プロテオームによる自然感染動物で認識される感染認識抗原の同定を進め、これら抗原を組み合わせたカクテルワクチンの開発を進める。さらに、遺伝子破壊原虫の解析で新規ワクチン抗原の機能を理解し、小型反芻獣への感染実験を通じて新規ワクチンの効果と防御免疫反応の詳細を明らかにする。 参加国：日本・モンゴル 予算見込み額：1,560万円	西川 義文

参加期間	相手国・研究機関名	研究プロジェクト等の概要	関係研究者名
令和2年度～令和4年度	インドネシア・ムラワルマン大学	プロジェクト名：特別研究員奨励費、植物内生真菌を用いたケミカルバイオロジーによる抗トキソプラズマ薬の探索 プロジェクト概要：本研究ではインドネシア産および日本産植物の内生菌を利用し、インドネシアのヒト及び家畜動物で感染が蔓延しているトキソプラズマ原虫を含む原虫感染症を対象にした大規模な抗原虫活性のスクリーニングを実施する。有望な菌株については、産生化合物の同定を行い、作用機序の解明を進める。インドネシア天然資源から創薬シーズが発見されれば自国課題解決型疾病対策の構築に繋がり、同国の科学技術の発展に資することが期待される。 参加国：日本・インドネシア 予算見込み額：230万円	西川 義文 アリエフタナナン
令和2年度～令和3年度	スリランカ・スリランカ動物生産管理局獣医学研究所	プロジェクト名：JSPS 二国間交流事業共同研究／セミナー、スリランカ国で発見された新牛バベシア病に対する簡易診断法の開発研究 プロジェクト概要：日本チームが保有する原虫病に対する診断技術を、牛バベシアに高度に汚染されているスリランカ国で展開し、スリランカ国での社会実装可能な牛バベシア病に対する簡易診断法を確立する。 参加国：日本・スリランカ	横山 直明
令和3年度～令和6年度	タイ・チュラロンコン大学	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）、家畜住血微生物病の新規制御法創出に向けたマラリア原虫・他住血微生物相互作用の解明 プロジェクト概要：スイギュウやヤギのマラリア原虫の病原性や生活環を明らかにするとともに、他の住血微生物との混合感染状況を明らかにする。住血微生物の混合感染状況と症状の解析を行うと共に、微生物間の干渉に焦点を当てた、家畜住血微生物病の新規制御法創出を行う。 参加国：日本・タイ 予算見込み額：1,470万円	麻田 正仁

令和3年度～令和4年度	チェコ・チェコ共和国科学アカデミー寄生虫学研究所	プロジェクト名：JSPS 二国間交流事業共同研究／セミナー、DiCre/loxP システムを応用した遺伝子改変バベシア原虫の創出 プロジェクト概要：DiCre/loxP システムを応用した遺伝子改変バベシア原虫を作成して、遺伝子組換え生ワクチンを作製することを目的とする。具体的には、チェコ科学アカデミーバイオロジーセンター・寄生虫学研究所（BC ASCR）が同定した欧州産バベシア原虫の増殖関連因子（BdAPD3）遺伝子を、帯広畜産大学原虫病研究センター（NRCPD）が確立している遺伝子改変原虫（GAP）作製技術を応用して、随意破壊することで、動物体内での増殖が制御可能な GAP ワクチンを作製する。 参加国：日本・チェコ共和国	河津 信一郎
令和3年度～令和5年度	ウガンダ・マケレレ大学、ケニア・ナイロビ大学、タンザニア・ソコイネ農業大学、ブルキナファソ・ワガドゥーグー大学、南アフリカ・ノースウェスト大学、エジプト・メノフィア大学	プロジェクト名：JSPS 拠点形成事業－B.アジア・アフリカ学術基盤形成型、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築 プロジェクト概要：ゲノム科学に立脚した、アフリカの各流行地域に適したマダニ媒介原虫病に対する斬新な診断・治療・予防法の創出を通し、アフリカ諸国における家畜生産性向上への貢献を目的とした国際ネットワークのプラットフォームを形成する。 参加国：日本・ウガンダ・ケニア・タンザニア・ブルキナファソ・南アフリカ・エジプト	玄 学南

④研究者の海外派遣状況・外国人研究者の招へい状況（延べ人数）

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

⑤その他・国際研究協力活動の状況

事業名等	概要	受入人数	派遣人数
該当なし			
合 計			

6. 教育活動・人材養成

①大学院生等の受入状況

区 分	令和3年度	
		うち外国人
博士後期課程	13	13
うち社会人 DC	0	0
修士・博士前期課程	2	1
うち社会人 MC	0	0
学 部 生	24	0
合 計	39	14

②留学生の受入状況

区 分	令和3年度
①アジア	13
②北米	0
③中南米	0
④ヨーロッパ	0
⑤オセアニア	0
⑥中東	1
⑦アフリカ	1
合 計	15

③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数

区 分	令和3年度	
	学内	学外
博士号取得者数	0	0

④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧

1	専攻分野名		学位授与 年月日	
	氏 名	該当なし	担当教員	
	学位論文 の題名			
	日本語訳			

7. 情報発信・広報活動等

①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）

シンポジウム 講演会		公開講座 セミナー		そ の 他 (施設等の一般公開等)		合 計	
件 数	参加人数	件 数	参加人数	件 数	参加人数	件 数	参加人数
2	66	3	88	0	0	5	154
○主なシンポジウム、公開講演会、施設等の一般公開の開催状況							
開催期間	形態 (区分)	対象	公開講座等名称	概 要		参加 人数	
R3.8.3	公開講座	一般	家畜衛生講習会（牛疾病特殊講習会）	牛の放牧衛生、牛小型ピロプラズマ病についてをオンラインで実施 対象者：家畜保健衛生所の職員など		47	
R3.10.28	シンポジウム	国際	Online symposium on joint usage/research center project “Establishment of tick biobank and its application to vector biology research”	Online symposium: DeMar Taylor 先生（筑波大学）と荻原麻里先生（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門）の 2 名による講演を実施		24	
R4.2.8-9	公開講座	一般	令和 3 年度家畜保健衛生所病性鑑定技術検討会(寄生虫部門)	ネオスポラ症の病性鑑定技術に参考となる講義をオンラインで実施 対象者：家畜保健衛生所職員		27	
R4.3.16	シンポジウム	国際	Online symposium on joint usage/research center project "Establishment of tick biobank and its application to vector biology research"	Online symposium: 原虫研マダニプロジェクトの活動紹介および Dr. Patrick Vudriko、Mr. Joseph Byaruhanga（ウガンダ；JICA 研修員 OB）による講演を実施		42	
R4.3.24	研究会	国際	原虫病研究センター/モンゴル獣医学研究所間のオンラインでの OIE 学術交流セミナー	OIE Academic Exchange Seminar (IVM-NRC PD) 「Molecular epidemiology of bovine <i>Babesia</i> species in domestic ruminants and <i>Theileria equi</i> and <i>Babesia caballi</i> in horses in Mongolia」		14	

② 定期刊行物やホームページによる一般社会に対する情報発信の取組

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

8. 分野等の研究活動

節足動物衛生工学分野

◆-----准教授 福 本 晋 也
(Shinya Fukumoto)

1. 研究テーマの概要

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

2. 主な研究テーマ

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

3. 2021 年度研究の総括

- ・ マラリア原虫は昆虫と哺乳動物の生物学的に異なる2宿主間を渡り歩き、感染を成立させます。マラリア原虫の感染メカニズム解析には、遺伝子組換え原虫が必須のツールとなってきています。ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* は全生活環を実験室で再現可能であることから、マラリアのモデルとして研究に用いられています。我々のグループでは現在までに、薬剤存在下の人工合成による薬剤耐性マーカー遺伝子の利用を考案し、本法を用いピューロマイシン・プラストサイジン選択システムの確立に成功しました。この研究成果応用し、マラリア原虫のハマダラカからマウスへの感染機構に重要な遺伝子を同定すると共に、ハマダラカへの感染機構の解明、ハマダラカの新規生物学的防除法の検証を行いました（論文リスト 3,5,7）。
- ・ 近年の野生鳥獣被害と捕獲必要性の増加を受け、野生鳥獣肉の食利用への期待が高まっています。しかしながら、その安全性の担保については理想的状態とは言えず、公衆衛生上のリスク要因であると懸念されています。そこで、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を調査モデル地域として研究を実施しました。エゾシカサンプルの収集・微生物叢について次世代シーケンサーを用いた解析を実施

しデータの集積を行いました。その結果、肝蛭、腸管出血性大腸菌、クリプトスポリジウム、住肉胞子虫、住血原虫など、多用な食中毒に関連する病原体をエゾシカが保有していることが明らかになりました。令和3年度においては、その中でもブラストシスティス、腸管出血性大腸菌などについて調査を行いました。ブラストシスティスについてはヒトの症例からは未検出のサブタイプ14が優占種であり現時点では公衆衛生上のリスクは低いこと、腸管出血性大腸菌についてはヒトで集団感染が頻発する血清型が分離され極めて高い公衆衛生上のリスクを持つことが確認されました（論文リスト1,4）。

- ・ 犬糸状虫は獣医学上、イヌで最も重要な問題となっている寄生虫です。定期的に駆虫を行う予防法はあるものの、生涯に渡る抗寄生虫薬投与の必要性や薬が効かない耐性寄生虫出現の問題があります。また、寄生虫薬の投与はペットオーナーの意思に依存するため、効果的な予防法が有るにも関わらず今も蔓延が続く深刻な寄生虫であり、抜本的な対策の提案が望まれています。我々のグループでは犬糸状虫およびフィラリアを媒介しない蚊の作出を目指して基礎研究を行っています。令和3年度についてはその一貫としてモンゴル獣医学研究所との共同研究により、犬糸状虫症の疫学調査を行い、犬糸状虫症および近縁のフィラリアの分布を明らかにしました（論文リスト6,9）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

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

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2021年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Eiki Yamasaki, Shinya Fukumoto*. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Yezo sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in the Tokachi sub-prefecture of Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2022 Apr 7. PMID: 35387920.
2. Naoaki Shinzawa, Chisako Kashima, Hiroka Aonuma, Kei Takahashi, Masayuki

- Shimajima, Shinya Fukumoto, Erisha Saiki, Daisuke S Yamamoto, Shigeto Yoshida, Hiroyuki Matsuoka, Yoshihiro Kawaoka, Hirotaka Kanuka. Generation of transgenic mosquitoes harboring a replication-restricted virus. **Frontiers in Tropical Diseases**. 2022. In pres.
3. Takahiro Shirozu, Nobuaki Seki, Akira Soga, Shinya Fukumoto*. Evaluation of mosquitocidal efficacy of Scorpion Toxin Tf2 from *Tityus fasciolatus* against *Anopheles stephensi* mosquitoes. **Medical Entomology and Zoology**. 2021; 72(4): 1–5.
 4. Takahiro Shirozu, Yu-ki Morishita, Mami Koketsu, Shinya Fukumoto*. Molecular detection of *Blastocystis* sp. subtype 14 in the Yezo sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Hokkaido, Japan. **Veterinary Parasitology-Regional Studies and Reports**. 2021 Jul; 25: 100585. PMID: 34474780.
 5. Kazuhiko Nakayama, Yuta Kimura, Yu Kitahara, Akira Soga, Asako Haraguchi, Jun Hakozaiki, Makoto Sugiyama, Kodai Kusakisako, Shinya Fukumoto, Hiromi Ikadai. Role of *Plasmodium berghei* ookinete surface and oocyst capsule protein, a novel oocyst capsule-associated protein, in ookinete motility. **Parasites & Vectors**. 2021 Jul 21; 14(1): 373. PMID: 34289894.
 6. Janchivsengee Bilegjargal, Izabella Rzaad, Shinya Fukumoto, Boldbaatar Chinchuluun, Sukhbaatar Lkhagvatseren, Sambuu Gantuya, Gansukh Azjargal, Zayat Batsukh, Tserendorj Munkhjargal. Microscopic and molecular detection of *Deraiphoronema evansi* (Lewis, 1882) in domestic Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) of Mongolia. **Parasitology International**. 2021 Jun 12; 84: 102404. PMID: 34129934.
 7. Akira Soga, Takahiro Shirozu, Shinya Fukumoto*. Glyoxalase pathway is required for normal liver-stage proliferation of *Plasmodium berghei*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2021 Apr 16; 549: 61–66. PMID: 33667710.
 8. Hironobu Sato, Hiroki Hiraya, Takutoshi Sugiyama, Shinya Fukumoto, Ryota Matsuyama, Yojiro Yanagawa, Ryo Nakao, Takao Irie, Kensuke Taira, Akiko Yamazaki, Katsuro Hagiwara, Ayako Yoshida, Yoichi Kamata, Madoka Ichikawa-Seki. Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) from Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1. **Parasitology International**. 2021 Feb; 80: 102222. PMID: 33137508.
 9. Ankhbayar Jambaldorj, Shinya Fukumoto, Munkhjargal Tserendorj. Surveillance of canine filarial infection in Ulaanbaatar city. **Mongolian Journal of Agricultural Sciences**. 2021; 32(1). 1–4.

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

1. 第 73 回日本衛生動物学会大会病害動物の生理分子生物談話会「病原体を媒介しない蚊による犬糸状虫症制御」、2021 年 4 月 16 日

9. 獲得研究費

1. 令和 2 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省) ベクター蚊におけるフィラリア媒介能獲得機構の遺伝学的分子基盤の解明 (19H03121)、代表、令和元年度～令和 3 年度
2. 令和 2 年度 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化(B)) (文部科学省) フィラリアを媒介しない蚊作出に向けたタイ王国における犬糸状虫の生態疫学調査 (19KK0175)、代表、令和元年度～令和 5 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞者：水関 実法子 (学部 5 年)
受賞名：第 67 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 大会長賞
受賞テーマ：重症複合型免疫不全マウスを用いた犬糸状虫ミクロフィラリア血症移植モデルの開発
受賞年：2021 年 10 月 2 日

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. フィラリアを媒介しない蚊作出に向けたタイ王国における犬糸状虫の生態疫学調査 (チェンマイ大学)
2. マラリアの媒介メカニズムに関する研究 (北里大学)
3. 野生動物感染症に関する網羅的解明 (千葉大学)
4. マラリアワクチンの開発 (金沢大学)

1. 研究テーマの概要

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

2. 主な研究テーマ

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

3. 2021 年度研究の総括

- ・ 犬バベシア症は、バベシア (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni*) の赤血球内寄生によって引き起こされるマダニ媒介性疾患であります。バベシアに感染した犬は、重度な溶血性貧血を引き起こし、死に至る場合も多い。日本を含む世界中に発生が認められ、その被害は深刻とされるが、いまだに副作用の少ない有効な治療法が開発されていないのが現状であります。そこで、当研究室では特に日本を含むアジア地域で流行が深刻とされる犬バベシア (*B. gibsoni*) 症に対する治療法やワクチン開発の研究に注力してきました。今回は、マラリアに対する新薬として上市したタフェノキンの抗犬バベシア症作用について調べてみました。犬を用いた治療効果試験では、1回か2回投与するだけで顕著な治療効果が認められました。また、特に目立つ副作用は認められませんでした。今後は、フィールドにおける臨床試験の実施が待たれています (論文リスト 19)。
- ・ トキソプラズマにはデンスグラニュール（濃縮顆粒）という小器官が存在しますが、虫体が宿主細胞に侵入した後この小器官からは多くのタンパク質が分泌され（デンスグラニュールタンパク質 (GRAs)）、寄生体胞の形成や宿主への病原性に関与するとされています。本研究では TgGRA9 の機能解析を行いました。いままで先行研究により TgGRA9 の存在は判明しました

が、その機能は不明のままでした。そこで、本研究では CRISPR/Cas9 系を用いて RH 株（遺伝子型 I）と PLK 株（遺伝子型 II）の TgGRA9 ノックアウト虫体を作出しました。マウスモデルにおけるこれら TgGRA9 欠損株は、遺伝子型特異的病原性を示しました。RHΔGRA9 はその親株（野生型）との間に病原性の変化が認められなかったが、PLKΔGRA9 は親株（野生型）より、病原性が著しく低下していることが判明しました。これらの結果より、マウスモデルにおいて TgGRA9 は遺伝子型特異的に病原性に関わっていることが示唆されました。さらに、TgGRA9 欠損 PLK 株で予防接種したマウスに強毒の RH 株の攻撃したところ、完全防御されることが明らかとなりました（論文リスト 24）。

- ・ブルキナファソ、フィリピン、トルコ、ウガンダ、スーダン、タイ、エジプトなどにおける家畜（牛・水牛・ヤク・羊・山羊）のマダニ媒介感染症の流行実態調査を広範囲に渡り実施しました。調査した地域において、バベシア属、タイレリア属、アナプラズマ属、エーリキア属、リケッチア属などが、家畜に被害を与える主なマダニ媒介感染症であることがそれぞれ明らかになりました。これらの調査地域においてはマダニの積極的な駆除対策の推進が提案されました（論文リスト 1、8、13、14、16、17、18）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

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

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（*責任著者）

1. Paul Franck Adjou Moumouni, Germaine Lim-Bamba Minoungou, Christian Enonkpon Dovonou, Eliza May Galon, Artemis Efstrtiou, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki, **Xuena Xuan***. A survey of tick infestation and tick-borne piroplasm infection of cattle in Oudalan and Seno provinces, northern Burkina Faso. **Pathogens**. 2022; 11: 31. PMID: 35055979.

2. Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, Kozo Fujisaki, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, Rika Umemiya-Shirafuji. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) and *Rickettsia* spp. in hard ticks distributed in Tokachi District, eastern Hokkaido, Japan. **Current Reaserch in Parasitology & Vector-Borne Diseases**. 2021; 1: 100059. PMID: 35284860.
3. Kidaka Taishi, Tatsuki Sugi, Kyoko Hayashida, Yutaka Suzuki, Xuenan Xuan, Jitender P Dubey, Junya Yamagishi. TSS-seq of *Toxoplasma gondii* sporozoites revealed a novel motif in stage-specific promoters. **Infection, Genetics and Evolution**. 2022; 98: 105213. PMID: 35041968.
4. Tawin Inpankaew, Thi Thuy Nguyen, Burin Nimsuphan, Chanya Kengradomkij, Ketsarin Kamiyingkird, Wissanuwat Chimnoi, Boy Boonaue, Xuenan Xaun. Sero-prevalence of *Toxoplasma gondii* infection from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in northeastern and southern Thailand. **Filia Parasitologica**. 2021; 68: 028. PMID: 34994346.
5. Shengwei Ji, Mingming Liu, Loiza May Galon, Mohamed Abdo Rizk, Bumduuren Tuvshintulga, Jixu Li, Iqra Zafar, Yae Hasegawa, Aiko Iguch, Naoaki Yokoyama, Xuenan Xuan*. Inhibitory effect of naphthoquine phosphate on *Babesia gibsoni* *in vitro* and *Babesia rodhaini* *in vivo*. **Parasites & Vectors**. 2022; 15: 10. PMID: 34991686.
6. Yongchang Li, Mohamed Abdo Rizk, Eloiza May Galon, Mingming Liu, Jixu Li, Aaron Edmond Ringo, Shengwei Ji, Iqra Zafar, Maria Agnes Tumwebaze, Byamukama Benedicto, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi, Bayin Chahan, Xuenan Xuan*. Discovering the potent inhibitors against *Babesia bovis* *in vitro* and *Babesia microti* *in vivo* by repurposing the natural product compounds. **Frontiers in Veterinary Scinence**. 2021; 8: 762107. PMID: 34389492.
7. Rawan A Satti, Eman A Awadelkareem, Keisuke Suganuma, Bashir Salim, Noboru Inoe, Xuenan Xuan, Suheir Rehan, Ehab Mossaad. Cattle anaplasmosis and babesiosis: Major tick-borne diseases affecting the cattle industry in Khartoum State, Sudan. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2021; 26: 10000632. PMID: 34684266.
8. Eloiza May Galon, Adrian Miki Macalanda, Mary Margaret Garcia, Chrysler James Ibasco, Anatolio Garvida, Shengwei Ji, Iqra Zafar, Yae Hasegawa, Mingming Liu, Rochelle Haidee Ybanez, Rika Umemiya-Shirafuji, Adrian Ybanez, Florencia Claveria, Xuenan Xuan*. Molecular identification of selected tick-borne protozoan and bacterial pathogens in thoroughbred racehorses in Cavite, Philippines. **Pathogens**. 2021; 10: 1318. PMID: 34684266.
9. Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, Arifin Budiman Nugraha, Believe Ahedor, Enkhbaatar Batmagnai, Davaajav Otgonsuren, MingMing Liu, Xuenan

- Xuan**, Ikuo Igarashi, Naoaki Yokoyama. Combination of clofazimine and atovaquone as a potent therapeutic regimen for the radical cure of *Babesia microti* infection in immunocompromised hosts. **Journal of Infectious Diseases**. 2022; 225: 238. PMID: 34664651.
10. Rika Umemiya-Shirafuji, Jinlin Zhou, Min Liao, Badgar Battsetseg, Damdinsuren Boldbaatar, Takeshi Hatta, Thasaneeya Kuboki, Takeshi Sakaguchi, Huey Chee, Takeshi Miyoshi, Xiaohong Huang X, Naotoshi Tsuji, **Xuenan Xuan**, Kozo Fujisaki. Data from expressed sequence tags from the organs and embryos of parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis*. **BMC Research Notes**. 2021; 14: 326. PMID: 34433501.
 11. Shengwei Ji, Mingming Liu, Eloiza May Galon, Mohamed Abdo Rizk, Jixu Li, Yongchang Li, Iqra Zafar, Ikuo Igarashi, **Xuenan Xuan***. *In vitro* screening of novel anti-*Babesia gibsoni* drugs from natural products. **Parasitology International**. 2021; 85: 102437. PMID: 34389492.
 12. Osamu Kawase, Hisashi Iwaya, Yoshiya Asano, Hiromoto Inoue, Seiya Kudo, Motoki Sasahira, Nobuyuki Azuma, Daisuke Kondoh, Madoka Ichikawa-Seki, **Xuenan Xuan**, Kimitoshi Sakamoto, Hikaru Okamoto, Jinaki Nakadate, Wataru Inoue, Ikuma Saito, Miyu Narita, Kiyono Sekii, Kazuya Kobayashi. Identification of novel yolk ferritins unique to planarians: planarians supply aluminum rather than iron to vitellaria in egg capsules. **Cell and Tissue Research**. 2021; 386: 391. PMID: 34319433.
 13. Onur Ceylan, Byamukama Benedicto, Ceylan Ceylan, Maria Tumwebaze, Eloiza May Galon, Mingming Liu, **Xuenan Xuan***, Secinc F. A survey on equine tick-borne diseases: The molecular detection of *Babesia ovis* DNA in Turkish racehorses. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 2021; 12: 101784. PMID: 34280696.
 14. Benedicto Byamukama, Patrick Vudriko, Maria Tumwebaze, Dickson Tayebwa, Joseph Byaruhanga, Martin Angwe, Jixu Li, Eloiza May Galon, Aaron Ringo, Mingming Liu, Yongchang Li, Shengwei Ji, Mohamed Abdo Rizk, Paul Frank Moumouni, Seung-Hun Lee, Ferda Sevinc, **Xuanan Xuan***. Molecular detection of selected tick-borne pathogens infecting cattle at the wildlife-livestock interface of Queen Elizabeth National Park in Kasese District, Uganda. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 2021; 12: 101771. PMID: 34214889.
 15. Huanping Guo, Yang Gao, David D N'Da, **Xuenan Xuan***. *In vitro* anti-*Toxoplasma gondii* efficacy of synthesised benzyltriazole derivatives. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. 2021; 88: e1. PMID: 34212734.
 16. Ehab Mossaad, Alex Gaithuma, Yassir O. Mohamed, Keisuke Suganuma, Rika Umemiya-Shirafuji, Yuma Ohari, Bashir Salim, Mingming Liu, **Xuenan Xuan***. Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens in cattle from Khartoum state and East Darfur state, Sudan. **Pathogens**. 2021; 10: 580. PMID: 34068782.
 17. Thom Do, Ruttayaporn Ngasaman, Vannarat Saechan, Opal Pitaksakulrat, Mingming

- Liu, **Xuenan Xuan***, Tawin Inpankaew. First molecular detection of *Babesia gibsoni* in stray dogs from Thailand. **Pathogens**. 2021; 10: 639. PMID: 34067366.
18. Hany M Ibrahim, Eloiza May Galone, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Mingming Liu, Khaled Mohammed-Geba, Sheir K Sheir, Asmaa Galal-Khallaf, Heba M Abd El Latif, Dalia S Morsi, Nora M Bishr, **Xuenan Xuan***. Serological survey of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle and water buffaloes from Menoufia province, Egypt. **Acta Parasitologica**. 2021; 66: 1458. PMID: 34043120.
 19. Mingming Liu, Shengwei Ji, Daisuke Kondoh, Eloiza May Galon, Jixu Li, Mizuki Tomihari, Masashi Yanagawa, Michihiro Tagawa, Mami Adachi, Masahito Asada, Ikuo Igarashi, Aiko Iguchi, **Xuenan Xuan***. Tafenoquine is a promising drug candidate for the treatment of babesiosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2021; 65: e0020421. PMID: 33941516.
 20. Remigiusz Galecki, **Xuenan Xuan**, Tadeusz Bakula, Jerzy Jaroszewski. Molecular characterization of *Lipoptena fortisetosa* from environmental samples collected in North-Eastern Poland. **Animals (Basel)**. 2021; 11: 1093. PMID: 33921225.
 21. Bumduuren Tuvshitulga, Arifin Budiman Nugraha, Tomoka Mizutani, Mingming Liu, Takahiro Ishizaki, Thillaiampalam Sivakumar, **Xuenan Xuan**, Naoaki Yokoyama, Ikuo Igarashi. Development of a stable transgenic *Theileria equi* parasite expressing an enhanced green fluorescent protein/blastocidin S deaminase. **Scientific Reports**. 2021; 11: 9107. PMID: 33907262.
 22. Yukihiro Goto, Rie Kamihira, Yoichi Nakao, Motohiro Nonaka, Ryo Takano, **Xuenan Xuan**, Kentaro Kato. The efficacy of marine natural products against *Plasmodium falciparum*. **Journal of Parasitology**. 2021; 107: 284. PMID: 33844839.
 23. Remigiusz Galecki, Jerzy Jaroszewski, Tadeusz Bakula, Eloiza May Galon, **Xuenan Xuan**. Molecular detection of selected pathogens with zoonotic potential in deer kebs (*Lipoptena fortisetosa*). **Pathogens**. 2021; 10: 324. PMID: 33801932.
 24. Jixu Li, Eloiza May Galon, Huanping Guo, Mingming Liu, Yongchang Li, Shengwei Ji, Iqra Zafar, Yang Gao, Weiqing Zheng, Paul Franck Adjou Moumouni, Mohamed Abdo Rizk, Maria Agnes Tumwebaze, Byamukama Benedicto, Aaron Edmond Ringo, Tatsunori Masatani, **Xuenan Xuan***. *PLK:Δgar9* live attenuated strain induces protective immunity against acute and chronic toxoplasmosis. **Frontiers in Microbiology**. 2021; 12: 619335. PMID: 33776955.
 25. Hang Li, Bingyi Yang, Mingming Liu, Shaowei Zhao, Suzhu Xie, Hao Wang, Shuang Zhang, **Xuenan Xuan**, Lijun Jia. Reproductive injury in male BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. **Parasites & Vectors**. 2021; 14: 151. PMID: 33726783.
 26. Onur Ceylan, Benedicto Byamukama, Ceylan Ceylan, Eloiza May Galon, Mingming Liu, Tatsunori Masatani, **Xuenan Xuan***, Ferda Sevinc. Tick-borne hemoparasites of sheep: A molecular research in Turkey. **Pathogens**. 2021; 10: 162. PMID: 33546428.

27. Yanan Wang, Houshuang Zhang, Li Luo, Yongzhi Zhou, Jie Cao, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki, Jinlin Zhou. ATG5 is instrumental in the transition from autophagy to apoptosis during the degeneration of tick salivary glands. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2021; 15: e0009074. PMID: 33513141.
28. Remigiusz Galecki, Jerzy Jaroszewski, Tadeusz Bakula, Xuenan Xuan. Molecular characterization of *Lipoptena cervi* from environmental samples collected in Poland. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**. 2021; 14: 41-47. PMID: 33425678.
29. Rikako Konishi, Yuna Kurokawa, Kanna Tomioku, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita. Raft microdomain localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Cell Biology**. 2021; 100: 151149. PMID: 33421842.
30. Shima Abd El-Salam El-Sayed, Mohamed Abdo Rizk, Aaron Edmond Ringo, Yongchang Li, Mingming Liu, Shengwei Ji, Jixu Li, Benedicto Byamukama, Maria A Tumwebaze, Xuenan Xuan*, Ikuo Igarashi. Impact of using pyronaridine tetraphosphate-based combination therapy in the treatment of babesiosis caused by *Babesia bovis*, *B. caballi*, and *B. gibsoni* in vitro and *B. microti* in mice. **Parasitology International**. 2021; 81: 102260. PMID: 33139594.

総説

1. Mingming Liu, Ikuo Igarashi I, Xuenan Xuan*. *Babesia gibsoni*. **Trends in Parasitology**. 2022; S1471-4922(22) 00058-7. PMID: 35339362.
2. Onur Ceylan, Xuenan Xuan, Ferda Sevinc. Primary tick-borne protozoan and rickettsial infections of animals in Turkey. **Pathogens**. 2021; 10(2): 231. PMID: 33669573.

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

1. ベトナム国立農業大学が主催した「マダニとマダニ媒介感染症に関する国際ワークショップ」に参加し、「原虫病研究センターの概要の研究活動内容」と題した招待講演を行った。2021 年 8 月 26 日（オンライン開催）

9. 獲得研究費

1. 令和 3 年度 研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、代表、令和 2 年度～令和 4 年度
2. 令和 3 年度 基盤研究（B）（一般）（文部科学省）、マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発、代表、平成 30 年度～令和 3 年
3. 令和 3 年度 国際共同研究強化（B）（文部科学省）、トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立、代表、平成 30 年度～令和 3 年度
4. 令和 3 年度 挑戦的研究（萌芽）（文部科学省）、トキソプラズマ潜伏により誘導される抗ウイルス応答：原虫とウイルスの攻防を紐解く、代表、令和元年度～令和 3 年度
5. 令和 3 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、スーダンにおけるマダニ媒介原虫病の流行実態の解明と制御対策の構築、代表、令和元年度～令和 3 年度
6. 令和 3 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、東南アジアにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と制御戦略の確立、指導教員、令和 2 年度～令和 4 年度
7. 令和 3 年度 日中二国間共同研究事業（農林水産省）、マダニ媒介原虫病制圧に向けた日中共同アプローチ、代表、令和 2 年度～令和 6 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 藤田 秋一：鹿児島大学獣医学部、トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質のナノスケールレベルでの分布解析、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
2. 正谷 達膳：岐阜大学応用生物科学部、トキソプラズマのプログラム細胞死メカニズム解明に向けた研究、2020 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日、2020 年度原虫病研究センター共同研究
3. Ferda SEVINC：トルコ・セルチューク大学獣医学部、トルコにおける家畜バベシア症に対するゲノム疫学調査と実践的制御戦略の確立、2018 年 10 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、国際共同研究強化(B)（文部科学省）
4. Patrick VUDRIKO：ウガンダ・マケレレ大学獣医学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、研究拠点形

成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）

5. Gabriel ABOGE : ケニア・ナイロビ大学獣医学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
6. Elikira KIMBITA : タンザニア・ソコイネ農業大学獣医学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
7. Athanase BADOLO : ブルキナファソ・ワガドゥーグー大学理学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
8. Oriel THEKISOE : 南アフリカ・ノースウェスト大学環境科学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）
9. Hany IBRAHIM : エジプト・メノフィア大学理学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）

◆-----教授 西 川 義 文
(Yoshifumi Nishikawa)

1. 研究テーマの概要

医学分野で重要なマラリア原虫は、世界で年間約2億人が罹患、年間62万人もの命を奪っています。わが国にも存在するトキソプラズマはその感染による流産や新生児の先天性トキソプラズマ症を引き起こし、少子化が進む現代社会には無視できない問題です。また畜産業界では、家畜原虫感染症による家畜の生産性の低下が問題視され、ネオスポラの感染による牛の流産例が全国的に見つかっており、被害の拡大が懸念されています。我々の研究室では、原虫感染による脳神経系の機能異常や宿主動物の行動変化、流産や垂直感染のメカニズムに関する研究を行っています。また、炎症反応や免疫抑制を制御する原虫因子の同定と解析を進めています。これら科学的な知見を基盤に、多機能性素材等を利用することでワクチン抗原を効率よくリンパ系組織へ輸送し、免疫担当細胞を効果的に刺激できる新型次世代ワクチンの開発を行っています。さらに、マウス感染モデルと自然宿主を対象にした感染実験により、ワクチンの実用化を目指しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トキソプラズマ感染による宿主動物の異常行動の解析と中枢神経系の機能破綻メカニズムの解明
- ・ トキソプラズマ、ネオスポラ由来因子による宿主免疫攪乱メカニズムの解明
- ・ トキソプラズマ及びネオスポラによる異常産の病態発症メカニズムの解明
- ・ 多機能性素材、遺伝子編集原虫、免疫賦活抗原を用いた病原性原虫に対するワクチン開発
- ・ 天然物・化合物ライブラリーからの抗原虫薬の探索
- ・ トキソプラズマ、ネオスポラ、クリプトスポリジウムの診断方法の開発と疫学調査

3. 2021 年度研究の総括

- ・ **感染による宿主動物の異常行動の解析と中枢神経系の機能破綻メカニズムの解明**
「トキソプラズマ感染に対するマウス脳組織の免疫反応におけるケモカイン受容体 CXCR3 の役割」
トキソプラズマは脳内に感染して脳機能に様々な障害を与えていると考えられていますが、その全貌は解明されていません。以前の我々の研究では、マウス脳組織を用いた網羅的トランスクリプトーム解析により、感染依存的にケモカイン受容体 CXCR3 とそのリガンド CXCL10 の発現が上昇することが明らかにされています (Tanaka et al., Infect Immun. 2013)。今回、CXCR3 欠損マウスを用いて、トキソプラズマ感染に対する脳細胞の応答性を解析しました。野生型マウスと比較して、CXCR3 欠損マウスは感染による臨床症状が増悪し、脳内原虫数と脳組織の炎症が増加していました。ミクログリアとアストロサイトの初代培養細胞を作製し、原虫感染による遺伝子発現の解析を実施しました。その結果、CXCR3 かつ原虫感染依存的な遺伝子として、免疫反応に関与する一連の遺伝子が見出されました。今回の結果は、脳内原虫のコントロールにはグリア細胞の CXCR3 依存的な免疫反応が一定の役割を担っていることを

示しています。本研究は South Valley 大学（エジプト）、東京大学との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構（AMED）の研究助成(21fk0108137h)と科研費（2011/LS003, JP24880006, JP17K17570, JP15K15118, 17K19538, 20KK0152, 20K21359, 21H02353 で実施しました（論文リスト 8）。

- ・ **異常産の病態発症メカニズムの解明**

- 「ネオスポラのデンスグラニクル 7 は垂直感染に関与する」

ネオスポラは牛の流産の原因となり、その対策には妊娠期の原虫感染による垂直感染の仕組みを理解することが必要です。我々の以前の研究で、ネオスポラのデンスグラニクル 7（NcGRA7）を欠損させるとマウスにおける原虫の病原性が低下することが明となっています（Nishikawa et al., Appl Environ Microbiol. 2018）。今回、妊娠期感染モデルを用いて、垂直感染における NcGRA7 の役割を解析しました。親株原虫と比較して、NcGRA7 欠損株の垂直感染率の低下が認められました。組織学的および生化学的解析により、NcGRA7 欠損株の感染では胎盤領域での炎症反応が亢進しており、原虫が障害を受けていたことが推測されました。従って、NcGRA7 は原虫の垂直感染を成立させる重要な分子であることが示唆されます。本研究は South Valley 大学（エジプト）との共同研究の成果であり、基盤 B（一般）（文部科学省：21H02353, 18H02335）、挑戦的研究(萌芽)（文部科学省：20K21359）の研究費で実施しました（論文リスト 4）。

- 「Toll 様受容体 2（TLR2）は妊娠後期のトキソプラズマ 感染により引き起こされる異常妊娠に関与する」

妊娠期のトキソプラズマ感染は流産、死産、早産の原因となることが知られていますが、その発症メカニズムの詳細は明らかにされていません。Toll 様受容体 2（TLR2）は免疫細胞や胎盤に発現していますが、トキソプラズマの妊娠期感染における TLR2 の役割は分かっていません。妊娠後期のトキソプラズマ感染マウスモデルで解析したところ、野生型マウスでは異常妊娠が認められますが、TLR2 欠損マウスでは異常妊娠が有意に減少しました。TLR2 欠損マウスでは感染に対する炎症性反応が減弱しており、胎盤への障害が起こりにくいことが推測されました。今回の結果により、妊娠期の TLR2 への刺激はトキソプラズマ 感染病態を悪化させ、胎盤の機能低下につながると考えられます。従って、先天性トキソプラズマ症に対する TLR2 の阻害による新たな治療法の開発につながることが期待されます。本研究は South Valley 大学（エジプト）との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構（AMED）の研究助成(21fk0108137h)と科研費（20KK0152, 20K21359, 21H02353）で実施しました（論文リスト 11）。

- ・ **宿主免疫攪乱メカニズムの解明**

- 「トキソプラズマ由来ペルオキシレドキシンの病原性への関与」

トキソプラズマはヒトに対して病原性を示し、畜産業にも莫大な経済的損失を与えています。本感染症を制御するためには、病原性の理解に基づいた科学的なアプローチが重要になります。

我々の以前の研究で、トキソプラズマ由来ペルオキシレドキシンである TgPrx1 と TgPrx3 の組換えタンパク質は免疫活性化作用があることが分かっていたが (Fereig et al., PLoS One. 2017; Fereig et al., Parasitol Int. 2016)、生理的な役割は不明でした。本研究では CRISPR-Cas9 の遺伝子編集技術により TgPrx1 と TgPrx3 の欠損原虫株を作出し、病原性解析を行いました。その結果、TgPrx3 欠損株は親株原虫と比較して過剰な炎症反応を誘導し、マウスにおける病原性が増加していました。この結果は、TgPrx3 特異的な免疫反応がトキソプラズマの病原性制御に重要であることを示唆しており、ワクチン開発への応用が期待できます。本研究は South Valley 大学 (エジプト) との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構 (AMED) の研究助成 (21fk0108137h) と国際共同研究 B (文部科学省: 20KK0152) の研究費で実施しました (論文リスト 3)。

・ 病原性原虫に対するワクチン開発

「脂質ナノ粒子を基盤技術としたトキソプラズマのデンスグラニクル 15 搭載 DNA ワクチンの感染防御効果」

トキソプラズマはヒトと家畜動物に感染し公衆衛生的にも問題視されており、安全で有効なワクチンの開発が望まれています。今回、細胞質で自己崩壊するようデザインされた脂質ナノ粒子を基盤とし、トキソプラズマ用 DNA ワクチンの開発を試みました。以前の我々の研究で免疫活性化能を有する原虫遺伝子としてデンスグラニクル 15 (TgGRA15) を見出しており (Ihara et al., Front Immunol. 2020)、前述のナノ粒子に TgGRA15 遺伝子を搭載してマウスの感染実験系で評価しました。本 DNA ワクチン接種により抗原特異的な免疫反応が誘導され、ワクチン接種マウスは感染抵抗性を示しました。本結果により、新型 DNA ワクチン開発への展開が期待されます。本研究は Chattogram Veterinary and Animal Sciences University (バングラデシュ)、千葉大学との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構 (AMED) の研究助成 (21fk0108137h) と国際共同研究 B (文部科学省: 20KK0152) の研究費で実施しました (論文リスト 6)。

・ 天然物からの抗原虫薬の探索

「エジプトの野生薬用植物の抗マラリア作用」

薬用植物は、感染症治療のための代替薬物資源として成功裏に使用されています。マラリアの新しい治療法を見つけることは困難であり、砂漠由来の野生植物の抽出物は、様々な薬用利用が報告されています。本研究では、エジプト砂漠の 13 種類の植物から抽出物を調整し、抗マラリア効力を評価しました。その結果、*Trichodesma africanum* の抽出物に最も効果的な抗マラリア活性を確認しました (IC_{50} : 11.7 μ g/ml、選択毒性: 35.2)。今回の結果は、エジプトの砂漠に生息する植物は代替薬物資源として有用であることを示唆しています。本研究は South Valley 大学 (エジプト) との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構 (AMED) の研究助成 (20fk0108137h) と国際共同研究 B (文部科学省: 20KK0152) で実施しました (論文リスト 1)。

「抗生物質スパールソマイシンの抗マラリア作用」

ペプチジルトランスフェラーゼ阻害剤として作用する抗生物質スパールソマイシンの抗マラリア活性を解析しました。熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmosium falciparum* 3D7 株および K1 株) に対して、スパールソマイシンはそれぞれ 12.07 および 25.43 nM の IC₅₀ 値を示しました。*P. falciparum* 3D7 をスパールソマイシンで処理すると、形態変化が起こり、リング期の原虫が阻害され、化合物を除去した後でも増殖阻害を維持しました。マウスマラリア原虫 (*P. yoelii* 17XNL 株および *P. berghei* ANKA 株) を用いたマウス感染実験でも、スパールソマイシンの治療効果を確認することができました。今回の結果により、スパールソマイシンをリード化合物とした新たな抗マラリア薬の開発が期待されます。本研究は微生物化学研究所との共同研究の成果であり、特別研究員奨励費(文部科学省:20F20402)、原虫病研究センター共同研究費(2020-joint-14, 27-joint-6, 28-joint-3, 29-joint-4) で実施しました(論文リスト 2)。

「トキソプラズマ感染に対する新たな薬剤：ポリエーテルイオノホア・キジマイシン」

ポリエーテル系抗生物質は反芻動物の飼料に広く用いられ、寄生虫病のкокシジウム症やマラリアに効果があるとされている。今回、ポリエーテル系抗生物質のキジマイシンについて、トキソプラズマ症に対する効果を検証した。キジマイシンは宿主細胞内と宿主細胞外のトキソプラズマに対する殺滅効果を示し(IC₅₀: 宿主細胞内 45.6 ± 2.4 nM、宿主細胞外 216.6 ± 1.9 pM)、原虫の膨化を誘導した。別のポリエーテル系抗生物質のモネンシンと同様に、キジマイシンは原虫のミトコンドリア膜電位を減少させ、活性酸素種の産生を増加させることで障害を与えることが明らかとなった。また、キジマイシンは感染マウスに対する治療効果を示した。今回の結果により、キジマイシンが家畜のトキソプラズマ症の治療薬として有効である可能性が示された。本研究はマヒドン大学(タイ)、微生物化学研究所との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構(AMED)の研究助成(21fk0108137h)、科研費(20KK0152, 26670204)、原虫病研究センター共同研究費(2020-joint-14, 27-joint-6, 28-joint-3, 29-joint-4) で実施しました(論文リスト 9)。

「モンゴルの薬草由来化合物ライブラリーを利用した抗原虫薬開発への可能性」

生物多様性を有する国では有望な天然生物資源が存在します。モンゴルの薬草は創薬資源として大きな可能性を秘めており、今回はモンゴルの薬草由来化合物 179 種のマラリア原虫とトキソプラズマ に対する増殖阻害活性を評価しました。マラリア原虫を阻害する化合物として、brachangobinan A (IC₅₀ 2.62μM)、oxazole (IC₅₀ 3.58μM)、chrysosplenetin (IC₅₀ 3.78 μM)、4,11-di-O-galloylbergenin (IC₅₀ 3.87μM)、2-(2',5'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole (IC₅₀ 6.94μM) が同定されました。また、トキソプラズマを阻害する ricin (IC₅₀ 12.94 μM)も同定されました。今後は、これら化合物をリード化合物とした創薬展開が期待されます。本研究はモンゴル国立大学、獣医学研究所(モンゴル)、東北医科薬科大学との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構(AMED)の研究助成(20fk0108137h)と科研費(20KK0152) で実施しました(論文リスト 14)。

「モンゴル植物由来エキスのマラリア原虫とトキソプラズマに対する抑制効果」

生物多様性を有する国では有望な天然生物資源が存在します。モンゴルの薬草は創薬資源として大きな可能性を秘めており、今回はモンゴルの薬草由来エキス 43 種のマラリア原虫とトキソプラズマ に対する増殖阻害活性を評価しました。マラリア原虫を阻害する植物エキスとして、*Galatella dahurica* leaf + flower, *Leonurus deminutus* leaf + flower, *Oxytropis trichophysa* aerial part, *Schultzia crinita* whole plant, Le の 6 種が同定されました。また、トキソプラズマを阻害する *Amaranthus retroflexus* root も同定されました。今後は、これら植物エキスをシーズとした創薬展開が期待されます。本研究はモンゴル国立大学、獣医学研究所（モンゴル）との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構（AMED）の研究助成（20fk0108137h）と科研費（20KK0152）で実施しました（論文リスト 15）。

・ 診断方法の開発と疫学調査

「フィリピンのヒト血清を用いたトキソプラズマのデンスグラニュル抗原（TgGRA6, TgGRA7, TgGRA14）の抗原性解析」

トキソプラズマ症の制御には、信頼性の高い診断系の開発が必須です。トキソプラズマは細胞内寄生原虫であるため、簡易検査としては抗体検査が有効です。以前の我々の研究では、フィリピンにおけるトキソプラズマ感染の実態を明らかにしました（Ybañez et al., PLoS One. 2019）。今回、フィリピンのヒト血清を用いたトキソプラズマのデンスグラニュル抗原（TgGRA6, TgGRA7, TgGRA14）の抗原性解析を行いました。TgGRA7 に加えて、TgGRA6 にも診断用抗原としての有効性が確認できました。今後、これらの診断用抗原を利用した簡便な検査系の開発が期待できます。本研究はセブ工科大学（フィリピン）との共同研究の成果であり、日本医療研究開発機構（AMED）の研究助成(21fk0108137h)と国際共同研究 B（文部科学省：20KK0152)の研究費で実施しました（論文リスト 5）。

「ウシのネオスポラ感染に対する血清診断法の開発：ネオスポラ抗原を搭載したイムノクロマトテストの有効性の検証」

ネオスポラ感染はウシの流産を引き起こすことから、畜産業に経済的な損失を与えます。ネオスポラ感染を制御するためには、迅速簡便な検査系を開発することが重要です。今回、ネオスポラの組換え抗原（NcSAG1, NcGRA6, NcGRA7、可溶性ライセート）を搭載したイムノクロマトを作製し、マウスとウシの血清を用いて有効性を評価しました。その結果、NcSAG1 を搭載したイムノクロマトが最も優れた特異性と感度を示しました。今後は、この結果をもとにした診断系の実用化が望まれます。本研究は South Valley 大学（エジプト）との共同研究の成果であり、科研費（18H02335, 20K21359, 21H02353）、JST バリュープログラム（VP29117937665）、伊藤記念財団、旗影会、畜産ニューテック協会の研究助成で実施しました（論文リスト 10）。

「北海道の流産胎仔由来ネオスポラの集団遺伝解析」

ネオスポラ感染による牛の流産は日本でも発生していますが、原虫の集団遺伝構造は不明です。

今回、北海道の流産胎仔由来ネオスポラを対象にマイクロサテライト解析を行い、遺伝構造を決定しました。これまでに報告されている世界のネオスポラ遺伝子型とは異なる集団となる日本特有の集団が見つかりました。今回の結果は、日本国内でネオスポラが垂直感染、水平感染により独自に維持されていることを示しています。本研究はマンスーラ大学（エジプト）との共同研究の成果であり、科研費（18H02335, 20K21359）で実施しました（論文リスト 16）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 日本獣医寄生虫学会常任理事・学術担当理事・学術委員会委員長・評議員
- ・ 日本寄生虫学会理事・評議員
- ・ 日本寄生虫学会北日本支部役員・理事・庶務委員

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 分子寄生虫・マラリア研究フォーラム世話人
- ・ The Journal of Protozoology Research 編集委員長
- ・ The Journal of Veterinary Medical Science 編集委員
- ・ 北海道地区大学等安全保障貿易管理ネットワーク幹事

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（＊責任著者）

1. Ahmed M Abdou, Abdel-latif S Seddek, Noha Abdelmageed, Mohamed O Badry, **Yoshifumi Nishikawa***. Wild Egyptian medicinal plants show *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity and antimalarial activities. **BMC Complementary Medicine and Therapies**. In press.
2. Nanang Rudianto Arieftha, Baldorj Pagmadulam, Coh-ichi Nihei, **Yoshifumi Nishikawa***. Sparsomycin exhibits potent antiplasmodial activity *in vitro* and *in vivo*. **Pharmaceutics**. 2022; 14(3): 544. PMID: 35335918.
3. Ragab M Fereig, **Yoshifumi Nishikawa***. Genetic disruption of *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin (*TgPrx*) 1 and 3 reveals the essential role of *TgPrx3* in protecting mice from fatal consequences of toxoplasmosis. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022; 23(6): 3076. PMID: 35328497.
4. Ahmed M Abdou, Rina Ikeda, Kenichi Watanabe, Hidefumi Furuoka, **Yoshifumi Nishikawa***. Role of dense granule antigen 7 in vertical transmission of *Neospora*

- caninum* in C57BL/6 mice infected during early pregnancy. **Parasitology International**. 2022; 89: 102576. PMID: 35301119.
5. Rochelle Haidee Ybañez, Yoshifumi Nishikawa*. Comparative performance of recombinant GRA6, GRA7, and GRA14 for the serodetection of *T. gondii* infection and analysis of IgG subclasses in human sera from the Philippines. **Pathogens**. 2022; 11(2): 277. PMID: 35215219.
 6. Tanjila Hasan, Ryo Kawanishi, Hidetaka Akita, Yoshifumi Nishikawa*. *Toxoplasma gondii* GRA15 DNA vaccine with a liposomal nanocarrier composed of an SS-cleavable and pH-activated lipid-like material induces protective immunity against toxoplasmosis in mice. **Vaccines (Basel)**. 2021; 10(1): 21. PMID: 35062682.
 7. Ruenruetai Udonsom, Yoshifumi Nishikawa, Ragab M Fereig, Thitirat Topisit, Natchakorn Kulkaweewut, Supitcha Chanamrung, Charoonluk Jirapattharasate. Exposure to *Toxoplasma gondii* in Asian elephants (*Elephas maximus indicus*) in Thailand. **Pathogens**. 2021; 11(1): 2. PMID: 35055950.
 8. Kousuke Umeda, Youta Goto, Kenichi Watanabe, Nanako Ushio, Ragab M Fereig, Fumiaki Ihara, Sachi Tanaka, Yutaka Suzuki, Yoshifumi Nishikawa*. Transcriptomic analysis of the effects of chemokine receptor CXCR3 deficiency on immune responses in the mouse brain during *Toxoplasma gondii* infection. **Microorganisms**. 2021; 9(11): 2340. PMID: 34835465.
 9. Arpron Leesombun, Coh-ichi Nihei, Daisuke Kondoh, Yoshifumi Nishikawa*. Polyether ionophore kijimicin inhibits growth of *Toxoplasma gondii* and controls acute toxoplasmosis in mice. **Parasitology Research**. 2022; 121(1): 413–422. PMID: 34750652.
 10. Ragab M Fereig, Hanan H Abdelbaky, Yoshifumi Nishikawa*. Comparative evaluation of four potent *Neospora caninum* diagnostic antigens using immunochromatographic assay for detection of specific antibody in cattle. **Microorganisms**. 2021; 9(10): 2133. PMID: 34683454.
 11. Rina Ikeda, Nanako Ushio, Ahmed M Abdou, Hidefumi Furuoka, Yoshifumi Nishikawa*. Toll-like receptor 2 is involved in abnormal pregnancy in mice infected with *Toxoplasma gondii* during late pregnancy. **Frontiers in Microbiology**. 2021; 12: 741104. PMID: 34675905.
 12. Ruenruetai Udonsom, Ruangrat Buddhirongawatr, Yoshifumi Nishikawa, Ragab M Fereig, Charoonluk Jirapattharasate. *Toxoplasma gondii* prevalence and risk factors in owned domestic cats from Nakhon Pathom Province, Thailand. **Veterinary Integrative Sciences**. 2021; 19(3): 557–566.
 13. Rajib Acharjee, Keith K Talaam, Endah D Hartuti, Yuichi Matsuo, Takaya Sakura, Bundutidi M Gloria, Shinaya Hidano, Yasutoshi Kido, Mihoko Mori, Kazuro Shiomi, Masakazu Sekijima, Tomoyoshi Nozaki, Kousuke Umeda, Yoshifumi Nishikawa,

- Shinjiro Hamano, Kiyoshi Kita, Daniel K Inaoka. Biochemical studies of mitochondrial malate: quinone oxidoreductase from *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021; 22(15): 7830. PMID: 34360597.
14. Orkhon Banzragchgarav, Nanang R Ariefta, Toshihiro Murata, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Badgar Battsetseg, Banzragch Battur, Javzan Batkhuu, Yoshifumi Nishikawa*. Evaluation of Mongolian compound library for potential antimalarial and anti-*Toxoplasma* agents. **Parasitology International**. 2021; 85: 102424. PMID: 34302982.
 15. Orkhon Banzragchgarav, Javzan Batkhuu, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Badgar Battsetseg, Banzragch Battur, Yoshifumi Nishikawa*. *In vitro* potently active anti-*Plasmodium* and anti-*Toxoplasma* Mongolian plant extracts. **Acta Parasitologica**. 2021; 66(4): 1442–1447. PMID: 34023977.
 16. El-Sayed El-Alfy, Yuma Ohari, Naomi Shimoda, Yoshifumi Nishikawa*. Genetic characterization of *Neospora caninum* from aborted bovine fetuses in Hokkaido, Japan. **Infection, Genetics and Evolution**. 2021; 92: 104838. PMID: 33819682.
 17. Nanang Rudianto Ariefta, Takuya Koseki, Yoshifumi Nishikawa, Yoshihito Shiono. Spirocollequins A and B, new alkaloids featuring a spirocyclic isoindolinone core, from *Colletotrichum boninense* AM-12-2. **Tetrahedron Letters**. 2021; 64: 152736.

総説（*責任著者）

1. 潮奈々子, 西川義文*. トキソプラズマ感染とげっ歯類の行動変容およびヒトの精神・神経疾患. **Infectious Agents Surveillance Report (IASR)**. 2022; 43: 62-63.
2. Fumiaki Ihara, Yoshifumi Nishikawa*. *Toxoplasma gondii* manipulates host cell signaling pathways via its secreted effector molecules. **Parasitology International**. 2021; 83: 102368. PMID: 33905814.

著書

1. Ragab M Fereig, Yoshifumi Nishikawa*. Macrophage stimulation as a useful approach for immunoscreening of potential vaccine candidates against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections. **Methods in Molecular Biology**. 2022; 2411: 129–144. PMID: 34816403.

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 「病原性原虫の制圧について」の紹介。第 26 回 One Health Relay Report (One Health フロンティア卓越大学院プログラム、北海道大学)、HP 掲載、<https://onehealth.vetmed.hokudai.ac.jp/activity/one-health-relay-report/26/> 2021 年 11 月 26 日
2. 「ネオスポラ制圧に向けた最近の動向について」講義を実施した。令和 3 年度家畜保健衛生所病性鑑定技術検討会(寄生虫部門)、Web 開催、2022 年 2 月 8 日

8. 招待講演等

1. Prevalence of zoonotic protozoal diseases in Mongolia and drug discovery from Mongolian natural resources, 特別講演、“VETERINARY SCIENCE – SUSTAINABLE COOPERATION” INTERNATIONAL ONLINE CONFERENCE – 2021, 60th anniversary of the institute of veterinary medicine, institute of veterinary medicine (Mongolia)、WEB 公開、2021 年 11 月 18 日

9. 獲得研究費

1. 令和 3 年度 基盤研究 B (一般) (文部科学省)、原虫伝搬因子を標的とした家畜病原性原虫ネオスポラの垂直感染防御法の開発 (21H02353)、代表、令和 3 年度～令和 6 年度
2. 令和 3 年度 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化 (B)) (文部科学省)、モンゴルにおける小型反芻獣トキソプラズマ症のワクチン開発研究 (20KK0152)、代表、令和 2 年度～令和 6 年度
3. 令和 3 年度 挑戦的研究 (萌芽) (文部科学省)、ネオスポラ症に対する次世代ワクチン株の開発と原虫ベクター化への応用展開 (20K21359)、代表、令和 2 年度～令和 4 年度
4. 令和 3 年度 科学研究費助成事業 (特別研究員奨励費) (外国人特別研究員) (文部科学省)、植物内生真菌を用いたケミカルバイオロジーによる抗トキソプラズマ薬の探索 (20F20402)、代表、令和 2 年度～令和 4 年度
5. 令和 3 年度 研究拠点形成費等補助金 (卓越大学院プログラム事業費) 「One Health フロンティア卓越大学院」に関する授業、実習、および演習等の実施及び令和 4 年以降に実施する授業、実習、および演習のトライアル (予行演習・予備試験) 等の実施、代表、令和 3 年度
6. 令和 3 年度 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 (AMED)、日本のトキソプラズマ症の感染実態把握とその制御に向けた協創的研究開発、先天性トキソプラズマ症モデル動物の開発と診断用抗原の同定 (21fk0108137h0002)、分担、令和 2 年度～令和 4 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

1. 医学書院「週刊医学界新聞」第 3462 号 (2019 年 10 月 9 日) 難敵トキソプラズマ症に挑む、
https://www.igaku-shoin.co.jp/paper/archive/y2022/3462_03

13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. Hadi Kuncoro: Mulawarman University, Screening of Anti-*Toxoplasma* Agent From East Borneo Natural Resource 2018 年 2 月 5 日～、共同研究契約
2. 小柴 琢己：福岡大学理学部化学科、トキソプラズマ分泌性タンパク質群の宿主ミトコンドリアとの相互作用解析、2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究
3. 杉 達紀：北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所、ポピュレーショントラックによるマウスでの潜伏感染に必要なトキソプラズマ原虫遺伝子の機能評価、2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

発生工学的応用による原虫感染機構の解明

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

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

また、この一連の研究のなかで、ある種の植物性の油には抗原虫効果を有する物があることを見出しました。植物油は化合物を投与する際の溶媒として汎用されているので、実験の精度を維持するためには留意が必要と考えます。サプリメントとしての植物油の投与は、原虫感染の予防や治療に効果的かもしれません。

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

発生・生殖工学の技術開発研究

バイオサイエンスの解析系を充実するためには、発生工学とそれを支える体外受精、胚移植、配偶子の凍結保存、凍結乾燥保存などの生殖工学の技術開発が不可欠です。当研究分野では、マウスを対象とした発生・生殖工学技術の深耕を図るとともに、この一連の技術は盲導犬をはじめとする補助犬の育成にも応用して、社会貢献を果たしています。我々は、世界で初めて凍結受精卵由来のイヌ産仔を得ることに成功しており、今後、盲導犬の普及への貢献が期待されています。また、イヌの発情間隔は非常に長く、1年に2回、あるいは2年に3回程度しか発情を示さないことから、生殖工学技術を適用する上で、卵子提供雌や受容雌の確保が困難であり、これがイヌの生殖工学技術開発進展の障害のひとつとなっています。この問題を克服するためには、効率的な発情誘起法、過剰排卵誘起法の開発が求められていますが、最近、抗インヒビン抗体と性腺刺激ホルモンの併用投与によって、効率的、効果的に発情を誘起する方法の開発に成功しました。

さらに、マウスの初期発生における卵割時間と発生能との関係をタイムラプスシネマトグラフィを用いて検討するとともに、ゲノム編集技術を用いた大型動物の遺伝子改変にも取り組んでいます。コロナ禍で研究が中断していますが、ウシの体外受精卵を用いてバベシア原虫受容体をゲノム編集技術によって欠損させ、バベシア耐性ウシの樹立を目指しています。

2. 主な研究テーマ

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

3. 2021 年度研究の総括

- ・ マラリアは、蚊が宿主動物を吸血することでマラリア原虫が感染する赤血球寄生性原虫感染症で、その患者は重度の貧血、脳マラリアや多臓器不全などの重篤な症状を呈することが知られていますが、いまだに十分な予防・治療法はなく、新たな予防・治療法の開発が必要とされている疾患です。昨年は、マイトカンとして機能し、抗ガン作用を持つことが報告されているビタミン E の誘導体である α -tocopheryloxy acid が、マウスマラリア原虫 *P. yoelii* 17XL 感染マウスの生存率を有意に上昇させ、パラシテミアを有意に減少させる効果を確認しました。本年度は、*P. yoelii* 17XL に加え、*P. berghei* についても検討を加えた結果、同様の成績を得ました。この化合物は、経口投与が可能であること、血中濃度の持続性が高いこと、および副作用が少ない（ほとんどない）ことが知られており、他の既存薬との併用による、より効果的な治療法、予防法の開発に寄与することが期待されます。
- ・ 盲導犬を始めとするイヌの効率的繁殖にとって、凍結精子による人工授精は重要なツールのひとつです。これまでにイヌ精子の凍結保存法の改良について、幾つかの報告をしてきましたが、昨年度は、凍結抵抗性を示す木々に含まれているフラボノイドのひとつであるケルセチンの凍

結保存液への添加が、凍結融解後の精子の運動性を有意に向上させ、人工授精後の高い受胎能を有することを見出しました。本年度は、ケルセチンの添加によって、イヌ精子凍結時の平衡時間を 1～2 時間短縮可能であることを見出し、精子の凍結保存技術の一層の効率化、簡便化に貢献しました。

- ・ イヌでは LH サージ (LH 0) の一定時間後に排卵を認めますが、報告によって 24～72 時間と幅が大きく、一匹のイヌにおける排卵の開始から完了までの時間も正確には理解されていません。人工授精や受精卵移植の適用には、排卵日の正確な把握が不可欠であることから、ラブラドル・レトリバーの自然発情 24 サイクルに対して、連日、血中プロゲステロン濃度の測定と 18MHz のリニアプローブを用いた超音波検査による卵巣・卵胞の観察を行い、排卵日の検出を試みた結果、15/24 サイクルにおいて、観察されたすべての卵胞の排卵が検出されました。その検出率は全体の 95%でありました。92%のサイクルでは LH 1～2 で排卵が始まり、82%の卵胞が LH 2～3 で排卵しました。また、排卵が 2 日および 3 日にわたって起こったサイクルが、それぞれ半数ずつで、1 日以内に排卵が完了したサイクルは認めませんでした。71%のサイクルでは LH2 で最大数が排卵しました。また、卵胞径は LH サージの 2 日前に 5 mmを超え、排卵時には 6.1 mmに成長していました。排卵開始日のプロゲステロン濃度は 5.6 ± 2.3 ng/ml でしたが、排卵が起こる基準とされてきた 5 ng/ml 以下でも排卵が始まっている場合が多くありました。以上、18MH リニアプローブを用いて、排卵プロセスを経時的に観察することによって、高い排卵検出率が達成されることを示しました。
- ・ イヌは 1 年に 1～2 回しか発情期を迎えないことから、効率的な繁殖のために有効な発情誘起法の確立が求められるところですが、効果的・簡便かつ安全なゴールドスタンダードと言える方法は未だ存在しません。そこで、ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) と抗インヒビン血清 (IAS) の併用による無発情期の雌犬の発情及び過排卵の誘起を試みました。無発情期の雌犬を以下の 3 群に分け、それぞれ、Ⅰ: IAS (0.1 ml/kg)、Ⅱ: eCG (50 IU/Kg)、およびⅢ: IAS (0.1 ml/kg) と eCG (50 IU/Kg 体重) の混合溶液を筋肉内注射し (Day0)、ⅡおよびⅢでは Day 7 に 500 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を投与しました。次いで、Day 0～14 まで発情徴候の観察と血中プロゲステロン (P4) 濃度の測定、超音波検査装置による卵巣・卵胞の観察を行った結果、Ⅰ群では発情徴候および卵胞の発育が認められず、Ⅱ群では発情徴候と卵胞の発育が観察されました。Ⅱ群の平均卵胞数は 8.3 個でしたが、平均排卵数は 4.5 個と少ないものでした。また、Day 7～8 に LH サージが起こりましたが、その後の P4 濃度の上昇は自然発情と比べて小さい成績でした。Ⅲ群では発情徴候と卵胞の発育が観察され、平均卵胞数は 8.8 個、平均排卵数は 9.6 個と発育した卵胞のすべてが排卵に致る成績でした。また、Day 7～9 に LH サージが起こり、その後の P4 濃度の上昇は eCG 単独投与群と比べて顕著に大きく、自然発情の場合と同等の成績を得ました。以上、IAS と eCG の混合投与によって発情が誘起され、過排卵に至る可能性、また、eCG 単独投与で見られた P4 濃度の低値及び排卵率の低下を改善できる可能性が示唆されました。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

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

② 主催した学会、研究会等

- ・ 第 62 回日本卵子学会学術集会（2021 年 5 月 29 日～30 日、学術集会長、参加者 1,300 名）

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 日本卵子学会生殖補助医療胚培養士資格認定委員
- ・ 日本卵子学会胚培養士認定委員会委員
- ・ 日本卵子学会学会将来検討委員会委員
- ・ マラヤ大学（マレーシア）学位論文審査外部審査委員
- ・ 日本実験動物学会動物実験に関する外部検証専門員

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（＊責任著者）

1. Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Thillaiampalam, Sivakumar, Naoaki Yokoyama, Kozo Fujisaki, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, Rika Umemiya-Shirafuji. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) and *Rickettsia* spp. in hard ticks distributed in Tokachi District, eastern Hokkaido, Japan. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**. 2021; 1: 10059. PMID: 35284860.
2. Hiroyuki Watanabe, Haruka Ito, Ayumi Shintome, Hiroshi Suzuki*. Effects of oxygen tension and humidity on the preimplantation development of mouse embryos produced by *in vitro* fertilization: Analysis using a non-humidifying incubator with time-lapse cinematography. **Experimental Animals**. In press. PMID: 35249913.
3. Shinji Harakawa, Takaki Nedachi, Toshikazu Shinba, Hiroshi Suzuki. Stress-reducing

- effect of a 50 Hz electric field in mice after repeated immobilizations, electric field shields, and polarization of the electrodes. **Biology (Basel)**. 2022; 11(2): 323. PMID: 35205189.
4. Paul Franck Adjou Moumouni, Germaine Lim-Bamba Minoungou, Christian Enonkpon Dovonou, Eloiza May Galon, Artemis Efstratiou, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan. A survey of tick infestation and tick-borne piroplasm infection of cattle in Oudalan and Séno Provinces, Northern Burkina Faso. **Pathogens**. 2021; 11(1): 31. PMID: 35055979.
 5. Hiroyuki Watanabe, Hiroshi Suzuki*. Morphokinetic analysis of development to the morula of mouse embryos fertilized *in vitro* using an incubator with time-lapse cinematography. **Journal of Mammalian Ova Research**. 2021; 38(2): 61–68.
 6. Mei Tsuchida, Nako Komura, Tatsuya Yoshihara, Yuta Kawasaki, Daichi Sakurai, Hiroshi Suzuki*. Ultrasonographic observation in combination with progesterone monitoring for detection of ovulation in Labrador Retrievers. **Reproduction in Domestic Animals**. 2022; 57(2): 149–156. PMID: 34724259.
 7. Mei Tsuchida, Daichi Sakurai, Nako Komura, Naomi Nakagata, Hiroshi Suzuki*. Induction of oestrus by administering Inhibin antiserum along with equine chorionic gonadotropin in anoestrous bitches. **Reproduction in Domestic Animals**. 2021; 56(11): 1398–1405. PMID: 34388283.
 8. Kasumi Kawamura, Aiko Kume, Rika Umemiya-Shirafuji, Shunji Kasai, Hiroshi Suzuki*. Effect of α -tocopheryloxy acetic acid, a vitamin E derivative mitocan, on the experimental infection of mice with *Plasmodium yoelii*. **Malaria Journal**. 2021; 20(1): 280. PMID: 34167535.
 9. Yanan Wang, Houshuang Zhang, Li Luo, Yongzhi Zhou, Jie Cao, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki, Jinlin Zhou. ATG5 is instrumental in the transition from autophagy to apoptosis during the degeneration of tick salivary glands. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2021; 15(1): e0009074. PMID: 33513141.

総説

1. Hiroshi Suzuki*, Hiroyuki Watanabe, Yasuyuki Abe. Assisted reproductive techniques for canines: preservation of genetic material in domestic dogs. **The Journal of Reproduction and Development**. 2022; 68(1): 1–11. PMID: 34840199.

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

1. 日本繁殖生物学会第 144 回大会イヌの生殖工学技術開発に関する研究、2021 年 9 月 23 日

9. 獲得研究費

該当なし

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞名：2021 年度日本繁殖生物学会技術賞
受賞テーマ：イヌの生殖工学技術開発に関する研究

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. マダニ媒介感染症制御による畜産農家支援プログラム（ウガンダ共和国）

◆-----准教授 白 藤 梨 可
(Rika Umemiya-Shirafuji)

1. 研究テーマの概要

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

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

2. 主な研究テーマ

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

3. 2021年度研究の総括

- ・ フタトゲチマダニは原虫、リケッチア、ウイルスといった多種多様な病原体を動物・ヒトに媒介する国内の重要なマダニ種です。獣医学上および医学上の重要性から、フタトゲチマダニはマダニ/ベクター生物学的研究のモデルとして実験室内で累代飼育され、様々な実験に使用されてきました。私たちの研究グループでは、吸血および胚発生中の生理学的プロセスに関連する重要なマダニ分子を見出すことを目的として、フタトゲチマダニの臓器別完全長 cDNA ライブラリーを作製しました。今回、フタトゲチマダニ雌（単為生殖系）の脂肪体、ヘモリンフ（体液）、中腸、卵巣、唾液腺、および同マダニの発育胚サンプルより得られた cDNA 配列情報をもとに構築した Expressed sequence tag (EST) データベースを再構築しました。合計 39,113 の EST 配列（胚 7,745、脂肪体 7,385、ヘモリンフ 8,303、中腸 7,385、および卵巣 8,295 配列）を日本 DNA データバンクに新規に登録しました。これらのデータと登録済みの唾液腺 EST を集約し、データ論文ならびにホームページ上で公開しました（論文リスト4）。

- ・ 2017年、北海道十勝地方の7か所においてマダニを採集し、マダニ種の同定とそれらの保有

病原体を調べました。採集したマダニは、ヤマトマダニ、シュルツェマダニ、ヤマトチマダニおよびオオトゲチマダニの4種であり、1155匹のマダニをDNA抽出に使用しました。527匹（成ダニ484匹、若ダニ41匹、幼ダニ2匹）より個体別DNA、幼ダニ67サンプル（1~10匹／サンプル）よりプールDNAを得ました。これらのDNAを鋳型とし、PCRによる*Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) および *Rickettsia* spp. 遺伝子検出を試みました。ボレリア *flaB* 遺伝子配列解析の結果、シュルツェマダニにおいて、ヒトに対し病原性を示す *B. burgdorferi* (*s.l.*) 種 (*B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. afzelii*) の存在が示唆され、非病原性の *B. japonica* はヤマトマダニにおいてのみ検出されました。また、シュルツェマダニでは、*B. garinii* および/またはその近縁種である *B. bavariensis* が成ダニと若ダニの両方で検出された（21.9%）のに対し、*B. afzelii* は成ダニでのみ検出されました（1.8%）。ヤマトマダニ成ダニにおける *B. japonica* の保有率は21.8%でした。次に、リケッチア *gltA*、16S rRNA、*ompB* および *sca4* 遺伝子をPCRにより検出しました。ヒトに対し病原性を示す *R. helvetica* の保有率は、シュルツェマダニ成・若ダニで26.0%、幼ダニ（プール）で55.6%、オオトゲチマダニ幼ダニ（プール）で1.7%でした。“*Candidatus R. tarasevichiae*”については、シュルツェマダニ成・若ダニで15.4%、幼ダニ（プール）で33.3%の保有率でした。また、オオトゲチマダニ成・若ダニにおける“*Candidatus R. principis*”の保有率は11.1%でしたが、オオトゲチマダニ幼虫プールサンプルでは3.4%で検出されました。これらのことから、十勝地方においては、ヒトに対しボレリア、リケッチアの媒介リスクを有する主要マダニ種はシュルツェマダニであることが確認されました（論文リスト2）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議員・教育委員
- ・ 日本ダニ学会編集幹事・文献目録委員
- ・ 日本寄生虫学会
- ・ 日本衛生動物学会

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

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

1. Paul Franck Adjou Moumouni, Germaine Lim-Bamba Minoungou, Christian Enonkpon Dovonou, Eloiza May Galon, Artemis Efstratiou, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto

- Byamukama, Patrick Vudriko, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan. A survey of tick infestation and tick-borne piroplasm infection of cattle in Oudalan and Séno Provinces, northern Burkina Faso. **Pathogens**. 2021; 11: 31. PMID: 35055979.
2. Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, Kozo Fujisaki, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, **Rika Umemiya-Shirafuji***. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) and *Rickettsia* spp. in hard ticks distributed in Tokachi District, eastern Hokkaido, Japan. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**. 2021; 1: 100059. PMID: 35284860
 3. Eloiza May Galon, Adrian Miki Macalanda, Mary Margaret Garcia, Chrysler James Ibasco, Anatolio Garvida, Shengwei Ji, Iqra Zafar, Yae Hasegawa, Mingming Liu, Rochelle Haidee Ybañez, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Adrian Ybañez, Florencia Claveria, Xuenan Xuan. Molecular identification of selected tick-borne protozoan and bacterial pathogens in thoroughbred racehorses in Cavite, Philippines. **Pathogens**. 2021; 10: 1318. PMID: 34684266.
 4. **Rika Umemiya-Shirafuji***, Jinlin Zhou, Min Liao, Badgar Battsetseg, Damdinsuren Boldbaatar, Takeshi Hatta, Thasaneeya Kuboki, Takeshi Sakaguchi, Huey Shy Chee, Takeharu Miyoshi, Xiaohong Huang, Naotoshi Tsuji, Xuenan Xuan, Kozo Fujisaki. Data from expressed sequence tags from the organs and embryos of parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis*. **BMC Research Notes**. 2021; 14: 326. PMID: 34433501.
 5. Kasumi Kawamura, Aiko Kume, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Shunji Kasai, Hiroshi Suzuki. Effect of α -tocopheryloxy acetic acid, a vitamin E derivative mitocan, on the experimental infection of mice with *Plasmodium yoelii*. **Malaria Journal**. 2021; 20: 280. PMID: 34167535.
 6. Ehab Mossaad, Alex Gaithuma, Yassir O Mohamed, Keisuke Suganuma, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Yuma Ohari, Bashir Salim, Mingming Liu, Xuenan Xuan. Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens in cattle from Khartoum State and East Darfur State, Sudan. **Pathogens**. 2021; 10: 580. PMID: 34068782.

総説

該当なし

著書

1. **Rika Umemiya-Shirafuji**. Distribution, seasonal occurrence, and biological characteristics of *Haemaphysalis longicornis*, a vector of bovine piroplasmiasis in Japan. CABI Climate Change Series. 2021 Nov: 183-187. In Climate, Ticks and Disease; Editor: Pat Nuttall; CABI, Switzerland.

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 令和 2 年度 基盤研究 (C) (文部科学省)、バベシア原虫の介卵伝播におけるマダニ卵形成関連分子と原虫の分子間相互作用の解明 (19K06416)、代表、令和元年度～令和 3 年度
2. 令和 2 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発 (18H02336)、分担、平成 30 年度～令和 3 年度
3. 令和 2 年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、バベシアのマダニ体内発育ステージ抗原の網羅的解析：伝播阻止ワクチン開発の基盤整備 (19H03120)、分担、令和元年度～令和 3 年度
4. 令和 2 年度 国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B)) (文部科学省)、新たに発見された病原性牛バベシアに対する国際防疫体制強化に向けた基盤研究、分担、令和元年度～令和 3 年度
5. 令和 2 年度 日中二国間共同研究事業 (農林水産省)、マダニ媒介原虫病制圧に向けた日中共同アプローチ、分担、令和 2 年度～令和 6 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 中尾 亮：北海道大学大学院獣医学研究院、介卵伝播性時における共生菌-マダニ間のクロストーク解析、2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究
2. 田仲 哲也：鹿児島大学共同獣医学部、分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるフタトゲチマダニの胚発生に及ぼす影響、2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究
3. 鈴木 文詞：東京農工大学大学院農学研究院、カブリダニの卵形成の分子機構解明と人工飼料開発への応用、2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究

◆-----教授 横山 直明
(Naoaki Yokoyama)

1. 研究テーマの概要

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

2. 主な研究テーマ

- ・ 牛および馬のピロプラズマ病に関する国際疫学研究
- ・ 国内に蔓延する牛ピロプラズマの分子疫学および臨床病理学的研究
- ・ 野生シカが保有するピロプラズマの分子疫学的研究
- ・ ピロプラズマの媒介マダニに関する基礎および疫学研究
- ・ 牛および馬ピロプラズマ病の診断法、治療薬、及び予防ワクチンの開発に関する基礎研究
- ・ 人バベシア病の治療法確立に向けた基礎研究
- ・ プラズマ技術を用いた原虫病対策に資する新学術的研究

3. 2021年度研究の総括

- ・ 原虫病の治療法を開発するためのプラズマ技術の応用： *Trypanosoma brucei* (Tb) は、ヒトの血液中に寄生して、睡眠病と呼ばれる致死疾患を引き起こします。これまでに化学物質やマクロファージのファゴソームを用いた殺傷メカニズムの基礎研究から、この原虫は酸化ストレスに対して非常に高い感受性を示すことが示唆されてきました。そこで本研究では、大気圧下の低温プラズマ（LTP）装置を用いて、培養液中に酸化ストレスが増大した状態を再現し、Tbの試験管内増殖がどうなるかを調べました。その結果、LTP処理した培地ではTbの増殖が著しく阻害されることが分かりました。特に、原虫のミトコンドリアや小胞体が膨らみ、原虫の形態的な恒常性が失われる変化が見られました。このことから、LTP技術を用いて増大させた酸化ストレスがTbを死滅させることを明らかにしました。プラズマ技術は、病変に寄生する原虫を、酸化ストレスを増大させることで殺滅できる新たな治療法となることが期待されます。また、輸血血液内や環境下に隠れた原虫の消毒などにも活用できるかもしれません。さらに、酸化ストレスの殺滅機序を解明することで原虫に対する新たな治療薬の標的が発見できる可能性があります。本研究は、千葉大学、名古屋大学、および産業技術総合研究所と共同で実施しました。

- ・ 蛍光タンパク質を発現する組換え *Theileria equi* を用いたライブイメージング解析 : *Theileria equi* はマダニによって媒介される赤血球内寄生性原虫で、感染馬に発熱、貧血、黄疸などを主徴とする致死性の馬ピロプラズマ病を引き起こします。*T. equi* に感染した馬は終生キャリアーとなり、非感染馬への感染源となります。一方で馬体内に寄生した本原虫の増殖メカニズムは不明な点が多く、結果として *T. equi* を感染馬から完全に排除できる治療薬は未だ開発されていません。本研究では、緑色蛍光タンパク質（GFP）を恒常的に発現する組換え *T. equi* を作出し、赤内期の増殖サイクルを対象としたライブイメージング解析を行いました。まず、遺伝子導入部位である *T. equi* の *elongation factor-1 alpha* (*ef-1a*) 遺伝子とその転写調節領域を特定しました。その後 *ef-1a* 遺伝子のプロモーターおよびターミネーター領域の間に GFP と blasticidin 耐性因子が融合した eGFP/BSD 遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、その発現カセットを *T. equi* ゲノムの *ef-1a* 遺伝子座に導入しました。培養 9 日後に出現した blasticidin 耐性原虫を限界希釈することにより、組換え系統の単離を行いました。その組換え系統における *ef-1a* 遺伝子内への eGFP/BSD 遺伝子カセットの組込みは、PCR およびサザンブロット解析によって確認しました。組換え系統と親株との間で試験管内増殖能に違いは認められませんでした。次に、共焦点レーザー顕微鏡を用いたライブイメージング解析を行いました。その結果、赤内期の全ての増殖ステージにおいて、GFP が常に発現していることが確認されました。また、赤内期の 4 分裂虫体が感染赤血球膜が消失した後に赤血球外へと脱出していく様子が撮影されました。さらに、脱出後のメロゾイトが能動的に運動しながら移動している様子も観察されました。本 GFP 発現 *T. equi* はその増殖を視覚的に捉えることができることから、*T. equi* の増殖メカニズムを明らかにする上で有用な研究ツールとなります。今後は、*T. equi* の生物学のさらなる理解を通して馬ピロプラズマ病に対する新規治療薬の開発を目指します。
- ・ クロファジミンとアトバコンの併用による人バベシア病の根治療法の確立 : *Babesia microti* 感染による免疫不全患者のヒトバベシア病は、現在使用されている薬剤では効果がなく、しばしば致命的となります。最近の研究から、感染免疫不全マウスにおいてクロファジミン（clofazimine）の投与が *B. microti* Munich 株の駆逐に効果的であることが明らかになりました。本研究では、同様に免疫不全マウスを用いて、人分離株である *B. microti* Peabody mjr 株に対するクロファジミン単独、もしくはクロファジミン、アトバコン（atovaquone）、およびアジスロマイシン（azithromycin）の 2 剤併用療法の有効性をそれぞれ検証しました。その結果、クロファジミン単独投与、クロファジミン＋アジスロマイシン併用投与、アトバコン＋アジスロマイシン併用投与では原虫を完全に排除できませんでしたが、クロファジミン＋アトバコンによる 44 日間の連続併用投与は高い効果を示し、根治的な治癒効果を得ることができました。本研究により、人バベシア病に対する有益な根治療法の組み合わせを明らかにできました。
- ・ モンゴル国のラクダにおける牛バベシアの感染疫学調査 : 牛バベシアによって引き起こされる牛バベシア病は、畜産業に多大な経済的損失を与えています。牛バベシアは水牛などの牛以外の宿主からも頻繁に検出されており、そこからマダニによって牛に伝播する可能性が危惧され

ています。そのため、牛だけでなく牛以外の宿主における牛バベシアの感染も監視する必要があります。本研究では、モンゴル国のラクダを対象に、モンゴルの牛から過去に検出された臨床学的に重要な3種の牛バベシア (*Babesia bovis*、*B. bigemina*、および *Babesia* sp. *Mymensingh*) の感染について疫学調査を行いました。我々は、モンゴル国内の6県のラクダ計305頭から採取した血液DNAサンプルについて、原虫特異的PCR法を用いてスクリーニング調査を行いました。その結果、モンゴル国のラクダは調査した3種すべての牛バベシアに感染していることが判明しました。*B. bovis*、*B. bigemina*、および *Babesia* sp. *Mymensingh* の全体陽性率はそれぞれ32.1%、21.6%、24.3%であり、調査対象動物の52.5%が少なくとも1種の牛バベシアに感染している実態が明らかとなりました。モンゴル国では通常牛とラクダが放牧地を共有しており、さらに牛に寄生するマダニ種はラクダにも寄生します。これらの背景から、牛とラクダの間でマダニを介した牛バベシアの伝播が起こっている可能性が示唆されました。したがって、モンゴル国における牛バベシア病の防除戦略には、ラクダにおける牛バベシア感染の対策を含める必要があります。本研究は、モンゴル(Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences) との国際共同研究として実施しました。

- ・ スリランカ国の口バにおける *Theileria equi* の感染疫学調査：馬ピロプラズマ病 (EP) は、馬、口バ、シマウマ、ラバなどのウマ科動物が *Theileria equi* と *Babesia caballi* の感染によって引き起こされるマダニ媒介性疾患です。EP は世界的に流行しており馬産業に多大な経済的被害を及ぼしています。特に、感染した動物はキャリアーとなり媒介マダニの感染源となることから疾病管理上の大きな課題となっています。スリランカ国の家畜の間では様々なマダニ媒介病原体による感染症が知られていますが、*T. equi* と *B. caballi* による感染実態はスリランカでは未解明のままでした。そこで本研究では、見かけ上健康な放し飼い口バを対象に、*T. equi* と *B. caballi* を検出する感染疫学調査を実施しました。スリランカの Mannar 地区 ($n = 100$) と Kilinochchi 地区 ($n = 11$) の口バ計 111 頭から血液サンプルを採取しました。まず血液サンプルから血液塗抹標本を作製し、顕微鏡検査を行いました。次に血液から DNA を採取し、種特異的 PCR 法を用いて *T. equi* および *B. caballi* 感染のスクリーニング診断を行いました。その結果、64 頭 (57.7%) および 95 頭 (85.6%) の口バが、それぞれ顕微鏡検査および PCR 検査により *T. equi* に陽性を示しました。一方で *B. caballi* はすべての検体で陰性でした。また *T. equi* の 18S rRNA 配列の系統解析から、C と D の 2 つの異なる遺伝子型が検出されました。これらの成果は、スリランカ国で減少している口バの *T. equi* による EP のモニタリングの重要性を明らかにするものとなりました。本研究は、スリランカ (Veterinary Research Institute) との国際共同研究として実施しました。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議員、疾患名用語集委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会理事・評議員、教育委員会委員長
- ・ 日本寄生虫学会評議員

- ・ 日本熱帯医学会評議員
- ・ 日本衛生動物学会

② 主催した学会、研究会等

- ・ OIE Academic Exchange Seminar (IVM-NRCPD) 「Molecular epidemiology of bovine *Babesia* species in domestic ruminants and *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Mongolia」、原虫病研究センター/モンゴル獣医学研究所（オンライン）、2022 年 3 月 24 日

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 国際獣疫事務局（OIE）リファレンスラボラトリー「牛バベシア病、馬ピロプラズマ病」専門家
- ・ OIE コラボレーティングセンター「動物原虫病のサーベイランスと防疫」代表者
- ・ OIE 専門家委員会「馬ピロプラズマ病」委員
- ・ 北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所 共同利用・共同研究拠点・課題等審査委員会委員
- ・ 北海道大学卓越大学院 One Health Ally Course 運営委員会委員
- ・ モンゴル国「公務員獣医師および民間獣医師実践能力強化プロジェクト」国内支援委員会（JICA/北海道大学）委員
- ・ 日本中央競馬会畜産振興事業・家畜呼吸器疾患制御事業推進委員会（東京大学）委員
- ・ プラズマ・核融合学会・「プラズマによる生体電荷制御の科学」専門委員会委員

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（＊責任著者）

1. 久保木基高、中江徳洋、山根俊治、平山一人、酒井由紀夫、戸次信彰、横山直明（2021）：福岡県内の小型ピロプラズマ感染調査、家畜診療、693 号、p159.
2. Believe Ahedor, Hemal Kothalawala, Ratnam Kanagaratnam, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Davaajav Otgonsuren, Bumduuren Tuvshintulga, Enkhbaatar Batmag-nai, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama*. First detection of *Theileria equi* in free-roaming donkeys (*Equus africanus asinus*) in Sri Lanka. **Infection, Genetics and Evolution**. 2022 Feb 9; 99: 105244. PMID: 35149223.
3. Shengwei Ji, Mingming Liu, Eloiza May Galon, Mohamed Abdo Rizk, Bumduuren Tuvshintulga, Jixu Li, Iqra Zafar, Yae Hasegawa, Aiko Iguchi, Naoaki Yokoyama, Xuenan Xuan. Inhibitory effect of naphthoquine phosphate on *Babesia gibsoni* *in vitro* and *Babesia rodhaini* *in vivo*. **Parasites & Vectors**. 2022 Jan 7; 15(1): 10. PMID: 34991686.
4. Davaajav Otgonsuren, Thillaiampalam Sivakumar, Tovuu Amgalanbaatar, Batsaikhan

- Enkhtaivan, Sandagdorj Narantsatsral, Batdorj Davaasuren, Myagmar Zoljargal, Daltantai Munkhgerel, Batbold Davkharbayar, Enkhbaatar Batmagnai, Bumduuren Tuvshintulga, Believe Ahedor, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, **Naoaki Yokoyama***. Molecular survey of bovine *Babesia* species in Bactrian camels (*Camelus bactrianus*) in Mongolia. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2022 Jan; 13(1): 101871. PMID: 34814064.
5. Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, Arifin Budiman Nugraha, Believe Ahedor, Enkhbaatar Batmagnai, Davaajav Otgonsuren, MingMing Liu, Xuenan Xuan, Ikuo Igarashi, **Naoaki Yokoyama***. Combination of clofazimine and atovaquone as a potent therapeutic regimen for the radical cure of *Babesia microti* infection in immunocompromised hosts. **The Journal of Infectious Diseases**. 2022 Jan 18; 225(2): 238–242. PMID: 34664651.
 6. Kiyoshi Okado, Paul Franck Adjou Moumouni, Seung-Hun Lee, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama**, Kozo Fujisakia, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, Rika Umemiya-Shirafuji. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) and *Rickettsia* spp. in hard ticks distributed in Tokachi District, eastern Hokkaido, Japan. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**. 2021 Oct; 1: 100059.
 7. Yongchang Li, Mohamed Abdo Rizk, Eloiza May Galon, Mingming Liu, Jixu Li, Aaron Edmond Ringo, Shengwei Ji, Iqra Zafar, Maria Agnes Tumwebaze, Byamukama Benedicto, **Naoaki Yokoyama**, Ikuo Igarashi, Bayin Chahan, Xuenan Xuan. Discovering the potent inhibitors against *Babesia bovis* *in vitro* and *Babesia microti* *in vivo* by repurposing the natural product compounds. **Frontiers in Veterinary Science**. 2021 Nov 29; 8: 762107. PMID: 34912876.
 8. Batsukh Odonbayar, Bumduuren Tuvshintulga, **Naoaki Yokoyama**, Duger Badral, Buyanmandakh Buyankhishig, Javzan Batkhuu, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Kenroh Sasaki, Toshihiro Murata. Anti-piroplasma activity of 2-methylbutane galloyl glycosides from *Saxifraga spinulosa*. **Phytochemistry Letters**. 2021 June; 43: 135–139.
 9. Amarin Rittipornlertrak, Boondarika Nambooppha, Anucha Muenthaisong, Veerasak Punyapornwithaya, Saruda Tiwananthagorn, Yang-Tsung Chung, Bumduuren Tuvshintulga, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama**, Nattawooti Sthitmatee. Structural and immunological characterization of an epitope within the PAN motif of ectodomain I in *Babesia bovis* apical membrane antigen 1 for vaccine development. **PeerJ**. 2021 Jul 16; 9: e11765. PMID: 34316404.
 10. ThankGod E Onyiche, Thillaiampalam Sivakumar, Bumduuren Tuvshintulga, Arifin Budiman Nugraha, Believe Ahedor, Lehlohonolo Mofokeng, Joshua Luka, Ali Mohammed, Albert W Mbaya, Abdullahi A Biu, **Naoaki Yokoyama**, Oriel Thekisoe. Serosurvey for equine piroplasms in horses and donkeys from North-Western Nigeria using

- IFAT and ELISA. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**. 2021 Jun 7; 1–14. PMID: 34097577.
11. Bumduuren Tuvshintulga, Arifin Budiman Nugraha, Tomoka Mizutani, Mingming Liu, Takahiro Ishizaki, Thillaiampalam Sivakumar, Xuenan Xuan, **Naoaki Yokoyama***, Ikuo Igarashi. Development of a stable transgenic *Theileria equi* parasite expressing an enhanced green fluorescent protein/blasticidin S deaminase. **Scientific Reports**. 2021 Apr 27; 11(1): 9107. PMID: 33907262.
 12. Tran Nhat Thang, Thillaiampalam Sivakumar, Hemal Kothalawala, Seekkuge Susil Priyantha Silva, **Naoaki Yokoyama**, Madoka Ichikawa-Seki. Geographic origin of *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847) Fukui, 1929 detected from domestic water buffaloes in Sri Lanka. **Infection, Genetics and Evolution**. 2021 Jul; 91: 104806. PMID: 33722696.
 13. **Naoaki Yokoyama**, Thillaiampalam Sivakumar, Sanae Ikehara, Yoshihiro Akimoto, Takashi Yamaguchi, Ken Wakai, Kenji Ishikawa, Masaru Hori, Tetsuji Shimizu, Hajime Sakakita, Yuzuru Ikehara. Growth inhibition effect on *Trypanosoma brucei gambiense* by the oxidative stress supplied from low-temperature plasma at atmospheric pressure. **Japanese Journal of Applied Physics**. 2021 Jan; 60(2): 020601.

総説

該当なし

著書

1. **横山直明**（分担執筆）（2022）：馬ピロプラズマ病、馬トリパノソーマ病、p284-287、獣医内科学（第3版）産業動物編、猪熊壽ら監修、文永堂出版

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. OIE 診断依頼の受託「馬ピロプラズマ病」（令和3年度）：イギリス、ニュージーランド、日本より計11件（20検体）
2. OIE 診断依頼の受託「牛小型ピロプラズマ病」（令和3年度）：国内より計3件（135検体）
3. OIE 診断試料の提供「馬ピロプラズマ病血清診断用の IFAT スライド」（令和3年度）：イギリス、フランス、カナダ、アルゼンチンへ計7件（2,760枚）
4. OIE 診断試料の提供「馬ピロプラズマ病血清診断用のコントロール血清」（令和3年度）：トルコへ計1件（4検体）
5. OIE 診断試料の提供「馬ピロプラズマ病遺伝子診断用のコントロール DNA」（令和3年度）：ルーマニアへ計1件（1検体）
6. OIE 診断試料の提供「牛のバベシア病用の IFAT スライド」（令和3年度）：オーストリアへ計2件（1,985枚）
7. OIE 診断に関するコンサルタント・情報提供「馬のピロプラズマ病、牛のバベシア病」（令和2

- 年度)：イギリス、オランダ、フランス、ポルトガル、スウェーデン、トルコ、ジンバブエ、UAE、カタール、キルギス、モンゴル、インド、パキスタン、オーストラリア、ニュージーランド、ニューカレドニア、USA、メキシコ、アルゼンチン、ブラジル、日本、OIE へ計 31 件
8. 「馬のピロプラズマ病」に関する OIE terrestrial code 案を専門家委員会にて取りまとめ、OIE に提出 (2021 年 7 月)
 9. OIE リファレンスラボラトリー「牛バベシア病、馬ピロプラズマ病」、および OIE コラボレーティングセンター「動物原虫病のサーベイランスと防疫」の活動報告書を OIE に提出 (2022 年 1 月)

8. 招待講演等

1. 「Current status and control of oriental theileriosis in Japan」学際領域特別講義、岐阜大学 (オンライン)、2021 年 6 月 22 日
2. 「牛の放牧衛生」家畜衛生講習会 (牛疾病特殊講習会)、農林水産省 (オンライン)、2021 年 7 月 29 日
3. 「Bovine babesiosis~Role of OIE reference laboratory~」人獣共通感染症対策専門家特論、北海道大学 (オンライン)、2021 年 9 月 3 日
4. 「原虫病に対する治療法を開発するためのプラズマ技術の可能性について」、シンポジウム 3 「プラズマによる生体荷電制御科学の進展」、プラズマ・核融合学会 (オンライン)、2021 年 11 月 23 日

9. 獲得研究費

1. 平成 3 年度 家畜衛生対策事業 (農林水産省・消費・安全局)「我が国の OIE 認定施設活動支援事業」、代表、令和 3 年度
2. 令和 2 年度 競走馬生産育成研究助成事業 ((一社) 日本競走馬協会)「競走馬の円滑な国際流通に向けた馬ピロプラズマ病の学術整備」、代表、令和 2 年度～令和 3 年度
3. 令和元年度 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化 B) (文部科学省)「新たに発見された病原性牛バベシアに対する国際防疫体制強化に向けた基盤研究」(19KKO174)、代表、令和元年度～令和 3 年度
4. 令和 2 年度 二国間交流事業オープンパートナーシップ共同研究 (日本学術振興会)「スリランカ国で発見された新牛バベシア病に対する簡易診断法の開発研究」、代表、令和 2 年度～令和 3 年度
5. 令和 2 年度 研究拠点形成事業-B.アジア・アフリカ学術基盤形成型 (日本学術振興会)「アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築」(代表 玄学南)、分担、令和 2 年度～令和 5 年度
6. 平成 30 年 基盤研究 (B) (文部科学省)「ピロプラズマ病に対するコンビネーション治療法の家畜への実用化を目指した研究開発」(18H02337) (代表 五十嵐郁男)、分担、平成 30 年度～令和 3 年度
7. 令和元年度 研究活動スタート支援 (文部科学省)「Determination of host range and global

distribution of *Babesia* sp. Mymensingh, a recently discovered virulent *Babesia* capable of causing clinical babesiosis in cattle」(19K23704) (代表者 Thillaiampalam Sivakumar)、支援、令和元年度～令和3年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Phung Thang Long: 「国際疫学調査（ベトナム）」 Hue University of Agriculture and Forestry, Vietnam, 2005 年 1 月～、大学間学術交流協定
2. Nattawooti Sthitmatee: 「国際疫学調査（タイ）」 Chiang Mai University, Thailand, 2012 年 12 月～、大学間国際学術交流協定
3. Badgar Battsetseg: 国際疫学調査（モンゴル）」 Institute of Veterinary Medicine, Mongolia, 2019 年 6 月～、部局間国際学術交流協定
4. Seekkuge Susil Priyantha Silva: 「国際疫学調査（スリランカ）」 Veterinary Seseerch Institute, Sri Lanka, 2019 年 7 月～、部局間国際学術協定
5. Phung Thang Long: 「Isolation and *In vitro* cultivation of *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Babesia* sp. Mymensingh, and *Babesia* sp. Hue-1 from cattle in Vietnam」 Hue University of Agriculture and Forestry, Vietnam, 2021 年度原虫病研究センター共同研究
6. Sanjay Kumar: 「Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmiasis」 ICAR-National Research Centre on Equines, India, 2021 年度原虫病研究センター共同研究

◆-----教授 河 津 信 一 郎
(Shin-ichiro Kawazu)

1. 研究テーマの概要

原虫細胞での、酸化ストレス応答とレドックス（酸化・還元）シグナル、カルシウムシグナルに着目しています。生物は細胞内の酸化・還元バランスやカルシウム振動を利用して、様々な生理機能を調節しています。バベシアおよびマラリア原虫で、この仕組みやそこに働く分子の役割を「細胞を観ること」「イメージング実験」に重点を置いて調べています。一連の研究から、これら原虫の対策に繋がる生命の仕組みや分子が見つかることを期待しています。また、バベシア原虫での遺伝子操作技術の開発を行っています。ここで開発した外来遺伝子発現技術や遺伝子ノックアウト技術を活用して、同原虫の赤血球侵入機構やマダニ体内での発育機構をライブイメージングによって「目に見える」形で明らかにしていこうとしています。

住血吸虫症は、フィリピンをはじめとするアジアの途上国においても、農村や漁村の保健衛生および家畜衛生と密接に関連した人獣共通感染症です。アジア地域からの住血吸虫症の排除（elimination）に向けて、患者と保中宿主動物で、この寄生虫病を正確に診断する酵素抗体法（ELISA）やポイント・オブ・ケア・テスト（POCT）などの One-Health 適正技術を開発する研究および、各流行地に分布する寄生虫の集団遺伝学的特性をマイクロサテライトマーカーを利用して解析する疫学研究を、国際共同としておこなっています。

2. 主な研究テーマ

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

3. 2021 年度研究の総括

- ・ ヒトで問題となっているマラリアや睡眠病などの病原原虫では、生物学的特性の解明および原虫病の治療・予防に有効な遺伝子探索を目的としたポストゲノム研究が進展し、遺伝子改変技術を駆使したゲノム機能解析および従来のワクチンより有用性が期待される次世代原虫ワクチン＝遺伝子改変原虫（Genetically-attenuated parasite: GAP）を用いた弱毒生ワクチンの開発等が精力的に進められています。一方、家畜の小型および大型ピロプラズマ原虫（タイレリア オリエンタリス及びバベシア・オバタ）における遺伝子操作技術は、マラリア原虫やトキソプラズマで汎用されている技術のレベルにはほど遠く、次世代治療・予防技術開発のための基盤技術の整備が急務になっております。そこで私達は、ピロプラズマ原虫における「家畜病害原虫のゲノム改変技術」の基盤を確立することを目的として研究をおこなっています。今年度は、遺伝子改変バベシア原虫でのゲノム機能解析（Functional genomics）において必須となる同調培養の技術を開発する目的で、同原虫の宿主赤血球から遊出（egress）における Cyclic GMP-dependent protein kinase (PKG)の役割を（バベシア・ボービス *Babesia bovis*）で解析しました。その結果、バベシア原虫の“egress”において PKG が重要な役割を担うこと、

また、この過程には、calcium-dependent protein kinase (CDPK)やcAMP-dependent kinase (PKA)といった他の分子が介在するカスケードも共役していることが推測されました。一連の研究成績を、バベシア原虫での同調培養技術の開発に向けた基礎知見として、専門誌に公表いたしました（論文リスト1）。一方、国産のバベシア原虫（バベシア・オバタ *Babesia ovata*）では、これまで詳細な研究がおこなわれていなかったマダニ体内での発育ステージの分子論に切り込むため、昨年度に確立したウシ赤血球内での発育ステージからマダニ体内での発育ステージへの分化を誘導する試験管内培養系法を応用して、RNA シーケンス (RNA-seq) をおこない予備データを取得いたしました。この技術を応用することで、バベシア原虫でのマダニ体内発育ステージ分化メカニズムの研究や伝播阻止型ワクチン (TBV) の開発研究が、進展することが期待できます。また、5-ALA (5-アミノレブリン酸) のバベシア症治療効果を *B. bovis* を用いた *in vitro* 培養実験系および、(バベシア・ミクロティ *Babesia microti*) を用いた *in vivo* マウス感染実験系で評価いたしました。一連の研究成績を、新規バベシア症治療法の開発に向けた基礎知見として、専門誌に公表いたしました（論文リスト2）。

- ・ フィリピンでは国内 28 州に日本住血吸虫症の流行地があり、住民 500 万人が感染の危険に曝されています。私達の研究室では、国内の各流行地に分布する寄生虫の DNA を用いて分子疫学調査をおこない、各感染症流行地での寄生虫症の特性と寄生虫株の関係を解析した成績を、感染症対策の現場に還元しようとしています。一方、日本住血吸虫症の診断法を開発する研究では、酵素抗体法 (ELISA) や POCT をはじめとする、この寄生虫病の排除・撲滅に向けて社会実装に適した適性診断技術の開発を目指しております。今年度は、カンボジア・ラオスの農村や漁村で流行するアジア型の住血吸虫症 (メコン住血吸虫症) の患者を検出する ELISA を整備する目的で、私達がこれまでに日本住血吸虫症の診断で有用であることを報告している、thioredoxine peroxidase 1 (TPx-1) の組換え体抗原を応用して評価いたしました。その結果、日本住血吸虫 TPx-1 などの有用抗原を ELISA に応用することで、メコン住血吸虫症診断法の開発も可能になることが解りました。ELISA や POCT などの高感度・高特異性の診断法を整備することで、患者や保虫宿主動物の正確な診断と精緻な疫学調査が可能になり、アジア地域からの住血吸虫症の elimination に向けた取り組みが加速することが期待できます。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本熱帯医学会理事 (会計担当)
- ・ 日本獣医寄生虫学会理事 (理事長)
- ・ 日本獣医学会評議員

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 長崎大学熱帯医学研究所運営協議会委員
- ・ 長崎大学熱帯医学研究所・熱帯医学研究拠点運営協議会委員
- ・ 千葉大学真菌医学研究センターNBRP 運営委員会委員
- ・ 日米医学協力計画寄生虫疾患部会パネル

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（＊責任著者）

1. Hassan Hakimi*, Masahito Asada, Takahiro Ishizaki, **Shin-ichiro Kawazu**. Isolation of viable *Babesia bovis* merozoites to study parasite invasion. **Scientific Reports**. 2021; 11(1): 16959. PMID: 34417510.
2. Afra Elata, Keisuke Suganuma, Ehab Mossaad, Iqra Zafar, Eloiza May Galon, Keiichiro Yoshimoto, Tohru Tanaka, Xuan Xuenan, **Shin-ichiro Kawazu***. Evaluation of 5-aminolevulinic acid plus ferrous ion for its potential to improve symptoms of bovine babesiosis. **Parasitologia**. 2021; 1(4): 218-224.

総説

1. Hassan Hakimi*, Masahito Asada, **Shin-ichiro Kawazu**. Recent advances in molecular genetic tools for *Babesia*. **Veterinary Sciences**. 2021; 8(10): 222. PMID: 34679052.

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

1. The 2nd International Forum on Collaborative Researches in Parasitic Diseases : Web シンポジウム、Manila, Philippines、2021 年 5 月 25 日

9. 獲得研究費

1. 共同研究 ネオファーマージャパン株式会社、5-ALA (5-アミノレブリン酸)のピロプラズマ病治療効果の検証 (K18087)、代表、平成 30 年度～令和 3 年度
2. 令和元年度 基盤研究 (B) (一般) (文部科学省)、バベシアのマダニ体内発育ステージ抗原の網羅的解析:伝搬阻止ワクチン開発の基盤整備 (19H03120)、代表、令和元年度～令和 3 年度
3. 令和元年度 国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化(B)) (文部科学省)、マイクロサテライトマーカーを応用した日本住血吸虫症対策の創出を目指した研究 (19KK0173)、代表、令

和元年度～令和4年度

4. 令和3年度 独立行政法人日本学術振興会チェコとの共同研（CAS）（日本学術振興会）、DiCre/loxP システムを応用した遺伝子改変バベシア原虫の創出 (JPJSBP120212501)、代表、令和3年度～令和5年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

1. 受賞者：河津 信一郎

受賞名：第10回相川正道賞（日本熱帯医学会）

受賞テーマ：マラリア原虫の酸化ストレス応答に関する研究

受賞年：2021年11月4日

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Memorandum Of Understanding (MOU) for academic cooperation and exchange between College of Public Health, University of the Philippines Manila, Philippines and National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、2008年1月～2023年11月（2018年11月に延長）、学術交流協定、フィリピン大学マニラ校・公衆衛生学部
2. Memorandum Of Understanding (MOU) between The College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Cavite State University, Philippines and National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、2019年5月～2022年5月、学術交流協定、カビテ州立大学・生物獣医科学部
3. Memorandum Of Understanding (MOU) on academic cooperation between Philippines Carabao Center and National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、2019年7月～2022年7月、学術交流協定、フィリピンカラバオセンター
4. Daniel Sojka : Institute of Parasitology, Biology Centre CAS、The development of a DiCre recombinase-expressing strain of *Babesia* for the creation of conditional gene knock-outs、2021年4月1日～2022年3月31日、2021年度原虫病研究センター共同研究(2021-joint-18 継続)
5. 荒木 球沙：国立感染症研究所寄生動物部、可視化マラリア原虫を用いたオルガネラの三次元構造解析、2021年4月1日～2022年3月31日、2021年度原虫病研究センター共同研究(2021-joint-3)

◆-----助教 菅 沼 啓 輔
(Keisuke Suganuma)

1. 研究テーマの概要

動物トリパノソーマ症は国際獣疫事務局（OIE）が定める国際重要家畜疾患であり、またヒトアフリカトリパノソーマ症は世界保健機関（WHO）が定める「顧みられない熱帯病」であり、それぞれ対策が強く求められている原虫病です。我々の研究室では、トリパノソーマ症流行国での宿主哺乳類と媒介吸血昆虫の疫学調査を通じてその感染状況の時空間的動態を明らかにするとともに、実際に流行国で被害をもたらしている“野外流行型トリパノソーマ”を感染動物から分離、実験室で実験を行えるように培養馴化させた株を独自に確立し、野外流行型トリパノソーマのゲノム解析、病原性解析、薬剤感受性試験などの基礎的研究を行っています。また、このようにして得られた野外流行型トリパノソーマの基礎研究成果をもとに、トリパノソーマ及びその他の病原体を媒介する吸血昆虫の制御法の開発及び新規トリパノソーマ症治療薬の探索と実用化に向けた研究を進めています。さらに OIE リファレンスラボラトリー（スーラ病（*Trypanosoma evansi* 感染症））として、動物トリパノソーマ症に関する各種診断業務を行っています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トリパノソーマ症の疫学調査
- ・ 野外流行型トリパノソーマの分離培養法の確立および分離株の性状解析
- ・ 既存薬及び天然物からの抗トリパノソーマ活性物質の探索
- ・ 吸血昆虫及び媒介病原体の発生動態の時空間的解析

3. 2021 年度研究の総括

- ・ *Trypanosoma equiperdum* はウマのトリパノソーマ症の一種である媾疫（こうえき）の病原体であり、主に血流中に寄生する他種トリパノソーマとは異なり生殖器粘膜に寄生し、感染ウマの交尾によって感染が拡大します。媾疫は OIE の定める国際重要家畜疾患であるにもかかわらず、*T. equiperdum* 寄生動態と臨床症状との関連（病態生理）は未解明であり、また媾疫の制御に重要である治療法は確立されていません。本研究では *T. equiperdum* 長期感染マウスモデルを構築し、組織病変について検討しました。本研究で確立した感染モデルを用いて、媾疫治療法の開発の進展などが期待されます（論文リスト 8）（帯広畜産大学基礎獣医学研究部門との共同研究）。
- ・ 既存のトリパノソーマ症治療薬は毒性が強く、また限られた少数の薬剤を長く使用しているため、薬剤耐性トリパノソーマ症及び薬剤耐性トリパノソーマが多く報告されています。そのため新規トリパノソーマ症治療薬の開発が強く望まれています。そこで我々は新規トリパノソーマ症治療薬の候補となりうる化合物を探索するために、薬用植物由来化合物群及び合成化合物群の抗トリパノソーマ活性を検証しています。今年度はザンビア国などアフリカ南部に自生する *Cassia abbreviata* から抽出された各種化合物の抗トリパノソーマ活性を検討した結果、ピ

ロガロール構造を有する一連の化合物群に抗トリパノソーマ活性を見出しました。（論文リスト2）（東北医科薬科大学、ザンビア大学との共同研究）。また、*Alpinia galanga* から抽出された各種化合物に対してトリパノソーマを含む複数種の抗原虫活性を検討した結果、ヒドロキノンなどに抗リーシュマニアおよび抗トリパノソーマ活性を見出しました（論文リスト12）（広島大学との共同研究）さらにオキサゾールおよびニトロフランチン関連化合物ライブラリーを用いた抗トリパノソーマ活性化合物の構造活性相関解析を行い、オキサゾール関連化合物の抗トリパノソーマ活性発現及び細胞毒性の低減に重要な構造（論文リスト9）（東北医科薬科大学との共同研究）及びニトロフランチン関連化合物の抗トリパノソーマ活性発現及び細胞毒性の低減に重要な構造（論文リスト7）（南ア North-West 大学との共同研究）を明らかにしました。これらの *in vitro* でのスクリーニングで見出された抗トリパノソーマ活性化合物の治療効果を、*in vivo* で検証することで、新規治療薬の開発が期待されます。

- ・ 動物トリパノソーマ症はアフリカのみならず、アジア・南米諸国での畜産業に負の影響を与える感染症です。南米諸国ではブラジル、ボリビア、アルゼンチンなど、多くの国で家畜トリパノソーマ症の疫学調査が実施され、流行が確認されています。しかしそれらの家畜トリパノソーマ症流行国に囲まれたパラグアイにおいては、これまでに家畜トリパノソーマ症の疫学調査は行われておらず、その流行状況は不明でした。そこでパラグアイで飼養されているウマ 408 頭を対象に、PCR 法による家畜トリパノソーマ (*Trypanozoon* 及び *T. vivax*) の感染実態を調査しました。その結果、調査したパラグアイ全県で家畜トリパノソーマの感染ウマが認められ、他種家畜、保虫宿主である野生動物および媒介節足動物を含めた疫学調査の必要性が示唆されました（論文リスト1）（帯広畜産大学生命・食料科学研究部門およびパラグアイ CEDEPEP 社との共同研究）。
- ・ *Trypanosoma theileri* は日本のウシにも広く感染している大型のトリパノソーマです。本年度は畜産フィールド科学研究センターで飼養しているウシの生産性に *T. theileri* 感染が与える影響を、年間を通じた血液成分値及び乳成分値と *T. theileri* 感染の有無をロジスティック混合回帰分析によって解析しました。その結果、*T. theileri* 感染によりいくつかの血液成分値及び乳成分値が有意に低下することが明らかになりました。これらの結果は *T. theileri* 感染によって採食後の栄養吸収性が低下していることを意味しています。すなわち、これまで低病原性とされてきた *T. theileri* 感染が家畜生産性を低下させることが明らかになり、それを媒介する吸血昆虫（アブなど）とともに対策が必要であることが示唆されました（論文リスト4）（帯広畜産大学人間科学研究部門および米コーネル大学との共同研究）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本獣医寄生虫学会
- ・ 日本寄生虫学会

- ・ 日本衛生動物学会

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（＊責任著者）

1. Keisuke Suganuma, Tomás J Acosta, Maria Fátima Rodríguez Valinotti, Antonio Rodríguez Sanchez, Ehab Mossaad, Afraa Elata, Noboru Inoue. First molecular survey of animal trypanosomes in Paraguayan horses. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2022; 27: 100664. PMID: 35012722.
2. Linous Munsimbwe, Keisuke Suganuma, Yoshinobu Ishikawa, Kennedy Choongo, Takashi Kikuchi, Izumi Shirakura, Toshihiro Murata. Benzophenone glucosides and B-type proanthocyanidin dimers from Zambian *Cassia abbreviata* and their trypanocidal activities. **Journal of Natural Products**. 2022; 85(1): 91–104. PMID: 34965114.
3. Rawan A Satti, Eman A Awadelkareem, Keisuke Suganuma, Bashir Salim, Noboru Inoue, Xuenan Xuan, Suheir Rehan, Ehab Mossaad. Cattle anaplasmosis and babesiosis: Major tick-borne diseases affecting the cattle industry in Khartoum State, Sudan. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2021; 26: 100632. PMID: 34879943.
4. Keisuke Suganuma*, Mitsunori Kayano, Jatsuya Kida, Yrjö T Gröhn, Ryotaro Miura, Yuma Ohari, Daiki Mizushima, Noboru Inoue. Genetic and seasonal variations of *Trypanosoma theileri* and the association of *Trypanosoma theileri* infection with dairy cattle productivity in Northern Japan. **Parasitology International**. 2022; 86: 102476. PMID: 34610467.
5. Mirza Synthia Sabrin, Erdenechimeg Selenge, Yohei Takeda, Javzan Batkhuu, Haruko Ogawa, Dulamjav Jamsransuren, Keisuke Suganuma, Toshihiro Murata. Isolation and evaluation of virucidal activities of flavanone glycosides and rosmarinic acid derivatives from *Dracocephalum* spp. against feline calicivirus. **Phytochemistry**. 2021; 191: 112896. PMID: 34371301.
6. Oluyomi Stephen Adeyemi, Nthati Innocentia Molefe-Nyembe, Abiodun Omokehinde Eseola, Winfried Plass, Oluwatosin Kudirat Shittu, Ibrahim Olatunji Yunusa,

- Olubunmi Atolani, Ikponmwosa Owen Evbuomwan, Oluwakemi J Awakan, **Keisuke Suganuma**, Kentaro Kato. New series of imidazoles showed promising growth inhibitory and curative potential against *Trypanosoma* Infection. **The Yale journal of biology and medicine**. 2021; 94: 199–207. PMID: 34211341.
7. Linous Munsimbwe, Anna Seetsi, Boniface Namangala, David D N'Da, Noboru Inoue, **Keisuke Suganuma***. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal efficacy of synthesized nitrofurantoin analogs. **Molecules**. 2021; 26: 3372. PMID: 34199682.
 8. Yusuke Tanaka, **Keisuke Suganuma**, Kenichi Watanabe, Yoshiyasu Kobayashi. Pathology of female mice experimentally infected with an *in vitro* cultured strain of *Trypanosoma equiperdum*. **The Journal of Veterinary Medical Science**. 2021; 83: 1212–1218. PMID: 34135196.
 9. Koichi Narita, **Keisuke Suganuma**, Toshihiro Murata, Ryutaro Kondo, Hiroka Satoh, Kazuhiro Watanabe, Kenroh Sasaki, Noboru Inoue, Yuichi Yoshimura. Synthesis and evaluation of trypanocidal activity of derivatives of naturally occurring 2,5-diphenyloxazoles. **Bioorganic & Medical Chemistry**. 2021; 42: 116253. PMID: 34130218.
 10. Batsukh Odonbayar, Bumduuren Tuvshintulga, Naoaki Yokoyama, Duger Badral, Buyanmandakh Buyankhishig, Javzan Batkhuu, **Keisuke Suganuma**, Ikuo Igarashi, Kenroh Sasaki, Toshihiro Murata. Anti-piroplasma activity of 2-methylbutane galloyl glycosides from *Saxifraga spinulosa*. **Phytochemistry Letters**. 2021; 43: 135–139.
 11. Ehab Mossaad, Alex Gaithuma, Yassir O Mohamed, **Keisuke Suganuma**, Rika Umemiya-Shirafuji, Yuma Ohari, Bashir Salim, Mingming Liu, Xuenan Xuan. Molecular characterization of ticks and tick-borne pathogens in cattle from Khartoum State and East Darfur State, Sudan. **Pathogens**. 2021; 10: 580. PMID: 34068782.
 12. Melanny Ika Sulistyowaty, Nguyen Hoang Uyen, **Keisuke Suganuma**, Ben-Yeddy Abel Chitama, Kazuhide Yahata, Osamu Kaneko, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Susumu Kawakami, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami. Six new phenylpropanoid derivatives from chemically converted extract of *Alpinia galanga* (L.) and their antiparasitic activities. **Molecules**. 2021; 26: 1756. PMID: 33801067.
 13. Afraa Elata, **Keisuke Suganuma***, Ehab Mossaad, Iqra Zafar, Eloiza May Galon, Keiichiro Yoshimoto, Tohru Tanaka, Xuan xuenan, Shin-Ichiro Kawazu*. Evaluation of 5-aminolevulinic acid plus ferrous ion for its potential to improve symptoms of bovine babesiosis. **Parasitologia**. 2021; 1: 218–224.

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 2019 年度 若手研究（文部科学省）、ゲノム情報に立脚した臨床現場で使用可能なウマトリパノソーマ症鑑別診断法の開発（19K15972）、代表、2019 年度～2021 年度
2. 2021 年度 基盤研究（B）（文部科学省）、人獣近接地域伝承薬の化学分析と病原体及び媒介者対策を軸とした感染症制圧シーズ発掘（21H02638）、分担、2021 年度～2025 年度
3. 2021 年度 研究助成（伊藤記念財団）、映像解析技術を用いたアブの吸血行動の定量的解析による病原体媒介リスクの可視化、代表、2021 年度
4. 2021 年度 研究助成「感染症媒介節足動物及び外来動物」（大下財団）、北海道十勝地方における吸血性アブ類による病原体媒介リスクの解析、代表、2021 年度
5. 2021 年度 研究助成-感染症領域-【若手研究者】（MSD 生命科学財団）、アフリカトリパノソーマ症経口治療薬開発にむけた探索と検証、代表、2022/1～2023/12
6. 共同研究 ネオファーマジャパン株式会社、5-ALA（5-アミノレブリン酸）のトリパノソーマ症治療効果の検証、代表、2018 年度～2021 年度
7. 共同研究 ネオファーマジャパン株式会社、5-ALA（5-アミノレブリン酸）のモンゴルウマ調教効率改善の検証、代表、2020 年度～2022 年度
8. 共同研究 長崎大学・キッコーマン株式会社、アスコフラノンの動物トリパノソーマ症に対する治療効果の評価、代表、2021 年度～2022 年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 成田 紘一：東北医科薬科大学医薬合成化学教室、モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾールをリード化合物とした安全性の高い新規トリパノソーマ症治療の開発、2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究
2. Mark Carrington: University of Cambridge, Establishment transgenic manipulation of *Trypanosoma equiperdum* using of CRISPR/Cas9 and RNAi, 2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究
3. Jack Sunter: Oxford Brookes University, Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration, 2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究
4. Marvin Ardeza Villanueva: Philippine Carabao Center, Investigation on the emergence of resistance among commonly used trypanocidal drugs in the Philippines, 2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究
5. Zhe Hu: Harbin Veterinary Research Institute, International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories, 2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日、2021 年度原虫病研究センター共同研究

◆-----教授 五十嵐 慎
(Makoto Igarashi)

1. 研究テーマの概要

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

獣医領域における、公衆衛生上問題になる寄生虫の感染状況調査を行なっています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トキソプラズマオーシスト壁の生化学的解析
- ・ トキソプラズマ症に対するワクチン開発
- ・ トキソプラズマ原虫の急性感染から慢性感染への移行過程の解析

3. 2021 年度研究の総括

- ・ 日本国内におけるトキソプラズマ症について、既報の論文をもとに概要をまとめました（総説リスト1）。
- ・ エジプトミヌーフィーヤ県のバッファローにおける牛鉤虫の保有状況について調査を行いました（論文リスト1）。
- ・ 十勝地方の飼い猫から新規トキソプラズマ原虫株を単離し、その性状を解析しました（論文リスト2）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本分子生物学会会員
- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議員
- ・ 日本寄生虫学会評議員

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（＊責任著者）

1. Mahmoud AbouLaila, Makoto Igarashi, Ahmed ElKhatam, Soad Menshawy. Gastro-intestinal nematodes from buffalo in Minoufiya Governorate, Egypt with special reference to *Bunostomum phlebotomum*. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 2022; 27:100673. PMID: 35012729.
2. Doaa Salman, Motamed E Mahmoud, Wilawan Pumidonming, Tolubaeva Mairamku, Eiji Oohashi, Makoto Igarashi. Characterization of a spontaneous cyst-forming strain of *Toxoplasma gondii* isolated from Tokachi subprefecture in Japan. **Parasitology International**. 2021; 80: 102199. PMID: 32961305.

総説

1. Abdelbaset E Abdelbaset, Mostafa F N Abushahba, Makoto Igarashi. *Toxoplasma gondii* in humans and animals in Japan: An epidemiological overview. **Parasitology International** 2022; 87: 102533. PMID: 34968753.

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

該当なし

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

該当なし

◆-----准教授 麻 田 正 仁
(Masahito Asada)

1. 研究テーマの概要

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

2. 主な研究テーマ

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

3. 2021 年度研究の総括

- ・ *Babesia bovis* はウシのバベシア原虫の中で最も病原性の高い原虫です。*B. bovis* 感染赤血球はウシの脳毛細血管内皮細胞に接着することで血管を栓塞し、ウシに致死的な神経症状を引き起こしますが、そのメカニズムについては感染赤血球表面に局在する原虫由来の分子 VESA が関わるという知見しかありません。昨年度は新規赤血球改変分子として 2 つの分子 VEAP 並びに MTM を同定しました。今年度は日本に分布する低病原性のウシバベシア原虫である *B. ovata* を対象に、*B. ovata* VEAP, さらに MTM に類似したタンパク質構造を持つ MFS について解析を行い、両分子が共に原虫感染赤血球側に局在する分子であることを明らかにしました(麻田ら、人獣共通感染症研究拠点 研究シンポジウム)。また、先端予防治療学分野のハキミ・ハッサン博士と共同研究を行い、バベシア原虫メロゾイトの遊出を阻害する薬剤の探索や赤内期原虫の同期化を試みました(論文リスト 4)。さらに、バベシア原虫のゲノム改変法に関する総説を執筆しました(総説リスト 1)。
- ・ ヒトのマラリアは年間 2 億人の患者と 40 万人以上もの死者を出す感染症ですが、スイギュウやヤギといった偶蹄類家畜のマラリアは病原性、分布域を含め、その疫学は謎に包まれています。今年度は COVID-19 の影響により現地を訪問しての調査はできませんでした。その替わりとして、タイの共同研究者とオンラインにて連絡を取りながら疫学調査を継続し、定量的 PCR 法にてスイギュウにおけるマラリア原虫の経時的な感染率を解析しました。
- ・ ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* はヒトに感染するマラリア原虫に比べ、遺伝子組換え

原虫の作出が容易なため、マラリア原虫のゲノム機能を解析する上で有用なツールとなっています。長崎大学・熱帯医学研究所の金子修博士と共同研究を行い、CDPK や APH といった原虫の侵入に関わる分子の詳細な機能解析を行いました(論文リスト 2,5)。さらに、2012 年に麻田らはバベシア原虫メロゾイトの滑走運動を発表しましたが、当時マラリア原虫メロゾイトは滑走運動を行わないというのが定説でした。しかしながら、長崎大学・熱帯医学研究所の矢幡一英博士らはマラリア原虫のタイムラプス解析を重ねることにより、マラリア原虫も滑走運動を行う事を発見し、報告を行いました(論文リスト 1)。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本寄生虫学会評議員・情報処理広報委員会委員
- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 日本獣医寄生虫学会評議員・渉外・広報委員
- ・ 日本熱帯医学会
- ・ 米国微生物学会

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2021 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

原著論文（＊責任著者）

1. Kazuhide Yahata, Melissa N Hart, Heledd Davies, **Masahito Asada**, Samuel C Wassmer, Thomas J Templeton, Moritz Treeck, Robert W Moon, Osamu Kaneko. Gliding motility of *Plasmodium* merozoites. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2021; 118(48): e2114442118. PMID: 34819379.
2. Nattawat Chaiyawong, Takahiro Ishizaki, Hassan Hakimi, **Masahito Asada**, Kazuhide Yahata, Osamu Kaneko. Distinct effects on the secretion of MTRAP and AMA1 in *Plasmodium yoelii* following deletion of acylated pleckstrin homology domain-containing protein. **Parasitology International**. 2022; 86: 102479. PMID: 34628068.
3. Tsukasa Waki, Minoru Nakao, Mizuki Sasaki, Hiromi Ikezawa, Ken Inoue, Yuma Ohari, Yuichi Kameda, **Masahito Asada**, Haruki Furusawa, Shinsuke Miyazaki. *Brachylaima phaedusae* n. sp. (Trematoda: Brachylaimidae) from door snails in Japan. **Parasitology International**. 2022; 86: 102469. PMID: 34534656.

4. Hassan Hakimi, Masahito Asada, Takahiro Ishizaki, Shinichiro Kawazu. Isolation of viable *Babesia bovis* merozoites to study parasite invasion. **Scientific Reports**. 2021; 11(1): 16959. PMID: 34417510.
5. Takahiro Ishizaki, Masahito Asada, Hassan Hakimi, Nattawat Chaiyawong, Yuto Kegawa, Kazuhide Yahata, Osamu Kaneko. cAMP-dependent protein kinase regulates secretion of apical membrane antigen 1 (AMA1) in *Plasmodium yoelii*. **Parasitology International**. 2021; 85: 102435. PMID: 34390881.
6. Shiomi Koudatsu, Tatsunori Masatani, Rikako Konishi, Masahito Asada, Hassan Hakimi, Yuna Kurokawa, Kanna Tomioku, Osamu Kaneko, Akikazu Fujita. Glycosphingolipid GM3 is localized in both exoplasmic and cytoplasmic leaflets of *Plasmodium falciparum* malaria parasite plasma membrane. **Scientific Reports**. 2021; 11(1): 14890. PMID: 34290278.
7. Mingming Liu, Shengwei Ji, Daisuke Kondoh, Eloiza May Galon, Jixu Li, Mizuki Tomihari, Masashi Yanagawa, Michihito Tagawa, Mami Adachi, Masahito Asada, Ikuo Igarashi, Aiko Iguchi, Xuenan Xuan. Tafenoquine Is a Promising Drug Candidate for the Treatment of Babesiosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2021; 65(7): e0020421. PMID: 33941516.

総説

1. Hassan Hakimi, Masahito Asada, Shin-Ichiro Kawazu. Recent advances in molecular genetic tools for *Babesia*. **Veterinary Sciences**. 2021; 8(10): 222. PMID: 34679052.

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 令和 3 年度 国際共同研究加速基金(国際共同研究強化(B)) (文部科学省)、家畜住血微生物病の新規制御法創出に向けたマラリア原虫・他住血微生物相互作用の解明 (21KK0121)、代表、令和 3 年度～令和 6 年度
2. 令和元年度 基盤研究 (C) (一般研究) (文部科学省)、脳性バベシア症解明に向けたバベシア・ボビス感染赤血球の血管内皮細胞接着機構解析 (19K06384)、代表、令和元年度～令和 3 年度

3. 令和元年度 基盤研究（B）（一般研究）（文部科学省）、バベシアのマダニ体内発育ステージ抗原の網羅的解析：伝搬阻止ワクチン開発の基盤整備（19H03120）、分担、令和元年度～令和3年度
4. 農林水産省 日中二国間共同研究事業、マダニ媒介感染症の征圧に向けた日中協同アプローチ、分担、令和2年度～令和6年度
5. 北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所一般共同研究、バベシア Major Facilitator Superfamily の局在・機能解析、代表、令和3年度
6. 長崎大学 熱帯医学研究拠点一般共同研究 タイムラプスイメージングによる *Babesia bovis* p200 の機能解析、代表、令和3年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 山岸 潤也；北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所：非固有宿主への馴化とゲノム解析によるバベシア原虫の宿主域決定分子構造の解明、2021年4月1日～2022年3月31日、2021年度原虫病研究センター共同研究
2. Morakot Kaewthamasorn; Chulalongkorn University : Pathogenicity of the buffalo malaria parasites、2021年4月1日～2022年3月31日、2021年度原虫病研究センター共同研究

9. 共同研究成果報告書

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 10 日

採択番号	2021-共同-1		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	介卵伝播性時における共生菌—マダニ間のクロストーク解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なかお りょう 中尾 亮	北海道大学大学院獣医学研究院・准教授	
研究分担者	おがた しょうへい 小方 昌平	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	たや ゆりえ 田谷 友里恵	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	おおまえ はるき 大前 日希	北海道大学獣医学部・学部学生	
	しらふじ りか 白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マダニは多様な微生物を保有することが知られている。一部の微生物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知されつつある。国内に分布するマダニにおいても、マダニ集団内で広く維持されているコア共生微生物の存在が明らかになり、その役割解明が待たれる。本共同研究では、コア共生微生物の中でも <i>Spiroplasma</i> を研究対象に、マダニ集団内での維持・伝播メカニズムの解明を目的とした。特に、これまでの研究により示唆された、マダニ体内での垂直および水平伝播の可能性について、帯広畜産大学原虫病研究センターのバイオリソースを活用し、検証した。		
研究経過の概要	研究代表者らが過去に分離した、2 種類の <i>Spiroplasma</i> 分離株を実験に用いた。<i>Spiroplasma ixodetis</i> (strain 135) は、<i>Ixodes monospinosus</i> からシカダニ細胞 (ISE6) を用いて分離したもので、同細胞を用いて培養し、精製菌体を得た。<i>Spiroplasma mirum</i> (strain Q35) は、<i>Ixodes pavlovsky</i> から ISE6 細胞を用いて分離し、SP4 無細胞培地を用いて菌体の培養を行い、精製菌体を得た。接種実験には、PBS 接種群、抗生物質 (ペニシリン) 接種群、<i>S. ixodetis</i> 接種群 (4 群: 低・高濃度菌体 +/- 抗生物質)、<i>S. mirum</i> 接種群 (4 群: 低・高濃度菌体 +/- 抗生物質添加) の合計 10 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接種実験を行った。接種後マダニは、1 週間飼育した後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。<i>Spiroplasma</i> の伝播確認は、特異的 PCR を用いて実施した。加えて、<i>S. ixodetis</i> の自然感染が認められる <i>Ixodes ovatus</i> を野外採集し、吸血試験に用いた。		

研究成果の概要

【*Spiroplasma* 接種によるマダニへの影響】

2 種の *Spiroplasma* を接種したフタトゲチマダニの産卵率(卵重量/飽血体重)および幼ダニ孵化率を算出した。PBS コントロール群と比較して、全ての接種群で有意な産卵率および孵化率の低下は認められなかった(表1)。

【*Spiroplasma* の卵および幼ダニへの伝播解析】

各飽血マダニが産卵した卵および孵化幼ダニを 10 個体プールして DNA を抽出し、PCR により *Spiroplasma* の検出を試みた。その結果、*S. ixodetis* を高濃度 (5×10^{11} 菌体/個体) で接種した群の一部の個体で、卵および幼ダニから *Spiroplasma* が検出された(表1)。

表1. *Spiroplasma* 接種フタトゲマダニにおける吸血試験の結果

接種群	平均卵重量/飽血 体重	平均孵化率	<i>Spiroplasma</i> 陽性 卵	<i>Spiroplasma</i> 陽性 幼ダニ
PBS	45.1	84.8	0/6	0/6
PBS + penicillin	44.9	76.4	0/7	0/7
<i>S. mirum</i> (低濃度)	51.1	82.4	0/7	0/7
<i>S. mirum</i> (高濃度)	49.2	76.7	0/7	0/7
<i>S. mirum</i> (低濃度) + penicillin	50.3	66.1	0/6	0/6
<i>S. mirum</i> (高濃度) + penicillin	39.3	61.8	0/7	0/7
<i>S. ixodetis</i> (低濃度)	45.9	81.7	0/7	0/7
<i>S. ixodetis</i> (高濃度)	38.3	71.7	2/7	2/7
<i>S. ixodetis</i> (低濃度) + penicillin	46.6	80.4	0/6	0/6
<i>S. ixodetis</i> (高濃度) + penicillin	46.9	86.5	1/3	1/3

【*I. ovatus* における *Spiroplasma* 伝播解析】

過去の研究で高率に *S. ixodetis* を保有することが知られている *I. ovatus* を実験的に吸血試験に供し、卵からの *Spiroplasma* 検出を試みた。その結果、ほぼ 100% の個体で *Spiroplasma* の伝播が確認された。

【まとめと考察】

これまでマダニが保有する *Spiroplasma* がどのように集団内で伝播・維持されているかを調べた報告はない。本共同研究により、*Spiroplasma* を高率に保有する *I. ovatus* においては、高確率で垂直伝播が起こることが初めて実験的に証明された。また、*S. ixodetis* においては、低率ながらフタトゲチマダニへ水平的に伝播しうることが確認された。

我々の過去の研究において、国内のマダニが保有する *Spiroplasma* の遺伝子型を調べたところ、ほとんどの遺伝子型は宿主マダニ種との相関が高く、垂直伝播によって維持されていることが示唆された。一方で、同一の *Spiroplasma* 遺伝子型が異なるマダニ種間で検出される事例もあり、その要因については不明であった。本共同研究により、*Spiroplasma* の水平伝播の可能性が示されたことから、自然界における伝播メカニズム解明への糸口となること期待できる。

Spiroplasma は、一部の節足動物において病原体制御の役割を持つこと等が知られており、本研究成果を基盤にマダニにおけるその機能解析を進めたい。

研究成果の発表

北海道大学大学院国際感染症学院学位論文
小方昌平 Studies on genetic diversity and transmission dynamics of *Spiroplasma* in ixodid ticks (マダニにおける *Spiroplasma* の遺伝的多様性と伝播動態に関する研究)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 5 月 23 日

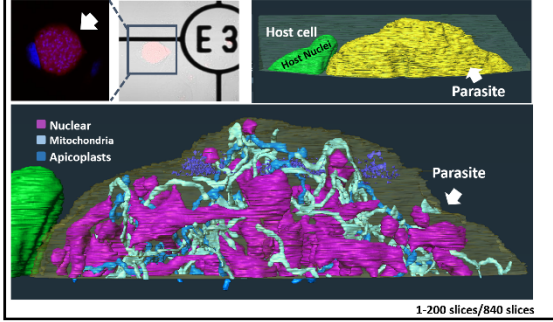
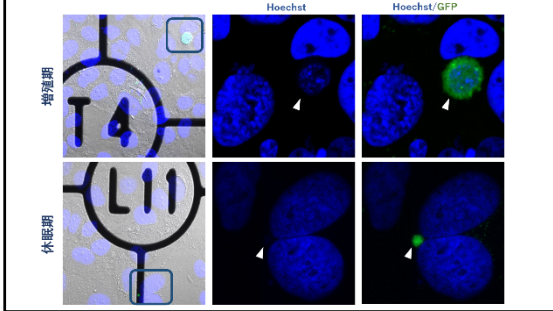
採択番号	2021-共同-2		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	トキソプラズマ分泌性タンパク質群の宿主ミトコンドリアとの相互作用解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	こしば たくみ 小柴 琢己	福岡大学 理学部化学科・教授	
研究分担者	にしごり みつひろ 錦織 充広	福岡大学 理学部化学科・助教	
	にし しょうへい 西 翔平	福岡大学 大学院理学研究科・大学院生	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	細胞内におけるエネルギーの産生場であるミトコンドリアは、真核生物の代謝系や品質管理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奇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が着目されている。これまで代表者は、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, 2020; <i>Sci. Rep.</i> 2017; <i>iScience</i> 2019, 2020; <i>JBC</i> 2020)。 本研究の目的は、トキソプラズマ原虫に感染した宿主内でのミトコンドリアがどのような影響を受け、またその際のタンパク質を通じた新たな相互作用に関しての学術的知見を得ることにあり、これまでに行ってきた抗ウイルス自然免疫研究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及び細胞生物学的な解析を主に行った。		

研究経過の概要	海外の研究チームによる研究結果では、タイプ I 型のトキソプラズマに感染した細胞内において一部の宿主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ている (PLoS Biol. 2014)。その生理的な意義を解明するために、本研究では以下のような実験を行った。 1) 西川研究室にて作製されたトキソプラズマゲノムの相補遺伝子 (GRA ファミリー) をクローニングした発現ライブラリー (FLAG タグ付加) を哺乳動物細胞 (HeLa) に遺伝子導入し、それら発現細胞内のミトコンドリア形態を免疫染色法 (抗 COX IV) にて観察した。 2) 上記、プラスミドを哺乳動物細胞 (HEK293) にもトランスフェクションし、発現細胞よりミトコンドリア分画を行い、ミトコンドリア画分をウェスタンブロット法 (抗 FLAG) により解析した。 3) 上記の実験により、ミトコンドリアへの局在が示された GRA タンパク質の安定発現株 (HEK293) を樹立した。その際にはタグとして、Myc タグを用いた。 4) 樹立した安定発現株を用いて、免疫沈降実験を行い、GRA タンパク質と相互作用する因子を網羅的に探索した。
研究成果の概要	西川研究室にて作製された計 17 種類の GRA 遺伝子 (FLAG タグ付加) を HeLa 細胞に導入し、免疫染色法により、発現した各 GRA タンパク質の細胞内局在解析を行った。その結果、GRA8 及び GRA25 において綺麗なミトコンドリアへの局在が確認できた。 次に、GRA8 及び GRA25 の発現プラスミドをそれぞれ HEK293 細胞へトランスフェクションし、その後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ェスタンブロット法 (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。そこで、GRA25 の詳細なミトコンドリア局在様式を調べるために、このタンパク質に Myc を付加した組換え体の安定発現株を 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。次に、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 Myc 抗体を添加し、Protein G 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。現在は、GRA25 を欠損した組換え原虫を作製中であり、今後はその表現型解析も含めて研究を進める予定である。
研究成果の発表	該当年度は、特になし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 5 月 27 日

採択番号	2021-共同-3		
研究部門	先端予防治療学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津 信一郎
研究課題名	可視化マラリア原虫を用いたオルガネラの三次元構造解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	あらき たまさ 荒木 球沙	国立感染症研究所 寄生動物部・任期付研究員	
研究分担者	あんのうら たけし 案浦 健	国立感染症研究所 寄生動物部・室長	
	かわい さとる 川合 覚	獨協医科大学 熱帯病寄生虫病学・教授	
	かくた そういちろう 角田 宗一郎	順天堂大学 形態解析イメージング研究室・准教授	
	かわず しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マラリア原虫は、非常に高度な生活環・増殖制御機構を持つユニークな単細胞の真核生物である。本研究では、そのマラリア原虫の肝内型ステージの増殖期と休眠期における内部オルガネラ分配のメカニズムを明らかにすることを目的に、集束イオンビーム内蔵の走査型電子顕微鏡(FIB-SEM)を使用し、可視化肝内型マラリア原虫のオルガネラ三次元構造解析を試みる。使用するマラリア原虫は、申請者らが既に作製に成功した可視化サルマラリア原虫 <i>Plasmodium cynomolgi</i> (Pcy-GFP)と可視化ネズミマラリア原虫 <i>P.berghei</i> (Pb-mChe)株を使用し、培養肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 感染実験系により調整したサンプルで各種解析を行う。		
研究経過の概要	予定していた河津博士との帯広畜産大学での共同研究の打合わせは、新型コロナウイルス蔓延に伴い、オンライン会議にて滞りなく行った(2022 年 2 月)。研究に関しては、おおむね研究計画通りに解析が進み、Pb-mChe の肝内型ステージにおける増殖期の内部オルガネラ構造の三次元構造解析が完了し、今後は、感染早期の原虫等のオルガネラ構造を同様の解析で明らかにし、増殖期におけるオルガネラの発達・増殖機構の網羅的な観察を行う予定である。また、Pcy-GFP 感染実験に関してもおおむね計画通りに研究は進み、Pcy-GFP 感染ハマダラカからスポロゾイトを作製することに成功し、このスポロゾイトを用いてサルマラリア原虫の肝内型ステージにおける増殖期・休眠期の作製(<i>in vitro</i>)が完了した。現在、これら原虫は、FIB-SEM 解析に進み、内部オルガネラ構造の解析を行っている。		

研究成果の概要	1. 可視化ネズミマラリア原虫 Pb-mChe の FIB-SEM 解析 <i>mCherry</i> 発現可視化ネズミマラリア原虫 Pb-mChe 株をマウスに感染させ、感染血をハマダラカへ吸血・感染させ唾液腺を回収し、スポロゾイト(SPZ)を大量に得ることが出来た。回収した SPZ は、培養肝細胞 Huh7 へ感染させ、野生型の増殖期にあたる 48 時間後(多核体の原虫が個々に分裂する直前)に固定し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて <i>mCherry</i> シグナルから原虫の位置の特定を行った。その後、サンプルは電子顕微鏡を用いて観察し、両顕微鏡により得られた像の相関を得る解析手法 CLEM 法 (Correlative light and electron microscopy) を用いて FIB-SEM 解析を行った。得られた複数枚の切片データから、原虫の内部オルガネラ構造の 3D 化がほぼ終わり、増殖時における原虫オルガネラのネットワーク形成の一部を把握することが出来た【図 1】。 2. 可視化サルマラリア原虫 Pcy-GFP の FIB-SEM 解析 Pb-mChe 同様に、Pcy-GFP 株をアカゲザルに感染させ、得られた SPZ を培養肝細胞へ感染させ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて GFP シグナルから原虫の位置の特定を行った。観察の結果から、GFP のシグナルが大きく多核形成が認められた原虫(増殖期)と GFP のシグナルが小さい原虫(休眠期)を確認することが出来た【図 2】。現在、これら原虫は電子顕微鏡を用いて観察し、CLEM 法を用いた FIB-SEM 解析中である。 【図 1】 Pb-mChe 肝内型(増殖期)を用いた内部オルガネラ構造解析 CLEM法 (Correlative Light and Electron Microscopy) 同一試料を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察し、両顕微鏡により得られた像の相関を得る解析手法  【図 2】 Pcy-GFP 肝内型(増殖期・休眠期)の観察 GFP発現サルマラリア原虫 (Pcy-GFP) 感染 8 日後の培養肝細胞: <i>in vitro</i> 
研究成果の発表	学会発表 ○荒木球沙、川合寛、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「FIB-SEM 解析を用いたマラリア原虫内部オルガネラ構造の解明」第 44 回日本分子生物学会(横浜:2021 年 12 月) ○荒木球沙、川合寛、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡 3D 構造解析を用いたマラリア原虫のオルガネラ分配機構の解明」第 5 回日本共生生物学会(JAMSTEC・オンライン:2021 年 11 月) ○荒木球沙、川合寛、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡三次元構造解析を用いたマラリア原虫内部オルガネラ構造の解明」第 80 回日本寄生虫学会東日本支部会(獨協大・オンライン:2021 年 10 月) ○荒木球沙、川合寛、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡 3D 構造解析を用いたマラリア原虫のオーシスト期・核分裂様式の解明」第 90 回日本寄生虫学会(奈良・オンライン:2021 年 4 月) 受賞 第 5 回日本共生生物学会 若手優秀発表賞 (JAMSTEC:2021 年 11 月)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 5 月 31 日

採択番号	2021-共同-4		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質の ナノスケールレベルでの分布解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふじた あきかず 藤田 秋一	鹿児島大学 共同獣医学部・教授	
研究分担者	またたに たつり 正谷 達膳	岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 人獣共通感染症学 研究室・准教授	
	げん がくなん 玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	酵母の遺伝的解析研究によって動物細胞でもオートファジー制御機構の詳細が明らかにされてきた。最近、同じ真核生物であるトキソプラズマについても、ミトコンドリア維持あるいは細胞分裂にオートファジーの関与が示唆されているが、哺乳類細胞など一般生物との違いが多く、その詳細は不明である。本研究では、申請者らが開発した急速凍結・凍結割断レプリカ法および免疫電子顕微鏡技術を駆使し、トキソプラズマのオートファゴソームの微細構造およびそれを形成する脂質膜を破壊すること無く可視化し、さらに構成する脂質成分の特定を行う。その成果に基づき、原虫におけるオートファジーの機能解明を目指す。		
研究経過の概要	申請者らは、急速凍結・凍結割断レプリカ標識(QF-FRL)法によってグリセロリン脂質の一つであるホスファチジルセリン(PtdSer)の局在を検討し、感染力の強い <i>Toxoplasma gondii</i> の RH 株と感染力の低い PLK 株細胞膜で違いのあることを明らかにした(図 1 の金コロイド)。本研究では、単離精製した <i>T. gondii</i> を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 PtdIns(3)P の微細分布の解析を行なった。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。今後はさらに条件検討をすることによりオートファゴソームでの PtdIns(3)P の局在を検討する予定にしている。		



研究成果の 概 要	我々は脂質の超微局在を明らかにすることが、膜脂質の機能を解明するために必須であると考え、そのための方法開発に注力してきた。その結果、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法 (QF-FRL: Quick Freezing & Freeze-fracture Labeling) によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示した。本研究では、この QF-FRL 法を用いることにより、<i>T. gondii</i> においてグリセロリン脂質の一つであるホスファチジルセリン (PtdSer) の微細分布を明らかにした (図1)。 <i>T. gondii</i> において RH 株および PLK 株ともに、PtdSer は細胞膜、inner membrane complex (IMC) 膜の外膜の内葉、外葉ともに存在が確認できたが、いずれの膜においても内葉の方がその密度は高いものであった。しかしながら、IMC の内膜では、PtdSer は外葉には局在するものの、内葉には存在しなかった。RH 株と PLK 株を比較した場合、いずれの膜においても内葉に局在する PtdSer の密度に差は見られなかったものの、外葉では RH 株の方が PLK 株よりも有意に高いものであった。RH 株と PLK 株の宿主細胞への感染性を比べた場合、RH 株の方が高いことが報告されている。このことから、<i>T. gondii</i> の生体膜の PtdSer の発現量がその感染力に影響していることが示唆された。さらに、<i>T. gondii</i> では PtdSer が IMC 膜の内膜では内葉に存在しないことから、IMC の内膜と外膜との間に PtdSer の拡散を妨げる何らかの障壁が存在することが示唆された。 また本研究では、単離精製した <i>T. gondii</i> の細胞内における PI(3)P の微細分布を可視化することに成功した (図 2)。しかしながら、飢餓状態あるいは薬物処理によりオートファジー誘導を行なった <i>T. gondii</i> においても、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観察することはできなかった。今後はオートファジー誘導を行う条件検討を行い、オートファゴソーム様構造の観察をできるよう予定しており、同時に PI(3)P の微細分布の解析を行う。 PtdIns(3)P が局在するベジクル 500 nm 図 2. トキソプラズマ虫体の細胞内での PtdIns(3)P の局在 (電顕写真)
研究成果の 発 表	1. 小西里可子、向達汐美、福田佳代子、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ホスファチジルセリンの微細局在. 第 95 回 日本生化学大会、名古屋、2022 年 11 月 9 日 (予定).

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 6 日

採択番号	2021-共同-5		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	ポピュレーショントラックによる マウスでの潜伏感染に必要なトキソプラズマ原虫遺伝子の機能評価		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	すぎ たつき 杉 達紀	北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所・助教	
研究分担者			
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トキソプラズマ原虫の潜伏感染は永続的なものではなく、宿主による原虫の排除が生じていることが近年報告されている。潜伏感染の維持を左右する原虫側因子を同定し作用機序を解明することは、潜伏感染の排除速度に介入して潜伏感染を制御する手法につながる。一方、トキソプラズマの感染実験において潜伏感染成立・維持の最終的な評価軸である脳内シスト数はマウス個体間で振れ幅が大きく、潜伏感染成立に影響する原虫因子の解析を妨げている。我々は解析対象遺伝子に変異を持った原虫と野生型原虫の増殖性の差異を同一マウス体内で評価することにより遺伝子機能を評価する手法の確立を目指した。		
研究経過の概要	<u>①迅速な遺伝子変異原虫ポピュレーション調整手法の確立</u> CRISPR/Cas9 を用いて変異導入された原虫集団を低継代数で樹立する系の確立を試みた。トキソプラズマ原虫において十分な効率で変異導入を実現する donor oligo の条件検討を実施した。トランスフェクション後にゲノム編集がされた原虫を薬剤選択し、変異株ポピュレーションが十分に濃縮できる期間の検討を実施した。 <u>②NGS によるポピュレーション追跡手法の確立</u> 次世代シーケンサー(NGS)を用いて、変異株と野生株などの混合集団におけるポピュレーションを推定する手法の確立を試みた。解析モデルとして TgGP 遺伝子にサイレント変異株もしくは KO 変異を導入した 2 株の混合集団の <i>in vitro</i> 培養のサンプルを利用した。継代のたびにゲノム DNA を精製し、変異 SNP 導入箇所を増幅し NGS 解析により KO 変異の割合を解析した。		

研究成果の 概 要	<u>①迅速な遺伝子変異原虫ポピュレーション調整手法の確立</u> ゲノム編集をするトキソプラズマ原虫の親株として潜伏感染実験系が確立している <i>Pru Δku80 Δhxgprt</i> 株を導入し(Dr. David Bzik より許可を得て帯広畜産大学西川教授より分与を受けた)、一つのプラスミドに Cas9:gRNA:選択マーカートを搭載した組換えコンストラクトおよび種々の長さの単鎖 DNA ドナーと組み合わせて電気穿孔法で原虫へ導入した。Cas9 が切断する部位の周囲 100bp のドナーを用いることで、遺伝子導入後の薬剤選択 1~2 週間で 9 割を超えた原虫に変異が導入されていることを確認した。樹立した系を用いてアミロペクチン代謝に関わる 6 遺伝子(TgGP/ TgGWD/ TgPPDK/ Amy1/ Amy2/ D-enzyme)の全てについて KO 変異を導入することに成功した。 <u>②NGS によるポピュレーション追跡手法の確立</u> TgGP の KO 変異もしくはサイレント変異が導入された混合集団のポピュレーション推移を NGS を用いて解析したところ、<i>in vitro</i> での継代期間に応じて KO 変異株の割合が減少していた。培養条件において TgGP が原虫増殖の適合性に寄与していることが明らかとなった。 確立されたポピュレーション追跡手法を用いて、潜伏感染状態のマウスの脳から得られたサンプルの解析を進めた。TgGP の活性型変異を導入された原虫と野生株の混合集団を腹腔内に投与後、感染後 1 か月目の感染感染マウスから回収した虫体では活性型変異原虫は野生株と同等程度存在していたのに対して、感染後 3 か月目では活性型変異原虫の割合が増加している傾向がみられた。野生型原虫と変異原虫の集団構成について同一の実験群の中でもマウスごとにばらつきが見られた。ばらつきの原因としては脳組織へ原虫が移行する際に少数の原虫が絞込まれている「ボトルネック効果」を受けていることが挙げられる。今後は投与する原虫の数を増やしてボトルネックを通過する際の原虫数を増やす、もしくは解析するマウスの個体数を増やすなどして、より頑強に潜伏感染時のポピュレーション推移を観察する予定である。
研究成果の 発 表	特記事項なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 5 月 12 日

採択番号	2021-共同-6		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるフタトゲチマダニの胚発生に及ぼす影響		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	たなか てつや 田仲 哲也	鹿児島大学 共同獣医学部・教授	
研究分担者			
	しらふじ りか 白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マダニにとって必須の生存基盤は宿主動物からの吸血・消化にあり、血液消化産物中に含まれる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の胚発生にも影響し、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。研究代表者らはその鉄代謝の制御を担う分子として、分泌型フェリチンに着目し、分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるマダニの胚発生に及ぼす影響について、胚発生のステージごとに検証した。また、鉄イオン濃度を測定することによって、鉄イオン濃度の動態と胚形態の相互関係を明らかにした。		
研究経過の概要	【研究目的】 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 FER などの抗酸化分子の発現動態については不明な点が多い。そこで本研究では、分泌型 FER (FER2) 遺伝子ノックダウンした発育胚について、各経過日の発育胚(Day 1、Day 5、Day 10、Day 15、Day 20)に含まれる鉄イオン濃度の動態と(FER2)タンパク質の局在を調べることによって、胚発生における両者の機能を明らかにすることを目的とした。 【材料と方法】 FER2 遺伝子ノックダウンしたフタトゲチマダニの発育胚について、Scale 法の手法に従い透明化を行った。透明化技術によって透明化したマダニの発育胚について、DAPI を用いて核染色をした後、蛍光顕微鏡で観察を行って、胚発生のステージを同定した。また、ノックダウンによって胚形態に及ぼす影響について観察した。さらに、Quantichrome™ iron assay kit を用いて、ホモジナイズした各経過日のノックダウンした発育胚(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。		

研究成果の概要	【結果】 <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群においても、発育胚における <i>FER2</i> 蛋白質の発現が観察され、対照群との間に、発現量や局在の違いは認められなかった。両群ともに、1 日目から 20 日目までの全経過日において胚細胞の細胞質内に <i>FER2</i> 蛋白質の蛍光が観察され、20 日目において、脚の中心部に強い蛍光が観察された。また、胚形態の観察およびステージ分類を行った結果、対照群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間で、胚形態やステージの割合に明らかな違いは認められなかった。さらに、全ての経過日において、<i>FER2</i> 遺伝子ノックダウンした胚に含まれる二価鉄イオンならびに三価鉄イオンの濃度に有意な差は認められなかった。 【考察】 RNA 干渉法を用いて、フタトゲチマダニの <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウンを行った場合であっても、雌成ダニに残存している <i>FER2</i> 蛋白質が、発育胚に移行することが考えられた。また、10 日目以降において、無処置群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間に <i>FER2</i> 蛋白質の発現量および局在に差は見られなかった。この結果から、<i>FER2</i> 遺伝子のノックダウンは、胚由来の <i>FER2</i> 遺伝子の発現に影響を及ぼさない可能性が考えられる。胚形態の観察およびステージ分類を行った結果、無処置群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間に、胚形態やステージの割合に違いは認められず、孵化率についても差は認められなかった。以上の結果より、RNA 干渉法を用いた <i>FER2</i> 遺伝子のノックダウンは、雌成ダニの吸血および卵形成を阻害するが、胚発生には影響を及ぼさないことが示唆される。
研究成果の発表	【学会発表(予定)】 島崎 慧, Emmanuel Pacia Hernandez, 新原博子, <u>白藤(梅宮)梨可</u>, 藤崎幸蔵, <u>田仲哲也</u>, フタトゲチマダニ胚発生におけるフェリチンの発現動態, 第 91 回日本寄生虫学会, 帯広畜産大学, 2022 年 5 月(北海道)

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: June 2, 2022

Project no: 2021-joint-7

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)

April 1, 2021–March 31, 2022 (1-year continuing project)

5. Purposes and objectives

This study aimed to study on pathogenicity of *Plasmodium bubalis* infection in buffalo calves and its vector.

6. Outline of research process

We carried out several surveys in Thailand i) from Asian water buffaloes in smallholder farms in Nakhon Ratchasima in December 2019 (n = 22); ii) from Murrah dairy buffaloes in Chachoengsao in June 2020 (n = 45); iii) in November 2021 (n = 45) and iv) from Asian water buffaloes in smallholder farms in Nan in December 2020 (n = 65). All blood samples (n=177) were collected from the jugular vein of buffaloes and kept in ACD tubes. DNA samples from buffalo blood underwent nested PCR screening for *Plasmodium* using primers DW2 and DW4 targeting cytochrome b (*cytb*) gene as the outer primers and NCYBINF and NCYBINR for the inner primers. Subsequently, *Plasmodium*-positive samples were further confirmed using primer sets targeting the cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) and 18S ribosomal RNA (*18S*) genes.

Naturally infected buffalo, which has already been confirmed by microscopic examination and molecular diagnostic, was followed up for 14 consecutive days. Afterward, the infected buffalo was monitored weekly until day 56. During the observation period, the following data were collected: body temperature, clinical signs, anemia, and appetite. Every day for 14 consecutive days, one ml of blood samples was drawn from the jugular vein and kept in a tube containing ACD solution (two infected

buffaloes). Blood samples from infected buffaloes were examined by nested PCR and qPCR for each day. Parasite burden was measured by real-time quantitative PCR. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using P_{pubCox1-F32} and P_{pubCox1-4B3} primers. Parasitemia levels were counted from thin blood smears under a microscope.

A total of 1,652 female mosquitoes were collected from two sampling sites Chachoengsao (n = 1,571) and Ratchaburi (n = 81) (Table 5). Anopheline mosquitoes and non-Anopheline mosquitoes were screened for the presence of malaria parasites. Adult female mosquitoes were grouped based on their morphology. A total of 268 female mosquitoes (214 *Anopheles* spp., 24 *Culex* spp., 24 *Aedes* spp., and 6 *Mansonia* spp.) were examined. Among 214 *Anopheles* spp., 133 were collected from a buffalo farm where concurrently water buffalo samples were shown to be *P. bubalis* positive). Anopheline mosquitoes were carefully dissected within three days after collection to obtain the salivary glands of each mosquito. Mosquito pools were made (head and thorax including dissected salivary glands) following morphological identification and were subsequently confirmed by molecular identification. Each pool was made up of one to three mosquitoes from the same groups depending on sample availability. DNA samples extracted from mosquitoes were subjected to PCR screening for *P. bubalis* based on *cytb*, *cox1*, and 18S rRNA genes. *Plasmodium*'s-positive samples that underwent PCR confirmation were subsequently subjected to sequencing. Anopheline mosquito species were conducted by sequencing the PCR products targeting *cox1*, cytochrome c oxidase subunit 2 (*cox2*), and internal transcribed spacer 2 (*ITS2*) markers.

7. Outline of research achievements

7.1 Detection of malaria parasite in blood samples

A total of 177 buffalo blood samples were collected and underwent screening for *P. bubalis* infection. We found that 2 out of 45 buffaloes in Chachoengsao collected in 2020 (THBuff20_37 and THBuff20_39) tested positive for the malaria parasite from day 1 after observation until day 49, being undetected. Parasite burden was measured by real-time quantitative PCR. Parasite burden in both buffaloes was detected as low as 15×10^4 copies per microliter of blood sample until day 28, as shown in Figure 1. Co-infection was detected in both infected buffaloes. *Theileria* sp. and *Anaplasma* sp. were detected in THBuff20_37, while THBuff20_39 was co-infected with *Theileria* sp only. All co-infection were tested by PCR using published primers PanPiroF1 and PanPiroR1 for piroplasma infection and EhrliAnaplas16SR5U-EhrliAnaplas16SR3U/ EhrliAnaplas16FWD-EhrliAnaplas16REV for *Anaplasma* infection. We recorded that the buffalo which were infected by *P. bubalis* had no symptoms. Body temperature in both infected buffaloes showed no significant deviation from normal ranges during the observation period (Figure 2). During the infection, the trophozoite stage was predominated. Evaluation of parasitemia levels Giemsa-stained blood smears were recorded as low parasitemia (<0.01-0.09%) for 14 consecutive days.

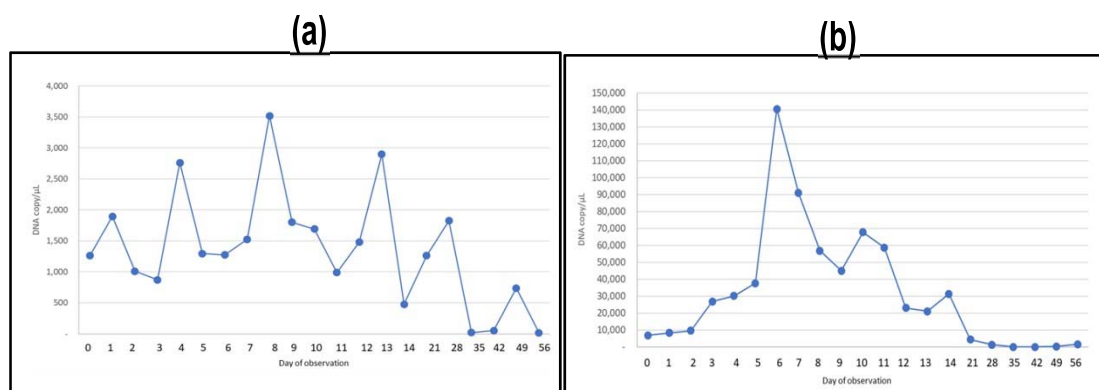


Figure 1. Malaria parasite's copy number measured by qPCR in buffalo during the observation period (a) THBuff20_37, (b) THBuff20_39

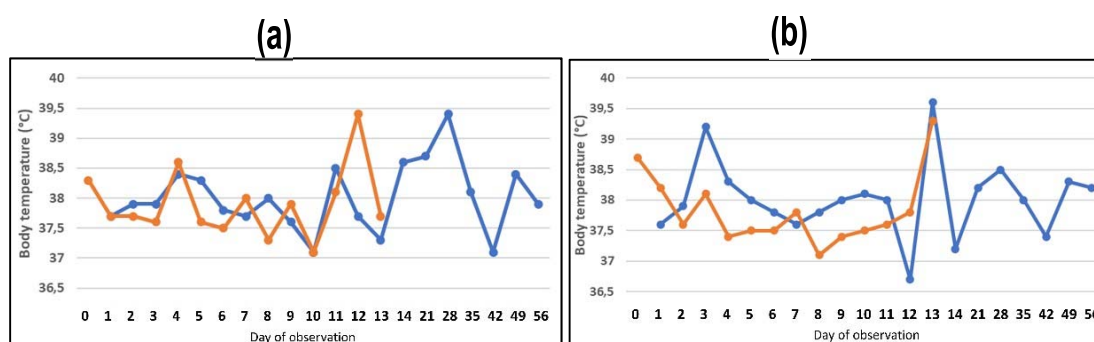


Figure 2. Body temperature malaria-infected buffaloes during observation period (a) THBuff20_37, (b) THBuff20_39. Blue and orange lines indicate the observed temperature in the morning and evening, respectively.

7.2 Morphological identification of mosquitoes' samples

Among collected mosquitoes, anopheline mosquitoes accounted for 13.01%, 70.94% for *Culex* spp., 12.41% for *Aedes* spp., 0.36% for *Mansonia* spp., and 3.27% were unidentifiable due to body part's destruction. Among 214 identified anopheline mosquitoes, nine different *Anopheles* spp. were identified belonging to Barbirostris, Hyrcanus, Funestus, Ludlowae, and Jamesii groups. *An. peditaeniatus*, which is a member of the Hyrcanus group, was predominant in the buffalo farm in Chachoengsao, while *An. aconitus* was the most common mosquito on the Ratchaburi buffalo farm, as depicted in Figure 3.

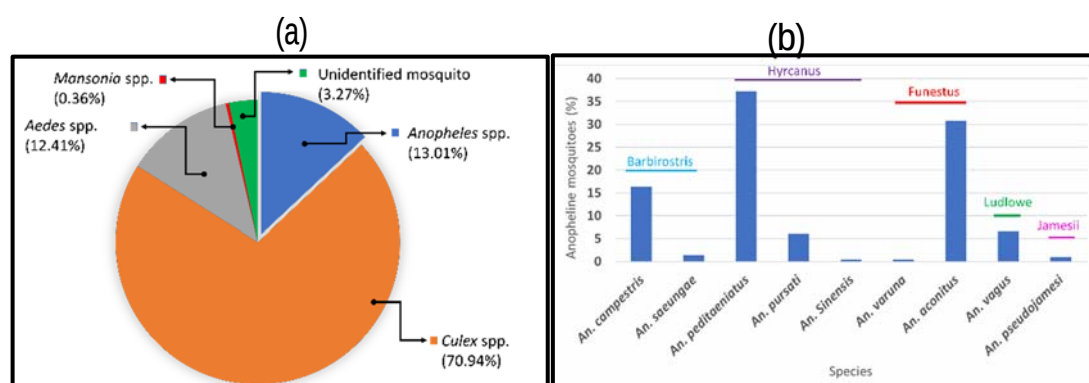


Figure 3. Chart illustrating the number of mosquitoes, according to morphological identification. (a) Percentages of each genus collected in this study as shown above. (b) *Anopheles* mosquitoes collected from buffalo farms based on group and species.

7.3 Molecular identification of anopheline mosquitoes

Among collected anopheline mosquitoes, 128 (59.81%) were selected for DNA extraction, which was made up of 102 pools per species depending on the availability of mosquitoes (1-3 individuals per pool). The number of each pool was subjected for sequencing and the results as follows: *An. wejchoochotei*/*An. campestris* (n = 35, 23 pools), *An. peditaeniatus* (n = 80, 46 pools), *An. vagus* (n = 14, 7 pools), *An. varuna* (n = 1, 1 pool), *An. pseudojamesi* (n = 2, 1 pool), *An. saeungae* (n = 3, 3 pools), *An. pursati* (n = 12, 12 pool), and *An. aconitus* (n = 66, 8 pools) *An. sinensis* (n = 1, 1 pool) (Table 1).

Table 1. Summary of *P. bubalis*'s PCR screening results of anopheline mosquitoes collected from the buffalo farm

Sampling sites	Group	No. collected	No. of pools	No. of positive pools			No. of pools sequenced for mosquito genes and determined species name
				18S	cytb	cox1	
Chachoengsao	Barbirostris	35	23	2	2	2	17 (<i>An. wejchoochotei</i> or <i>An. campestris</i>)
	Hyrcaus	80	46	1	1	1	15 (<i>An. peditaeniatus</i>),
		1	1	0	0	0	1 (<i>An. sinensis</i>)
	Funestus	1	1	0	0	0	1 (<i>An. varuna</i>)
	Ludlowae	14	7	0	0	0	6 (<i>An. vagus</i>)
	Jamesii	2	1	0	0	0	1 (<i>An. pseudojamesi</i>)
Ratchaburi	Barbirostris	3	3	0	0	0	1 (<i>An. saeungae</i>)
	Hyrcaus	12	12	0	0	0	5 (<i>An. pursati</i>)
	Funestus	66	8	0	0	0	8 (<i>An. aconitus</i>)
Total		214	102	3	3	3	55

7.4 Molecular detection of *P. bubalis* in mosquito samples

Out of 79 pools of anopheline mosquitoes originating from Chachoengsao, three pools were PCR positive for *Plasmodium*. These samples were *An. wejchoochotei*/*An. campestris* (IDs THMosqBuff20_P6_3, THMosqBuff20_P8_2), and *An. peditaeniatus* (ID THMosqBuff20_P20_3) (Table 6). The MIR (%) was calculated at 5.7 (0.015-0.186) in *An. wejchoochotei*/*An. campestris* and 1.9 (0.003-0.101) in *An. peditaeniatus* (Table 2). None of the 54 non-anopheline mosquitoes from the buffalo farm were PCR positive for *Plasmodium*.

Table 2. Minimum infection rates of *Plasmodium bubalis* from collected mosquitoes

Species	Total no. mosquitoes	Pool size (range)	No. tested	No. positive pools	MIR (%) (95%, CI)
<i>An. campestris</i> or <i>wejchoochotei</i>	35	1-3	35	2	5.7 (0.015-0.186)
<i>An. peditaeniatus</i>	80	1-3	52	1	1.9 (0.003-0.101)

8. Publication of research achievements

Nugraheni YR, Arnuphapprasert A, Nguyen TT, Narapakdeesakul D, Nguyen HLA, Poofery J, Kaneko O, **Asada M** and **Kaewthamasorn M** 2022. Myzorhynchus series of Anopheles mosquitoes as potential vectors of *Plasmodium bubalis* in Thailand. Sci Rep. 12(1): 5747. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09686-9>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 10 日

採択番号	2021-共同-8		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	カブリダニの卵形成の分子機構解明と人工飼料開発への応用		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	(すずき たけし) 鈴木 丈詞	東京農工大学大学院農学研究院・准教授	
研究分担者	(もり こうたろう) 森 光太郎	石原産業株式会社中央研究所・グループリーダー	
	(おさかべ まさひろ) 刑部 正博	京都大学大学院農学研究科・准教授	
	しらふじ りか 白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	捕食性天敵であるカブリダニ類は、薬剤抵抗性が発達しやすいハダニ類に対する持続可能な生物的防除資材として、半世紀以上にわたって利用されてきた。ハダニ類に対する主要な天敵製剤として、国内では、チリカブリダニ (<i>Phytoseiulus persimilis</i>) 剤およびミヤコカブリダニ (<i>Neoseiulus californicus</i>) 剤が市販されている。2017 年の統計では、これらカブリダニ剤の国内出荷金額は約 7 億円であり、近年増加傾向である。ただし、この金額は、殺虫剤全体の国内出荷金額のわずか 0.6%程度である。さらなる普及拡大のためには効率的なカブリダニ剤の生産体制の構築が必要である。 ミヤコカブリダニは国内土着種であり、ハダニ類のみ摂食するチリカブリダニと異なり、その大量生産には、ハダニ類の他に、害虫とならない節足動物あるいは花粉が餌として用いられている。しかし、これら天然物の管理は煩雑であり、安定的なミヤコカブリダニ生産のボトルネックとなっている。 他方、同じダニ目に属するマダニ類では、卵形成の分子機構研究が進展し、栄養シグナル伝達を担う Target of rapamycin (TOR) 経路によって卵黄タンパク質前駆体であるビテロジェニン (Vg) の合成が制御されることが判明している。そこで本研究では、このマダニ類の卵形成の専門家である白藤(共同研究担当教員)との連携のもと、ミヤコカブリダニの TOR 経路や Vg 合成系で機能する遺伝子群を分子マーカーとし、卵形成を促す栄養成分のスクリーニングと、栄養シグナル伝達の分子機構の解明を目指す。		

研究経過の概要	ミヤコカブリダニ卵からゲノム DNA を抽出し、illumina 社の NovaSeq 6000 System を用いたショートリードシーケンシング(リード長:150 bp、読み取り深度:81.24×)を実施した。得られた総リードから低品質のリードを除去し、クリーンリード(リード数:102,279,784)を作成した。これらクリーンリードをアセンブリに使用し、8895 のコンティグを構築した(N50:99.85 kb)。 次に、Oxford Nanopore Technologies 社の MinION を用いたロングリードシーケンシングを実施した。得られた総リードから低品質のリードを除去し、クリーンリード(リード数:6,501,331)を作成した(N50:2.538 kb、読み取り深度:115.44×)。 そして、得られたショートリードとロングリードの両データを用いたハイブリッドアセンブリを実施した。 なお、研究代表者、研究分担者および共同研究担当教員は、オンライン会議やメールで進捗状況について適宜ディスカッションし、緊密な連携のもと研究計画を遂行した。
研究成果の概要	ハイブリッドアセンブリによりミヤコカブリダニのドラフトゲノムを決定した。そのコンティグ数、N50 およびゲノム長は、それぞれ 264、1.359 Mb および 179.6 Mb であった。また、BUSCO 値(節足動物の遺伝子データセット)は 94.4%であった。これら値は、すでに先行してゲノム解析が進められてきた近縁種のククメリスカブリダニ(<i>Neoseiulus cucumeris</i>)やオキシデンタリスカブリダニ(<i>Galendromus occidentalis</i>)のドラフトゲノムのそれらと同等であった。 現在は、近縁種の遺伝子モデルを用い、遺伝子領域の推定を進めている。今後は、このゲノム情報を基盤としたトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を実施し、特に TOR 経路や Vg 合成系に焦点を当て、卵形成に資する分子マーカーを選定していく。そして、その分子マーカーを用いた卵形成を促す栄養成分のスクリーニングを実施する。卵形成を促す栄養成分が特定されれば、それを導入した人工飼料の開発に進み、ミヤコカブリダニの安定的な大量生産体制の構築へと展開していく。
研究成果の発表	武田直樹, N.A. Ghazy, 鈴木伽奈, 片岡孝介, 由良敬, 白藤(梅宮)梨可, 森光太郎, 刑部正博, 鈴木丈詞(2022)ミヤコカブリダニのゲノム全塩基配列解読:ゲノム情報を利用した天敵育種への展望. 第 66 回日本応用動物昆虫学会大会, オンライン開催, 2022 年 3 月 20~22 日(口頭)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 5 月 30 日

採択番号	2021-共同-9		
研究部門	国際連携研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	麻田 正仁
研究課題名	非固有宿主馴化バベシア原虫を用いた宿主域決定因子の同定		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	やまぎしじゅんや 山岸 潤也	北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授	
研究分担者			
	あさだ まさひと 麻田 正仁	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	一般にバベシア原虫の宿主特異性は高いが、人為的な変異導入により <i>B. bovis</i> がヒト赤血球に馴化することも知られており(私信)、その再現性について我々も確認している。そこで本研究では、バベシア原虫の宿主特異性を規定する分子メカニズムの一端を明らかにする目的で、我々が再取得したヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> の比較ゲノム、トランスクリプトーム解析を行う。一方、<i>B. microti</i> は、げっ歯類を宿主とするが、同時にヒトへの感染性と病原性も有する。ここで、ヒトにおける感染性と病原性を規定する分子メカニズムの解明は疾病対策を行う上で重要であるが、ヒト赤血球を用いた <i>in vitro</i> 培養系がないことが妨げになっている。そこで、ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> 作出と同様の方法を用いて、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出を試みる。		
研究経過の概要	昨年度の原虫病研究センター共同研究において、4 株の独立したヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> の取得に成功し、そのゲノム解析を行ったが、4 株に共通する変異は見いだせなかった。その際、変異元の親株ゲノムを参照にした re-sequencing ではなく、既知 T2Bo 株ゲノム配列を参照に解析を行ったことから、構造変化を検出できなかった可能性が考えられたため、本研究では、親株と馴化株の <i>de novo</i> ゲノム解析を行った。さらに、転写変化が馴化に関与する可能性を考え、4 株の馴化株と、親株、および、親株をクローン化する際に得られた兄弟株 3 株間で RNA-seq 解析も行った。 ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出については、SCID マウスの赤血球をヒト赤血球に置換した SCID-HuRBC マウスを作製し、<i>B. microti</i> を接種した。<i>B. microti</i> 接種後、原虫感染率が上昇したところで、血液塗抹標本を作製し、間接蛍光抗体法にて、ヒト赤血球への感染を解析した。		

研究成果の概要	RNAseq の結果、全 3781 遺伝子中、93 遺伝子が 8 倍以上かつ補正後 p 値が 0.05 以下を満たす発現変化を示した。同様に、693 遺伝子が 2 倍以上の発現変化を示した。このうち、馴化に関与する可能性のある遺伝子として、下記の遺伝子を抽出した (Table 1)。特に、SmORF、および、merozoite surface antigen 2a2 が馴化に関与する可能性が高いと考えられる。 加えて、<i>B. bovis</i>には 10 回以上の膜貫通領域を持つ遺伝子として multi-transmembrane (mtm) type A (16 遺伝子) および、mtm type B (10 遺伝子) が知られているが、type A のうち 3 遺伝子、type B のうち 9 遺伝子が 2 倍以上の発現変動を示した (Table 2)。mtm は栄養素等の化合物の膜を介した輸送に関与していると考えられており、blasticidin 耐性に関与することも知られていることから、これらがのヒト赤血球への馴化に関与する可能性も十分考えられる。 VESA 遺伝子については、標準ゲノム (T2Bo) を参照配列とした発現解析で、BBOV_IV005660 (ves1-alpha)、BBOV_IV002830 (ves1-beta) の発現更新が認められたが (Table 1)、VESA 領域は高頻度で組換えが発生するとされており、標準ゲノム (T2Bo) を参照配列に用いることは適切ではない。そこで、4 株の馴化株のうちの 1 つ (6H 株) を de novo sequencing し、改めて RNA-seq 解析を行ったところ、chr2:2578 Kb 領域で ves1-alpha、および、ves1-beta が対で高発現していることが判明したが、親株に対しての発現比に顕著な違いは認められなかった (Figure 1)。 今後、上記候補遺伝子を過剰発現する組換え原虫の作出を行うことで、馴化に関わる遺伝子の特定を進めたいが、親株がヒト赤血球で増殖できない理由が、1) 侵入にあるのか、2) 赤血球内での複製にあるのか、それとも、3) egress 時なのかを改めて確認することで、対象遺伝子の優先順位に反映させる必要がある。 ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出については、SCID マウスの脾臓を摘出後ヒト赤血球を隔日で接種し、マウス赤血球の大半をヒト赤血球に置換した SCID-HuRBC マウスを作製した。同時に <i>B. microti</i> 感染マウスを用意し、マウスから採血後、N-ニトロソ-N-エチル尿素 (NEU) 2 mM 存在下で 8 時間培養し、変異を誘導した。変異を誘導した原虫ならびに NEU 未処理原虫をそれぞれ 2 頭の SCID-HuRBC マウスに接種し、感染率をモニタリングした。感染率は NEU 処理原虫接種群が NEU 未処理原虫接種群に比べて高く推移し、実験開始 11 日目に原虫感染率が十分あがったところで血液塗抹標本作製し、マウス赤血球に対する間接蛍光抗体法を実施した。すると、赤血球の大半がマウス赤血球に戻っており、ヒト赤血球に感染している原虫は発見されず、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出には至らなかった。本実験から NEU 処理による原虫の赤血球感染効率向上が示唆されたが、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出には、SCID-HuRBC マウスへの追加のヒト赤血球投与も含め、更なる条件の最適化が必要であると考えられた。
研究成果の発表	特記事項なし。

Table 1				
gene ID	baseMean	Log2 FC	padj	annotation
BBOV_IV005660	2491.1	7.0	3.3E-288	variant erythrocyte surface antigen-1, alpha subunit
BBOV_IV003790	17.1	6.3	3.26E-08	ATP binding family protein
BBOV_III000050	4411.5	6.1	NA	SmORF
BBOV_IV002830	1031.4	5.6	0.003809	variant erythrocyte surface antigen-1, beta subunit
BBOV_IV003840	9.7	5.5	5.88E-06	ATP binding family protein, putative
BBOV_III006480	8.6	5.3	3.35E-05	Spherical Body Protein 2 truncated copy 8
BBOV_III006230	8.5	5.3	2.09E-05	uracil-DNA glycosylase family protein
BBOV_III006220	1.1	-4.8	0.103083	RNA recognition motif domain containing protein
BBOV_III006330	59.5	4.2	5.27E-16	YT521-B-like family protein
BBOV_VI000020	88.3	3.9	1.02E-10	cytochrome c oxidase subunit III
BBOV_I005060	24.2	3.7	2.24E-06	ubiquitin conjugating enzyme, putative
BBOV_I003000	119.1	3.7	7.61E-25	merozoite surface antigen-2a2
additional ves and SmORF, mtm, and hypothesis protein have been omitted				

Table 2				
gene ID	baseMean	Log2 FC	padj	annotation
BBOV_IV012100	8.9	-7.1	3.58E-08	mtmB
BBOV_IV012090	0.9	-4.6	0.137791	mtmB
BBOV_IV000100	84.7	3.6	1.75E-20	mtmB
BBOV_II000070	59.5	3.0	1.84E-13	mtmB
BBOV_II007760	44.1	2.5	0.000433	mtmB
BBOV_II007770	356.4	1.9	1.22E-22	mtmB
BBOV_I001380	0.1	-1.7	0.672433	mtmB
BBOV_IV000110	520.1	1.7	8.19E-16	mtmB
BBOV_III011920	1973.0	1.7	0.020318	mtmB
BBOV_III000060	10087.1	-0.5	3.49E-07	mtmB
BBOV_I001310	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_II000020	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_II007800	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_II007840	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_III001210	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_III001290	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_III002360	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_III011980	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_IV000210	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_IV000340	0.0	NA	NA	mtmA
BBOV_IV012120	52.8	5.0	NA	mtmA
BBOV_II004200	0.2	-3.2	0.4222	mtmA
BBOV_IV005630	140.7	2.3	NA	mtmA
BBOV_I001200	232.9	2.1	0.009274	mtmA
BBOV_III000010	3875.3	-1.4	NA	mtmA
BBOV_IV000020	123.3	0.2	0.896661	mtmA

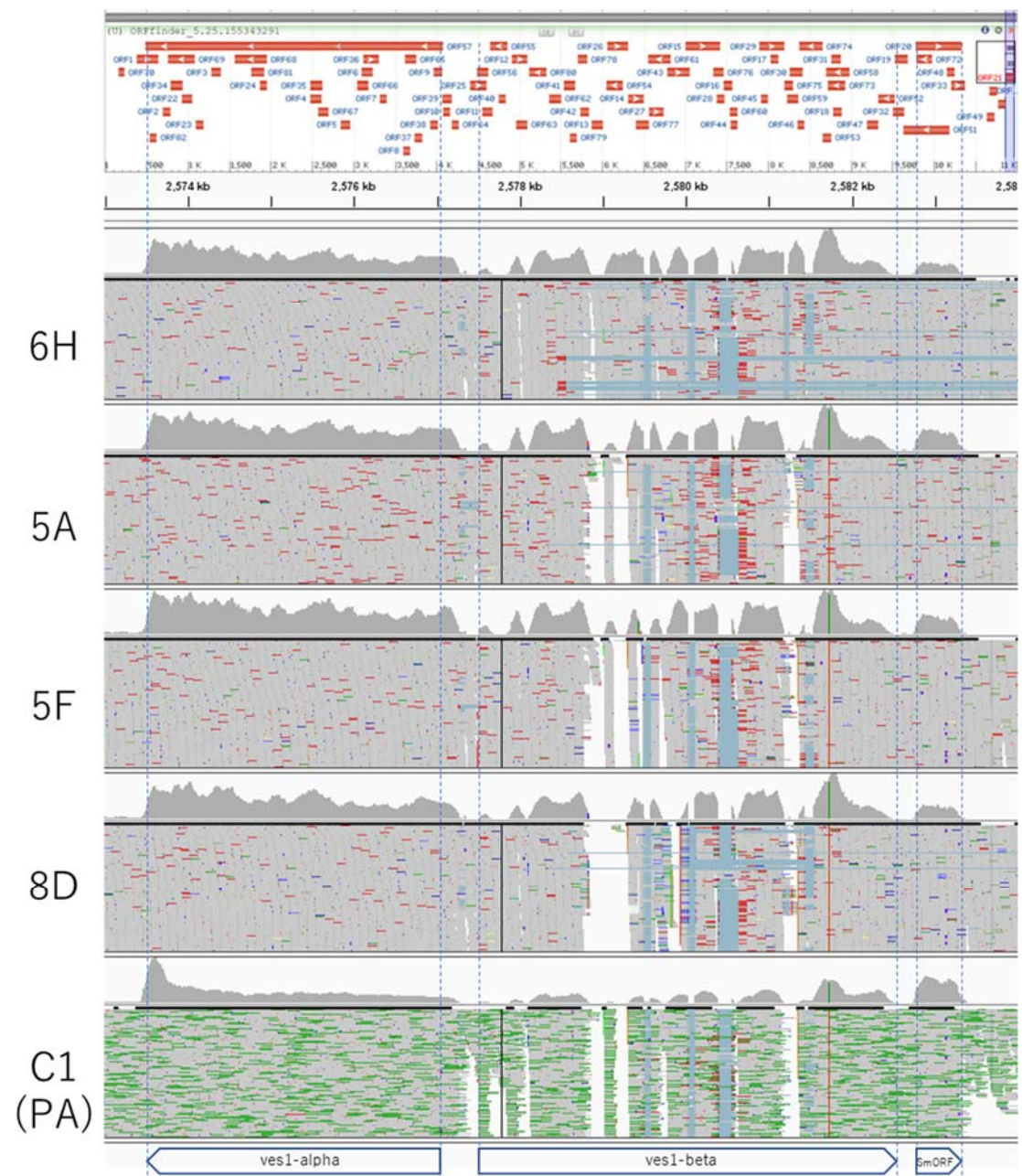


Figure 1

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 2 日

採択番号	2021-共同-10		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	トキソプラズマのプログラム細胞死メカニズム解明に向けた研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	またに たつのり 正谷 達膳	岐阜大学応用生物科学部・准教授	
研究分担者			
	げん がくなん 玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	病原性原虫のプログラム細胞死機構を詳細に知ることは、新規創薬考案のヒントとなりうる。本研究ではトキソプラズマを対象とし、その細胞死シグナル機構を解明することを目的とする。細胞死に先駆けて発現上昇する遺伝子を対象とし、ゲノム編集に基づくノックアウト原虫を作出する。作出されたノックアウト原虫の性状、特にプログラム細胞死への影響を検討することで、当該遺伝子のプログラム細胞死への寄与を評価する。		
研究経過の概要	トキソプラズマ細胞死関連遺伝子を探索し、その遺伝子発現量をリアルタイム PCR にて定量することで、これら遺伝子が細胞死に関連することを確認できた。 これら遺伝子をノックアウトするため、各遺伝子の特異的 guide RNA 配列を挿入した CRISPR/Cas9 ベクターを作製し、トキソプラズマ RH 株に導入した。しかし、いずれの遺伝子もうまく KO できなかったことから、guide RNA の再設計による再検討または薬剤添加時のみ目的遺伝子の発現量を一過性に減少させる目的で、コンディショナルノックアウト法の確立が必要と考えられた。 マラリア、バベシアで活用されているコンディショナルノックアウト法である、glmS リボザイム配列を用いた方法に注目し、トキソプラズマでも可能かどうかを検討した。しかし、トキソプラズマでは本実験系がうまくいかない可能性が示された。コロナ禍での移動制限のため、電話またはメールでの情報のやりとりによる共同研究となった。		

研究成果の概要	はじめにトキソプラズマ細胞死関連遺伝子を探索した。データベース ToxoDB 及び、すでに報告されているトキソプラズマ細胞死関連遺伝子に関する論文 (Ni Nyoman et al., Apoptosis, 2013) を参考に、PDCD2、BI-1 及び ELMO1 に注目した。トキソプラズマ RH 株に細胞死誘導薬剤として知られるスタウロスポリンで処理し、これら遺伝子の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。その結果、いずれの遺伝子も発現上昇が認められた。 これら遺伝子をノックアウトするため、各遺伝子の特異的 guide RNA 配列を挿入した CRISPR/Cas9 ベクターを構築し、Nucleofector 2b を用いて導入した。しかし、目的のノックアウト原虫を得ることができなかった。次に、相同組換えに基づくノックアウト法を試みる目的で、ベクターを構築し、これを Nucleofector 2b を用いて導入し薬剤により選抜を試みた。しかし、3 度の試みにもかかわらず、目的のノックアウト原虫を得ることができなかった。 薬剤添加時のみ目的遺伝子の発現量を一過性に減少させる目的で、コンディショナルノックアウト法の確立を試みた。glmS リボザイム配列を目的遺伝子終止コドン直後に配置するコンディショナルノックアウト法をトキソプラズマでも実施可能かどうか検証する目的で、現在、EGFP 遺伝子に glmS リボザイム配列を付したものを発現させるようプラスミドを構築し、トキソプラズマ RH 株に導入・クローニングすることで、RH-EGFPglmS 株の作出を試みた。しかし、樹立した RH-EGFPglmS 株に、コンディショナルノックアウト誘導試薬であるグルコサミンを、宿主細胞への致死量以下の様々な濃度で添加したものの、EGFP の発光低下はみられなかった。そのため、マラリアやバベシアで可能なコンディショナルノックアウト法である glmS リボザイム法は、トキソプラズマに適用することは困難である可能性が示された。今後は、トキソプラズマですでに確立されているオーキシン誘導デグロン法を適用し、遺伝子コンディショナルノックアウト原虫の樹立を目指す。
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

2022 年 6 月 20 日

採択番号	2021-共同-11		
研究部門	国際連携研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	麻田 正仁
研究課題名	Bar-seq を用いたウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いしざき たかひろ 石崎 隆弘	ウメオ大学分子感染医学研究所・特別研究員	
研究分担者	かねこ おさむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・教授	
	あさだ まさひと 麻田 正仁	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<i>Babesia bovis</i> はウシ赤血球に寄生する原虫であり、感染宿主に発熱、貧血、血色素尿といった病態を引き起こすことから獣医学領域においてその制圧が課題となっている。ウシバベシア症対策として生ワクチンやジミナゼン等の薬剤が使用されているが安全性及び薬剤耐性原虫出現のリスクといった問題点から、安全で効果的な抗原虫薬やワクチンの開発が求められている。バベシア原虫は全長 8.2Mbp からなる 4 つの染色体を持ち、約 3700 個のタンパク質をコードする遺伝子を有している。宿主に病態を引き起こす赤血球期において発現する、原虫特異的かつ原虫の生存に必須な分子は治療薬やワクチンの標的分子として有望である。そのため赤血球期における必須遺伝子を明らかにすることはウシバベシア症制圧に向けた基礎研究として重要な意味を持つ。本研究ではネズミマラリア原虫の遺伝子必須性解析において既に報告のある Bar-seq ライブラリ技術 (Pfander <i>et al.</i>, 2011; Gomes <i>et al.</i>, 2015; Bushell <i>et al.</i>, 2017) をバベシア原虫へと応用することで、<u>赤血球期におけるバベシア原虫の必須遺伝子を同定することを目的とする。</u>		

研究経過の概要	初年度は共同研究者である麻田先生より実験試料であるバベシア原虫ゲノム DNA の提供を受けた。バベシア原虫 DNA をシリencingを用いて裁断、精製した後に pJazz ベクターへの挿入を行なった。サンガーシーケンス法による 1000 プラスミドの解析を実施するにあたり、後述する長鎖相同組換えベクターを用いることが最も効率の良い手法か疑問点が生じたため本解析を一時中断している。 現所属が保有しているバーコード配列を保有する PlasmogEM ライブラリー技術は CRISPR/Cas9 システムがアピコンプレクサ門原虫で報告される以前は強力な手法であった。近年マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、バベシア原虫での CRISPR/Cas9 系が報告され、トキソプラズマ原虫では CRISPR/Cas9 ライブラリーを用いた大規模な遺伝子必須性及び必須遺伝子機能のスクリーニング解析が実施された。一方、マラリア原虫やバベシア原虫では c-NHEJ 経路を欠損しているため遺伝子の修復にはドナー配列の付与が必要となる。
研究成果の概要	組換え時のドナー配列の長さは一般的に 500bp と大規模スクリーニングに適さない長さが必要と考えられていたが、我々の研究室は 50bp という短鎖のドナー配列が遺伝子修復に充分であるという知見を見出した(学会発表 1)。さらに必須遺伝子の機能解析スクリーニングを可能とするエピトープタグ挿入型遺伝子ノックダウン手法も確立した(学会発表 1)。マラリア原虫で CRISPR/Cas9 系に関する知見が実際にバベシア原虫の遺伝子スクリーニング手法に応用可能かどうか？また、長鎖相同組換え領域を有するプラスミドを用いて遺伝子編集が可能か？という 2 点を実際の原虫を用いて検討した後に今後の実験方針を決定したい。また、手法の最適化を検討するにあたり PlasmogEM や CRISPR/Cas9 系を用いた原虫遺伝子の genetic screen に関する知見をまとめた総説が受理された(発表論文 1)。
研究成果の発表	<学会発表> 1. Ishizaki T., Bushell E. An effective CRISPR/Cas9 system using short length homology repair template for genetic modification of <i>Plasmodium berghei</i>. BioMalPar XVIII Heidelberg, Germany, May 2022 <発表論文> 1. Ishizaki T., Hernandez S., Paoletta M.S., Sanderson T., Bushell E.S.C. CRISPR/Cas9 and genetic screens in malaria parasites: small genomes, big impact. Biochemical Society transactions. 2022 (in press).

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 5 日

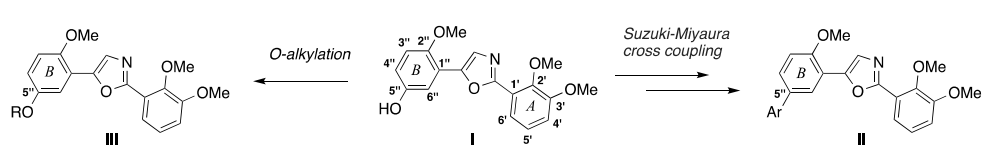
採択番号	2021-共同-12		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	Establishment transgenic manipulation of <i>Trypanosoma equiperdum</i> using of CRISPR/Cas9 and RNAi		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Mark Carrington	Department of Biochemistry, University of Cambridge, Professor	
研究分担者	Oliva Macleod	Department of Biochemistry, University of Cambridge, Post-Doctoral Research Assistant	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	節足動物の吸血に伴う生物学的もしくは機械的伝播により媒介される他種トリパノソーマと異なり、ウマ属特有の疾病である媾疫の病原体である <i>Trypanosoma equiperdum</i> は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特異な性質を有する。細胞外寄生するアフリカトリパノソーマであるが、脳脊髄液への侵入や脂肪組織への潜伏感染など、組織とのコンタクト(接着)がトリパノソーマの寄生適応と病原性の鍵となっている可能性がある。そこで <i>T. equiperdum</i> を対象として、<i>T. equiperdum</i> の特異な寄生動態に関わる遺伝子の機能解析を試みた。本研究では <i>T. equiperdum</i> の培養系を有する原虫研先端予防治療学分野に、研究代表者が CRISPR/Cas9 をもちいた遺伝子組換え原トリパノソーマ作製用プラスミドの構築と提供を行う。研究分担者は分与プラスミドをもちいた遺伝子組換え <i>T. equiperdum</i> の樹立を目指した。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開および遺伝子組換えトリパノソーマ作製用プラスミド提供後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者はトリパノソーマの維持に努めた。		
研究成果の概要	関連研究の成果として、<i>T. equiperdum</i> での遺伝子組換え原虫の作製を目指して、複数株の <i>T. equiperdum</i> のゲノム解析およびトランスクリプトーム解析により <i>T. equiperdum</i> に特異的に発現する解析候補遺伝子を特定した。現在、それらの中から遺伝子組換え原虫を用いた機能解析を行う標的遺伝子の検討を進めている。		

研究成果の 発 表	特になし。
--------------	-------

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 2 日

採択番号	2021-共同-13		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	安全性の高いトリパノソーマ症新規治療薬の開発を目指した モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾール誘導体の合成と活性評価		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なりた こういち 成田 紘一	東北医科薬科大学・薬学部・助教	
研究分担者	むらた としひろ 村田 敏拓	東北医科薬科大学・薬学部・講師	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	これまでに申請者らはモンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾール化合物を標的化合物とした創薬研究を展開してきた。有機合成化学的手法により天然物のみならず、多種多様な類縁化合物を創製し、その抗トリパノソーマ活性評価を行なっている。 これまでの研究成果から天然物よりも優れた活性を示す化合物を見出すことができたものの、溶解性が悪く扱いにくい欠点を持っていた。そこで、溶解性改善と活性増強を狙い更に類縁化合物の合成を行う。また、構造最適化の手がかりを得るため、天然からの候補化合物の探索も並行して行う。これらの研究を通して安全性の高いトリパノソーマ症治療薬の開発を目指す。		
研究経過の概要	1. 新規類縁化合物の設計と合成 昨年度までに確立した類縁体合成法を用い、B 環部 5 位におけるアルキル基やアリール基の置換基が生物活性に与える影響を明らかにするため、類縁体の合成を行った(成田)。 2. 天然資源からの新規物質の探索 これまで当グループで見出し報告してきた抗トリパノソーマ活性化合物と同様の骨格を有する化合物を継続的に探索した(村田)。 上記 1 および 2 で得た化合物について随時、5 種類の病原性トリパノソーマ <i>Trypanosoma congolense</i>, <i>T. brucei brucei</i>, <i>T. evansi</i>, <i>T. b. rhodesiense</i>, <i>T. b. gambiense</i> に対して抗トリパノソーマ活性を評価した。また細胞毒性 (MDBK ウシ腎臓細胞株)を評価した(菅沼)。 COVID-19 パンデミックのため、サンプルは郵送でやり取りをし、その結果についてメールおよび web 会議にてディスカッションを行った。		

研究成果の 概 要	昨年度、モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾールの B 環部 5 位における構造修飾に焦点を当てた類縁化合物合成法の検討から以下の 2 つの手法を確立している。すなわち、① 鈴木-宮浦クロスカップリング反応によるアリール基の導入 (I → II) および ② O-アルキル化反応によるアルキル基の導入 (I → III) である。そこで、これらの方法論を用いて様々な置換基を有する類縁化合物の合成を行った。5 位にベンジルオキシ基を有するプロモアセトフェノンを出発物質として用い、オキサゾール環の構築、接触水素化反応を経てフェノール I を合成した。フェノール I に対し、① の方法論に従い、種々のボロン酸を用いて反応を行うことでフェニル基上にメキシ基、アルキル基、ハロゲン、ピリジル基、フリル基、チエニル基などを有する類縁体を合成した。また、② の方法論によりシクロヘキシル基あるいはフェニルエチル基を有する化合物の合成を行った。  昨年度までに得られている知見から、5 位にフェニル基やベンジルオキシ基を有する化合物が <i>T. congolense</i> に対する選択的な抗トリパノソーマ活性と MDBK 細胞に対する低い細胞毒性を示すことが明らかとなっている。しかし、今回合成した化合物はそれらの化合物と非常に類似した構造を有しているにも関わらず、非常に弱い抗トリパノソーマ活性を示した。この原因として、構造的な変化により化合物の溶解性が低下しており、DMSO へ溶解しづらいことが一因として考えられた。現在、試験濃度について検討を行っており、各化合物が溶解する適切な濃度の溶媒を用いて再度試験を実施する予定である。 上記課題を解決するために、極性溶媒への溶解性向上を狙って化合物 I のグリコシル化反応について検討を行った。反応条件について検討を行ったところ、化合物 I に対する相間移動触媒を用いた D-グルコース誘導体のグリコシル化反応が進行し、中程度の収率ながら目的のカップリング体を得ることができた。さらに、アセチル基の除去を行うことで O-グリコシド体へと導くことができた。現在、本化合物の活性評価を行っている。 今後、得られた知見を基に更なる構造展開を行い、優れた抗トリパノソーマ活性を示す新規化合物の創製を目指したいと考えている。
研究成果の 発 表	<論文> 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>, 42, 116253 (2021). <学会発表> 天然由来の 2, 5-ジフェニルオキサゾール誘導体の合成と抗トリパノソーマ活性評価、成田紘一、菅沼啓輔、村田敏拓、近藤龍太郎、佐藤廣河、渡邊一弘、佐々木健郎、井上昇、吉村祐一、日本薬学会第 142 年会、名古屋(オンライン開催)、2022 年 3 月、演題番号 28PO9-pm1-15。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 9 日

採択番号	2021-共同-14		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	ネズミマラリア原虫における Brca2 による雌ガメートサイトへの分化		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	よしかわ やすなが 吉川 泰永	北里大学獣医学部・准教授	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マラリア原虫における雌雄ガメートサイトへの分化は、マラリア原虫の生活環において必須のステージである。我々は相同組換え修復に関係する Brca2 の研究を行ってきた。ネズミマラリア原虫においても Brca2 の特徴をもつタンパク質がデータベース上に存在したので、ノックアウト原虫を作製した。予想外なことに、ノックアウト原虫において雌雄ガメートサイト比率が変化し、雌ガメートサイトへの分化が抑制される結果が得られた。そこで本研究では、ネズミマラリア原虫において Brca2 がどの様に雌ガメートサイトへの分化に貢献しているのかを解明することを目的とした。		
研究経過の概要	貴研究センターの福本先生に Brca2 のノックアウト原虫を作製していただき、吉川がこのノックアウト原虫の解析を行ってきた。2021 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、メールによるディスカッションを行い、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。これまでに得られた成果を現在論文にまとめ投稿中である。 貴研究センターへの旅費を計上していたが、前述のように訪問することが出来なかったため、その分の予算は共同研究の遂行に必要な消耗品の購入に充てた。		

研究成果の 概 要	(1) 病原性に対する影響 前年度までに Brca2 ノックアウト原虫において赤血球感染率の低下とマウスに対する病原性が低下することを示した。さらに今年度、Brca2 ノックアウト原虫において赤内型のステージ比率を調べたところ、リング期が増加し、トロフォゾイト期が減少した。この結果は Brca2 がリング期からトロフォゾイト期への発育に貢献していることが予想され、このことが赤血球感染率の低下につながると考えられた。 (2) スポロゾイトに対する影響 前年度までに Brca2 ノックアウト原虫においてガメトサイトの形成数、接合した後のオーカイネート形成数およびオーシスト形成数が低下することを示した。今年度はオーシスト内で発育し、蚊の唾液腺に移行するスポロゾイトに着目して解析した。まず、蚊に感染後 28 日目の唾液腺を採材し、唾液腺にスポロゾイトが存在するか観察した。Brca2 ノックアウト原虫においては全くスポロゾイトが観察されなかった。次に感染後、7,14, 21 日目の中腸を採在し、オーシストにおけるスポロゾイトの発育を電子顕微鏡により観察した。Brca2 ノックアウト原虫は 7 日目までは野生型と同程度の発育を示したが、それ以降スポロゾイトの形成は観察できなくなり、21 日目では、オーシストが退縮していく様子が観察された。また、14 日目からオーシストが脱落していく様子も観察された。 これらの結果は、Brca2 がスポロゾイトの分化に必須であり、Brca2 をノックアウトしたことでマラリア原虫の生活環がスポロゾイトに分化出来ないことで回転しなくなる事が示唆された。 (3) Brca2 の各ドメインの機能解析 マラリア原虫 Brca2 のクローニングを現在行っており、今後ノックアウト原虫や野生型原虫に導入することで、Brca2 タンパク質のどの領域が雌雄分化等に重要であるのか解析する予定である。
研究成果の 発 表	なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 3 日

採択番号	2021-共同-15		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	雄ハマダラカ-マラリア原虫易感染モデルによるベクターコンピテンシー制御機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いかだい ひろみ 後井 宏実	北里大学獣医学部・准教授	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	ハマダラカがマラリア原虫の感染を受けるオーカイネートからオーシスト形成期は原虫数が最も減少し、原虫感染に対して最も重要な防御免疫応答を起こす時期である。 様々な節足動物において、病原微生物に対する感受性雌雄差が報告されている。申請者はハマダラカにもマラリア原虫感受性の雌雄差があるとの仮説を立て、その立証を試みた。オーカイネートのマイクロインジェクションにより、本来吸血をしない雄に対しマラリア原虫を感染させることに成功した。次にオーシスト数を指標として雌雄ハマダラカのマラリア原虫感染表現型を解析した。その結果、雄ハマダラカが雌と比較し、高いマラリア原虫感受性を持つことを明らかにした。 以上の結果を踏まえ、本研究では原虫感染時の雌雄ハマダラカ遺伝子シグナル応答を比較解析し、マラリア原虫の感受性を規定する因子を同定、そのメカニズムを解明することを目的とする。		
研究経過の概要	マイクロインジェクション感染モデルにより、雄ハマダラカが雌と比較し高い感受性を示すこと、オーシストの形成部位に組織特異性が無いことが明らかになった。次に、オーカイネートインジェクション後、24・72 時間後の遺伝子発現を次世代シーケンサーによる RNA-Seq 法を用いて比較解析した。その結果、雌雄双方においてインジェクション後 24 時間で最も有意な遺伝子転写変動が認められた。さらに雄ハマダラカに培養した <i>P. falciparum</i> のガメートサイトおよびザイゴートをインジェクションし、<i>P. falciparum</i> の発育を確認した。 以上の結果を基盤として、ハマダラカのマラリア原虫ベクターコンピテンシー制御因子の同定を目指し、その分子メカニズムの解明を検討している。		

研究成果の概要	<i>P. berghei</i> のオーカイネートのインジェクションによるオーシスト形成数は注入したオーカイネート数(2000-5000/蚊)に関わらず雄で雌よりも多く形成され、感染率はともに 100% で差はなかった。オーカイネートのインジェクションによって分化したスポロゾイトは、雌雄蚊どちらの由来かに関わらず、3-6 日でマウスへの感染が確認され、オーカイネートのインジェクション感染により形成されたスポロゾイトに感染性があることが示された。 次に、雌雄 <i>A. stephensi</i> のオーシスト形成数に差を認めたため、原因遺伝子の探索を目的に RNA-seq を行った。まず雌雄蚊に 5000 オーカイネートまたは培養液のみをインジェクションし、オーカイネートが初期オーシストへと形態変化するインジェクション 24 時間後、およびオーシストへの形態変化が完了するインジェクション 72 時間後にそれぞれ蚊を採取して RNA-seq を行った。インジェクション 24 時間後において雄で遺伝子発現変動が 2 倍以上発現増加した遺伝子数は 140 個、発現減少したものは 89 個、雌では発現増加したものが 304 個、発現減少したものが 167 個であった。インジェクション 72 時間後では、雄で発現増加したものは 101 個、発現減少したものは 64 個、雌では発現増加したものは 141 個、発現減少したものは 114 個だった。 インジェクション 24・72 時間後において最も発現増加ならびに発現減少した上位 10 遺伝子をそれぞれみると、遺伝子機能が明らかとなっていないものが多くを占めていた。このことから、雌雄で変動の大きな遺伝子の多くが機能不明であることが示された。 雄 <i>A. stephensi</i> において <i>P. falciparum</i> のガメートサイトおよびザイゴートのインジェクション後 15 日目まで感染が確認された。さらに、ガメートサイトのインジェクション 1 日後と比べ 15 日後には <i>P. falciparum</i> の DNA 量が増加していた。これらのことから、雄 <i>A. stephensi</i> にガメートサイトまたはザイゴートのインジェクションにより形成されたオーシスト内でスポロゾイトが形成されている可能性が示された。 本年度は来所できながったが、Web およびメールでのディスカッションを実施し、旅費に関する経費を研究課題遂行に必要な、試薬および研究用消耗品の購入に変更した。
研究成果の発表	第 164 回日本獣医学会学術集会(2021 年 9 月) 雌雄ハマダラカにおける <i>Plasmodium berghei</i> 感受性の比較 原口 麻子、鈴木 こなつ、高野 真、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、吉川 泰永、草木迫 浩大、筏井 宏実 第 67 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会(2021 年 10 月) 雄ハマダラカを用いた <i>Plasmodium falciparum</i> oocyst 形成の検討 原口 麻子、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、草木迫 浩大、筏井 宏実 第 91 回日本寄生虫学会大会(2022 年 5 月) <i>Plasmodium</i> 原虫発育に対する雌雄ハマダラカの分子機構解析 原口 麻子、高野 真、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、吉川 泰永、草木迫 浩大、筏井 宏実

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 5 日

採択番号	2021-共同-16		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Jack Sunter	Oxford Brookes University, David Fell Research Fellow	
研究分担者			
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	アフリカ動物トリパノソーマ症病原原虫の中でもっとも病原性が高く、かつ他種アフリカトリパノソーマに比べて研究が進展していない <i>Trypanosoma congolense</i> を対象として、遺伝子組換えトリパノソーマの哺乳類およびベクター組織移行動態の解析を目的とする。本研究では <i>T. congolense</i> の全ステージ培養系を有する原虫研先端予防治療学分野に、研究代表者が遺伝子組換え原トリパノソーマ作製用プラスミドの構築と提供を行う。研究分担者は分与プラスミドをもちいた遺伝子組換え <i>T. congolense</i> の樹立を目指す。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開および遺伝子組換えトリパノソーマ作製用プラスミド提供後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者は培養トリパノソーマの維持に努めた。		
研究成果の概要	<i>T. congolense</i> での遺伝子組換えトリパノソーマの作製を目指して、解析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。さらに、申請者のラボで標的遺伝子に対するプラスミドコンストラクトを設計・構築済みであり、今後共同研究者への送付を予定している。		
研究成果の発表	特になし。		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 5 月 30 日

採択番号	2021-共同-17		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	横山 直明
研究課題名	Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmosis		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	サンジャイ クマール Sanjay Kumar	ICAR-National Research Centre on Equines Principal Scientist	
研究分担者	ラジェンダ クマール Rajender Kumar	ICAR-National Research Centre on Equines Principal Scientist	
	よこやま なおあき 横山 直明	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<i>Theileria equi</i> と <i>Babesia caballi</i> の感染によって引き起こされる馬ピロプラズマ病は世界で深刻な問題となっている。そこで、その急性感染を現場で迅速に診断できる“抗原検出用馬ピロプラズマ感染診断システム”を開発する。本システムを開発できれば、馬の国際移動時の感染馬の摘発や臨床現場での迅速な治療が可能となる。		
研究経過の概要	馬ピロプラズマ病 (EP) は、馬、ロバ、シマウマ、ラバなどのウマ科動物が <i>Theileria equi</i> と <i>Babesia caballi</i> の感染によって引き起こされるマダニ媒介性疾患である。その EP は世界的に流行しており馬産業に多大な経済的被害を及ぼしている。特に、感染した動物はキャリアーとなり媒介マダニの感染源となることから疾病管理上の大きな課題となっている。インドの隣国であるスリランカ国の家畜動物の間では様々なマダニ媒介病原体による感染症が知られているが、<i>T. equi</i> と <i>B. caballi</i> による感染実態はスリランカでは未解明のままであった。そこで、見かけ上健康な放し飼いロバを対象に、<i>T. equi</i> と <i>B. caballi</i> を検出する遺伝子診断法を用いて感染疫学調査を実施した。		

研究成果の概要	スリランカの Mannar 地区 (n = 100) と Kilinochchi 地区 (n = 11) のロバ計 111 頭から血液サンプルを採取した。まず血液サンプルから血液塗抹標本を作製し、顕微鏡検査を行った。次に血液から DNA を採取し、種特異的 PCR 法を用いて <i>T. equi</i> および <i>B. caballi</i> 感染のスクリーニング診断を行った。その結果、64 頭 (57.7%) および 95 頭 (85.6%) のロバが、それぞれ顕微鏡検査および PCR 検査により <i>T. equi</i> に陽性を示した。一方で <i>B. caballi</i> はすべての検体で陰性であった。また <i>T. equi</i> の 18S rRNA 配列の系統解析から、C と D の 2 つの異なる遺伝子型が検出された。これらの成果は、スリランカ国で減少しているロバの <i>T. equi</i> による EP のモニタリングの重要性を明らかにするものとなった。
研究成果の発表	Believe Ahedor, Hemal Kothalawala, Ratnam Kanagaratnam, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Davaajav Otgonsuren, Bumduuren Tuvshintulga, Enkhbaatar Batmagnai, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama: First detection of <i>Theileria equi</i> in free-roaming donkeys (<i>Equus africanus asinus</i>) in Sri Lanka. Infection, Genetics and Evolution. 2022 Feb 9; 99: 105244. PMID: 35149223.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 23, 2022

Project no: 2021-joint-18

1. Principal investigator

Name: RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.

Position: Research Scientist – Laboratory of Molecular Biology of Ticks (previously Laboratory of Vector Immunology)

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

2. Project title:

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

3. Collaborating research group members at NRCPD

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

Position:

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

01/04/2021 -31/03/2022

1 year

5. Purposes and objectives

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

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

6. Outline of research process

no progress (no visit) due to COVID-19 related restrictions in 2021

7. Outline of research achievements

no progress (no visit) due to COVID-19 related restrictions in 2021

8. Publication of research achievements

no progress (no visit) due to COVID-19 related restrictions in 2021

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 5 月 30 日

採択番号	2021-共同-19		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	横山 直明
研究課題名	Isolation and <i>In vitro</i> cultivation of <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>Babesia</i> sp. Mymensingh, and <i>Babesia</i> sp. Hue-1 from cattle in Vietnam		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ブン タン ロン Phung Thang Long	Hue University of Agriculture and Forestry Associate Professor	
研究分担者	ディン チ ビッチ ラン Dinh Thi Bich Lan	Hue University of Agriculture and Forestry Associate Professor (Visiting)	
	よこやま なおあき 横山 直明	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 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	牛バベシアによって引き起こされる牛バベシア病は、畜産業に多大な経済的損失を与えている。牛バベシアは水牛などの牛以外の宿主からも頻繁に検出されており、そこからマダニによって牛に伝播する可能性が危惧されている。そのため、牛だけでなく牛以外の宿主における牛バベシアの感染も監視する必要がある。そこで、モンゴル国のラクダを対象に、モンゴルの牛から過去に検出された臨床学的に重要な 3 種の牛バベシア (<i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , および <i>Babesia</i> sp. Mymensingh) の感染について疫学調査を行った。		

研究成果の 概 要	モンゴル国内の 6 県のラクダ計 305 頭から採取した血液 DNA サンプルについて、原虫特異的 PCR 法を用いてスクリーニング調査を行った。その結果、モンゴル国のラクダは、調査した 3 種すべての牛バベシアに感染していることが判明した。<i>B. bovis</i>、<i>B. bigemina</i>、および <i>Babesia</i> sp. Mymensingh の全体陽性率はそれぞれ 32.1%、21.6%、24.3%であり、調査対象動物の 52.5%が少なくとも 1 種の牛バベシアに感染している実態が明らかとなった。モンゴル国では通常牛とラクダが放牧地を共有しており、さらに牛に寄生するマダニ種はラクダにも寄生する。これらの背景から、牛とラクダの間でマダニを介した牛バベシアの伝播が起こっている可能性が示唆された。したがって、モンゴル国における牛バベシア病の防除戦略には、ラクダにおける牛バベシア感染の対策を含める必要がある。
研究成果の 発 表	Davaajav Otgonsuren, Thillaiampalam Sivakumar, Tovuu Amgalanbaatar, Batsaikhan Enkhtaivan, Sandagdorj Narantsatsral, Batdorj Davaasuren, Myagmar Zoljargal, Dalantai Munkhgerel, Batbold Davkharbayar, Enkhbaatar Batmagnai, Bumduuren Tuvshintulga, Believe Ahedor, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, <u>Naoaki Yokoyama</u>: Molecular survey of bovine <i>Babesia</i> species in Bactrian camels (<i>Camelus bactrianus</i>) in Mongolia. Ticks and Tick-borne Diseases. 2022 Jan; 13(1): 101871. PMID: 34814064.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 5 日

採択番号	2021・共同・20		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	Investigation on the presence of trypanocidal drug resistance used for water buffaloes in the Philippines		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Marvin Villanueva	Philippine Carabao Center, Senior Science Research Specialist	
研究分担者	Claro Mingala	Philippine Carabao Center, Scientist III	
	Gabriel Alexis Tubalinal	Livestock Biotechnology Center, Science Research Specialist II	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 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、家畜生産性を低下させる大きな要因となっている。そのため、スーラ病のコントロールはフィリピンにおける畜産業振興のために喫緊の課題となっている。薬剤投与による効率的なスーラ病制御のためには、対象となる地域で流行している <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。またフィリピン国から入手したサンプルを用いてトリパノソーマ症感染にかかるリスク因子を探索した。		
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、ボホール島のフィリピンカラバオセンターおよびその周囲で使用されている各種家畜の血液サンプルから <i>T. evansi</i> および <i>T. (Megatrypanum) theileri</i> の遺伝子を検出した。また、これらのトリパノソーマを媒介する吸血性節足動物が多く発生されると推測される雨季に感染率が有意に上昇することから、とくにその時期に薬剤投与などの対策が必要であることが明らかとなった。		
研究成果の発表	Elata A., et al., Molecular detection of animal trypanosomes in different animal species in the Visayas region of the Philippines(論文投稿中)		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 5 日

採択番号	2021-共同-21		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	I International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Zhe Hu	Harbin Veterinary Research Institute, CAAS	
研究分担者	Cheng Du	Harbin Veterinary Research Institute, CAAS	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	ウマ伝染性貧血の OIE リファレンスラボラトリー (Harbin Veterinary Research Institute) であり、ウマの感染症を多数研究している申請者の研究室へ、共同研究者の研究室で確立した梅毒トリパノソーマ分離・培養技術およびトリパノソーマ症診断技術を移転することを目的とした共同研究を展開する。さらに移転された技術を用いて、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 web での梅毒トリパノソーマ分離・培養技術の指導と、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を行った。		
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の流行状況の把握および感染リスク解析を目的として、パラグアイにおけるウマトリパノソーマ症の疫学調査を実施した。ここで得られた成果を、今後の共同研究事業において活用する。		
研究成果の発表	Suganuma et al., First molecular survey of animal trypanosomes in Paraguayan horses, Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 2022, 27, 100664 Yamazaki et al., Risk factors for equine trypanosomosis and hematological analysis of horses in Paraguay, Acta Tropica, 2022, 233, 106543		

令和 4 年 8 月 15 日発行

帯広畜産大学 原虫病研究センター

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地

TEL (0155) 49-5642 (事務室)

FAX (0155) 49-5643



帯広畜産大学 原虫病研究センター

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

