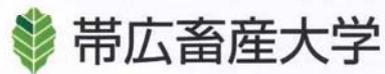


文部科学省認定 共同利用・共同研究拠点
WOAHコラボレーティングセンター

原虫病研究センター 年報

NRCPD 2022 | 令和4年度



Obihiro University
of Agriculture
and Veterinary Medicine

**National Research Center
for Protozoan Diseases**

WOAH 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	24	
①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）	24	
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	25	
8. 教員の研究活動	26	
先端治療学分野	鈴木宏志 教授	26
	西川義文 教授	32
高度診断学分野	横山直明 教授	37
	白藤梨可 准教授	44
先端予防治療学分野	河津信一郎 教授	49
	菅沼啓輔 助教	55
感染病理学分野	五十嵐慎 教授	59
	福本晋也 准教授	61
地球規模感染症学分野	玄学南 教授	64
	麻田正仁 准教授	70
国際協力分野	井上昇 教授	75
9. 共同研究成果報告書	79	
トキソプラズマ感染における頭頸部感覚器フェロトーシスの研究	80	
妊娠期のトキソプラズマ感染防御における $\gamma\delta T$ 細胞の役割の解析	82	
ヒストン制御機構に着目した新規抗マラリア化合物のスクリーニングと 原虫オルガネラの三次元構造解析	84	
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	86	
熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトの細胞接着に必要な表層分子の同定	88	
トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質の ナノスケールレベルでの分布解析	90	
ヒト赤血球馴化 <i>Babesia microti</i> の作出と宿主域決定因子の解析	92	
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	95	
カブリダニの卵形性の分子機構の解明と人口飼料開発への応用	97	
抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と 作用機序解析	99	

ネズミマラリア原虫における Brca2 による雌ガメトサイトへの分化	101
マダニ卵形性に貢献する共生微生物の探索	103
抗原虫作用を示す微化研由来天然化合物における分子標的の解析	105
フタトゲチマダニから同定されたアクアポリンの特性解明	108
オス生殖細胞発達障害を持つ熱帯熱マラリア原虫株の 原因遺伝因子の同定と機能解析	110
トキソプラズマ分泌タンパク質の宿主ミトコンドリア機能に対する影響解析	112
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	114
Establishment of split Cas9 for functional characterization of essential genes in <i>Babesia bovis</i>	116
Establishment of DiCre parasite lineages to study essential aspartyl peptidases of <i>Babesia</i>	118
Identification of mosquitoes in goat farms and molecular screening of malaria parasite in mosquitoes	121
Investigation of parasitic strategy, especially tissue parasitism of <i>T. equiperdum</i> on horse	124

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、国際獣疫学分野の新設

2006年 3月 研究棟増設（1,520 m²）

2007年 6月 WOAH（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 WOAH 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 WOAH 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 WOAH/ISO 業務担当分野として、国際獣疫分野新設

2022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

2022年 4月 創薬研究部門先端治療学分野新設

②設置目的等

大 学 名	国立大学法人北海道国立大学機構 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	我が国唯一の家畜原虫病に関する研究拠点として、海外の大学や国際獣疫事務局（WOAH）等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家畜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、地球規模での人類の健康福祉と安全な動物性食品の安定供給に対して学術的貢献をなし得る、原虫病と蚊やマダニ等の媒介節足動物（ベクター）に関する総合的研究を推進する。
研 究 内 容	共同利用・共同研究拠点である原虫病研究センターの活動を中核に、WOAH コラボレーティングセンターとしての国際防疫活動、国際協力機構（JICA）との連携事業、ならびに日本学術振興会（JSPS）拠点形成事業等の大型プロジェクトにより構築した研究者ネットワークを活用して、1) 原虫病の診断、治療、予防とベクター対策に関する先端研究の推進、2)原虫病とベクターの制圧及び監視体制構築による国際防疫上の学術貢献、3) 世界の原虫病及びベクター対策を牽引する若手研究者及び専門家の育成を推進する。
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4年度 (R04.12.31 現在)					
	現 員 数	女 性 数	外 国 人 数	任期制導入状況		
				任 期 付 教 員 数	女 性 数	外 国 人 数
教 授	7	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	11	1	1	1	0	0

②技術系職員数

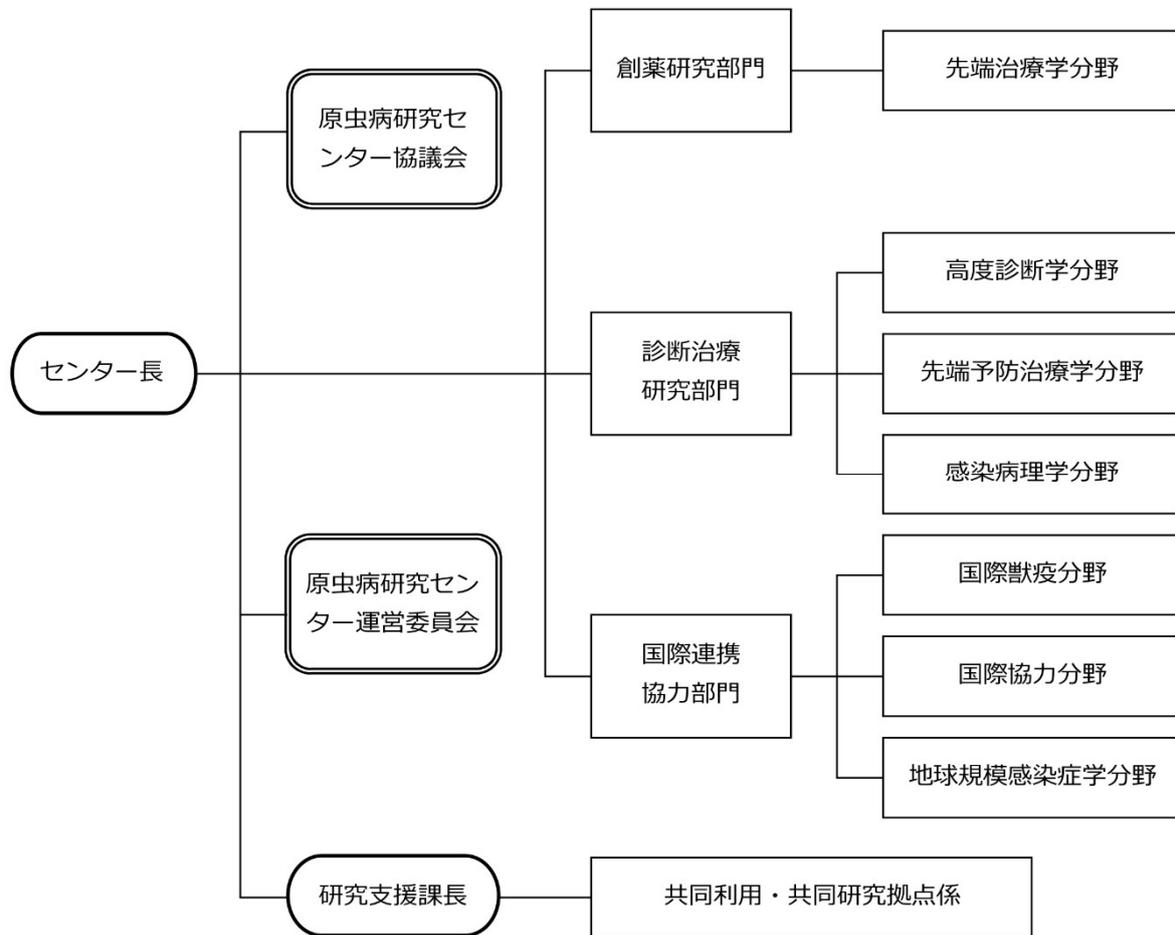
区 分	令和4年度 (人)
技術系職員数	11
うち常勤	4
うち非常勤	7

③事務系職員数

区 分	令和4年度 (人)
事務系職員数	6
うち常勤	1
うち非常勤	5

④組織図

【令和4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	WOAH 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 BATTSETSEG	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	
五十嵐 慎	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	
井上 昇	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4年度（単位：百万円）	
	決算額	うち運営費交付金
人 件 費	162	151
物 件 費	182	43
計	344	194

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4年度 (単位：百万円)	11	344	173	31.3	15.7

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)	22H02512	新規	准教授・白藤 梨可	6,000
基盤研究(B)	22H02509	新規	教授・玄 学南	5,700
基盤研究(B)	22H02510	新規	准教授・福本 晋也	5,800
基盤研究(B)	22H02511	新規	教授・横山 直明	5,600
基盤研究(B)	21H02353	継続	教授・西川 義文	3,200
挑戦的研究(萌芽)	22K19235	新規	准教授・福本 晋也	2,500
挑戦的研究(萌芽)	20K21359	継続	教授・西川 義文	1,500
国際共同研究強化 (B)	22KK0095	新規	教授・横山 直明	5,100
国際共同研究強化 (B)	21KK0121	継続	准教授・麻田 正仁	4,900
国際共同研究強化 (B)	20KK0152	継続	教授・西川 義文	1,100
国際共同研究強化 (B)	19KK0173	継続	教授・河津 信一郎	3,500
国際共同研究強化 (B)	19KK0175	継続	准教授・福本 晋也	2,700
基盤研究(C)(一般)	22K05982	新規	准教授・麻田 正仁	1,300
若手研究	22K15006	新規	特任研究員・ 潮 奈々子	1,700
特別研究員奨励費	22F21092	新規	特任研究員・ MOHANTA UDAY	1,200
特別研究員奨励費	22F21395	新規	特任研究員・ EL-SAYED SHIMAA	1,200
特別研究員奨励費	22F22402	新規	特任研究員・ GUSWANTO	600
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	20F20402	継続	特別研究員・ ARIEFTA NANANG	800

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	3,274
国立大学法人北海 道大学	卓越大学院プロ グラム	継続	教授・西川 義文	1,350
独立行政法人日本 学術振興会	研究拠点形成事 業（アジア・アフ リカ学術基盤形 成型）	継続	教授・玄 学南	5,840
独立行政法人日本 学術振興会	二国間交流事業 共同研究（チェ コ）	継続	教授・河津 信一郎	2,375
独立行政法人日本 学術振興会	二国間交流事業 共同研究（スリラ ンカ）	新規	教授・横山 直明	1,900
独立行政法人日本 学術振興会	二国間交流事業 共同研究（南アフ リカ）	新規	助教・菅沼 啓輔	2,375
A（株）	共同研究	新規	教授・玄 学南	300
B（株）	共同研究	継続	准教授・福本 晋也	5,517
（株）白寿生化学研 究所	寄附講座	継続	教授・鈴木 宏志	5,000
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
C（株）	寄付金	新規	教授・玄 学南	450
D（株）	寄付金	新規	教授・玄 学南	450

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	4
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	4
うち国内での共同利用・共同研究数	17
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	17

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
兼子 裕規	トキソプラズマ感染における頭頸部感覚器フェロトーシスの研究	西川 義文
長谷 耕二	妊娠期のトキソプラズマ感染防御における $\gamma\delta$ T細胞の役割の解析	西川 義文
荒木 球沙	ヒストン制御機構に着目した新規抗マalaria化合物のスクリーニングと原虫オルガネラの三次元構造解析	河津信一郎
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
宮崎 真也	熱帯熱マalaria原虫ガメトサイトの細胞接着に必要な表層分子の同定	麻田 正仁
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
山岸 潤也	ヒト赤血球馴化 <i>Babesia microti</i> の作出と宿主域決定因子の解析	麻田 正仁
筏井 宏実	雄ハマダラカ-マalaria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
鈴木 丈詞	カブリダニの卵形性の分子機構の解明と人口飼料開発への応用	白藤 梨可
中尾 洋一	抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と作用機序解析	菅沼 啓輔
吉川 泰永	ネズミマalaria原虫における Brca2 による雌ガメトサイトへの分化	福本 晋也

中尾 亮	マダニ卵形性に貢献する共生微生物の探索	白藤 梨可
二瓶 浩一	抗原虫作用を示す微化研由来天然化合物における分子標的の解析	西川 義文
田仲 哲也	フタトゲチマダニから同定されたアクアポリンの特性解明	白藤 梨可
古谷 哲也	オス生殖細胞発達障害を持つ熱帯熱マラリア原虫株の原因遺伝因子の同定と機能解析	福本 晋也
錦織 充広	トキソプラズマ分泌タンパク質の宿主ミトコンドリア機能に対する影響解析	西川 義文
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
Albert Mulenga	Establishment of split Cas9 for functional characterization of essential genes in <i>Babesia bovis</i>	麻田 正仁
Daniel Sojka	Establishment of DiCre parasite lineages to study essential aspartyl peptidases of <i>Babesia</i>	麻田 正仁
Morakot Kaewthamasorn	Identification of mosquitoes in goat farms and molecular screening of malaria parasite in mosquitoes	麻田 正仁
Batdorj Davaasuren	Investigation of parasitic strategy, especially tissue parasitism of <i>T. equiperdum</i> on horse	菅沼 啓輔

③共同利用・共同研究の参加状況

区 分	令和4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)	7	64 (35)	37 (18)	47 (28)	22 (14)	883 (437)	576 (244)	682 (332)	504 (262)
国立大学	13	36 (8)	4 (4)	13 (6)	7 (4)	56 (16)	8 (8)	24 (13)	13 (8)
公立大学	1	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
私立大学	6	11 (0)	0 (0)	5 (0)	0 (0)	14 (0)	0 (0)	5 (0)	0 (0)
大学共同 利用機関法人	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
独立行政 法人等公的 研究機関	7	26 (11)	3 (0)	1 (1)	0 (0)	30 (13)	3 (0)	1 (1)	0 (0)
民間機関	10	30 (3)	0 (0)	3 (0)	0 (0)	33 (3)	0 (0)	4 (0)	0 (0)
外国機関	28	41 (15)	41 (15)	22 (10)	7 (3)	1730 (629)	1730 (629)	1366 (536)	1011 (315)
その他	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	72	209 (72)	85 (37)	91 (45)	36 (21)	2748 (1098)	2317 (881)	2082 (882)	1528 (585)

※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4年度
論 文 数	69
うち国際学術誌に 掲載された論文数	69

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
山崎 藍	第 165 回日本獣医学会学術集会優秀発表賞	R4 年 10 月	パラグアイで飼養されている馬のトリパノソーマ感染に関するリスク因子解析

⑦ 研究者を対象とした研究会、シンポジウム等の実施状況

シンポジウム		講演会 セミナー		研究会 ワークショップ		その他		合計	
件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数	件数	参加人数
1	40	0	0	6	150	0	0	7	190

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4年度		
主催件数	1		
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	R4.10.5	The 4 th International symposium entitled "Strategies for the Control of Ticks and Tick-borne Diseases" (supported by JSPS Asia-Africa Platform Project)	40 (23)

(2)参加状況

区 分	令和4年度		
参加件数	10		
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	R4.6.30～ 7.2	International Symposium on Canine and Feline Reproduction in a joint meeting with the 24th European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress ISCFR-EVSSAR 2020+2	2
2	R4.7.26～ 7.29	55 th SSR Annual Meeting	1
3	R4.8.21～ 8.26	15 th International Congress of Parasitology	2
4	R4.9.11	第26回ポーランド寄生虫学会	1
5	R4.10.25 ～10.27	第20回熱帯医学・マラリア国際会議 (ICTMM)	2
6	R4.10.31	American Society of Tropical Medicine and Hygiene 2022 Annual Meeting	1
7	R4.12.1～ 12.5	XVI International Congress of Acarology 2022	1
8	R5.3.8～ 3.10	日米医学協力計画国際会議、寄生虫症患者部会日米合同会議	3

9	R5.3.11～ 3.15	13 th Congress for Pacific Society of Reproductive Medicine 2023	3
10	R5.3.29～ 3.31	15 th International Symposium on Ticks and Tick-borne Diseases	1

②国際学術交流協定の状況

協定総数	15						
締結年月	終了予定年月	相手国	機 関 名	協定名	分 野	受入人数	派遣人数
2008年 11月	2023年 11月	フィリピン	フィリピン大学マニラ校公衆衛生学部	MOA	原虫病	1	2
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
2015年 12月	2020年 12月	ウガンダ	マケレレ大学	MOA	原虫病	1	7
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 6月	2022年 6月	南アフリカ	ノースウエスト大学	MOA	原虫病	4	1
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	3	4
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	3
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	4
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
2022年 6月	2027年 6月	フィリピン	ダバオデルスル州立大学	MOU	原虫病	0	2
2022年 8月	2025年 8月	メキシコ	ケレタロ自治大学自然科学学部	MOU	原虫病	2	0
合 計						11	23

③国際的な研究プロジェクトへの参加状況

総 数	12		
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	<p>プロジェクト名：国際共同研究強化（B）、フィラリアを媒介しない蚊作出に向けたタイ王国における犬糸状虫の生態疫学調査</p> <p>プロジェクト概要：蚊は病原体の媒介者として、人類に最も脅威を与えている生物(Top Deadliest Animal)である。殺虫剤耐性、生態系への影響などへの問題から、殺虫剤による蚊の撲滅は困難である。そこで病原体を媒介しない蚊へと置換することで、感染症を制圧できないかとの概念が浮上してきた。近年のゲノム編集技術の進歩により、病原体を媒介しない蚊の実現が技術的に可能となってきた。そこで本研究では、犬糸状虫を媒介しない蚊の作出実現にむけた基礎的知見を得るために、タイ王国で犬と蚊における犬糸状虫疫学調査を行い、どのような遺伝子応答が蚊による犬糸状虫の媒介に重要なのかフィールドレベルで解析を行うことを目指す。</p> <p>参加国：日本・タイ 予算見込み額：1,410万円</p>	福本 晋也
令和2年度～令和6年度	モンゴル・モンゴル生命科学大学	<p>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</p> <p>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。</p> <p>参加国：日本・モンゴル 予算見込み額：1,560万円</p>	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：194万円	西川 義文 アリエフタ ナナン
令和2年度～令和4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 予算見込み額：380万円	横山 直明
令和2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 予算見込み額：1932万円	玄 学南

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3年度～令和5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 予算見込み額：475 万円	河津 信一郎
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 4 年度～令和 6 年度	モンゴル・モンゴル獣医学研究所	プロジェクト名：国際共同研究強化（B）、馬ピロプラズマ病に対する国際標準血清診断法の開発に向けた学術基盤研究 プロジェクト概要：馬ピロプラズマ病に対する現行の血清診断法には致命的な欠陥があることが指摘され、しばしば大きな社会問題を引き起こしている。そこで、モンゴル国で多発している馬ピロプラズマ病の罹患馬を研究対象に、現行の血清診断法の問題点を科学的に実証し、その成果に基づいて新たな馬ピロプラズマ病に対する国際標準血清診断法を開発していく。 参加国：日本・モンゴル 予算見込み額：2,002 万円	横山 直明

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4年度～令和5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	<p>プロジェクト名：JSPS 二国間交流事業協同研究／セミナー、新牛タイレリア (<i>Theileria</i> sp. Yokoyama) の分離及び性状解析</p> <p>参加国：日本・スリランカ</p> <p>プロジェクト概要：我々が発見した新牛タイレリア (<i>Theileria</i> sp. Yokoyama) の野生株を、汚染国であるスリランカ国で分離・培養し、そのリンパ球感染原虫を多角的に解析することで、病原性解明や診断・予防・治療の開発に繋がる“生物学的並びに遺伝学的な基礎的知見”を共同で収集する。</p> <p>参加国：日本・スリランカ</p> <p>予算見込み額：390万円</p>	横山 直明
令和4年度～令和5年度	南アフリカ・ノースウェスト大学	<p>プロジェクト名：JSPS 二国間交流事業共同研究／セミナー、ニトロフランおよびその関連化合物に着目したトリパノソーマ症新規経口治療薬の開発</p> <p>プロジェクト概要：医療・獣医療インフラの未整備な農村地帯で流行しているヒトと動物のアフリカトリパノソーマ症制御に向けて、ニトロフラン系化合物群の合成と <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> での抗トリパノソーマ活性の検証を行い、経口投与可能な治療薬および予防薬開発を目指す。</p> <p>参加国：日本・南アフリカ</p> <p>予算見込み額：237万円</p>	菅沼 啓輔

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4年度	
		派遣状況	招へい状況
事業区分	合計	33	28
	文部科学省事業	0	0
	日本学術振興会事業	24	19
	当該法人による事業	6	4
	その他の事業	3	5
派遣先国	① アジア	21	9
	② 北米	0	0
	③ 中南米	0	2
	④ ヨーロッパ	3	4
	⑤ オセアニア	0	0
	⑥ 中東	1	3
	⑦ アフリカ	8	10

⑤その他・国際研究協力活動の状況

事業名等	概要	受入人数	派遣人数
JICA 課題別研修	2022年度（課題別）人獣共通感染症対策（寄生虫病含む）研究者育成 202107802J001	8	
JICA 国別研修	2022年度（エチオピア国別）人獣共通感染症対策（寄生虫病含む）研究者育成 201903772J004	6	
合計		14	

6. 教育活動・人材養成

①大学院生等の受入状況

区 分	令和4年度	
		うち外国人
博士後期課程	15	15
うち社会人 DC	0	0
修士・博士前期課程	7	4
うち社会人 MC	0	0
学 部 生	24	0
合 計	46	19

②留学生の受入状況

区 分	令和4年度
① アジア	17
② 北米	0
③ 中南米	1
④ ヨーロッパ	0
⑤ オセアニア	0
⑥中東	1
⑧ アフリカ	5
合 計	24

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4年度	
	学内	学外
博士号取得者数	4	1

④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧

1	専攻分野名	獣医学専攻博士課程	学位授与年月日	R5年3月20日
	氏名	Даважав Отгонсүрэн Davaajav Otgonsuren (モンゴル)	担当教員	横山 直明
	学位論文の題名	The molecular epidemiology of bovine Babesia species in livestock animals in Mongolia		
	日本語訳	モンゴルの家畜動物における牛バベシア種の分子疫学研究		
2	専攻分野名	獣医学専攻博士課程	学位授与年月日	R5年3月20日
	氏名	วันลอย อักษรพันธ์ Wanlop Atcharphan (タイ)	担当教員	河津 信一郎
	学位論文の題名	Studies on modification of miracidium hatching technique (MHT) for preparation of single-genome DNA for use in population structure analysis of <i>Schistosoma japonicum</i> and development of ELISA for diagnosis of <i>S. mekongi</i> infection in humans		
	日本語訳	日本住血吸虫の集団構造解析で使用するシングルゲノム DNA の調整を目的としたミラシジウムふ化法の改良およびメコン住血吸虫症の患者の診断を目的とした ELISA の開発に関する研究		
3	専攻分野名	獣医学専攻博士課程	学位授与年月日	R5年3月20日
	氏名	กาลอน อีไลซ่า เมย์ ซาลดูอา GALON Eloiza May Saldua (フィリピン)	担当教員	玄 学南
	学位論文の題名	Molecular epidemiological studies on livestock tick-borne parasitic diseases in the Philippines		
	日本語訳	フィリピンにおける家畜のマダニ媒介性寄生虫病に関する分子疫学的研究		
4	専攻分野名	獣医学専攻博士課程	学位授与年月日	R5年3月20日
	氏名	汲 生威 汲 生威 (JI Shengwei) (中国)	担当教員	玄 学南
	学位論文の題名	Discovery and evaluating new drugs for babesiosis treatment		
	日本語訳	バベシア症に対する新薬候補の特定と評価		

5	専攻分野名	JSPS 論博事業	学位授与 年月日	R5年3月20日
	氏名	リンゴ アーロン RINGO Aaron Edmond (タンザニア)	担当教員	玄 学南
	学位論文 の題名	Epidemiological Study on tick-borne parasitic diseases in live- stock from Tanzania and Kenya		
	日本語訳	タンザニアとケニアの家畜におけるマダニ媒介性寄生虫症の疫学的 研究		

7. 情報発信・広報活動等

①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）

シンポジウム 講演会		公開講座 セミナー		その他 (施設等の一般公開等)		合 計	
件 数	参加人数	件 数	参加人数	件 数	参加人数	件 数	参加人数
1	50	8	781	0	0	9	831
○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		
R4.6.20	公開講座	一般	家畜衛生講習会（牛疾病特殊講習会）	「Current status and control of oriental theileriosis in Japan」という講義タイトルで、日本に流行する牛小型ピロプラズマ病の現状と対策を紹介した。 対象者：家畜保健衛生所の職員など	46		
R4.6.25	公開講座	一般	帯広の森サポーターの会 とかちのマガニ現地研修講演（帯広の森）	帯広の森ボランティア活動者、および一般市民への現地公開講座（マガニの生態についての講義およびマガニ採集） 対象者：帯広の森ボランティア活動者、一般市民	20		
R4.7.29	公開講座	一般	第45回十勝消費者大会（中札内村文化創造センター）	「感染症の調査中に食した世界のごはん ～食の安全・安心について感じたこと～」という演題で75分間の基調講演を行った。 対象者：一般市民	190		
R4.7.30-31	公開講座	一般	令和4年度大学説明会オープンキャンパス	原虫病研究センターの活動紹介と研究室見学ツアー、顕微鏡を用いた標本観察と研究内容のポスター展示を行った。	247		
R4.11.11	公開講座	一般	苫小牧東高校出前授業	WOAH 活動について紹介	48		
R4.12.22	公開講座	一般	横浜動物検疫所セミナー 金曜会（動物検疫所）	WOAH 活動について紹介を行った 対象者：動物検疫所職員	60		
R5.2.3	公開講座	一般	令和4年度肉用牛講演会（熊本県畜産農業協同組合連合会）	令和4年度肉用牛講演会 対象者：酪農家、獣医師	150		

R5.2.14	公開講座	一般	茶安別地域振興会酪農部・講習会（茶安別公民会）	茶安別地域振興会酪農部・講習会 対象者：酪農家、獣医師	20
R5.2.19	公開シンポジウム	国内	延長された表現型の機構解明～生物がいかにして他の生物を改変、操作するのか～	トキソプラズマ原虫によるホスト・マニピュレーションに関する招待講演を行った。	50

② 定期刊行物やホームページによる一般社会に対する情報発信の取組

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

8. 教員の研究活動

先端治療学分野

◆-----教授 鈴木宏志
(Hiroshi Suzuki)

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、ミトコンとして機能し、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 や *P. berghei* 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ています。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。

さらに、これら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。

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

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LHサージ後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でした。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日以内で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。以上のように、18MHzリニアプローブを用いた排卵プロセスの経時的観察によって、排卵開始から完了までのプロセスを初めて明らかにしました。

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しています。タイムラプスを用いた観察から、ある培養条件下では、雌胚よりも雄胚の方が卵割（発生）が速いことが認められました。これらの成績は、非侵襲的な胚の性別法の開発につながることで期待されます。

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

3. 2022 年度研究の総括

- ・ マラリア原虫は、酸化ストレスに弱いことが知られています。そこで、ミトコンとして知られているビタミン E 誘導体 α -tocopheryloxy acetic acid (α -TEA) が、*P. berghei* ANKA および *P. falciparum* による感染に対して、それぞれ、マウスおよびヒト赤血球 (RBC) を用いて、どのような影響を与えるかを検討しました。マウスを用いた *in vivo* 実験では、*P. berghei* ANKA に感染した赤血球を C57BL/6J 雄マウスに腹腔内注射で接種した後に α -TEA を投与しました。1.5%の濃度の α -TEA を感染後 14 日間投与したところ、*P. berghei* ANKA 感染マウスの 88%が生存しましたが、 α -TEA を投与していないコントロールマウスは感染後 12 日以内にすべて死亡しました。また、感染後 7 日目にエバンスブルー染色により血液脳関門 (BBB) 透過性を調べたところ、 α -TEA を投与したマウスの脳内のエバンスブルー強度は、無投与のマウスに比べて小さく、 α -TEA が BBB の破壊と脳マラリアの進行を抑制する可能性が示されました。さらに、*P. falciparum* 3D7 (クロロキン感受性株) および K1 (多剤耐性株) に対する α -TEA の *in vitro* 阻害効果を SYBR Green I ベースのアッセイを用いて検討したところ、 α -TEA が 3D7 株と K1 株の両方の増殖を抑制することが明らかとなりました。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。
- ・ 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、昨年度、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たところ、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を見出しました。本年度は、IAS と eCG の混合投与による発情誘起後に交配実験を実施し、妊孕能の有無を検証しました。交配を試みた雌 6 例のうち 3 例が妊娠・分娩に至り、産仔数はそれぞれ 1 頭、4 頭、11 頭で、全 6 例の妊娠率は 50%、平均産仔数は 2.7 頭との成績でした。妊娠例と非妊娠例を比較すると、妊娠例では平均 10.7 個排卵したのに対し、非妊娠例では平均 18.3 個と 7 個以上多い結果でした。また、非妊娠例の P₂ 濃度は LH₂ 以降、妊娠例の 1.8~3.0 倍高く、E₂ 濃度は LH サージの 3 日前から 2.0~2.8 倍高いレベルを維持していました。さらに、非妊娠例は自然発情時と比較しても LH サージ前後の P₄ および E₂ 濃度が有意に高いことが明らかとなり、P₄ および E₂ の非生理的上昇が妊娠を阻害する可能性が示唆されました。今後は、適切な P₄ および E₂ 濃度を維持できる IAS 投与量を検討していく予定です。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本卵子学会常任理事・広報担当
- ・ 日本熱帯医学会評議員
- ・ 日本繁殖生物学会評議員
- ・ 日本寄生虫学会評議員
- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 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

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 日本卵子学会生殖補助医療胚培養士資格認定委員
- ・ 日本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
- ・ 科学研究費委員会専門委員

6. 2022 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, Souichirou Naomasa, Bumduuren Tuvshintulga, Nariko Sato, Kiyoshi Okado, Weiqing Zheng, Seung-Hun Lee, Juan Mosqueda, **Hiroshi Suzuki**, Xuenan Xuan, Rika Umemiya-Shirafuji. Identification and Characterization of *Rhipicephalus microplus* ATAQ Homolog from *Haemaphysalis longicornis* Ticks and Its Immunogenic Potential as an Anti-Tick Vaccine Candidate Molecule. **Microorganisms**. 2023 Mar; 11(4): 822. PMID: 37110244
2. Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, Benedicto Byamukama, Maria Tumwebaze, Xuenan Xuan, **Hiroshi Suzuki**. Molecular Characterization of Octopamine/Tyramine Receptor Gene of Amitraz-Resistant *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* Ticks from Uganda. **Microorganisms**. 2022 Nov; 10(12): 2384. PMID: 36557637
3. Shinji HaraKawa, Takuya Hori, Takao Hiramoto, Takaki Nedachi, Toshikazu Shinba, **Hiroshi Suzuki**. Suppression of Glucocorticoid Response in Stressed Mice Using 50

- Hz Electric Field According to Immobilization Degree and Posture. **Biology (Basel)**. 2022 Sep; 11(9): 1336. PMID: 36138815
- Nanang R Ariefta, Aiko Kume, Yoshifumi Nishikawa, Tomoyo Taniguchi, Rika Umemiya-Shirafuji, Shunji Kasai, **Hiroshi Suzuki**. Effect of α -tocopheryloxy acetic acid on the infection of mice with *Plasmodium berghei* ANKA *in vivo* and humans with *P. falciparum* *in vitro*. **Acta Parasitologica**. 2022 Aug 11. PMID: 35951222
 - Maki Kuniyori, Nariko Sato, Naoaki Yokoyama, Shin-Ichiro Kawazu, Xuenan Xuan, **Hiroshi Suzuki**, Kozo Fujisaki, Rika Umemiya-Shirafuji. Vitellogenin-2 Accumulation in the Fat Body and Hemolymph of *Babesia*-Infected *Haemaphysalis longicornis* Ticks. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022 Jun; 12: 908142. PMID: 35800383

総説

- 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.
- Mototada Shichiri, **Hiroshi Suzuki**, Yuji Isegawa, Hiroshi Tamai. Application of regulation of reactive oxygen species and lipid peroxidation to disease treatment. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. 2023 Jan; 72(1): 13-22. PMID: 36777080

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）

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）

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. 2022年度研究の総括

- ・ 感染による中枢神経系の機能破綻メカニズムの解明

「ネオスポラ感染による脳病変を抑える細胞群を発見」(論文リスト1)

ネオスポラの感染は畜産業に多大な経済的損失をもたらすことから、その対策には病態発症機構の解明が重要となります。ネオスポラ症の主徴は流産と神経症状はであり、その病態には宿主の免疫応答が深く関わっています。今回、CXCR3 ノックアウト (CXCR3KO) マウスを用いた感染モデルにおいて CXCR3 の役割を解析し、CXCR3 陽性制御性 T 細胞が脳病変の抑制に重要であることを見出しました。従って、過剰な炎症反応を適切に制御することで宿主動物の致死的な影響を回避できることが示され、新規ワクチンの開発につながることを期待されます。本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) の研究助成(21fk0108137h)、挑戦的研究(萌芽) (20K21359)、基盤研究(B) (21H02353) の研究費で実施しました。

- ・ 天然物からの抗原虫薬の探索

「エジプトの野生薬用植物エキスはトキソプラズマとネオスポラの増殖抑制効果を持つ」

(論文リスト4)

野生の薬用植物は、伝統的に抗菌剤として使用されてきました。今回、エジプトの砂漠の野生植物の抽出エキスからトキソプラズマとネオスポラの増殖抑制効果を持つ種類を見出しました。その中でもヨモギ (*Artemisia judaica*)、フウチョウソウ (*Cleome droserifolia*) のエキスについては強力な効果を示したため、これら感染症の代替治療薬の生物資源となる可能性が示されました。本研究は South Valley 大学 (エジプト) との共同研究の成果であり、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。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

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

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. 2022 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. Hanan H Abdelbaky, Shuichiro Mitsuhashi, Kenichi Watanabe, Nanako Ushio, Miku Miyakawa, Hidefumi Furuoka, Yoshifumi Nishikawa*. Involvement of chemokine receptor CXCR3 in the defense mechanism against *Neospora caninum* infection in C57BL/6 mice. **Frontiers in Microbiology**. 2023 Jan; 13: 1045106. PMID: 36704563
2. Ruenruetai Udonsom, Onrapak Reamtong, Poom Adisakwattana, Supaluk Popruk, Charoonluk Jirapattharasate, Yoshifumi Nishikawa, Tawin Inpankaew, Jitbanjong Toompong, Manas Kotepui, Aongart Mahittikorn. Immunoproteomics to identify species-specific antigens in *Neospora caninum* recognised by infected bovine sera.

- Parasite.** 2022 Dec; 29: 60. 2022;29:60. PMID: 36562441.
3. Nanang R Arieftha, Aiko Kume, **Yoshifumi Nishikawa**, Tomoyo Taniguchi, Rika Umemiya-Shirafuji, Shunji Kasai, Hiroshi Suzuki. Effect of α -tocopheryloxy acetic acid on the infection of mice with *Plasmodium berghei* ANKA *in vivo* and humans with *P. falciparum* *in vitro*. **Acta Parasitologica.** 2022 Aug; 67(4): 1514-1520. PMID: 35951222.
 4. Ahmed M Abdou, Abdel-Latif S Seddek, Noha Abdelmageed, Mohamed O Badry, **Yoshifumi Nishikawa***. Extracts of wild Egyptian plants from the desert inhibit the growth of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* *in vitro*. **Journal of Veterinary Medical Science.** 2022 Jul; 84(7): 1034-1040. PMID: 35661076
 5. 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.** 2022 May; 22(1): 130. PMID: 35550108

総説（*責任著者）

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

1. 細胞内寄生原虫トキソプラズマによる宿主・マニピュレーション. 第 21 回 ERATO 共生進化機構先端セミナー、オンライン、2022 年 12 月 21 日
2. トキソプラズマ原虫による宿主・マニピュレーション. 公開シンポジウム 延長された表現型の機構解明～生物がいかにして他の生物を改変、操作するのか～、産業技術総合研究所つくば中央共用講堂（茨城県つくば市）、2023 年 2 月 19 日

9. 獲得研究費

1. 令和 4 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 4 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 4 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4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4年度(2022年度) 基盤研究（C）（一般）（文部科学省）、寄生虫感染とシリコーンオイル使用眼で観察される網膜障害の原因はフェロトシスか?（22K09810）、分担、令和4年度～令和6年度
 6. 令和4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4年度
 7. 令和4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. 毎日新聞・科学の森「宿主操り生き延びる寄生生物」2022年7月14日
<https://mainichi.jp/articles/20220714/ddm/016/040/019000c>
2. 日本経済新聞・「（科学の絶景）オオカミを操る寄生体 群れのボス指名、野心あおる」
2022年12月3日
<https://www.nikkei.com/article/DGXZQOUC291KE0Z21C22A1000000/>
3. テレビ朝日・木曜ドラマ「警視庁アウトサイダー」2023年2月2日、西川研究室が提供した「トキソプラズマの動画」を使用したドラマの放映

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. 兼子 裕規：名古屋大学医学部付属病院眼科、トキソプラズマ感染における頭頸部感覚器フェロトシスの研究、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究
3. 長谷 耕二：慶應義塾大学薬学部生化学講座、妊娠期のトキソプラズマ感染防御における $\gamma\delta$ T細胞の役割の解析、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共

同研究

4. 杉 達紀：北海道大学・人獣共通感染症 リサーチセンター、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、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究
5. 二瓶 浩一：公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所、抗原虫作用を示す機化研由来天然化合物における分子標的の解析、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究
6. 錦織 充広：福岡大学 理学部 化学科、トキソプラズマ分泌タンパク質の宿主ミトコンドリア機能に対する影響解析、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

マダニによって媒介されるピロプラズマ（タイレリアおよびバベシア）病は、牛や馬などの家畜動物に発熱や貧血などの消耗性疾患を引き起こし、世界中で深刻な経済的被害をもたらしています。しかしながら、いずれの動物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（WOAH）から、“牛バベシア病”と“馬ピロプラズマ病”に関する WOAH 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拡充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病の分子疫学および臨床病理学研究
- ・ 野生シカが保有するピロプラズマの分子疫学研究
- ・ ピロプラズマの媒介マダニに関する疫学研究
- ・ 牛および馬ピロプラズマ病の診断法、治療薬、および予防法の確立に向けた基礎研究
- ・ 人バベシア病に関する国際疫学研究

3. 2022 年度研究の総括

- ・ パラグアイの馬における馬ピロプラズマの感染疫学調査：馬ピロプラズマ病は *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原虫病です。本疾病は世界的に広く発生が見られ、しばしば馬産業に重大な経済的被害をもたらしますが、パラグアイの疫学情報は不明のままでした。そこで、パラグアイ 16 州で飼育されていた計 545 頭の馬から血液を回収し、*T. equi* と *B. caballi* の感染について PCR スクリーニング診断を行いました。その結果、32.7%と 1.5%の馬が、それぞれ *T. equi* と *B. caballi* に感染していたことが示されました。本研究の成果により、パラグアイにも *T. equi* と *B. caballi* が定着しており、かつ *T. equi* の感染率が *B. caballi* よりも高いことが明らかとなりました。本研究は、パラグアイ（Centro de Diagnostico Veterinario, Universidad Nacional de Canendiyu）との国際共同研究として実施しました。
- ・ スリランカのロバにおける馬ピロプラズマの感染疫学調査：馬ピロプラズマ病は、馬、ロバ、シマウマ、ラバなどのウマ科動物が *Theileria equi* と *Babesia caballi* に感染することによって引き起こされます。スリランカ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、放し飼い口バを対象に、*T. equi* と *B. caballi* の感染疫学調査を実施しました。スリランカ 2 地区の口バ計 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、*T. equi* および *B. caballi* 感染の PCR スクリーニング診断を行いました。その結果、57.7%および 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* による馬ピロプラズマ病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。

- ・ エジプトのラクダにおけるバベシア、タイレリア、トリパノソーマ、アナプラズマの感染疫学調査：ラクダはエジプトにおいて経済的に重要な家畜動物です。本研究では、エジプトのラクダにおけるバベシア、タイレリア、トリパノソーマ、アナプラズマの感染状況を調べるために、エジプト 6 県で飼育されていた計 148 頭のラクダの血液を PCR スクリーニング診断しました。その結果、19.6%、14.9%、0.7%、1.4%、0.7%、1.4%、および 18.9%のラクダが、それぞれ *Babesia bovis*、*B. bigemina*、*Babesia* sp. Mymensingh、*Theileria* sp. Yokoyama、*Theileria equi*、*Trypanosoma evansi*、および *Anaplasma marginale* に感染していました。この成果は、*Babesia* sp. Mymensingh と *Theileria* sp. Yokoyama の感染をエジプトおよびラクダで診断した最初の報告となりました。本研究は、エジプト (Sohag University, Assiut University) との国際共同研究として実施しました。
- ・ 新たな系統解析による *Babesia* sp. Mymensingh の新学名の決定 (*Babesia naoakii*)：最近我々が発見した高病原性バベシア種 (*Babesia* sp. Mymensingh) は世界に広く分布することが分かってきました。本研究では、*Babesia* sp. Mymensingh のミトコンドリア、プラスチド、核の遺伝子群を解析し、本原虫種の系統学的位置を検証しました。その結果、本原虫種は既存バベシア種とは異なるユニークな系統学的位置を占め、かつ *Babesia bigemina* と *B. ovata* の共通の祖先の姉妹クレードを形成することが明らかとなりました。形態学的並びに遺伝学的特徴から、我々は本原虫種を新たな学名として "*Babesia naoakii*" と名付けました。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

- ・ 牛臨床寄生虫研究会

② 主催した学会、研究会等

- ・ WOAH Academic Exchange Seminar (KRIV-NRCPD) 「The molecular epidemiology of hemopathogens infecting cattle in Kyrgyzstan」、原虫病研究センター/キルギス獣医学研究所（オンライン）、2023年2月20日
- ・ WOAH Academic Exchange Seminar (VRI-NRCPD) 「スリランカにおける牛・馬ピロプラズマ病の発生と対策」、スリランカ獣医学研究所（キャンディー）、2023年3月23日

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ WOAH リファレンスラボラトリー「牛バベシア病」専門家
- ・ WOAH リファレンスラボラトリー「馬ピロプラズマ病」専門家
- ・ WOAH コラボレーティングセンター「動物原虫病のサーベイランスと防疫」代表者
- ・ 北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所 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
- ・ 沖縄牧野へのダニ侵入防止事業・技術検討会（沖縄県）・技術検討委員

6. 2022 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. 森 菜々美、Thillaiampalam Sivakumar, 水谷 友香、松井 伸一、河合 孝弘、白藤 梨可、猪熊 壽、**横山 直明**（2023）：日本には2種類の牛大型ピロプラズマ（牛バベシア）が存在する、**牛臨床寄生虫研究会誌**、第13巻、第1号、p22
2. 林田 京子、白藤 梨可、杉本 千尋、**横山 直明**（2023）：ウシ化マウス感染モデルを用いた小型ピロプラズマ原虫のマダニ体内感染動態の解明、**牛臨床寄生虫研究会誌**、第13巻、第1号、p23-27
3. Believe Ahedor, Thillaiampalam Sivakumar, Maria Fátima Rodríguez Valinotti, Davaajav Otgonsuren, **Naoaki Yokoyama**, Tomás J Acosta. PCR detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in apparently healthy horses in Paraguay. **Veterinary Parasitology, Regional studies and Reports**. 2023 Jan; 39: 100835. PMID: 36878622
4. Thillaiampalam Sivakumar, Bumduuren Tuvshintulga, Davaajav Otgonsuren, Enkhbaatar Batmagnai, Believe Ahedor, Hemal Kothalawala, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Junya Yamagishi, **Naoaki Yokoyama**. Phylogenetic analyses of the mitochondrial, plastid, and nuclear genes of *Babesia* sp. Mymensingh and its naming as *Babesia naoakii* n. sp. **Parasites & Vectors**. 2022 Aug; 15(1): 299. PMID: 36002908

5. Amarin Rittipornlertrak, Boondarika Nambooppha, Anucha Muenthaisong, Nisachon Apinda, Pongpisid Koonyosying, Wanwisa Srisawat, Paweena Chomjit, Kanokwan Sangkakam, Veerasak Punyapornwithaya, Saruda Tiwananthagorn, **Naoaki Yokoyama**, Nattawooti Sthitmatee. Immunization of Cattle With Recombinant Structural Ectodomains I and II of *Babesia bovis* Apical Membrane Antigen 1 [BbAMA-1(I/II)] Induces Strong Th1 Immune Response. **Frontiers in Veterinary Science**. 2022 Jun; 9: 917389. PMID: 35812841
6. Maki Kuniyori, Nariko Sato, **Naoaki Yokoyama**, Shin-Ichiro Kawazu, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki, Kozo Fujisaki, Rika Umemiya-Shirafuji. Vitellogenin-2 Accumulation in the Fat Body and Hemolymph of *Babesia*-Infected *Haemaphysalis longicornis* Ticks. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022 Jun; 12: 908142. PMID: 35800383
7. Doaa Salman, Thillaiampalam Sivakumar, Davaajav Otgonsuren, Motamed E Mahmoud, Ehab Kotb Elmahallawy, Arafat Khalphallah, Ahmed M E Y Kounour, Sara A Bayomi, Makoto Igarashi, **Naoaki Yokoyama**. Molecular survey of *Babesia*, *Theileria*, *Trypanosoma*, and *Anaplasma* infections in camels (*Camelus dromedaries*) in Egypt. **Parasitology International**. 2022 Oct; 90:102618. PMID: 35777654
8. 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 *Theileria equi* in free-roaming donkeys (*Equus africanus asinus*) in Sri Lanka. **Infection, Genetics and Evolution**. 2022 Apr; 99:105244. PMID: 35149223

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. WOAH 学術セミナーの開催 : ケニア、モンゴル、キルギス、インド、スリランカ、パラグアイ、北海道大学・卓越大学院、農林水産省・動物衛生課、農林水産省・動物検疫所、熊本県畜産農業協同組合連合会、苫小牧東高校 (17 件)
2. WOAH 技術トレーニング研修会の開催 : モンゴル、ケニア、農林水産省・動物検疫所、北海道大学・卓越大学院 (5 件)
3. 海外からの WOAH 診断依頼 : イギリス、ドイツ、アメリカ、ニュージーランド、モンゴル、

- スリランカ（14件；343検体）
4. 国内からの WOH 診断依頼：北海道、宮城、熊本、沖縄（16件；1,002検体）
 5. WOH コンサルティング依頼：イギリス、アイルランド、オランダ、フランス、トルコ、南アフリカ、モンゴル、インド、キルギス、スリランカ、ニュー・カレドニア、オーストラリア、カナダ、アメリカ、アルゼンチン、チリ、日本（47件）
 6. WOH 診断用の試料提供（IFAT スライド）：フランス、イギリス、アイルランド、オランダ、カナダ、アルゼンチン、日本（10件；4,266枚）
 7. WOH 診断用の試料提供（DNA）：オランダ、南アフリカ（2件；4本）
 8. インターンシップの受入：スウェーデン、キルギス、モンゴル、メキシコ、パラグアイ、日本（6件、7名）
 9. 国際疫学調査研究の受入：キルギス、モンゴル、スリランカ、インド、エジプト、マラウイ、アルゼンチン、パラグアイ（8カ国）
 10. WOH 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 WOH 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 WOH に提出（2023年1月）

8. 招待講演等

1. 「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・動物衛生研究部門（つくば）、2022年6月20日
2. 「Bovine babesiosis~Role of WOH reference laboratory~」人獣共通感染症対策専門家特論、北海道大学・卓越大学院（オンライン）、2022年9月12日
3. 「寄生虫病学はおもしろい！」出前講義、苫小牧東高校（苫小牧）、2022年11月11日
4. 「WOH リファレンスラボラトリーの活動紹介と解決すべき問題点」所内・金曜会セミナー、農林水産省・動物検疫所（横浜）、2022年12月22日
5. 「牛小型ピロプラズマ病の現状と対策について」令和4年度肉用牛講演会、熊本県畜産農業協同組合連合会（熊本）、2023年2月3日
6. 「牛小型ピロプラズマ病の対策について」酪農部講習会、茶安別地域振興会酪農部（標茶）、2023年2月14日

9. 獲得研究費

1. 令和4年度 家畜衛生対策事業（農林水産省・消費・安全局）「我が国の WOH 認定施設活動支援事業」、代表、令和4年度
2. 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4年度（延長）
3. 令和4年度 基盤研究（B）（文部科学省）「牛小型ピロプラズマ病を引き起こす牛タイレリアの生体内増殖メカニズムの解明」（22H02511）、代表、令和4年度～令和6年度
4. 令和4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）「馬ピロプラズマ病

- に対する国際標準血清診断法の開発に向けた学術基盤研究」(22KK0095)、代表、令和4年度～令和6年度
5. 令和2年度 二国間交流事業オープンパートナーシップ共同研究(日本学術振興会)「スリランカ国で発見された新牛バベシア病に対する簡易診断法の開発研究」、代表、令和2年度～令和4年度(延長)
 6. 令和4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)「新牛タイレリア(*Theileria* sp. Yokoyama)の分離と性状解析」、代表、令和4年度～令和5年度
 7. 令和4年度 特別研究員奨励費(文部科学省)「動物及びヒトのバベシア病の治療薬開発に向けた海洋生物由来の活性化化合物の探索研究」(22F22402)、受入研究者(Guswanto)、令和4年度～令和6年度
 8. 令和4年度 外国人研究者招へい事業・調査研究費(日本学術振興会)「馬ピロプラズマ病に対する新たな血清診断法の開発に向けた原虫分離の試み」、受入研究者(BATTSETSEG Badgar)、令和4年度
 9. 令和4年度 外国人研究者招へい事業・調査研究費(日本学術振興会)「*In vitro* assessment of plant-derived medicines for the treatment of piroplasm infections」、受入研究者(Daniel Kent Erik BERGMAN)、令和4年度
 10. 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
 11. 令和4年度 WOAH 検査診断経費(帯広畜産大学)

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究(共同研究契約締結分)

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

4. Seekkuge Susil Priyantha Silva: 「国際疫学調査（スリランカ）」 Veterinary Sesech Institute, Sri Lanka, 2019年7月～、部局間国際学術協定
5. Elisha Chatanga: 「Molecular detection and genetic characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses and donkeys in Malawi」 Lilongwe University of Agriculture & Natural Resources, Malawi, 2022年度原虫病研究センター共同研究
6. Sanjay Kumar: 「Genetic diversity of *Theileria equi* infecting equines in India and quantification of parasite loads」 ICAR-National Research Centre on Equines, India, 2022年度原虫病研究センター共同研究

◆-----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、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」（2017～2021年度）で整備した、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について、その拡充を進めています。

2. 主な研究テーマ

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

3. 2022年度研究の総括

- ・ 雌ダニがバベシア感染動物で吸血すると、バベシアは雌ダニ中腸内腔で有性生殖、中腸上皮細胞内で無性生殖を行い、体液（ヘモリンフ）に乗って各組織に到達します。一部のバベシアは卵巣内の卵母細胞に侵入し、胚発生後の幼ダニ体内に残存します。この幼ダニが次の宿主動物へのバベシア感染源となります（介卵伝播）。マダニにおけるバベシアの介卵伝播は実験的に証明されていますが、その分子機構は未だ不明です。本研究では、バベシア伝播においてカギとなるマダニ因子を見つけることを目的として、マダニの卵形成において重要なイベントである卵黄タンパク質前駆体（ビテロジェニン；Vg）合成とVgの取り込みに関わる分子に注目しました。人工吸血法によりバベシア感染マダニを作出し、吸血完了（飽血）後経日的に回収した各組織を用いて、Vg合成関連遺伝子とVg取り込み関連遺伝子について発現パターンを解析しました。その結果、非感染マダニに比べ、①バベシア感染マダニの脂肪体では、Vg-2およびVg-3の発現レベルが飽血後1日目に有意に低下、②バベシア感染マダニの卵巣では、Vg-2発現は飽血後1、2日目に有意に高く、飽血後3日後には低下、③VgRは飽血後2日目および4日目において顕著に低下することが明らかになりました。次に、各組織のタンパク質

抽出液を用いたウェスタンブロットにより、バベシア感染マダニの脂肪体およびヘモリンフに Vg-2 が蓄積することを見出しました。これらの結果から、ヘモリンフから卵巣への Vg-2 の取り込みが、バベシアの存在下で抑制されることが推測されました。さらに、Vg-2 遺伝子発現抑制マダニでは、対照群と比較して、卵巣におけるバベシア DNA の検出率が低下し、また、ヘモリンフ中のバベシア DNA レベルが有意に低下しました。以上のことから、蓄積した Vg-2 がマダニ体内でのバベシア伝播に関連することが示唆されました（論文リスト 5）。

- ・ 抗マダニワクチンは中南米において現在市販されており、マダニ対策法の一つとして活用されています。そのワクチンはオウシマダニの中腸タンパク質 Bm86 をベースとしたものであり、Bm86 ホモログがフタトゲチマダニを含むいくつかのマダニ種で同定されています。しかし、Bm86 ベースのワクチンの有効性はマダニ種や地域によって異なることが知られており、より安定した効果を発揮する抗原の候補や組み合わせを特定することが、新規抗マダニワクチン開発において重要視されています。本研究では、Bm86 に構造的に類似するタンパク質である ATAQ に着目し、オウシマダニ ATAQ のホモログをフタトゲチマダニより単離・同定しました（HIATAQ）。遺伝子およびアミノ酸配列解析により、HIATAQ は 654 アミノ酸からなるタンパク質で、特徴的な配列「YFNATAQRRCYH」と複数の Epidermal Growth Factor (EGF) 様ドメインを有することがわかりました。遺伝子発現解析により、中腸とマルピーギ管における HIATAQ の発現は吸血中に増大することが判明しました。そこで、HIATAQ の機能を推測するため、RNA 干渉法による遺伝子発現抑制を行いました。対照群と HIATAQ 遺伝子発現抑制群間には表現型の違いは見られませんでした。次に、組換え HIATAQ をウサギ（日本白色種）に免疫し、抗体価上昇を確認後、フタトゲチマダニ（単為生殖系；雌）を吸血させ、ワクチン効果を検証しました。その結果、対照群に比べ、ワクチン群では吸血期間と卵期間（孵化に至るまでの期間）の有意な延長が認められました。今回の研究により、ATAQ はワクチン候補分子の一つになることが示されましたが、抗原となる組換え HIATAQ の作製法や他抗原との組み合わせによるワクチン効果検証が今後の課題です（論文リスト 1）。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

- ・ 日本獣医学会評議委員
- ・ 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

1. Guest editor of special issue "Tick biology and microorganism interaction: Understanding the groundwork of pathogen transmission mechanisms". *Microorganisms* (MDPI).

6. 2022 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, Souichirou Naomasa, Bumduuren Tuvshintulga, Nariko Sato, Kiyoshi Okado, Weiqing Zheng, Seung-Hun Lee, Juan Mosqueda, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, Rika Umemiya-Shirafuji*. Identification and Characterization of *Rhipicephalus microplus* ATAQ Homolog from *Haemaphysalis longicornis* Ticks and Its Immunogenic Potential as an Anti-Tick Vaccine Candidate Molecule. **Microorganisms**. 2023 Mar; 11(4): 822. PMID: 37110244
2. Emmanuel Pacia Hernandez, Kei Shimazaki, Hiroko Niihara, Rika Umemiya-Shirafuji, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka. Localization of secreted ferritin (FER2) in the embryos of the tick *Haemaphysalis longicornis*. **Parasites & Vectors**. 2023 Jan; 16(1): 42. PMID: 36717957
3. Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph Byaruhanga, Benedicto Byamukama, Maria Tumwebaze, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki. Molecular characterization of octopamine/tyramine receptor gene of amitraz-resistant *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* ticks from Uganda. **Microorganisms**. 2022 Nov; 10(12): 2384. PMID: 36557637
4. Nanang R Ariefta, Aiko Kume, Yoshifumi Nishikawa, Tomoyo Taniguchi, Rika Umemiya-Shirafuji, Shunji Kasai, Hiroshi Suzuki. Effect of α -tocopheryloxy acetic acid on the infection of mice with *Plasmodium berghei* ANKA *in vivo* and humans with *P. falciparum in vitro*. **Acta Parasitologica**. 2022 Dec;67(4):1514-1520. PMID: 35951222
5. Maki Kuniyori, Nariko Sato, Naoaki Yokoyama, Shin-Ichiro Kawazu, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki, Kozo Fujisaki, Rika Umemiya-Shirafuji*. Vitellogenin-2 accumulation in the fat body and hemolymph of *Babesia*-infected *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022 Jun; 12: 908142. PMID: 35800383
6. Shengwei Ji, Onur Ceylan, Zhuowei Ma, Eloiza May Galon, Iqra Zafar, Hang Li, Yae Hasegawa, Mutlu Sevinc, Tatsunori Masatani, Aiko Iguchi, Osamu Kawase, Rika Umemiya-Shirafuji, Masahito Asada, Ferda Sevinc, Xuenan Xuan. Protozoan and rickettsial pathogens in ticks collected from infested cattle from Turkey. **Pathogens**. 2022 Apr; 11(5): 500. PMID: 35631021

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 帯広の森サポーターの会 とかちのマダニ現地研修講演、帯広の森 H9H10 年植樹区および屋敷林跡地、2022 年 6 月 25 日
2. 原虫病研究センター施設見学および寄生虫の標本展示、令和 4 年度度帯広畜産大学オープンキャンパス、帯広畜産大学・原虫病研究センターPK ホール、2022 年 7 月 30 日～7 月 31 日

8. 招待講演等

1. 白藤（梅宮）梨可. 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. 第 91 回日本寄生虫学会大会・シンポジウム 1（マダニ研究展開のための基盤構築に向けて）（とかちプラザ, 北海道帯広市）. 2022 年 5 月 28 日.（招待講演⑩、企画）
2. Rika Umemiya-Shirafuji. Establishment of the Tick Biobank for the application to vector biology research and the development of tick control methods. 15th International Congress of Parasitology (ICOPA2022) (Bella Center, Copenhagen, Denmark). 2022. August 21-26. (Oral presentation #1499 in Video on-demand - Symposium 03: New tools for prevention and control of ticks and tick-borne pathogens).（招待講演⑪）

9. 獲得研究費

1. 令和 4 年度 基盤研究 (B)（文部科学省）、原虫感染マダニにおける臓器特異的ピテロジェニンの機能解明 (22H02512)、代表、令和 4 年度～令和 6 年度
2. 令和 4 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、マダニ卵形成に貢献する共生微生物の探索、2022年4月1日～2023年3月31日、2022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、組換えアクアポリンを用いた抗マダニワクチンの構築、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究
3. 鈴木 丈詞：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、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

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

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. 2022 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及び原虫病の治療・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行っています。今年度は、外国産大型ピロプラズマ原虫（バベシア・ビゲミナ）によるウシのバベシア症に対するワクチン開発の基盤となる標的分子の探索を、ケレタロ自治大学（メキシコ合衆国）との共同研究で行いました。Spherical Body Protein 4 及び GP-45 の B 細胞（抗原）エピトープについて解析を行い、前者に対する免疫血清が、国産の大型ピロプラズマ原虫（バベシア・オバタ）

に対する交差免疫を示すこと、後者がバベシア・ビゲミナの野外分離株間で保存されていることを見出しました。一連の研究成績を、ウシバベシア症に対するワクチン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（原著論文リスト 1 及び 7）一方、バベシア・オバタでは、昨年度に引き続き、これまで詳細な研究が行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、独自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試料を調製して、RNA シーケンス (RNA-seq) を行い、マダニ体内での発育ステージで発現が亢進する遺伝子群を同定いたしました。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、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最新の遺伝子改変技術について概説する論文を、専門誌に公表いたしました（総説論文リスト 1）。

- ・ フィリピンでは国内 28 州に日本住血吸虫症の流行地があり、住民 500 万人が感染の危険に曝されています。私達の研究室では、国内の各流行地に分布する寄生虫の DNA を用いて分子疫学調査を行い、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 (elimination) 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) をはじめとする数種の組換え体抗原の性能を評価いたしました。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。また、メコン住血吸虫のドラフトゲノムを取得して、この寄生虫種の TPx-1 の組換え体抗原を作製いたしました。同組み組換え体抗原を ELISA に応用してその性能を評価したところ、高感度・高特異性を示す、良好な成績が得られましたが、タイ肝吸虫症の患者血清との交差反応も認められ、今後解決が必要な問題として提示されました。一連の研究成績を、アジア型住血吸虫症の診断法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（原著論文リスト 2 及び 3）。また、日本住血吸虫の酵素抗原二種類の組換え体についても ELISA 抗原としての性能を評価して、専門誌に公表いたしました（原著論文リスト 6）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。また、アジア型住血吸虫症の対策に必須となる情報を得るための手法として、寄生虫の集団構造解析に使用するシングルゲノム DNA の調整を目的としたミラシジウムふ化法 (MHT) の改良を行いました。その結果、既存の MHT プロトコールを 96 穴プラスチック ELISA プレートでの簡易法に改良し、また、通常は蛍光灯下で行う MHT を日光下で行っても効率的にミラシジウムのふ化が誘導できることを初めて明らかにいたしました。この手法で採取したミラシジウムから調整したングルゲノム DNA を鋳型にした PCR ではマイクロサテライトマーカーが増幅され、MHT の改良法が寄生

虫の集団構造解析の研究にも十分応用可能であることが確認できました。一連の研究成績を、アジア型住血吸虫症の elimination に向けた対策手法開発の基礎知見として、専門誌に公表いたしました(原著論文リスト 5)。MHT 改良法をアジア型住血吸虫症の対策に導入することで、流行地での寄生虫の集団構造解析が可能になります。

4. 学会等の活動状況

① 所属学会等、役職等

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

② 主催した学会、研究会等

- ・ 第 91 回日本寄生虫学会大会 (令和 4 年 5 月 28-29 日、帯広市とかちプラザにてハイブリッド開催)

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 長崎大学熱帯医学研究所運営協議会委員
- ・ 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. 2022 年度研究成果発表等 (原著論文、総説・著書)

原著論文 (*責任著者)

1. Juan Mosqueda, Diego Josimar Hernandez-Silva, Massaro W Ueti, Adolfo Cruz-Reséndiz, Ricardo Marquez-Cervantez, Uriel Mauricio Valdez-Espinoza, Minh-Anh Dang-Trinh, Thu-Thuy Nguyen, Minerva Camacho-Nuez, Miguel Angel Mercado-Uriostegui, Gabriela Aguilar-Tipacamú, Juan Alberto Ramos-Aragon, Ruben Hernandez-Ortiz, **Shin-Ichiro Kawazu**, Ikuo Igarashi. Spherical Body Protein 4 from *Babesia bigemina*: A Novel Gene That Contains Conserved B-Cell Epitopes and Induces Cross-Reactive Neutralizing Antibodies in *Babesia ovata*. **Pathogens**. 2023 Mar; 12(3): 495. PMID: 36986418
2. Jose Ma M Angeles, Atcharaphan Wanlop, Minh-Anh Dang-Trinh, Masashi Kirinoki, **Shin-Ichiro Kawazu**, Aya Yajima. Evaluation of Crude and Recombinant Antigens of *Schistosoma japonicum* for the Detection of *Schistosoma mekongi* Human Infection. **Diagnostics (Basel)**. 2023 Jan; 13(2): 184. PMID: 36672994
3. Atcharaphan Wanlop, Jose Ma M Angeles, Adrian Miki C Macalanda, Masashi Kirinoki, Yuma Ohari, Aya Yajima, Junya Yamagishi, Kevin Austin L Ona, **Shin-Ichiro Kawazu**.

- Cloning, Expression and Evaluation of Thioredoxin Peroxidase-1 Antigen for the Serological Diagnosis of *Schistosoma mekongi* Human Infection. **Diagnostics (Basel)**. 2022 Dec; 12(12): 3077. PMID: 36553084
4. Maki Kuniyori, Nariko Sato, Naoaki Yokoyama, **Shin-Ichiro Kawazu**, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki, Kozo Fujisaki, Rika Umemiya-Shirafuji. Vitellogenin-2 Accumulation in the Fat Body and Hemolymph of *Babesia*-Infected *Haemaphysalis longicornis* Ticks. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022 Jun; 12: 908142. PMID: 35800383
 5. Atcharaphan Wanlop, Minh-Anh Dang-Trinh, Masashi Kirinoki, Saki Suguta, Kaho Shinozaki, **Shin-Ichiro Kawazu**. A simple and efficient miracidium hatching technique for preparing a single-genome DNA sample of *Schistosoma japonicum*. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2022 Aug; 84(8): 1108-1110. PMID: 35732429
 6. Jose Ma M Angeles, Yasuyuki Goto, Minh Anh Dang Trinh, Pilarita T Rivera, Elena A Villacorte, **Shin-Ichiro Kawazu**. Serological evaluation of the schistosome's secretory enzyme phytochelatin synthase and phosphoglycerate mutase for the detection of human *Schistosoma japonicum* infection. **Parasitology Research**. 2022 Aug; 121(8): 2445-2448. PMID: 35672537
 7. Miguel Angel Mercado-Uriostegui, Luis Alberto Castro-Sánchez, Gaber El-Saber Batiha, Uriel Mauricio Valdez-Espinoza, Alfonso Falcón-Neri, Juan Alberto Ramos-Aragon, Ruben Hernández-Ortiz, **Shin-Ichiro Kawazu**, Ikuo Igarashi, Juan Mosqueda. The GP-45 Protein, a Highly Variable Antigen from *Babesia bigemina*, Contains Conserved B-Cell Epitopes in Geographically Distant Isolates. **Pathogens**. 2022 May; 11(5): 591. PMID: 35631112

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.
2. Hassan Hakimi, Junya Yamagishi, **Shin-Ichiro Kawazu**, Masahito Asada. Advances in understanding red blood cell modifications by *Babesia*. **Plos Pathogens**. 2022 Sep; 18(9): e1010770. PMID: 36107982

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. ICD 講習会開催（令和4年5月29日、帯広市とかちプラザにて開催）

8. 招待講演等

1. 2023 年日米医学合同 EID 会議 寄生虫疾患部会パネル会議：シンポジウム、フィリピン マニラ市、2023 年 3 月 10 日

9. 獲得研究費

1. 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
2. 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

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Memorandum Of Understanding (MOU) for academic cooperation and exchange between College of Public Health, University of the Philippines Manila, Philippines and National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、2023 年 3 月～2028 年 2 月（2023 年 3 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、2023 年 2 月～2028 年 1 月（2023 年 2 月に延長）、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～2023 年 7 月、学術交流協定、フィリピンカラバオセンター
4. Memorandum Of Understanding, hereinafter referred to as “MOU” made and entered into by the College Of Natural Sciences, Autonomous University Of Queretaro, United

Mexican States and the National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、2022年9月～2025年8月、学術交流協定、ケレタロ自治大学・自然科学部

5. 荒木 球沙：国立感染症研究所寄生動物部、ヒストン制御機構に着目した新規抗マラリア化合物のスクリーニングと原虫オルガネラの三次元構造解析、2022年4月1日～2023年3月31日、2021年度原虫病研究センター共同研究（2022-共同-3）

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（WOAH）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 WOAH 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. 2022 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）の病原体です。主に血流中に寄生し吸血昆虫を介して伝播される他種トリパノソーマとは異なり、*T. equiperdum* は血流中に現れることはまれで生殖器に寄生するとされ、交尾によって伝播されます。媾疫は WOAH の定める国際重要家畜疾患であるにもかかわらず、*T. equiperdum* の寄生動態、とくに感染源となる生殖器への組織移行性については未解明でした。本研究では *T. equiperdum* 感染オスマウスモデルを構築し、雄性生殖器における原虫の詳細な寄生部位を特定し、*T. equiperdum* の精液への移行性について検討しました。その結果、感染オスマウスの生殖器では精子肉芽腫を伴う精巣上体炎が観察され、間質に原虫の寄生が認められました。また精巣上体管上皮細胞のアポトーシスによる血液精巣上体関門の崩壊、および精巣上体管内に侵入した *T. equiperdum* が認められました。また、精巣上体間質には多量の炎症細胞と、細胞にアポトーシスを誘導するサイトカイン *TNF- α* の存在も確認されました。本研究により、*T. equiperdum* のオスマウス生殖器における寄生部位を特定するとともに、原虫の精液への移行機序の一端が明らかとなりました。（論文リスト 3）（帯広畜産大学基礎獣医学研究部門との共同研究）。

- ・ 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。昨年度我々はパラグアイにおける馬トリパノソーマ感染状況を明らかにしました (Suganuma *et al.*, 2021)。本年はパラグアイの馬におけるトリパノソーマ感染リスク因子を探索しました。その結果、アブなどの媒介吸血昆虫が多く発生する夏季・雨季に感染リスクが有意に増大することが明らかとなりました。本研究結果から動物トリパノソーマ症感染予防を行うために媒介昆虫防除の重要性が示されました (論文リスト 4) (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)。

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. 2022 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. Mo Zhou, Lianfeng Li, Keisuke Suganuma. Editorial: Epidemic status and prevention of swine infectious diseases. **Frontiers in Veterinary Science**. 2023 Mar; 10: 1169644. PMID: 36950539
2. Stipan Nurbyek, Buyanmandakh Buyankhishig, Keisuke Suganuma, Yoshinobu Ishikawa, Mika Kutsuma, Marie Abe, Kenroh Sasaki, Bekh-Ochir Davaapurev, Javzan Batkhuu, Toshihiro Murata. Phytochemical investigation of *Scutellaria scordiifolia* and its trypanocidal activity. **Phytochemistry**. 2023 Feb; 209: 113615. PMID: 36828100
3. Yusuke Tanaka, Keisuke Suganuma, Kenichi Watanabe, Yoshiyasu Kobayashi. Epididymitis in mice experimentally infected with *Trypanosoma equiperdum*: a histopathological and immunohistochemical study. **Journal of Comparative Pathology**. 2023 Feb; 201: 1-9. PMID: 36642054
4. Ai Yamazaki, Keisuke Suganuma, Mitsunori Kayano, Tomás J Acosta, Tomoko Saitoh, Maria Fátima Rodríguez Valinotti, Antonio Rodríguez Sanchez, Noboru Inoue. Risk

factors for equine trypanosomosis and hematological analysis of horses in Paraguay.

Acta Tropica. 2022 Sep; 233: 106543. PMID: 35643185

5. Mahmoud Kandeel, Keisuke Suganuma. The broad-spectrum antitrypanosomal inhibitory efficiency of the antimetabolite/anticancer drug raltitrexed. **Processes**. 10(11): 2158.

総説

1. Moitshepi Plaatjie, ThankGod Onyiche, Lesetja Legoabe, Tsepo Ramatla, Nthatsi Nyembe, Keisuke Suganuma, Oriel Thekiso. Medicinal plants as potential therapeutic agents for trypanosomosis: a systematic review. **Advances in Traditional Medicine**. 2022

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. 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
2. 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)、牧場及び牧場周囲の環境要因が吸血性アブ類の発生・飛来消長に与える影響の解析、代表、2022 年度
3. 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
4. 2022 年度 独立行政法人日本学術振興会・南アフリカとの共同研 (NRF) (日本学術振興会)、ニトロフランおよびその関連化合物に着目したトリパノソーマ症新規経口治療薬の開発 (JPJSBP120226501)、代表、2022 年度～2023 年度
5. 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
6. 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

1. 受賞者：山崎 藍（畜産学専攻博士前期課程1年）

受賞名：第165回日本獣医学会学術集会優秀発表賞（寄生虫分科会）

受賞テーマ：パラグアイで飼養されている馬のトリパノソーマ感染に関するリスク因子解析

受賞年：2022年10月16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. 中尾 洋一：早稲田大学理工学術院先進理工学研究科、抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と作用機序解析、2022年4月1日～2023年3月31日、2021年度原虫病研究センター共同研究（2022-共同-10）
2. Davaasuren Batdorj: Institute of Veterinary Medicine, Mongolian Life Science University, Investigation of parasitic strategy, especially tissue parasitism of *T. equiperum* on horse (2022-Joint-21)
3. Memorandum Of Understanding (MOU) between North-West University, South Africa acting through with Unit for Environmental Sciences and Management, and Center of Excellence for Pharmaceutical Sciences and National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan、学術交流協定、南アフリカノースウェスト大学・Unit for Environmental Sciences and Management, and Center of Excellence for Pharmaceutical Sciences

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。

馬に原虫性脊髄脳炎を引き起こすザルコシスティス原虫 (*Sarcocystis neurona*) について、培養系の確立とその系を用いた基礎研究を行っています。

エンセファリトゾーン症は、*Encephalitozoon cuniculi* という微胞子虫による感染症であり、主としてウサギに対して神経症状や眼症状、腎臓疾患などを引き起こす可能性があります。この感染症に対する薬剤の有効性を検証する目的で、培養系での増殖率の測定法の確立を目指しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トキソプラズマ病原性因子の同定と機能解析
- ・ ザルコシスティス・ニューロナ原虫の培養系の確立
- ・ エンセファリトゾーンの増殖率測定法の開発

3. 2022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）。

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. 2022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）

該当なし

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 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. 2022 年度研究の総括

- ・ 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4年度においては、その中でもロイコチトゾーンと腸管出血性大腸菌などについて調査を行いました。ロイコチトゾーンについては千葉大学との共同研究でドバトやキジバトを対象として新たなリンケージを検出する方法を確立したうえでその疫学情報を明らかにしました。また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 O26 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 3,4）。
- ・ 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4年度についてはその一貫として免疫不全マウスを用いたマイクロフィラリア血症モデルの確立、フィラリアの媒介能に関するゲノム領域の解析等を実験室系統のヤブカおよびフィールド由来のヤブカを用いて行いました。またフィラリア汚染地域でのヒトスジシマカの採取とラボコロニー化を行いました。

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
- ・

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. 2022 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. Yuki Ishiguro, Motoki Sasaki, Emi Yamaguchi, Kotaro Matsumoto, **Shinya Fukumoto**, Hidefumi Furuoka, Kunitoshi Imai, Nobuo Kitamura. Seasonal changes of the prostate gland in the raccoon (*Procyon lotor*) inhabiting Hokkaido, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2023 Feb 10; 85(2): 214-225. PMID: 36596557
2. Yasunaga Yoshikawa, Shunta Kimura, Akira Soga, Makoto Sugiyama, Aki Ueno, Hiroki Kondo, Zida Zhu, Kazuhiko Ochiai, Kazuhiko Nakayama, Jun Hakozaki, Kodai Kusakisako, Asako Haraguchi, Taisuke Kitano, Koichi Orino, **Shinya Fukumoto**, Hiromi Ikadai. *Plasmodium berghei* Brca2 is required for normal development and differentiation in mice and mosquitoes. **Parasites & Vectors**. 2022 Jul; 15(1): 244. PMID: 35804459
3. 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 Jun; 84(6): 770-776. PMID: 35387920
4. Yui Honjo, **Shinya Fukumoto**, Hirokazu Sakamoto, Kenji Hikosaka. New PCR primers targeting the cytochrome b gene reveal diversity of *Leucocytozoon* lineages in an

individual host. Parasitology Research. 2022 Nov; 121(11): 3313-3320. PMID: 3612563

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 令和4年度 基盤研究(B) (一般) (文部科学省) 犬糸状虫を媒介しない蚊の創出に向けた病原体媒介機構の分子遺伝学的解析(22H02510)、代表、令和4年度～令和6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
3. 令和4年度 挑戦的研究(萌芽) 病原体を媒介しない蚊バイオリソース構築による犬糸状虫症制御基盤の創出(22K19235)、代表、令和4年度～令和5年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究(共同研究契約締結分)

1. フィラリアを媒介しない蚊作出に向けたタイ王国における犬糸状虫の生態疫学調査(チェンマイ大学)
2. マラリアの媒介メカニズムに関する研究(北里大学・東京農工大学)
3. フィラリアの媒介メカニズムに関する研究(藤田医科大学)

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

2. 主な研究テーマ

- ・ バベシア症などにおける宿主感染防御免疫機構の解明
- ・ バベシア症における自己免疫生貧血の分子機構の解明
- ・ バベシア症に対する治療法の開発
- ・ バベシア症に対する組換えワクチンの開発
- ・ 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. 2022 年度研究の総括

- ・ バベシア症は、動物や人に貧血など重症を引き起こす感染症であります。今日まで有効なワクチンがなく、最も一般的に使用されている制御戦略として化学療法が挙げられます。しかし、現在使用されている抗バベシア薬には副作用や薬剤耐性の問題が懸念されています。したがって、より効果的な新規治療薬開発が急務となっています。そこで、マラリア臨床試験中の化合物である MMV390048 (MMV) の *in vitro* 培養の *B. gibsoni*、および *in vivo* での *B. rodhaini* と *B. microti* に対する阻害効果を評価しました。その結果、いずれの虫体の増殖も顕著に抑制し、その標的遺伝子はホスファチジルイノシトール 4 キナーゼ (PI4K) であることを明らかにしました。また、MMV が現行のバベシア症治療薬であるアトバコン (ATO) の耐性株にも有効であることを実証した (論文リスト 5、12)。
- ・ マウスのバベシア症モデルを用いてバベシア感染に対する宿主防御免疫機構の解明を試みしました。マウスに *Babesia microti* (弱毒株、人バベシア症の原因病原体) を初感染させた後に、*Babesia rodhaini* (致死性強毒株) で再感染させると、完全な感染防御免疫が成立していることを証明しました。この感染防御免疫は初感染後 4 日後で成立することと、主要免疫担当細胞はマクロファージであることを明らかにした (論文リスト 14)。

- ・タンザニアとトルコにおける家畜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7、15、総説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

- ・国際シンポジウム「マダニとマダニ媒介感染症の制御戦略」（日本学術振興会拠点形成事業-アジア・アフリカ学術基盤形成型）（2022年10月5日、当センター）

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2022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, Souichirou Naomasa, Bumduuren Tuvshintulga, Nariko Sato, Kiyoshi Okado, Weiqing Zheng, Seung-Hun Lee, Juan Mosqueda, Hiroshi Suzuki, **Xuenan Xuan**, Rika Umemiya-Shirafuji. Identification and characterization of *Rhipicephalus microplus* ATAQ homolog from *Haemaphysalis longicornis* ticks and its immunogenic potential as an anti-tick vaccine candidate Molecule. **Microorganisms**. 2023 Mar; 11(4): 822. PMID: 37110244
2. Hang Li, Shengwei Ji, Eloiza May Galon, Iqra Zafar, Zhuowei Ma, Thom Do, Moaz M Amer, Yihong Ma, Junya Yamagishi, Mingming Liu, **Xuenan Xuan***. Identification of three members of the multidomain adhesion CCp family in *Babesia gibsoni*. **Acta Tropica**. 2023 Mar; 241: 106890. PMID: 36907290
3. Hejia Ma, Eloiza May Galon, Yanjun Lao, Ming Kang, **Xuenan Xuan**, Jixu Li, Yali Sun. De novo assembled transcriptomics assisted label-free quantitative proteomics analysis reveals sex-specific proteins in the intestinal tissue of *Haemaphysalis qinghaiensis*. **Infection, Genetics and Evolution**. 2023 Feb; 109: 105409. PMID: 36773671
4. Patrick Vudriko, Rika Umemiya-Shirafuji, Dickson Stuart Tayebwa, Joseph

- Byaruhanga, Benedicto Byamukama, Maria Tumwebaze, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki. Molecular characterization of octopamine/tyramine receptor gene of amitraz-resistant *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* ticks from Uganda. **Microorganisms**. 2022 Nov; 10(12): 2384. PMID: 36557637
5. Shengwei Ji, Eloiza May Galon, Moaz M Amer, Iqra Zafar, Masashi Yanagawa, Masahito Asada, Jinlin Zhou, Mingming Liu, Xuenan Xuan*. Phosphatidylinositol 4-kinase is a viable target for the radical cure of *Babesia microti* infection in immunocompromised hosts. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022 Nov; 12: 1048962. PMID: 36452305
 6. Mohammad Hazzaz Bin Kabir, Frances Cagayat Recuenco, Nur Khatijah Mohd Zin , Nina Watanabe, Yasuhiro Fukuda, Hironori Bando, Kenichi Watanabe, Hiroki Bochimoto, Xuenan Xuan, Kentaro Kato. Identification of potent anti-*Cryptosporidium* new drug leads by screening traditional Chinese medicines. **Plos Neglected Tropical Diseases**. 2022 Nov; 16(11): e0010947. PMID: 36441814
 7. Aaron Edmond Ringo, Hezron Emanuel Nonga, Eloiza May Galon, Shengwei Ji, Mohamed Abdo Rizk, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Uday Kumar Mohanta, Zhuowei Ma, Boniface Chikufenji, Thanh Thom Do, Xuenan Xuan*. Molecular investigation of tick-borne haemoparasites isolated from indigenous zebu cattle in the Tanga region, Tanzania. **Animals (Basel)**. 2022 Nov; 12(22): 3171. PMID: 36428398
 8. Sanghyun Lee, Yeonchul Hong, Dong-Il Chung, Hyung-Kwan Jang, Youn-Kyoung Goo, Xuenan Xuan*. Evolutionary analysis of *Babesia vulpes* and *Babesia microti*-like parasites. **Parasites & Vectors**. 2022 Nov; 15(1): 404. PMID: 36329533
 9. Eloiza May Galon, Rochelle Haidee Ybañez, Adrian Miki Macalanda, Giemelene Rose Estabillo, Margaret Therese Rose Montano, Marielle Danise Veedor, Anatolio Garvida, Ralph Joselle Fabon, Mary Ruth Callanta, Kim Joseph Labutong, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Shengwei Ji, Iqra Zafar, Adrian Ybañez, Xuenan Xuan*. First molecular identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* in goats from the Philippines. **Pathogens**. 2022 Sep; 11(10): 1109. PMID: 36297166
 10. Jiaying Guo, Furong Yang, Lingna Wang, Xuenan Xuan, Junlong Zhao, Lan He. A novel promising diagnostic candidate selected by screening the transcriptome of *Babesia gibsoni* (Wuhan isolate) asexual stages in infected beagles. **Parasites & Vectors**. 2022 Oct; 15(1): 362. PMID: 36217160
 11. Clara-Lee van Wyk, Khethiwe Mtshali, Moeti O Taioe, Stallone Terera, Deon Bakkes, Tsepo Ramatla, Xuenan Xuan*, Oriel Thekiso. Detection of ticks and tick-borne pathogens of urban stray dogs in South Africa. **Pathogens**. 2022 Jul; 11(8): 862. PMID: 36014983
 12. Shengwei Ji, Eloiza May Galon, Mohamed Abdo Rizk, Yunpeng Yi, Iqra Zafar, Hang Li, Zhuowei Ma, Aiko Iguchi, Masahito Asada, Mingming Liu, Xuenan Xuan*. Efficacy of

- the antimalarial MMV390048 against *Babesia* infection reveals phosphatidylinositol 4-kinase as a druggable target for babesiosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2022 Sep; 66(9): e0057422. PMID: 35924942
13. Maki Kuniyori, Nariko Sato, Naoaki Yokoyama, Shin-Ichiro Kawazu, Xuenan Xuan, Hiroshi Suzuki, Kozo Fujisaki, Rika Umemiya-Shirafuji. Vitellogenin-2 accumulation in the fat body and hemolymph of *Babesia*-infected *Haemaphysalis longicornis* ticks. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022 Jun; 12: 908142. PMID: 35800383
 14. Iqra Zafar, Eloiza May Galon, Daisuke Kondoh, Artemis Efstratiou, Jixu Li, Shengwei Ji, Mingming Liu, Yongchang Li, Yae Hasegawa, Jinlin Zhou, Xuenan Xuan*. The cross-species immunity during acute *Babesia* co-infection in mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022 May; 12: 885985. PMID: 35719355
 15. Shengwei Ji, Onur Ceylan, Zhuowei Ma, Eloiza May Galon, Iqra Zafar, Hang Li, Yae Hasegawa, Mutlu Sevinc, Tatsunori Masatani, Aiko Iguchi, Osamu Kawase, Rika Umemiya-Shirafuji, Masahito Asada, Ferda Sevinc, Xuenan Xuan*. Protozoan and rickettsial pathogens in ticks collected from infested cattle from Turkey. **Pathogens**. 2022 Apr; 11(5): 500. PMID: 35631021

総説

1. Eloiza May Galon, Iqra Zafar, Shengwei Ji, Hang Li, Zhuowei Ma, Xuenan Xuan*. Molecular Reports of Ruminant *Babesia* in Southeast Asia. **Pathogens**. 2022 Aug; 11(8): 915. PMID: 36015035
2. Mingming Liu, Ikuo Igarashi I, Xuenan Xuan*. *Babesia gibsoni*. **Trends in Parasitology**. 2022 Sep; 38(9): 815. PMID: 35339362.

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 26 回ポーランド寄生虫学会、バベシア症とマラリアの共感染モデルの確立と交差防御免疫機構、2022 年 9 月 14 日、ポーランド・オールシュティン

9. 獲得研究費

1. 令和 4 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 5 年度

2. 令和 4 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
3. 令和 4 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 4 年度
4. 令和 4 年度 基盤研究（B）（一般）（文部科学省）、犬バベシア症における宿主防御免疫機構の解明と新型組換えワクチンの開発、代表、令和 4 年度～令和 6 年
5. 令和 4 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 4 年度～令和 5 年度
6. 令和 4 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、犬バベシア症に対する分子標的治療法の開発、代表、令和 4 年度～令和 5 年度
7. 令和 4 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

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、2022 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、2022 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、2022 年 4 月 1 日～2023 年 3 月 31 日、2022 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～2023 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～2024 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～2024 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の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020年4月1日～2024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の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020年4月1日～2024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の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020年4月1日～2024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の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020年4月1日～2024年3月31日、研究拠点形成事業（アジア・アフリカ学術基盤形成型）（日本学術振興会）

1. 研究テーマの概要

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. 2022 年度研究の総括

- ・ *Babesia bovis* はウシのバベシア原虫の中で最も病原性の高い原虫です。*B. bovis* 感染赤血球はウシの脳毛細血管内皮細胞に接着することで血管を栓塞し、ウシに致命的な神経症状を引き起こしますが、そのメカニズムについては感染赤血球表面に局在する原虫由来の分子 VESA が関わるという知見しかありません。そこで、バベシア原虫による宿主赤血球の改変に焦点を当て、研究を進めています。今年度は昨年度に引き続き、私たちの発見した *B. bovis* DnaK, *B. ovata* MFS, VEAP について解析を進めると共に、感染赤血球側に局在するバベシア原虫分子として知られていた SBP(スフェリカルボディープロテイン)についても機能解析を開始しました。*B. ovata* MFS については機能解析を進め、プラストサイジン S の取り込みに関与することを示唆する結果を得ました(佐藤ら、第 92 回日本寄生虫学会大会)。また、*B. bovis* DnaK、*B. ovata* VEAP については局在解析を長崎大学の坂口美亜子博士と進めました。さらに、テキサス A&M 大学のハキミ・ハッサン博士とバベシア原虫による赤血球改変分子に関する総説を執筆しました(総説リスト 1)。
- ・ 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。今年度はタイ・チュラロンコン大学の Morakot Kaewthamasorn 博士と共にベクターの調査を進め、スイギュウのマラリア原虫、ヤギのマラリア原虫とも *Anopheles* 属の蚊がベクターである可能性が高いことを明らかにしました(論文リスト 2,3)。また、タイより特別研究学生を受け入れて、家畜の住血原虫検出法に関する共同研究を行いました(論文リスト 1)。

- ・その他にも原虫病研究センター共同研究において、チェコ・CAS から研究者を受け入れ、新たなバベシア原虫遺伝子組換え法の開発に取り組みました。

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

- ・ 第 91 回日本寄生虫学会大会 大会事務局. 2022 年 5 月. 帯広市
- ・ 第 29 回分子寄生虫学ワークショップ/第 19 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 世話人. 2022 年 8 月. 長崎市

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

6. 2022 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. Apinya Arnuphapprasert, Yudhi Ratna Nugraheni, Aung Aung, **Masahito Asada**, Morakot Kaewthamasorn. Detection of *Babesia bovis* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with improved thermostability, sensitivity and alternative visualization methods. **Scientific Reports**. 2023 Feb; 13(1): 1838. PMID: 36725982
2. Anh Hoang Lan Nguyen, Sittiporn Pattaradilokrat, Winai Kaewlamun, Osamu Kaneko, **Masahito Asada***, Morakot Kaewthamasorn*. Myzomyia and Pyrethophorus series of *Anopheles* mosquitoes acting as probable vectors of the goat malaria parasite *Plasmodium caprae* in Thailand. **Scientific Reports**. 2023 Jan; 13(1): 145. PMID: 36599869
3. Anh Hoang Lan Nguyen, Yudhi Ratna Nugraheni, Trang Thuy Nguyen, Aung Aung, Duriyang Narapakdeesakul, Winai Kaewlamun, **Masahito Asada***, Morakot Kaewthamasorn*. Molecular characterization of anopheline mosquitoes from the goat malaria-endemic areas of Thailand. **Medical and Veterinary Entomology**. 2023 Jan. PMID: 36598082
4. Shengwei Ji, Eloiza May Galon, Moaz M Amer, Iqra Zafar, Masashi Yanagawa, **Masahito Asada**, Jinlin Zhou, Mingming Liu, Xuenan Xuan. Phosphatidylinositol 4-

- kinase is a viable target for the radical cure of *Babesia microti* infection in immunocompromised hosts. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2022 Nov; 12: 1048962. PMID: 36452305
5. Shengwei Ji, Eloiza May Galon, Mohamed Abdo Rizk, Yunpeng Yi, Iqra Zafar, Hang Li, Zhuowei Ma, Aiko Iguchi, **Masahito Asada**, Mingming Liu, Xuenan Xuan. Efficacy of the Antimalarial MMV390048 against *Babesia* Infection Reveals Phosphatidylinositol 4-Kinase as a Druggable Target for Babesiosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2022 Sep; 66(9): e0057422. PMID: 35924942
 6. Shengwei Ji, Onur Ceylan, Zhuowei Ma, Eloiza May Galon, Iqra Zafar, Hang Li, Yae Hasegawa, Mutlu Sevinc, Tatsunori Masatani, Aiko Iguchi, Osamu Kawase, Rika Umemiya-Shirafuji, **Masahito Asada**, Ferda Sevinc, Xuenan Xuan. Protozoan and Rickettsial Pathogens in Ticks Collected from Infested Cattle from Turkey. **Pathogens**. 2022 Apr; 11(5): 500. PMID: 35631021
 7. Yudhi Ratna Nugraheni, Apinya Arnuphapprasert, Trang Thuy Nguyen, Duriyang Narapakdeesakul, Hoang Lan Anh Nguyen, Juthathip Poofery, Osamu Kaneko, **Masahito Asada**, Morakot Kaewthamasorn. Myzorhynchus series of *Anopheles* mosquitoes as potential vectors of *Plasmodium bubalis* in Thailand. **Scientific Reports**. 2022 Apr; 12(1): 6497. PMID: 35444253

総説

1. Hassan Hakimi, Junya Yamagishi, Shin-Ichiro Kawazu, **Masahito Asada***. Advances in understanding red blood cell modifications by *Babesia*. **Plos Pathogens**. 2022 Sep; 18(9): e1010770. PMID: 36107982

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. リーシュマニア症. 長崎大学熱帯医学研究所 熱帯医学研修課程 2022 年 4 月

8. 招待講演等

1. 動物やヒトの原虫病とその対策に向けた研究開発について. マーシャル・バイオリソース・ジャパン株式会社 第 29 回 AH (Animal Health) セミナー. 2022 年 9 月 16 日(オンライン講演)
2. *Babesia*. Workshop Gene editing & regulation in protozoan parasites & their vectors, University of Glasgow, UK. 2022 年 10 月 27 日 (オンライン講演)

9. 獲得研究費

1. 令和4年度 基盤研究(C) (一般研究) (文部科学省)、脳性バベシア症に繋がるバベシア・ボビスによる感染赤血球改変機構の解明(22K05982)、代表、令和4年度～令和7年度
2. 令和4年度 基盤研究(B) (一般研究) (文部科学省)、犬バベシア症における宿主防御免疫機構の解明と新型組換えワクチンの開発(22H02509)、分担、令和4年度～令和7年度
3. 令和4年度 基盤研究(B) (一般研究) (文部科学省)、牛小型ピロプラズマ病を引き起こす牛タイレリアの生体内増殖メカニズムの解明(22H02511)、分担、令和4年度～令和7年度
4. 令和4年度 基盤研究(B) (一般研究) (文部科学省)、原虫感染マダニにおける臓器特異的ピテロジェニンの機能解明(22H02512)、分担、令和4年度～令和7年度
5. 令和4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
6. 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
7. 長崎大学 熱帯医学研究拠点一般共同研究 新規バベシア原虫赤血球修飾分子 BbDnaK の局在・機能解析、代表、令和4年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

該当なし

13. 国内外との共同研究(共同研究契約締結分)

1. 宮崎 真也; 長崎大学熱帯医学研究所: 熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトの細胞接着に必要な表層分子の同定、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究
2. 山岸 潤也; 北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所: ヒト赤血球馴化 *Babesia microti* の作出と宿主域決定因子の解析、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究
3. Albert Mulenga; Texas A&M University: Establishment of split Cas9 for functional characterization of essential genes in *Babesia bovis*、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究

4. Daniel Sojka; Institute of Parasitology, Biology Centre CAS : Establishment of DiCre parasite lineages to study essential aspartyl peptidases of *Babesia*、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究
5. Morakot Kaewthamasorn; Chulalongkorn University : Identification of mosquitoes in goat farms and molecular screening of malaria parasite in mosquitoes、2022年4月1日～2023年3月31日、2022年度原虫病研究センター共同研究

1. 研究テーマの概要

哺乳動物体内に寄生するアフリカトリパノソーマの細胞表面は、強い抗原性を有する単一の糖蛋白質 (VSG) で覆われています。長年にわたり VSG を標的とするワクチンの開発が試みられてきましたが、同分子の易変異性が原因で今のところ成功していません。そこで我々はツェツェバエの体内に寄生するトリパノソーマの発育期、特にエピマスティゴート型虫体とメタサイクリック型虫体に着目し、これら 2 つの発育期におけるパラサイト vs ベクター相互作用メカニズムを分子レベルで解明することで、伝播阻止ワクチンやメタサイクロジェネシス阻害法を開発を目指しています。

安全な治療薬やワクチンが無いトリパノソーマ症の流行を阻止するには患者や患畜の早期診断と隔離（家畜の場合は殺処分）に頼るほかありません。加えてトリパノソーマ症は世界の貧しい国や地域で流行している感染症です。そこで我々は可能な限り簡便・安価で迅速かつ正確な診断法の開発と実用化を目指して研究を行っています。これまでに LAMP 法やイムノクロマトグラフィ法を応用した簡易迅速診断法を開発し、実用化することに成功しました。

Trypanozoon 亜属に分類される *Trypanosoma brucei*、*T. evansi*、*T. equiperdum* はそれぞれナガナ病、スーラ病、媾疫の病原体で、宿主特異性や好適寄生部位が異なります。伝播様式も異なっており、*T. brucei* はツェツェバエによる生物学的伝播、*T. evansi* はアブによる機械伝播、*T. equiperdum* は交尾で伝播します。近年、迅速な全ゲノム解読が可能となりこれらの原虫種のゲノム解読と相互比較が進んだ結果、これら 3 種はゲノムレベルでの差異が極めて少なく、別種に定義できないレベルであることが明らかとなりました。我々は「極めて近縁なこれら 3 種の宿主特異性、好適寄生部位、伝播様式が大きく異なっているのはなぜなのか？」という問いに解を見出すべく、フィールド調査で得られた知見や材料をもとに研究を進めています。

現在ヒトと動物のアフリカトリパノソーマ症には安全で完璧な治療・予防効果を示す薬がありません。一般的に新たな薬の実用化には莫大な費用と長い時間が必要なため、開発コストが回収できるマーケットが期待できない抗トリパノソーマ薬のような薬の開発は遅れているのが現状です。そこで我々はアカデミアからの地道な取り組みとして、トリパノソーマの培養系を駆使して既存の化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを実施し、治療薬・予防薬候補化合物の探索を行っています。

アフリカトリパノソーマはツェツェバエやアブなどの吸血性双翅目昆虫によって媒介されます。特に世界中に分布しているアブは *T. evansi* や *T. vivax* のベクターとして重要ですが、アフリカ大陸固有のツェツェバエに比べるとベクターとしての研究が立ち遅れています。加えてアブに刺咬されることによる家畜の生産性への悪影響も定量化する手段に乏しい現状です。そこで我々は

アブの刺咬が家畜の生産性に及ぼす影響の定量化や、アブ対策の効果測定を行うため、アブ刺咬歴を免疫学的手法で定量化する方法を研究しています。

2. 主な研究テーマ

- ・ トリパノソーマのパラサイトーベクター相互作用メカニズム解明
- ・ トリパノソーマ症の簡易迅速診断法開発
- ・ トリパノソーマの伝播様式、宿主特異性ならびに好適寄生部位の遷移機構解明
- ・ 抗トリパノソーマ薬候補化合物の探索
- ・ 吸血性双翅目昆虫による刺咬被害の定量化

3. 2022 年度研究の総括

- ・ 既存の化合物ライブラリーから約 1 万種類の異なる化合物を得てトリパノソーマに対する増殖阻害活性のスクリーニングを実施した結果、1%程度の化合物に強い増殖阻害活性があることを見出した。次年度はこれらの化合物のトリパノソーマ増殖阻害活性と動物細胞への影響を精査する予定。
- ・ 十勝南部の農場に設置したアブトラップを用いて約 2 万匹のアブを捕獲し、冷凍保存しておいたアブから優占種であるニッポンシロフアブを選択して唾液腺を摘出した。得られた唾液腺から粗抗原を調製し、次年度はアブトラップ設置農場で飼養されているウシの血液から血清を調製し、アブ唾液腺粗抗原を用いて抗アブ唾液腺抗体の検出を実施する予定。

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
- ・ 日本寄生虫学会評議員
- ・ 日本熱帯医学会

② 主催した学会、研究会等

該当なし

5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 国際獣疫事務局（WOAH）リファレンスラボラトリー「スーラ病」専門家
- ・ WOAH-Non Tsetse Transmitted Animal Trypanosomoses Network Expert
- ・ 北海道科学技術審議会委員
- ・ 北海道立総合研究機構研究評価委員会常任委員

6. 2022 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. Ai Yamazaki, Keisuke Suganuma, Mitsunori Kayano, Tomás J Acosta*, Tomoko Saitoh, Maria Fátima Rodríguez Valinotti, Antonio Rodríguez Sanchez, **Noboru Inoue**. Risk factors for equine trypanosomosis and hematological analysis of horses in Paraguay. **Acta Tropica**. 2022 Sep; 233: 106543. PMID: 35643185
2. Keisuke Suganuma*, David D N'Da, Ken-Ichi Watanabe, Yusuke Tanaka, Ehab Mossaad, Afraa Elata, **Noboru Inoue**, Shin-Ichiro Kawazu. Therapeutic efficacy of orally administered nitrofurantoin against animal African trypanosomosis caused by *Trypanosoma congolense* Infection. **Pathogens**. 2022 Mar; 11: 331. PMID: 35335655
3. Keisuke Suganuma*, Mitsunori Kayano, Katsuya 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 Feb; 86: 102476. PMID: 34610467
4. 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 Jan; 27: 100664. PMID: 35012722

総説

該当なし

著書

該当なし

7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. WOH 診断試料の提供「トリパノソーマ DNA」（令和 4 年度）：UAE および南アフリカに計 6 件
2. WOH 診断試料の提供「トリパノソーマ粗抗原」（令和 4 年度）：南アフリカに 1 件
3. WOH 診断に関するコンサルタント・情報提供「スーラ病」（令和 4 年度）：日本（動物検疫所ほか）、WOH アジア太平洋地域代表事務所、USA、インドネシア、中国へ計 10 件
4. WOH リファレンスラボラトリー「スーラ病」の活動報告書を WOH に提出（2022 年 3 月）
5. 基調講演「感染症の調査中に食した世界のごはん～食の安全・安心について感じたこと～」十勝消費者大会（中札内村）、2022 年 7 月 29 日

8. 招待講演等

該当なし

9. 獲得研究費

1. 令和5年度 基盤研究(B) (一般) (文部科学省) EMF 特異的ヘモグロビンレセプターから
紐解くトリパノソーマのベクター寄生戦略(23H02377)、代表、令和5年度~令和8年度

10. 特許申請・取得

該当なし

11. 学術に関する受賞状況

該当なし

12. 報道等

1. 十勝毎日新聞社「勝毎電子版ジャーナル」(2022年3月22日) 研究・教育でSDGs推進
畜大のビジョンを井上昇副学長に聞く【ちくだい×SDGs(1)】
<https://kachimai.jp/article/index.php?no=202231520251>

13. 国内外との共同研究(共同研究契約締結分)

該当なし

9. 共同研究成果報告書

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-1		
研究部門	創薬研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	トキソプラズマ感染における頭頸部感覚器フェロトーシスの研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	かねこ ひろき 兼子 裕規	名古屋大学医学部医学系研究科・准教授	
研究分担者	しみず ひでゆき 清水 英幸	名古屋大学医学部附属病院眼科・病院助教	
	たざき あきら 田崎 啓	名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学・講師	
	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	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>申請者は現在、細胞死の新概念であるフェロトーシスの中枢神経・頭頸部感覚器における重要性を「網膜フェロトーシス」という新概念を提唱することで研究報告しており、その一環として、寄生虫眼感染を主軸として網膜細胞死におけるフェロトーシスの関与を科学的に証明することに挑戦している。本研究では、『眼内液中 Fe 濃度の低下』の背景にある『網膜フェロトーシス』という生物学的変化をヒト・実験動物・培養細胞で証明し、フェロトーシスを制御することによる頭頸部感覚器障害の抑制に挑戦する。</p>		
研究経過の概要	<p>研究は順調に進められ、論文発表に必要な実験計画の半分以上は順調に揃っている。また競争的研究費獲得として科研費基盤 C を獲得した。</p> <p>研究課題: 寄生虫感染とシリコンオイル使用眼で観察される網膜障害の原因はフェロトーシスか？</p> <p>研究代表者: 兼子裕規 研究分担者: 西川義文ほか2名 研究期間: 2022/04/01 – 2025/03/31</p> <p>AMED: 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」は 2023 年度不採択となったが、2024 年度に再度申請する。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>これまでに以下の内容について研究成果を得ており、今後追加実験を行い論文発表する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・トキソプラズマ感染ヒト硝子体液中の Fe 濃度低下に対し、ウイルス性網膜炎のヒト硝子体液中では Fe 濃度は低下していなかった。 ・数十年前に摘出されたヒト眼球から得られた網膜切片から Berlin Blue 染色・レーザアブレーション ICP 質量分析 (LA-ICP-MS) 法で Fe が検出された。 ・トキソプラズマ感染マウスに安定同位体 Fe57(自然界に存在する Fe の 90%は Fe56 であるのに対し Fe57 は 2%しか存在しないため、体外から投与するとトレーサーとして動態解析できる)を投与し、そのマウス網膜切片から LA-ICP-MS 法での Fe57 が有意に多く検出された。 ・ Fe キレート剤をトキソプラズマ感染マウスに投与したところ、トキソプラズマ網脈絡膜炎が軽減された。
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>研究論文は特許出願完了の後に投稿する方針で進めてきており、現在投稿に向けて準備している。</p> <p>投稿予定 Journal: Redox Biology</p> <p>論文発表に先立って特許出願は完了した。</p> <p>特願 2022-178619</p> <p>【発明の名称】微生物性眼疾患の検査技術、微生物性眼疾患治療薬</p> <p>出願者: 兼子裕規・西川義文ほか2名</p> <p>施設: 名古屋大学・帯広畜産大学</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-2		
研究部門	創薬研究部門	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	妊娠期のトキソプラズマ感染防御における $\gamma\delta T$ 細胞の役割の解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	はせ こうじ 長谷 耕二	慶應義塾大学薬学部生化学講座・教授	
研究分担者	すずき こういちろう 鈴木 功一郎	慶應義塾大学薬学部生化学講座・特任助教	
	きなし ゆうすけ 木梨 祐輔	慶應義塾大学薬学研究科生化学講座・博士課程大学院生	
	とりうみ ひろき 鳥海 広暉	慶應義塾大学薬学研究科生化学講座・修士課程大学院生	
	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>母体-胎児のインターフェース(母子境界面)に存在する子宮免疫系は、外来微生物に対する生体防御を発動する一方で、胎児に対しては免疫寛容を発動するよう厳密に調節されている。子宮免疫系の特徴として、T細胞の大部分を特殊なT細胞サブセットである $\gamma\delta T$ 細胞が占めることが挙げられるが、その生理的意義については不明である。そこで、妊婦への感染によって垂直感染を引き起こすトキソプラズマ感染実験を共同研究として実施することで、妊娠時感染防御における $\gamma\delta T$ 細胞の重要性を検証する。</p>		
研究経過の概要	<p>これまでに、$\gamma\delta T$ 細胞を欠損する <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスを用いて、妊娠時の感染実験4回(3回は出産時の表現型を観察、1回はメカニズム解析のため出産直前に剖検)に加え、非妊娠時に感染させる実験も実施している。妊娠時に感染させる実験では毎回 <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスが出産中に死亡するという再現性の高い結果が得られており、メカニズムの解析に着手している。</p> <p>以上の研究により、母子境界面 $\gamma\delta T$ 細胞の重要性を示唆する結果が得られており、研究は概ね順調に進捗している。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>妊娠時感染防御における $\gamma\delta T$ 細胞の役割を調べるために、野生型および <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスをそれぞれ交配しプラグが確認された個体に、<i>Toxoplasma gondii</i> を感染させた。その結果、野生型マウスと <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスで <i>T. gondii</i> 感染後の臨床スコアには有意な差は認められなかった。しかし、全ての野生型マウスが全胎児を分娩しその後も生存したのに対して、<i>Tcrd</i>^{-/-}マウスでは約 3 割の個体が難産により出産中に死亡した。この時 <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスの子宮では胎盤遺残が認められた。また、母親と出生後の子の脳内の <i>T. gondii</i> を定量したところ、母親の脳では野生型マウスと <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスで差がなかったのに対して、子の脳の <i>T. gondii</i> は <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスで多い傾向にあった。</p> <p>一方、非妊娠下で <i>T. gondii</i> を感染させた場合は、雌雄ともに、野生型マウスと比べて <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスでは臨床スコアが低い傾向にあった。</p> <p>以上の結果より、子宮や脱落膜に存在する $\gamma\delta T$ 細胞が母子境界面局所におけるトキソプラズマの排除や組織修復に関与しており、妊娠中のトキソプラズマ感染から母子を保護している可能性が示唆された。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>2022 年度帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究成果報告会にて発表</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

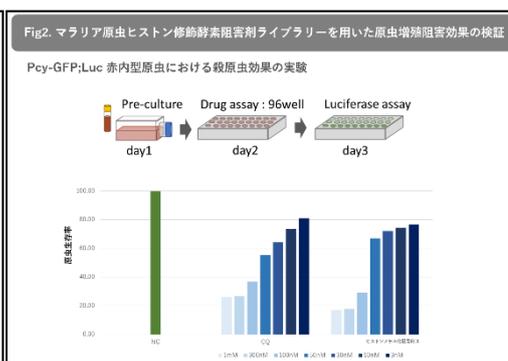
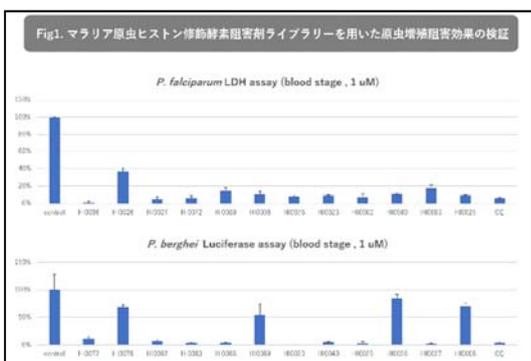
2023年5月30日

採択番号	2022-共同-3		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津 信一郎
研究課題名	ヒストン制御機構に着目した新規抗マalaria化合物のスクリーニングと原虫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	
	あらか 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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>本研究では、新規抗マalaria化合物のスクリーニングのためにヒストン制御機構に着目し、原虫の肝内型ステージの休眠期と増殖期におけるメカニズムの解明と、それらを用いた際の原虫オルガネラの三次元構造解析を実施する。申請者らが既に作製に成功した可視化サルマalaria原虫 <i>Plasmodium cynomolgi</i> (Pcy-GFP;Luc)株と可視化ネズミマalaria原虫 <i>P.berghei</i> (Pb-GFP;Luc)株を使用し、培養肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 感染実験系によりルシフェラーゼアッセイを用いた薬物感受性試験を行う。また、化合物における原虫の増殖機構への影響を詳細に評価するために、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、化合物環境下の原虫オルガネラの三次元構造解析を試みる。</p>		
研究経過の概要	<p>新型コロナウイルス感染症の影響で実験用アカゲザルの搬入が遅れ、当初の予定より実験の進行が遅れた。2023年3月現在アカゲザルへの感染実験を遂行中であり、肝内型原虫における化合物ライブラリーを用いたスクリーニング実験を随時実施する予定である。そのため、本年度は関連実験として <i>in vitro</i> 培養系で維持が可能な <i>P.berghei</i>と <i>P.falciparum</i>を用いた赤内型におけるスクリーニング実験を実施した。実験に使用したライブラリーは、セレックバイオテック社より選定したで原虫ヒストン修飾酵素阻害化合物全200種類である。結果、<i>P.falciparum</i>では、200化合物中34化合物で既存の薬と同程度または、それ以上の効果を示すものが明らかとなった。また、<i>P.falciparum</i>において非常に原虫阻害効果の高かった化合物13種類を用いて <i>P.berghei</i>への増殖阻害効果を確認したところ、驚いたことに原虫阻害効果が殆どない化合物も認められた(Fig1)。本実験により、原虫種によって各々のヒストン修飾酵素は、異なる働きを持つことが示唆された。</p>		

研究成果の概要

更に我々は、*P. cynomolgi* に関しても赤内型におけるスクリーニング実験に向けた *in vitro* 培養系を構築した。これまで、*P. cynomolgi* (B株) においては、赤内型の *in vitro* 培養系が存在せず、薬剤スクリーニング実験の実施が非常に困難であった。そこで、今回我々の作製した luciferase 発現株 Pcy-GFP;Luc 株を使用して構築した短時間培養系から、*P. cynomolgi* の薬剤感受性の実験の樹立に成功した。原虫の増殖の阻害効果の指標には、luciferase signal を用いて、luciferase assay による測定を行った。この実験系から本実験では、既存の抗マalaria薬である CQ (chloroquine) とヒストンメチル化酵素阻害剤 X を用いて *P. cynomolgi* の原虫増殖阻害効果を確認した。結果、CQ においてもヒストンメチル化酵素阻害剤 X においても非常に低濃度で原虫を殺滅することが明らかとなった。

また、肝内型原虫においても *P. berghei* を使用して同阻害化合物ライブラリーを用いたスクリーニング実験を開始しており、非常に興味深いデータを得ている。*P. cynomolgi* に関しても、スポロゾイトの調整が完了次第随時、肝内型原虫における本ライブラリーを用いたスクリーニング実験を開始する予定である。今後、本研究の遂行により、休眠期原虫の再活性化機序の分子トリガーが明らかとなれば、殺原虫活性を有する新たな化合物スクリーニングを実地できる可能性があり、マalariaの創薬科学に大きく貢献することが出来る。



研究成果の発表

学会発表

1. 荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、梅木優子、立石祐樹、中野由美子、岡本宗裕、保富康宏、久枝一、案浦健「可視化マalaria原虫を用いた休眠・増殖の分子機構と創薬基盤の構築」帯広畜産大学原虫病研究センター2022 年度共同研究報告会(帯広:2023 年 3 月)
2. 荒木球沙、川合覚、梅木優子、立石祐樹、中野由美子、岡本宗裕、保富康宏、久枝一、案浦健「マalaria原虫・肝臓内休眠体ステージの解析を目的とした可視化原虫株の開発(1)～可視化原虫株の作製、全発育期における確認、*in vitro* 解析、創薬開発への発展性～」第 92 回日本寄生虫学会大会(金沢:2023 年 3 月)
3. 荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡を用いたマalaria原虫オルガネラの三次元構造解析」第 28 回分子寄生虫ワークショップ/第 18 回分子寄生虫マalaria研究フォーラム合同大会

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月31日

採択番号	2022-共同-4		
研究部門	創薬研究部門	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>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。潜伏感染の成立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、潜伏感染を制御する手法につながる。R3年度までにゲノム編集後の継代期間を最小限にして変異原虫の混合ポピュレーションを効率的に樹立する方法を確立し、NGSを用いたポピュレーション解析の感度を感染臓器中の原虫材料に適用可能なレベルまで向上させた。R4年度はマウス感染モデルにおける各感染時期、感染臓器ごとの変異原虫ポピュレーションを追跡し、原虫因子機能の時空間的な解析技術の構築を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p><u>①NGSによるポピュレーション追跡手法の実践</u> 遺伝子変異を保有する原虫と野生型の原虫集団が潜伏感染期のマウス脳でどのように集団構成を変化させるかを R3年度に引き続き感染マウスの個体数を増やして実施した。感染期間に依存した変化より感染マウスごとの差が大きく、脳に到達する原虫集団は厳しいボトルネックを経験していることが判明し、ポピュレーション追跡を潜伏感染解析に用いる際の課題を明確にした。</p> <p><u>②NGSによるポピュレーション追跡手法の改良</u> 潜伏感染のみで機能する原虫因子について本手法での解析が不向きであることが①でしめされたことから、解析の焦点を急性期と潜伏期のいずれでも影響の出る因子 <i>myr1</i>へ変更した。また、既存の KO 株に適用可能とするため、病原性に影響のない <i>uprt</i> 遺伝子にバーコードを埋め込み、感染マウス個体内で詳細な原虫動態を追跡可能とした。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>① <u>NGSによるポピュレーション追跡手法の実践</u></p> <p>急性感染期におけるポピュレーション追跡 親株と TgGP 変異原虫を混合して感染させたマウスから回収した臓器(心、肝、肺、腎)で PCR により変異アリルを増幅し、上記 2 株の割合の増減を観察した。本実験では潜伏感染を成立させるために原虫投与量を少なく設定している。そのため急性期における臓器中の原虫数も少なく、PCR のバイアスは避けられないものの、各臓器から抽出した DNA では上記 2 株の割合は同程度に検出されたため、急性感染期において本遺伝子の変異が影響ないという従来の報告と一致する結果を得た。</p> <p>潜伏感染期におけるポピュレーション追跡 R3 年度に実施していた潜伏感染期における 2 株の割合変動について、マウス個体数を増やして解析した。感染マウス個体ごとのばらつきは再現性がとれ、潜伏感染を成立させた原虫には強いボトルネック効果がかかっていることが改めて確認された。この傾向は 2022 年に Child 等のグループから報告された 96 種類のバーコードを付けた野生株原虫の <i>in vivo</i> での動態解析における潜伏感染移行の際のボトルネック効果と一致しており、ポピュレーション追跡手法を潜伏感染の評価に用いるために解決すべき課題であることが示唆された。</p> <p>② <u>NGSによるポピュレーション追跡手法の改良</u></p> <p>解析の焦点を潜伏期においてシスト形成が全くない、かつ、急性期での宿主体内増殖にも影響が見られる遺伝子にシフトし、急性期のどの段階で影響があり結果的に潜伏感染に至らないのかを解析する手法の開発を目指した。</p> <p>モデル遺伝子として IFN-gamma による抗原虫効果を阻止するエフェクター群の分泌を司る <i>myr1</i> 遺伝子を選択した。<i>myr1</i> の KO および HA タグ付き <i>myr1</i> で相補した株を作成した。KO 株と相補株を混合したポピュレーションを詳細に追跡可能とするため、R3 年度に構築した迅速バーコード技術を用いて、<i>in vivo</i> での増殖に影響がない <i>uprt</i> 遺伝子座にそれぞれの細胞を識別するための 10 塩基のインデックスを挿入した。導入されたインデックスの多様性は、すべての実験群において 10^6 程度の原虫に対して 5000 を超えており、<i>in vivo</i> において混合集団内のポピュレーション変動を超並列に実施可能となる。今後はこの技術でバーコードを付けた原虫集団を混合してマウスに感染させ、急性感染期から脳に到達して潜伏感染を成立させる段階のどこで <i>myr1</i> ノックアウト原虫の割合が変動するかを解析していく。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>特記事項なし</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月3日

採択番号	2022-共同-5		
研究部門	国際連携協力部門	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	熱帯熱マalaria原虫ガメトサイトの細胞接着に必要な表層分子の同定		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	みやざき しんや 宮崎 真也	長崎大学熱帯医学研究所細胞環境構築学分野・助教 実験の実施、研究の総括	
研究分担者	Blandine Franke- Fayard	Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, The Netherlands. Assistant Professor 熱帯熱マalaria原虫の遺伝子改変・細胞接着に関する技術提供	
	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 (役割分担) 考察、マalaria原虫の細胞接着に関する技術提供	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>本研究の目的は、熱帯熱マalaria原虫のガメトサイトがヒト骨髄の中に潜伏するために必要な原虫分子を同定することである。マalariaは熱帯地域で蚊により媒介され、甚大な数の感染者・死者を出す原虫感染症である。その病原体である熱帯熱マalaria原虫は、ヒト赤血球内で増殖する一方で、一部の原虫はガメトサイトと呼ばれる形態へと分化しヒトから蚊へと伝播する。熱帯熱マalaria原虫が赤血球内で増える際には、その感染赤血球は末梢の血管系の中に滞留するが、ガメトサイト感染赤血球は骨髄の中の微小環境に潜伏する。この潜伏過程では、ガメトサイト感染赤血球の表面に発現する表層分子を介した骨髄中の間葉系細胞への接着が起こると考えられている。しかしながら、骨髄中の細胞への接着に関与する原虫分子の実体は未同定である。この不明点を明らかにするために、遺伝子ノックダウンの手法と骨髄間葉系幹細胞の系を用いて、ガメトサイト期の細胞接着に必要な原虫分子を同定する。本研究によりガメトサイトの骨髄潜伏の分子基盤が明らかになり、ガメトサイト生物学・抗マalaria薬開発における新機軸が打ち出される。</p>		
研究経過の概要	<p>本研究計画では熱帯熱マalaria原虫ガメトサイトのヒト細胞への接着メカニズムを解明するために、以下の複数のアプローチで研究を行った。</p> <p>① <u>ガメトサイト感染赤血球の表層分子の遺伝子改変および発現・局在解析</u></p> <p>本研究ではガメトサイト細胞表層への局在が確認されている6種類の遺伝子を選定し、ノックダウン原虫を作出する。本研究では、これら6種類の遺伝子ノックダウン用のプラスミドを作出し、そのうちのひとつを熱帯熱マalaria原虫NF54株にトランスフェクションした。薬剤選択を行うことでプラスミドを保持する原虫の作出に成功し、現在多段階の薬剤選択を進めて目的のノックダウン原虫の作出を行っているところである。</p>		

	<p>② 熱帯熱マalaria原虫遺伝子改変レポーターラインの性状解析 ガメサイト期研究のための新たなツールとなるレポーターラインの開発研究に従事した。本研究では、以前に作出した GFP-NanoLuc 発現熱帯熱マalaria原虫の性状解析を行い、この原虫がガメサイト期での薬剤アッセイに使用できることを示した。</p> <p>③ ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養系および接着アッセイのセットアップ ヒト体内では、熱帯熱マalaria原虫ガメサイトはヒトの骨髄間葉系幹細胞に接着することが示唆されている。この現象を <i>in vitro</i> で再現するために、市販の骨髄間葉系幹細胞を入手し研究室で培養系を立ち上げた。また、不死化した骨髄間葉系幹細胞も入手することができ、この細胞も順調に培養することができた。これらの細胞を使った熱帯熱マalaria原虫ガメサイト接着アッセイを構築中である。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>本研究では、熱帯熱マalaria原虫ガメサイト感染赤血球の表層分子の遺伝子改変原虫の作出を進めた。また、これと並行して新たなレポーターラインの開発研究を行い論文発表の準備を進めた。さらに、ガメサイトのヒト細胞への接着アッセイ系の構築を志向して、ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養系を構築した。本研究成果により、ガメサイトのヒト細胞への接着の分子基盤が明らかになると期待される。</p> <p>以下に発表予定の原著論文の概要を記載する。 【概要】 ルシフェラーゼを発現するマalaria原虫は、抗マalaria化合物の評価に広く利用されている。我々は、マalaria原虫の複数のステージに有効な新規抗マalaria薬をスクリーニングするために、ライフサイクル全体を通して NanoLuciferase (NanoLuc) を構成的に発現する新規熱帯熱マalaria原虫レポーターラインを作成した。NanoLuc を発現するレポーターラインは赤内期、ガメサイト、蚊、肝臓の各ステージで定量的な NanoLuc シグナルを示した。また、化合物の抗マalaria活性を赤内期、ガメサイト、肝臓の段階で評価するアッセイ系を確立し、いくつかの抗マalaria化合物の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) 値を決定しました。この堅牢なハイスループット・スクリーニング・システムの開発を通じて、赤内期の寄生虫を死滅させる抗マalaria化合物を同定した。本研究は NanoLuc レポーターラインの有用性を明らかにするものであり、ヒトマalaria原虫を標的とする化合物の多段階スクリーニングにより抗マalaria薬開発を促進することができる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>【原著論文】 A versatile <i>Plasmodium falciparum</i> reporter line expressing NanoLuc enables highly sensitive multi-stage drug assays. Miyazaki Y*, Vos MW, Geurten FJA, Bigeard P, Kroeze K, Yoshioka S, Arisawa M, Inaoka DK, Soulard V, Dechering KJ, Franke-Fayard B, <u>Miyazaki S*</u> <i>Communications Biology</i>. In press. * Corresponding author</p> <p>【学会発表など】 1. オンラインセミナー熱研夏塾 2022「感染症研究のキャリアパス」(長崎大学アウトリーチ活動) 「マalaria原虫がヒト・蚊に寄生する仕組みに魅せられて」宮崎真也 2. 招待講演: 第 95 回日本生化学会大会シンポジウム「若手研究者が切り拓く生化学の学際的フロンティア」 「創薬・ワクチン開発のための遺伝子組み換えマalaria原虫レポーターライン」宮崎真也</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月26日

採択番号	2022-共同-6		
研究部門	国際連携協力部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と 構成膜脂質のナノスケールレベルでの分布解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふじた あきかず 藤田 秋一	鹿児島大学共同獣医学部・教授	
研究分担者	まさたに たつり 正谷 達膳	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>酵母の遺伝的解析研究によって動物細胞でもオートファジー制御機構の詳細が明らかにされてきた。最近、同じ真核生物であるトキソプラズマについても、ミトコンドリア維持あるいは細胞分裂にオートファジーの関与が示唆されているが、哺乳類細胞など一般生物との違いが多く、その詳細は不明である。本研究では、申請者らが開発した急速凍結・凍結割断レプリカ法および免疫電子顕微鏡技術を駆使し、トキソプラズマのオートファゴソームの微細構造およびそれを形成する脂質膜を破壊すること無く可視化し、さらに構成する脂質成分の特定を行う。その成果に基づき、原虫におけるオートファジーの機能解明を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>申請者らは、急速凍結・凍結割断レプリカ標識(QF-FRL)法によってグリセリン脂質の一つであるホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)と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, 2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。</p>		

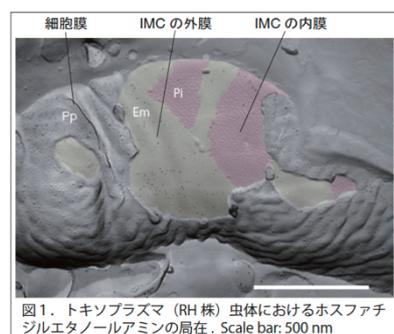


図1. トキソプラズマ (RH株) 虫体におけるホスファチジルエタノールアミンの局在. Scale bar: 500 nm

<p>研究成果の概要</p>	<p>我々は脂質の超微局在を明らかにすることが、膜脂質の機能を解明するために必須であると考え、そのための方法開発に注力してきた。その結果、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法(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であるホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn, 図1) およびホスファチジルセリン (PtdSer, 図2) の微細分布を明らかにした。<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。PtdSer に対し、PtdEtn では、細胞膜よりも IMC 膜の方が標識が多く、全ての膜で外葉の方が標識密度が高いものであった。RH 株と PLK 株を比較した場合、PtdSer については、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。また、PtdEtn については、全ての膜において 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 および PtdEtn の発現量はその感染性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。</p> <div data-bbox="810 315 1401 842" style="text-align: center;"> <p>図2. トキソプラズマ (RH株) 虫体におけるホスファチジルセリンの局在 Scale bar: 500 nm</p> </div>
<p>研究成果の発表</p>	<p>Rikako Konishi, Kayoko Fukuda, Sayuri Kuriyama, Tatsunori Masatani, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita, Unique asymmetric distribution of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in <i>Toxoplasma gondii</i> revealed by nanoscale analysis, <i>Histochem. Cell Biol.</i> 2023, in press.</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月6日

採択番号	2022-共同-7		
研究部門	国際連携協力部門	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	ヒト赤血球馴化 <i>Babesia microti</i> の作出と宿主域決定因子の解析		
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 (役割分担) 変異原虫のゲノム、トランスクリプトーム解析	
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 (役割分担) パベシア原虫の非固有宿主への馴化	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p><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。しかしながら、ヒト赤血球を用いた <i>in vitro</i> 培養系がないため、ヒトにおける感染性と病原性に関与する分子メカニズムの解明は進んでいない。そこで、赤血球の一部をヒト赤血球に置換した SCID-Bo-RBC マウスを用いたヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出について、昨年度の原虫病研究センター共同研究から継続して実施している。本年度は、条件の最適化を進めると共に、馴化に成功した場合は、馴化に関わるゲノムおよびトランスクリプトーム変異の特定を試みる。また、馴化がうまくいかない場合に備え、既に馴化に成功している <i>B. bovis</i> について、宿主域拡大に関わる原因遺伝子の特定と機能解析、および、当該遺伝子発現亢進に関与することが考えられるメタゲノム解析をおこない、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> 導出の参考とする。</p>		
研究経過の概要	<p><i>B. microti</i> のヒト赤血球馴化について、SCID マウスにて増殖・調整した Peabody 株を、DNA 変異導入剤で処理した後、マウス赤血球の大半をヒト赤血球に置換した SCID-Hu-RBC マウスに接種した。接種 11 日後にパラシテミアの上昇が確認されたが、ヒト赤血球はほとんど見当たらず、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出には至らなかった。</p> <p>昨年度の共同研究で、ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> で、メロゾイト表面抗原分子 (MSA2a) の転写が特異的に亢進することを見出した。そこで、この遺伝子を過発現させることで、ヒト赤血球感染能を獲得できるか検証する目的で、組換え原虫を作成し、アピカルエンドへの局在を確認した。今後、ヒト赤血球への感染性の有無を確認する。</p> <p>MSA2a に代表される遺伝子発現変動の原因として、ゲノム DNA 変異が疑われたが、全ゲノム解析により、馴化株と親株のゲノムが同一であることが示された。そこで、DNA メチル化に着目し、nanopore シーケンサーにより解析したところ、馴化株では、5mC の割</p>		

	<p>合が減少する一方、5hmC の割合が増加していた。確認のため、バイサルファイト法で追試したが、本法ではメチル化は認められず、矛盾した結果となった。今後、ヒストンアセチル化の解析と、未知の DNA 修飾が介在する可能性について検討する。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>① SCID-Hu-RBC マウスを用いたヒト赤血球馴化</p> <p>摘脾した SCID マウスを用意し、ヒト赤血球を隔日で腹腔内投与することにより、マウス赤血球の大半をヒト赤血球に置換した SCID-Hu-RBC マウスを作製した。同時に <i>B. microti</i> Peabody 株を SCID マウスに接種し、パラシテミアが約 15% になった所で心採血を行い、ゲノムに変異を導入するため N-ニトロソ-N-エチル尿素 (NEU) 2mM 入り GIT 培地にて 8 時間培養を行った。NEU 処理群並びにコントロールとして培地のみで培養した未処理群をそれぞれ 2 頭の SCID-Hu-RBC マウスに接種した。原虫接種 11 日後にパラシテミアの上昇が確認されたため、血液塗抹標本を作製し、抗マウス赤血球抗体を用いた間接蛍光抗体法にてマウス赤血球を染色し、ヒト赤血球に寄生する <i>B. microti</i> を探したが、ヒト赤血球がほとんど見当たらず、ヒト赤血球に馴化した <i>B. microti</i> は観察されなかった (図 1)。本実験は更なる条件検討が必要と考えられる。</p> <p>② <i>B. bovis</i> のヒト赤血球馴化に関わる遺伝子の機能解析</p> <p>昨年度の共同研究で作製したヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> を用いたゲノム・トランスクリプトーム解析から、バベシア原虫のヒト赤血球馴化に関わる候補分子が 2 種類同定されたため、その内の 1 つ (MSA2a:メロゾイト表面抗原分子の 1 種) について解析を進めた。本分子は MSA ファミリーの 1 つであり、ヒト赤血球馴化株において mRNA 発現量の亢進が見られたが、詳しい機能解析は行われていなかった。そこで、Myc タグ配列を付加した本分子を過発現する組換え <i>B. bovis</i> を作出した。得られた組換え原虫に対し、抗 Myc 抗体を用いた間接蛍光抗体法を行ったところ、原虫のアピカルエンドに局在が観察され、過発現が確認されると共に、アピカルエンドのオルガネラからメロゾイト表面に分泌される分子であることが示唆された (図 2)。今後過発現原虫において、ヒト赤血球への侵入・発育能向上が見られるか解析を進める予定である。</p> <p>③ <i>B. bovis</i> のヒト赤血球馴化に関わるエピゲノム制御の解析</p> <p>昨年度の共同研究では、導出したヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> のゲノムが親株と同一であることを全ゲノム解析により明らかとした。一方、トランスクリプトームには差異が認められたため、馴化にはゲノム変異によらない遺伝子発現制御、すなわち、エピゲノムの関与が示唆された。そこで、nanopore シーケンサーがメチル化修飾の有無も判定できることに着目し解析を行ったところ、馴化株では、5mC の割合が減少する一方、5hmC の割合が増加しており、メチル化修飾の転写制御への関与が疑われた。そこで、バイサルファイト法でメチル化修飾の確認を試みたが、本法ではメチル化は認められず、矛盾した結果となった。今後、ヒストンアセチル化の解析と、未知の DNA 修飾が介在する可能性について検討する。</p> <p>上記の結果をふまえ、今後の SCID-Hu-RBC マウスを用いたヒト赤血球馴化については、馴化に長期間を要する可能性を想定し、<i>B. microti</i> 感染後、継続してヒト赤血球を追加する系を検討する他、DNA に変異を誘導するのではなく、ヒストン脱アセチル化阻害剤の添加によりエピジェネティクス制御を攪乱することで、馴化の可能性を高めることが可能か検討する。</p>

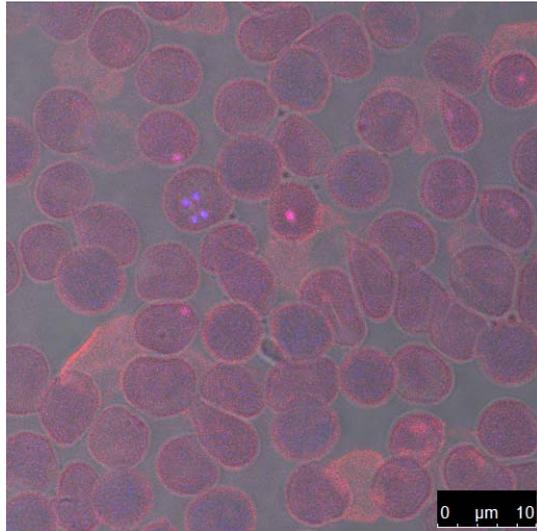


図 1. *B. microti* 感染 SCID-HuRBC マウス

赤色蛍光:マウス赤血球を示す。青色蛍光:*B. microti* の核が染色されている。*B. microti* の増殖が見られた時点でヒト赤血球はほとんど消失していた。

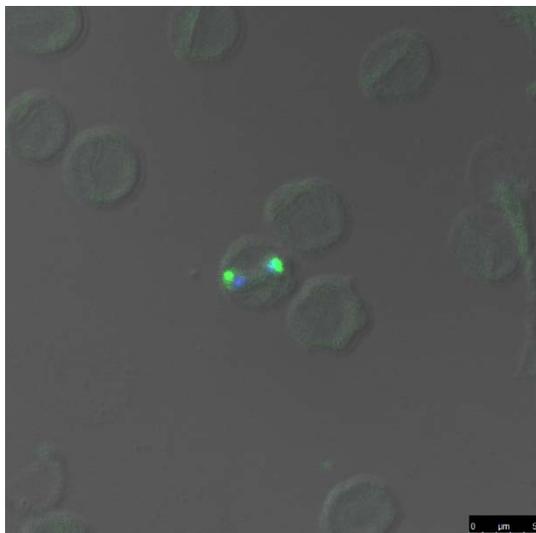


図 2. MSA2a の局在観察。緑色蛍光:Myc タグ付加した MSA2a。青色蛍光:核染色。アピカルエンドに局在していることがわかる。

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

2023年6月7日

採択番号	2022-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	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>ハマダラカがマラリア原虫の感染を受けるオーカイネートからオーシスト形成期は原虫数が最も減少し、原虫感染に対して最も重要な防御免疫応答を起こす時期である。</p> <p>様々な節足動物において、病原微生物に対する感受性雌雄差が報告されている。申請者はハマダラカにもマラリア原虫感受性の雌雄差があるとの仮説を立て、その立証を試みた。オーカイネートのマイクロインジェクションにより、本来吸血をしない雄に対しマラリア原虫を感染させることに成功した。次にオーシスト数を指標として雌雄ハマダラカのマラリア原虫感染表現型を解析した。その結果、雄ハマダラカが雌と比較し、高いマラリア原虫感受性を持つことを明らかにした。</p> <p>以上の結果を踏まえ、本研究では原虫感染時の雌雄ハマダラカ遺伝子シグナル応答を比較解析し、マラリア原虫の感受性を規定する因子を同定、そのメカニズムを解明することを目的とする。</p>		
研究経過の概要	<p>①オーカイネートのインジェクション感染モデルにより、雄ハマダラカが雌と比較しマラリア原虫に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。②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。③雄蚊での発現変動が $fc \geq 10$ の 5 遺伝子のうち 3 遺伝子について、雌蚊の感染血吸血時と非感染血吸血時で遺伝子変動を比較したところ、雌蚊においてもそれら遺伝子発現に差がみられた。④加えて、オーカイネートの中腸細胞の通過および吸血血液がオーシスト分化にどのような影響を与えるかを検討した結果、オーカイネートによる中腸細胞の通過の有無はオーシストの大きさに影響せず、吸血血液はオーシスト形成(大きさ)に影響する因子が</p>		

	存在することが示された。
研究成果の概要	<p><i>P. berghei</i> のオーカイネートのインジェクション感染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た。オーシストの大きさを比較すると、インジェクション後 12 日目から 14 日目において雄蚊の方が雌蚊よりオーシスト径が大きかった。さらに、オーカイネートのインジェクション感染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、マウスへの感染が確認されスポロゾイトに感染性があることが示された。</p> <p>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った。さらに、雄蚊での発現変動が $fc \geq 10$ の 5 遺伝子のうち 3 遺伝子について、雌蚊の感染血吸血時と非感染血吸血時で遺伝子変動を比較したところ、雌蚊においてもそれら遺伝子発現に差がみられた。今後、これらの結果を基に、ハマダラカのマalaria原虫ベクターコンピテンシー制御因子の同定を目指し順次解析を行う予定である。</p> <p>加えて、オーカイネートの中腸細胞の通過および吸血血液がオーシスト分化にどのような影響を与えるかを検討した。すなわち、雌 <i>A. stephensi</i> に浣腸を行い、直接中腸内腔にオーカイネートを入れて感染させ、中腸細胞基底膜下にオーシストを形成させる感染方法を用いた(浣腸感染)。インジェクション感染群、浣腸感染群において形成されたオーシスト径を比較したところ、差はみられなかったことから、オーカイネートによる中腸細胞の通過の有無はオーシストの大きさに影響しないことが示された。次に、吸血血液の影響を比較するために、インジェクション感染および浣腸感染直後に非感染血を吸血させてオーシスト径を比較したところ、インジェクション感染では吸血の有無により大きさに差がみられなかった。しかしながら、浣腸感染では吸血させた方のオーシスト径が明らかに大きくなった。このオーシスト径と感染マウスを吸血して形成された通常のオーシスト径とは差がみられなかった。このことから、吸血血液はオーシスト形成(大きさ)に影響する因子が存在することが示された。</p>
研究成果の発表	<p><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 第 91 回日本寄生虫学会大会(2022 年 5 月)</p> <p>Formation of free oocysts in <i>Anopheles</i> mosquitoes injected with <i>Plasmodium</i> ookinetes. Haraguchi, A., Takano, M., Hakozaki, J., Nakayama, K., Nakamura, S., Yoshikawa, Y., Fukumoto, S., Kusakisako, K., Ikadai H. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> submitted</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月15日

採択番号	2022-共同-9		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	カブリダニの卵形成の分子機構の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	日本ダニ学会・会長	
	たけだ なおき 武田 直樹	東京農工大学大学院生物システム応用科学府・大学院生	
	のるえいでん がじい あぶるはどる Noureldin Abuelfadl Ghazy	石原産業株式会社中央研究所・研究員	
	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>農作物の約3割は病害虫によって消失し、食料不足に拍車をかけている。このうちハダニ類(胸板ダニ上目:汎ケダニ目:ハダニ科)は、殺虫剤に対する抵抗性を急速に発達させる難防除害虫の代表格であり、持続可能な防除手法の研究開発が進められている。その一つが、捕食性天敵であるカブリダニ類(胸穴ダニ上目:トゲダニ目:カブリダニ科)の利用である。カブリダニ類の利用は、半世紀以上にわたって研究が進められ、国内でも複数種のカブリダニ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額は約7億円で、近年も増加傾向である。ただし、この金額は、国内における殺虫剤全体のわずか0.6%程度であり、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。</p> <p>ミヤコカブリダニ(<i>Neoseiulus californicus</i>; 以下、ミヤコ)は国内土着種であり、カブリダニ剤としても用いられている。ハダニ類のみ捕食する狭食性のカブリダニ種とは異なり、ミヤコは広食性であるため、その大量生産には、ハダニ類以外にも小型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、これら餌の管理は煩雑であり、安定的なミヤコ生産のためには人工飼料の開発が重要である。他方、カブリダニ類と同じ胸穴ダニ上目に属するマダニ類(マダニ目:マダニ科)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 vitellogenin(Vg)の合成が制御されることが判明している。ミヤコの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すれば、卵形成を促す栄養成分の高効率</p>		

	<p>なスクリーニングが期待できる。さらに、その栄養成分を含有する人工飼料の開発、延いては安定的なミヤコ生産体制の構築も期待できる。ただし、ミヤコのゲノム情報は不足しているため、分子マーカーの探索は困難である。そこで本研究では、まずミヤコのゲノム全塩基配列を解読し、TOR 経路や Vg 合成系を解析するための情報基盤を整備した。</p>
研究経過の概要	<p>ミヤコ卵および成虫からゲノム DNA を抽出し、NovaSeq 6000 を用いたショートリードシーケンシング(リード長:150 bp、深度:81.24×)および MinION を用いたロングリードシーケンシング(N50:2.538 kb、深度:115.4×)を実施した。低品質リードの除去後、MaSuRCA(ver. 4.0.8)を用いたハイブリッドアセンブリを実施し、264 のスキホールドを取得した(N50:1.359 Mb)。本種のゲノムサイズは 179.6 Mb と推定され、既報のカブリダニ 2 種のそれと同等であった。近縁種との相同性および既知の遺伝子配列に基づいた遺伝子予測により、TOR 経路や Vg 合成系で機能する遺伝子群(このうち、Vg は 4 遺伝子)を推定した。</p>
研究成果の概要	<p>飢餓処理(24 h)の有無による比較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、ミヤコの Vg の動態を調査した。その結果、いずれの Vg も飢餓処理によって RNA およびタンパク質レベルで発現低下する傾向がみられた。今後はこれら Vg の機能解析や TOR 経路の動態解析を進め、卵形成経路におけるマーカー遺伝子を同定し、多産系統の分子育種を目指す。本成果は第 31 回日本ダニ学会大会にて発表した(以下参照)。</p>
研究成果の発表	<p>武田直樹, 新井優香, 鈴木伽奈, 片岡孝介, 由良敬, 白藤(梅宮)梨可, N.A. Ghazy, 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と飢餓応答因子のマルチオミクス解析. 第 31 回日本ダニ学会大会, 京都, 2022 年 9 月 17-18 日(口頭)</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月26日

採択番号	2022-共同-10		
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	抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と作用機序解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	なかお よういち 中尾 洋一	早稲田大学理工学術院・教授 研究統括、作用機序解析	
研究分担者	なかむら ふみあき 中村 文彬	早稲田大学大学院先進理工学研究科・助教 活性化化合物の精製・構造決定	
	おおえだ かずき 大枝 一喜	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士2年 活性化化合物の精製・構造決定	
	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	2022年4月1日～2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>トリパノソーマ症に対する既存の薬剤には耐性株の出現や副作用などの問題があるため、依然として新たな治療薬開発のニーズは高い。そこで本研究では新たなトリパノソーマ治療薬のリード化合物を探索し、それらの作用機序解析を行うことを目的とする。具体的には、研究代表者が保有する海洋生物サンプルライブラリーを対象として、抗原虫活性スクリーニングを行い、ヒットサンプルから抗トリパノソーマ活性を有する天然化合物を探索する。研究代表者は研究分担者と協力して化合物の単離・同定・作用機序解析を担当し、貴センター菅沼啓輔助教が抗原虫活性試験を担当する。代表者の研究については一部を本共同研究経費により実施する。</p>		
研究経過の概要	<p>当研究室が保有する海洋無脊椎動物抽出物ライブラリー計 5,622 サンプルに対して、<i>T. congolense</i> に対する抗トリパノソーマ活性を指標としたスクリーニングを行った結果、125 サンプルがヒットした。大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿に着目して活性本体の探索を行った。海綿抽出物の分画・精製を行い、単離した活性成分について MS・NMR スペクトルを測定し、得られたスペクトルを解析し、活性本体は新規アルカロイドであることが明らかとなった。</p> <p>一方、食品中の抗トリパノソーマ活性化化合物に着目し、埼玉産春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> について活性本体の探索を行った。その結果 coronarin D をはじめとする抗トリパノソーマ活性化化合物を得た。これらの活性化化合物について、作用機序解析のため、原虫抽出物に含まれる標的タンパク質の探索に用いるプローブ分子の合成を行っている。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>貴センター菅沼啓輔助教との共同研究により、当研究室が保有する海洋無脊椎動物 2,811 検体から調整した、水溶性画分と脂溶性画分の計 5,622 サンプルに対して、<i>T. congolense</i> に対する抗トリパノソーマ活性を指標としたスクリーニングを行った結果、125 サンプルがヒットした。ヒットサンプルの中で抗トリパノソーマ活性と細胞毒性の比較を行い、選択的に抗トリパノソーマ活性を示した大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿に着目して活性本体の探索を行った。本海綿のメタノール抽出物を溶媒分画に付し、得られた活性画分を、ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィーにより順次精製し、化合物 1 を得た。化合物 1 の MS および各種 NMR スペクトルを測定し、スペクトル解析を行ったところ、化合物 1 はイミダゾール環を含む新規アルカロイド化合物であると構造決定できた。</p> <p>本化合物については、化学プローブが結合したビーズを合成し、プローブ分子に結合する標的タンパク質をトリパノソーマ原虫抽出物からつり上げ、SDS-PAGE および MS/MS 解析によって同定する予定である。同定した標的タンパク質について、パスウェイ解析を行うことで、化合物の作用メカニズムを検討する。</p> <p>また、食品中に含まれる抗トリパノソーマ活性化合物の探索を目的として、埼玉産春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> 抽出物について <i>T. congolense</i> に対する発育阻害活性成分の探索を行った。<i>Curcuma aromatica</i> 抽出物について、活性画分を各種クロマトグラフィーを用いて精製した。活性本体の MS、NMR スペクトルを測定し、そのスペクトルを解析することで coronarin D (IC₅₀ = 1.5 μM) およびその類縁体を活性本体として同定した。これらの化合物について、抗トリパノソーマ活性に関する構造-活性相関解析の結果、活性発現に重要な構造モチーフを明らかにしたため、論文としてまとめている。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>(論文)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nakamura, F.; Kimura, H.; Fusetani, N.; Nakao, Y. Two Onnamide Analogs from the Marine Sponge <i>Theonella conica</i>: Evaluation of Geometric Effects in the Polyene Systems on Biological Activity. <i>Molecules</i>, 28, 2524, (2023). https://doi.org/10.3390/molecules28062524. 2. Aihara, K.; Nakamura, F.; Nakao, Y. Alotamide B, a New Cyclic Depsipeptide Isolated from Assemblies of Marine Cyanobacteria, Mainly Consisting of <i>Moorena</i> sp. <i>Chem. Lett.</i>, 52, 270-272, (2023). https://doi.org/10.1246/cl.230035 <p>(学会発表)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 大枝一喜, 菅沼啓輔, 中村文彬, 中尾洋一, 『春ウコン由来の抗トリパノソーマ活性化合物の探索』, 第 12 回 CSJ 化学フェスタ 2022, 東京, 2022.10.18. 2. 大枝一喜, 菅沼啓介, 中尾洋一, 『春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> 由来抗トリパノソーマ活性化合物の探索』, 第 91 回日本寄生虫学会大会, 帯広, 2022.5.28.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月31日

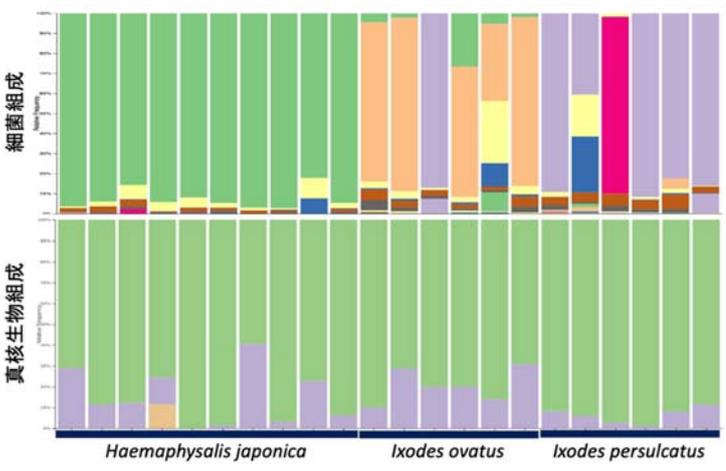
採択番号	2022-共同-11		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	ネズミマラリア原虫における Brca2 による雌ガメートサイトへの分化		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	よしかわ やすなが 吉川 泰永	北里大学獣医学部・准教授	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>マラリア原虫における雌雄ガメートサイトへの分化は、マラリア原虫の生活環において必須のステージである。我々は相同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 がどのよう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。</p>		
研究経過の概要	<p>貴研究センターの福本先生に Brca2 のノックアウト原虫を作製していただき、吉川がこのノックアウト原虫の解析を行ってきた。</p> <p>5月に貴研究センターを訪問した上で福本先生と研究内容についてディスカッションを行った。さらに、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。</p> <p>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てきた。2022年度にはこれまでに得られた成果を論文にまとめ発表し、さらに第91回日本寄生虫学会大会や第165回日本獣医学会学術集会において学会発表を行った。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>Brca2 のドメインの機能解析</p> <p>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、ガメートサイトの形成数、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、このオーシストにはスポロゾイトが形成されないことも観察した。</p> <p>今年度は、マラリア原虫 Brca2 のどの領域が発見した表現型、特にガメートサイトの分化に必要であるか解析するために全長 Brca2 のクローニングを試みた。しかしながら、全長 Brca2 のクローニングには現在までのところ成功していない。これはマラリア原虫の遺伝情報が AT リッチなため大腸菌で増幅しにくいためと予想された。そこで、全長ではなく、Brca2 のドメインの一部をクローニングし、野生型ネズミマラリア原虫に導入する計画を考えた。マラリア原虫 Brca2 のドメインとして、相同組換え酵素 Rad51 と相互作用する領域である BRC repeats と呼ばれるドメインと DNA と相互作用する可能性がある OB-Tower ドメインのクローニングに成功した。これらのドメインは、赤色蛍光タンパク質である DsRed-Monomer との融合タンパク質を発現するベクターにクローニングした。現在、ネズミマラリア原虫にトランスフェクトすることを試みている。</p> <p>ネズミマラリア原虫 Brca2 の OB-Tower ドメインは、AlphaFold2 による立体構造解析により、ヒト BRCA2 の OB-Tower ドメインと類似している領域として推定した。立体構造として DNA と相互作用する可能性が高いと考えられるが、実際に DNA との相互作用は証明されていない。そこで、リコンビナントタンパク質を発現、精製して、実際に DNA と相互作用することを <i>in vitro</i> において確認する計画を立てた。この解析に必要なリコンビナントタンパク質を発現するためのベクターを現在、構築中である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Yoshikawa Y</u>, Kimura S, Soga A, Sugiyama M, Ueno A, Kondo H, Zhu Z, Ochiai K, Nakayama K, Hakozaiki J, Kusakisako K, Haraguchi A, Kitano T, Orino K, Fukumoto S, Ikadai H. <i>Plasmodium berghei</i> Brca2 is required for normal development and differentiation in mice and mosquitoes. <i>Parasit Vectors</i>. 15(1):244. (2022) 査読有 2. 木村 駿太、<u>吉川 泰永</u>、曾賀 晃、杉山 真言、朱 子達、他 5 名, <i>Plasmodium berghei</i>(ネズミマラリア原虫)における減数分裂関連タンパク質 Brca2 の機能解析, 第 165 回日本獣医学会学術集会, 2022 年 9 月 3. <u>吉川 泰永</u>、木村 駿太、曾賀 晃、杉山 真言、朱 子達、他6名, ネズミマラリア原虫 <i>Plasmodium berghei</i> における相同組換えタンパク質 Brca2 機能解析, 第 91 回日本寄生虫学会大会, 2022 年 5 月

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-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	白藤 梨可
研究課題名	マダニ卵形成に貢献する共生微生物の探索		
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	マッケンジー クワク Mackenzie Kwak	北海道大学大学院獣医学研究院・JSPS PD	
	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	
	ばば さおり 馬場 佐織	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニは様々な病原体を保有し、吸血の際に人や動物に伝播する。一方で、マダニは病原体以外にも様々な微生物を保有しており、マダニとの共生関係を築いている。抗生物質を用いて人為的に共生微生物叢を攪乱した場合、マダニの生存力(産卵数や孵化率)が著しく低下することから、一部の共生微生物はマダニの生理活動にとって重要と考えられる。これらの共生微生物は、進化の過程で宿主に高度に適応しており、多くの場合、介卵伝播することで次世代へ効率的に受け継がれる。本研究では網羅的解析手法を用いることで、マダニで介卵伝播する微生物の検出を目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>【マダニのサンプリング】 マダニは野生動物体表から tick twister 等を用いて回収した。北海道のエゾシカ、アライグマ、ヒグマ、ウシ、さらに本州のニホンジカ、イノシシ、ツキノワグマを検索対象とした。</p> <p>【実験室内でのマダニ飼育】 得られたマダニは 25 度のインキュベータで個別に一定期間飼育し、産卵および幼ダニの孵化を待った。幼ダニは体表を洗浄後、-80 度に保管した。</p> <p>【網羅的微生物検出】 幼ダニより DNA を抽出し、細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子を PCR 増幅した。また、真核生物の 18S リボソーム RNA 遺伝子の増幅は、マダニ遺伝子に特異的に結合するブロッキング PNA を添加した PCR により実施した。これらの PCR 産物を元に Illumina シーケンスライブラリーを作製し MiSeq により解読した。得られたシーケンスリードは Qiime2 により解析し、幼ダニに含まれる微生物の組成を決定した。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>【マダニのサンプリング】 2022年5月から12月にかけて、合計196個体の飽血および部分吸血マダニを野生動物個体から回収した。実体顕微鏡による種同定の結果、チマダニ属 (<i>Hemophilic</i>) は5種 (<i>H. longicornis</i>, <i>H. flava</i>, <i>H. japonica</i>, <i>H. megaspinosa</i>, <i>H. kitaokai</i>)、マダニ <i>Ixodes</i> 属は3種 (<i>I. ovatus</i>, <i>I. tanuki</i>, <i>I. persulcatus</i>) が含まれていた。回収時の重量は最も小さいものでニホンジカに寄生していた <i>H. flava</i> の3.3 mg、最大でアライグマに寄生していた <i>I. persulcatus</i> の357.2 mgであった。</p> <p>【実験室内でのマダニ飼育】 産卵・孵化試験に用いた8種196個体のマダニのうち、<i>H. kitaokai</i> 以外の7種68個体で産卵が見られ、幼ダニが得られた。</p> <p>【網羅的微生物検出】 これまでのところ、<i>H. japonica</i>, <i>I. ovatus</i>, <i>I. persulcatus</i> の3種22検体についての解析が完了し、細菌群ではコクシエラ、リケッチア等の配列が確認された(図1)。また、真核生物としては、<i>H. japonica</i> の1検体から <i>Babesia</i> 属の配列が検出された。今後、介卵伝播した微生物の詳細な遺伝的分類を行い、宿主マダニへの影響解析につなげたい。</p>  <p>図1. 孵化した幼ダニから検出された微生物群</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>なし</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-13		
研究部門	創薬研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	抗原虫作用を示す微化研由来天然化合物における分子標的の解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	にへい こういち 二瓶 浩一	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員 研究総括と実験の実施	
研究分担者	いがらし まさゆき 五十嵐 雅之	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・部長 化合物生産菌ブロスおよび化合物ライブラリー資源の開発	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 (役割分担)原虫サンプル調製, 抗原虫活性の検証	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>トキソプラズマは、世界人口の1/3以上が感染していると推定されている。その感染により、流産、新生児の先天性トキソプラズマ症を引き起こし、少子化が進む現代社会において回避できない問題となっている。さらに、畜産業界において、アピコンプレクサ原虫他、原虫感染症による家畜の生産性の低下が国内外で問題視され、経済的損失は大きく、地球規模での被害額は年間約数千億円にのぼるとの試算もある(Reichel et al. <i>Int J Parasitol.</i> 2012)。一方、世界三大感染症のマラリアは、世界で年間3~5億人が罹患し、その内約200万人もの命を奪い、コロナ禍に影響されることなく医学分野で重要な疾患である。我々は、有効な抗原虫薬を開発するために、当研究所で分離した放線菌、糸状菌由来の天然物を中心に化合物のライブラリー化を進めている。その成果として、トキソプラズマ症モデルに対して有効な治癒効果を示す MCF を初め、キジマイシン、スパルソマイシン他、抗マラリア作用を示すアミノペプチダーゼ阻害剤の PBT など原虫薬候補化合物を西川義文教授と共同で発見している。我々は、原虫の小胞体機能および小胞体を含む分泌経路が有効な薬剤標的の一つであることを突き止めている。しかしながら、原虫の分泌経路における小胞輸送の分子レベルでの実体について未だ解っていない点が多い。</p> <p>本申請は、MCF の標的および作用機序を中心に抗原虫活性を示すライブラリー化合物の作用機構を解明することを目的とし、優れた原虫創薬の基盤構築に繋げる。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>原虫病薬は、市場規模が新規薬剤の開発費を下回る。したがって製薬企業がその開発に積極的に着手しないのが現状である。利潤に左右されない大学とわれわれ公的研究機関で抗原虫薬の探索および創薬に向けた開発を実施することが重要である。</p> <p>これまでに、われわれは原虫薬開発に適した天然化合物ライブラリーの構築を行い、トキソプラズマ感染マウスに対する優れた治癒効果を示す MCF を発見した。さらに、MCF は抗ネオスポラ、抗マラリア活性を示すことも確認した。一方、マラリア原虫に高い抗原虫活性を示す PBT を見出した。PBT は、トキソプラズマには、抗原虫活性を示さなかった。MCF の実用化に向けて動物実験による作用機序解析を行う必要がある。その為に MCF の生産量を担保する必要がある、われわれは生産菌による発酵(育種法)で化合物を効率的に得る手法を開発した。われわれは、MCF の原虫に対する有効な作用点の一つが輸送系、ストレス応答に関わる小胞体の機能であることをこれまでに示してきた。しかしながら未だ分子レベルでの証明に至っていない。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>DKP 誘導体の MCF は、トキソプラズマ、ネオスポラおよびマラリア原虫に対する抗原虫活性を示し、MCF がマラリアの既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性を持つ。MCF は、世の中でマラリア既存薬に対する耐性株が出現している現状を踏まえると次世代のマラリア薬として、もしくは、新規アピコンプレクサ門原虫の新規の抗原虫活性を示す薬剤として発展することが期待できる。現存の MCF 生産菌の育種による生産方法では、MCF の原虫に対する作用機序解析、種々の実験動物による感染モデルを用いた解析を進めるのに必要な量を担保するのが困難な状況であった。この現状を打開するために、われわれは、低コストで且つ効率的な MCF の生産方法の開発における基盤構築を行い、育種による生産およびカラム精製で MCF を得ることに成功した。MCF は、経口投与で高い抗原虫作用を示すことを確認している。今後は、MCF の作用する dose, 吸収, 排出について詳細を解析する必要がある、現在、解析を進めている。</p> <p>一方、MCF の抗原虫作用において、これまでにトランスクリプトーム解析から原虫の小胞体および核に作用している可能性を示し、特に、原虫の小胞体におけるストレス応答機構、Sar1GTPase により形成する COPII 小胞、さらに、その小胞輸送経路を経由すると考えられる各エフェクター、アミノペプチダーゼなどの分泌カーゴも標的となる結果が得られた。原虫の小胞体におけるストレス応答機構は、哺乳類や酵母で解っている従来の機構と大きく異なる分子機構と考えられている。さらに、細胞死のメカニズムについても同様に未だわかっていない。したがって、その解明は、新たな分子標的の開発につながり、新たな創薬研究の発展に重要である。</p> <p>本年度は、トキソプラズマの小胞体における COPII 小胞形成に働くと考えられる Sar1GTPase に対するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と予想される因子が Sar1 と同様に MCF の作用部位と考えられたので、その同定を行った。これまで原虫で GEF の存在が明らかにされていなかった。さらに、トキソプラズマ、マラリア原虫など一部のアピコンプレクサ以外の原虫では未だにゲノム上で確認されていない状況である。酵母、哺乳類などの Sar1GEF で保存される Sec7ドメイン、WD リピートドメイン、II 型膜タンパク質のトポロジーを考慮し、トキソプラズマ Sar1GEF を酵母変異株を用いて機能相補する因子を同定した。さらに、その特異的抗体を調製し、トキソプラズマ動物培養細胞感染モデル系のライセートにおいて、トキソプラズマ Sar1GEF が発現していることを確認した。従って、原虫において実際に Sar1GEF が働いている可能性が示された。</p> <p>現在、酵母変異株を相補するトキソプラズマ Sar1GEF 発現系を用いて触媒機能に必要な最小部位、小胞体局在化シグナルについて解析中である。</p>

<p>研究成果の 発 表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leessombun A, Iijima M, Umeda K, Kondoh D, Pagmadulam B, Abdou AM, Suzuki Y, Ohba SI, Isshiki K, Kimura T, Kubota Y, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis. <i>J Infect Dis.</i> 221 (5).pp764-776. doi: 10.1093/infdis/jiz501. 2020. 2. Leesombun A, Iijima M, Pagmadulam B, Orkhon B, Doi H, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin has potent anti-malarial activity. <i>Parasitol Int.</i> 2021 81, 102267. doi:10.1016/parint.2020.102267. 2021. 3. <u>Nihei C</u>, Nakanishi M. Cargo selection in the early secretory pathway of African trypanosomes. <i>Parasitol Int.</i> 84, 102379. doi: 10.1016/j.parint.2021.102379. 2021. 4. Leesombun A, Kondoh D, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Polyether ionophore kijimicin inhibits growth of <i>Toxoplasma gondii</i> and controls acute toxoplasmosis in mice. <i>Parasitol Res.</i> doi: 10.1007/s00436-021-07363-w. 2021. 5. Ariefta NR, Pagmadulam B, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Sparsomycin Exhibits Potent Antiplasmodial Activity In Vitro and In Vivo. <i>Pharmaceutics.</i> 14(3):544. doi: 10.3390/pharmaceutics14030544. 2022.
----------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月5日

採択番号	2022-共同-14		
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	フタトゲチマダニから同定されたアクアポリンの特性解明		
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	みやた たけし 宮田 健	鹿児島大学農学部・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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニの吸血行動は、幼・若・成ダニ期に約1週間ずつ、生涯で計3回行なわれる一大イベントである。マダニの吸血行動において、細胞膜に発現するアクアポリン(AQP)は細胞膜を介して水分子を輸送し、血液を濃縮していることが考えられる。そこで、本研究は化学的殺ダニ剤にかわる抗マダニワクチンに着目し、そのワクチン候補分子として、AQPの特性を調べることを目的とした。すなわち、本研究の成果は、マダニの生存基盤である吸血消化を根本的にたたき、環境にやさしいAQPを標的とする抗マダニワクチンの開発につながる可能性が高い。</p>		
研究経過の概要	<p>1. 研究目的</p> <p>マダニは脊椎動物の血液を栄養源とし、その生活史は「未吸血」と「飽血」で成り立っている。マダニの吸血行動は、幼・若・成ダニ期に約1週間ずつ、生涯で計3回行なわれる一大イベントである。</p> <p>吸血節足動物の吸血行動においてAQPは重要な分子である。細胞膜に発現するAQPは水分子を水チャネルによって細胞膜を介して輸送する。そのため、マダニは大量の血液を吸血する時に、体内でAQPを通じて水分を排出し、血液を濃縮していることが考えられる。</p> <p>化学的殺ダニ剤のほぼ全ては、農薬の転用・流用にすぎない実態が世界的に半世紀以上も継続しているため、薬剤耐性マダニや残留問題などの弊害を招いている。そこで、化学的殺ダニ剤にかわる抗マダニワクチンに着目し、そのワクチン候補分子として、水分調節機構を担うAQPに焦点を絞り、本研究ではAQPの特性を調べることを目的とした。</p>		

	<p>2. 材料と方法</p> <p>①酵母による組換え AQP の発現 フタトゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから <i>AQP</i> 遺伝子をクローニングし、遺伝子解析を行った。その後 RT-PCR 法によって増幅した <i>AQP</i> の cDNA を酵母発現用ベクターに組み込んだ後、エレクトロポレーターを用いて酵母(<i>Pichia pastoris</i>)に導入した。</p> <p>②フタトゲチマダニにおける AQP の特性解明 フタトゲチマダニにおける <i>AQP</i> の特性を解明するために、<i>AQP</i> 遺伝子の発現を臓器別、吸血日数別にそれぞれ RT-qPCR によって発現動態を調べた。また、RNA 干渉法による <i>AQP</i> 遺伝子発現の抑制を行い、マダニの吸血時間、体重変化、生存率、産卵、孵化などの変化を観察し、マダニの吸血・繁殖生理における <i>AQP</i> の役割について検討した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>3. 結果</p> <p>①フタトゲチマダニにおける AQP 遺伝子の同定および AQP の特徴 フタトゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから完全長 <i>AQP</i> cDNA を得、塩基配列解析を行ったところ、3341 bp で、ORF は 876 bp であり、その推定産物は 291 アミノ酸であった(推定分子量 30.9 kDa)。これらのアミノ酸から 6 回膜貫通型のタンパク質であり、1箇所の N-型糖鎖結合部位が存在することが推定された。我々はこの配列情報を基に酵母を用いて組換え体の作製を行ったが、<i>AQP</i> が膜タンパク質であるため、発現および精製することができなかった。</p> <p>②フタトゲチマダニにおける AQP 遺伝子の発現ならびに AQP 遺伝子抑制の及ぼす影響 フタトゲチマダニの臓器における <i>AQP</i> 遺伝子の発現動態を調べたところ、吸血に従って、唾液腺、中腸、マルピーギ管で発現レベルが増大した。しかし、中腸では未吸血状態でも発現レベルが高かった。</p> <p>RNA 干渉法による <i>AQP</i> 遺伝子発現の抑制を行ったところ、飽血時まで <i>AQP</i> 遺伝子抑制群はコントロール群に比べて表現型の差に大きな違いはなかった。しかし、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群を解剖したところ、コントロール群に比べて、飽血後の中腸内容物は白く、中腸とマルピーギ管の形態が変化していた。また、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群はコントロール群に比べて産卵数も低下した。</p> <p>4. 考察 <i>AQP</i> は推定されたアミノ酸配列から細胞膜に発現している可能性が示唆された。また、RNA 干渉法の結果から、<i>AQP</i> は中腸やマルピーギ管において水分調節や排せつに重要な分子であり、吸血中の血液濃縮に関与していることが考えられた。</p> <p>今後は抗 <i>AQP</i> 抗体を用いて、唾液腺、中腸、マルピーギ管における <i>AQP</i> の局在を調べる必要がある。さらに、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群の唾液腺、中腸、マルピーギ管、卵巣の変化について組織レベルで観察することによって、マダニの吸血における <i>AQP</i> の役割がより明確になることが予想される。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>特になし</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-15		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	オス生殖細胞発達障害を持つ熱帯熱マalaria原虫株の原因遺伝因子の同定と機能解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふるや てつや 古谷 哲也	東京農工大学農学部共同獣医学科獣医伝染病学研究室・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	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>熱帯熱マalaria原虫 (<i>Plasmodium falciparum</i>) はヒトに感染するマalaria原虫の中で最も病原性が高く、現在も、世界で年間40万人以上の感染死亡者が報告されている。複雑なマalaria原虫の生活環において、生殖細胞(ガメートサイト)は感染蚊によってヒトから摂取され、蚊の腸内で生殖するステージだが、蚊の吸血時にヒトに感染するスポロゾイトと共に、生活環の中で最も原虫の数が減少する(ボトルネック)であることが知られているため、伝播阻止ワクチンのターゲットとして非常に重要である。これらの背景を踏まえ、本共同研究では、先行研究以降に利用可能となった次世代シーケンサーを用い、オス生殖細胞に発達障害を持つ Dd2 株に対し、その直接の親株であるがオス生殖細胞が正常に発達する W2 株における染色体 12 ゲノム配列を解読し、ゲノム配列がデータベースに公開されている Dd2 株配列との比較により、Dd2 株のオス生殖細胞発達障害の原因となる遺伝子変異の同定と、遺伝子ノックアウトおよび遺伝子スワップにより遺伝子機能の証明を行う。さらに、同定遺伝子、あるいはそれに関与して発現している遺伝子の産物に対する抗体を作製し、それが、ガメートサイトを摂取した蚊の体内で、<i>P. falciparum</i> の生殖に及ぼす影響を判定し、媒介阻止ワクチン開発における可能性を検証する。</p>		
研究経過の概要	<p>本共同研究では、まず、<i>P. falciparum</i> Dd2 株のオスガメートサイト発達障害の原因遺伝子の同定のため、データベース上の Dd2 株ゲノム配列との比較を行うため、次世代シーケンスにより親株である W2 株のゲノム配列の解読を行った。ゲノム配列は、本学工学部の養王田正文教授との共同研究により、Pacific Bioscience 社と Illumina 社のシーケンスにより、高解像度の W2 ゲノム配列を取得した。コンティグ配列は、最長約 250kb の配列によって構成されていたため、申請者による先行研究において報告された 82 kb を含む染色体 12 上の約 800 kb の領域をカバーする W2 コンティグをマップして、W2 と Dd2 の比較を行った。その結果、まず、82kb の領域(Furuya T et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 102(46):16813-8.)について、Dd2 と W2 に存在する</p>		

	<p>変異を探したところ、非翻訳領域以外に、顕著な変異が見つからなかった。そのため、更に以前の報告 (Vaidya AB et al., Mol Biochem Parasitol. 1995 69(1):65-71.) を参照し、報告された染色体 12 上の遺伝子マーカーを参照として、対象となる遺伝子領域の同定を試みた。その結果、当時、800kb と報告されていた染色体 12 の領域が、最もアップデートした遺伝子マーカーのゲノム上の塩基配列位置によって、367kb の領域となる事が明らかになった。そこで、改めて、この領域に存在する遺伝子群(100 遺伝子程度)について、その翻訳領域における Dd2 株と W2 株の塩基配列の比較を試みた。その結果、2 つの遺伝子において、明らかな遺伝子多型が発見された。一つは、転写因子に相同性を持つ遺伝子で、翻訳領域の前半およそ 1/3 の箇所に存在する点変異による終止コドンにより偽遺伝子となっていた。もう一つの遺伝子は、ヒストン修飾遺伝子であり、翻訳領域の 2/3 の箇所に 27 塩基の配列が挿入されていた。</p> <p>現在、本研究室では上記のゲノム配列解析により同定された Dd2 株のオスガメートサイト発達障害候補遺伝子について、機能の証明をするため、先ず、人血清を用いた熱帯熱マラリア培養系により、ガメートサイトの産生を開始している。ガメートサイトを比較的多く産生する HB3 株を用いてガメートサイトの培養を開始しており、ガメートサイトステージの産生を確認できたため、今後、先ずは、親株の W2 株における遺伝子改変によるオス生殖細胞の機能性を評価するため、上記の候補遺伝子のノックアウト株の作製を行い、成熟ガメートサイト細胞の鞭毛放出数の測定を行う。さらに、Dd2 株の遺伝子改変により、偽遺伝子を野生型の発現遺伝子にスワップを行い、表現型の回復を試みる。これらの実験には、既に確立している CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変システムを活用する。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>上記のように、本研究の成果として、遺伝的に直系でありながら、オス生殖ステージの発達機能が明らかに異なる熱帯熱マラリア寄生虫株 W2 と Dd2 における、染色体 12 上の遺伝子配列比較において、2 つの遺伝子に明らかな多型を発見した。一つは、転写遺伝子における変異による機能的遺伝子の翻訳停止であり、もう一つは、ヒストン修飾遺伝子における明らかな配列挿入であった。これらの遺伝子は、マラリア寄生虫に限らず、真核細胞の分化における遺伝子の転写活性化と、染色体タンパク質修飾による転写制御において、非常に重要な遺伝子であり、上記の熱帯熱マラリア株における生殖細胞の分化と機能発達において、大きな役割が予想される。今後は、この発見をもとに、これらの遺伝子変異が及ぼす生物学的な影響について、遺伝子操作による機能的な実験によって、これら遺伝子の実際の機能を明らかにしていく。そして、更には、ネズミマラリアにおける相同遺伝子の同定により、In vivo 実験においても、最新の CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変システムにより、これらの生物学的な研究を進める予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>現在まで、本研究についての学会発表や論文発表は行われていない。本研究成果については、発見のポテンシャルを鑑み、学会発表、投稿論文発表について、慎重な検討を必要とすると考える。今後、共同研究者と検討の上、発表形式と内容について決定する。</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月6日

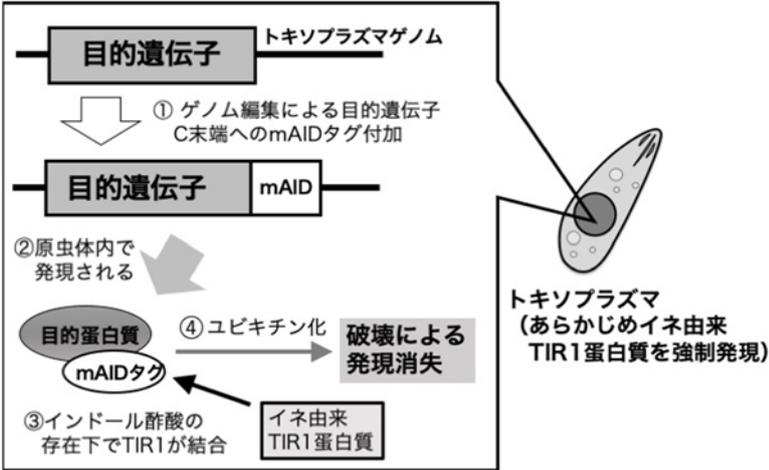
採択番号	2022-共同-16		
研究部門	創薬研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	トキソプラズマ分泌タンパク質の宿主ミトコンドリア機能に対する影響解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	にしごり みつひろ 錦織 充広	福岡大学理学部化学科・助教	
研究分担者	こしば たくみ 小柴 琢己	福岡大学理学部化学科・教授	
	ひらた せりな 平田 聖里菜	福岡大学大学院理学研究科・大学院生	
	まき ゆうか 牧 優香	福岡大学大学院理学研究科・大学院生	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>細胞内小器官の1種であるミトコンドリアはエネルギー産生工場として機能し、真核生物における代謝系などの生命機能の維持に不可欠な役割を果している。近年の研究より、ミトコンドリアは抗ウイルス自然免疫におけるプラットフォームとして機能していることが示されてきた。我々は、これまでに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、世界に先駆けてミトコンドリアの生理的な重要性を明らかにしてきた (<i>Nat. Commun.</i> 2014, 2019, 2020; <i>Sci. Rep.</i> 2017; <i>iScience</i> 2019; <i>JBC</i> 2020)。一方、トキソプラズマを始めとする寄生虫が哺乳細胞へ感染した際の宿主ミトコンドリアの役割はほとんど分かっていない。そこで本研究では、トキソプラズマ原虫に感染した宿主細胞内でミトコンドリアがどのような挙動を示すかを明らかにすることを目的とする。特にトキソプラズマ原虫由来の分泌性タンパク質群と宿主ミトコンドリアの相互作用に着目し、病原性発現との関連性を明らかにする。また、感染原虫の持つミトコンドリアの役割にも着目し、感染前後における原虫ミトコンドリアの機能変化が病原性にどのような影響を及ぼすかについての理解を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>我々のこれまでの予備実験では、一部のトキソプラズマ分泌性タンパク質が宿主ミトコンドリアと強い親和性を持つことが生化学的な実験より明らかになった(未発表データ)。さらに、これらタンパク質を培養細胞内で過剰発現させると、宿主ミトコンドリアに局在することも見出した。これらの知見を基に、本研究では以下の研究計画を実施した。</p> <p>(1)これまでに、宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質を恒常的に発現させたヒト培養細胞を用いた網羅的な相互作用タンパク質探索により、これらの原虫タンパク質と相互作用する宿主ミトコンドリアのタンパク質を複数種、同定している。そこで、抗体を用いた免疫沈降実験や遺伝子導入実験等を用いて、これらのタンパク質間の相互作用の</p>		

	<p>検証実験を試みた。</p> <p>(2)これまでのホスト研究室の西川義文教授との共同研究(2021 年度、小柴琢己教授)では、宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質の遺伝子改変原虫の作成に成功している。そこで遺伝子改変原虫を感染させた細胞を用いて、免疫染色による感染の確認や原虫の感染率・増殖能への影響評価などを実施した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>まず、ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質の安定発現細胞を用いたプロテオーム解析情報に基づき、宿主ミトコンドリア側の相互作用タンパク質を探索した。これまでの細胞分画およびプロテアーゼ耐性実験の結果から、トキソプラズマタンパク質がミトコンドリア外膜に結合することが示されたため、特にミトコンドリア外膜タンパク質に着目して相互作用タンパク質を探索した。免疫沈降による検証実験では、ミトコンドリア外膜貫通型タンパク質および一部の MICOS 複合体構成タンパク質との相互作用が確認されたが、外膜タンパク質の相互作用は限定的であり、タンパク質間相互作用以外の結合要因が存在する可能性が示唆された。</p> <p>そこで、さらなる相互作用因子の探索のため、脂質アレイおよびリポソームを用いた結合試験により膜リン脂質とトキソプラズマタンパク質との相互作用について解析した。その結果、トキソプラズマタンパク質が特定のリン脂質と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、この結合性はリン脂質の脂肪鎖長や不飽和度の違いにより変動することも示された。また、上記リン脂質の合成酵素のうち、ミトコンドリア外膜局在型のサブタイプとトキソプラズマタンパク質が相互作用することが免疫染色および免疫沈降の結果から明らかとなり、ミトコンドリア外膜のリン脂質を介した相互作用が存在することが予想された。</p> <p>一方、野生型およびタンパク質改変型トキソプラズマ原虫を Vero 細胞に感染させ、それぞれ 24, 48, 72 時間後におけるトキソプラズマ原虫の感染率、増殖率、エグレッション率の比較を行った。免疫染色により少なくとも 200 個以上のトキソプラズマ原虫をカウントし(N=4)、上記の値を算出したが、有意な差は見出されず、比較的期間での細胞感染では大きな影響は無いと考えられた。一方、プラークアッセイにより長期間での感染の影響を調べた結果、タンパク質改変型トキソプラズマ原虫では増殖が抑制されていることが明らかとなった。また、ミトコンドリア外膜局在型のリン脂質合成酵素の高発現細胞ではトキソプラズマ原虫のエグレッション率に変動があり、宿主ミトコンドリアが膜リン脂質を介して原虫へ影響を及ぼす可能性が示唆された。</p> <p>以上の内容については現在、論文にまとめて投稿中である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>本共同研究の研究成果について、下記の学会、ワークショップにて発表を行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 錦織 充広: Analysis for the localization of <i>Toxoplasma gondii</i> secretory proteins to the host mitochondria., 第 28 回分子寄生虫学ワークショップ 第 18 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会(2022 年 8 月) ・ 錦織充広, 牧 優香, 西 翔平, 西川義文, 小柴琢己: 病原性寄生虫・トキソプラズマの分泌タンパク質と宿主ミトコンドリアの相互作用解析, 令和 4 年度日本生化学会九州支部例会(WEB 開催) (2022 年 6 月) ・ 錦織充広, 牧 優香, 西 翔平, 西川義文, 小柴琢己: トキソプラズマ原虫分泌タンパク質の宿主ミトコンドリア膜への局在化の解析, 第 91 回日本寄生虫学会大会(2022 年 5 月)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-17		
研究部門	国際連携協力部門	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	
	まさたに 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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>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。細胞死に関連すると予測された遺伝子を対象とし、ゲノム編集に基づくコンディショナル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。</p>		
研究経過の概要	<p>これまでに、細胞死関連遺伝子として注目し選抜された 2 つの遺伝子 (PDCD2、ELMO1) について相同組換えによるノックアウト原虫作出を試みたものの、成功しなかった。具体的には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、すなわち、これら遺伝子は原虫にとって必須遺伝子である可能性が高いと考えられた。</p> <p>前年度、本課題において、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、glmS リボザイムに基づくコンディショナルノックアウト法の確立を試みたものの、本方法は、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。</p> <p>そこで今年度は、オーキシン誘導デグロン法(図)に基づくコンディショナルノックアウト原虫の作出に向けた準備を行なった。具体的には、トキソプラズマ原虫 Pru Δ Ku80 株を対象とし、イネ由来 OsTIR1 を過剰発現する原虫を作出した。この原虫に CRISPR/Cas9 によって目的蛋白質の C 末端にオーキシン誘導デグロン(mAID)タグを付加し、これに基づいたコンディショナルノックアウト法の確立をおこなうためのプラスミドを作出した。</p>		

	 <p>図 オーキシン誘導デグロン法</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>Addgene 社より購入した OsTIR1 強制発現プラスミド(#87258)に搭載された薬剤耐性遺伝子 CAT であったため、CAT を既にゲノム中に組み込まれた Pru Δ Ku80 株には適用できなかった。そのため、同プラスミドの CAT を HXGPRT に置き換えたものを導入することで、OsTIR1 発現 Pru Δ Ku80 株を作出した。</p> <p>次に、PDCD2 及び ELMO1 のコンディショナルノックアウト原虫を樹立するため、Addgene 社より購入した mAID-HXGPRT カセット搭載プラスミド(#87258)の HXGPRT カセットを DHFRTSc3 遺伝子に置き換えたプラスミドを作出し、これを鋳型に PCR 産物として mAID-DHFRTSc3 カセットを増幅し、それぞれの遺伝子の C 末端に mAID が融合するよう設計した CRISPR/Cas9 プラスミドとともに導入した。ピリメタミンで選抜することで、コンディショナルノックアウト原虫を得た。現在これらをクローニング中であり、完了次第、オーキシン誘導によりノックアウトができるかどうか検証していく。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>なし</p>

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: June 1, 2023

Project no: 2022-joint-18

1. Principal investigator

Name: Albert Mulenga

Position: Professor of Veterinary Parasitology

Affiliation: Texas A&M University

2. Project title:

Establishment of split Cas9 for functional characterization of essential genes in *Babesia bovis*

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)

01/04/2022 -31/03/2023: one year

5. Purposes and objectives

We aimed to establish an inducible CRISPR/Cas9 system for *B. bovis* to be used for functional characterization of essential genes in this parasite.

6. Outline of research process

The workflow for adaptation of inducible CRISPR/Cas9 consists of the following aims:

1. Construction of splitCas9-expressing plasmid
2. Generation of splitCas9-expressing *B. bovis*
3. Optimization of rapamycin to be used for reassembly of Cas9 fragments
4. Validation of CRISPR/splitCas9 for induction of gene knockout

7. Outline of research achievements

A plasmid construct was generated to express splitCas9 and inserted into *ef-1 α* locus of *B. bovis* genome. PCR assay confirmed the insertion of the plasmid construct into the target locus. To recycle the selection marker, *yFCU* gene was used in the expression plasmid which confers sensitivity to 5-fluorocytosine (5-FC). A growth inhibition assay was conducted using the transgenic parasite to find the optimum concentration of 5-FC for negative selection. The calculated EC₅₀ was 26±1.2 nM for transgenic parasite expressing splitCas9 while no inhibition was seen in wildtype parasite. We used 1µM of 5-FC for negative selection which resulted in selection of parasites that lost the selection marker.

Next, we measured IC₅₀ of rapamycin to optimize the concentration that can be used for Cas9 assembly. A growth inhibition assay was done using wildtype parasite. The calculated IC₅₀ was 13.9±11.6 μM and no inhibition was seen at 1μM which was decided to be used for Cas9 assembly.

To validate CRISPR/splitCas9 for induction of a gene knockout, we targeted BbVEAP (VESA1-export associate protein) which previously was shown to be essential for the parasite growth *in vitro* [1]. A circular plasmid expressing guide RNA and having homologous arms for *bbveap* locus repair was transfected into splitCas9-expressing parasite. Following appearance of transgenic parasites, using PCR we found that *veap* locus was modified before the addition of rapamycin. This could be due to the assembly of Cas9 peptides which may happen during protein synthesis and transport in the cytoplasm. In our construct design, we fused Cas9 C-terminal peptide with a nuclear localization signal which will transport the peptide to the nucleus. Cas9 N-terminal peptide has no signal and is assumed to remain in the cytoplasm. Since Cas9 peptides are expressed using strong *ef-1α* promoter, abundant Cas9 peptides may be assembled and exported to nucleus where the functional holoenzyme produces double-strand break in *bbveap* locus. Recently it was shown in *Toxoplasma gondii* that the addition of nuclear export signal to Cas9 N-terminal may prevent this unwanted assembly before addition of rapamycin [2]. We are planning to modify splitCas9-expressing plasmid by fusing nuclear export signal to Cas9 N-terminal peptide and perform the experiments again.

Altogether, we were able to achieve 3 aims mentioned in the research outline: construction of split-Cas9-expressing plasmid, generation of splitCas9-expressing *B. Bovis*, and optimization of rapamycin to be used for reassembly of Cas9 fragments. The final aim could be achieved by modification of splitCa9-expressing plasmid in future studies.

8. Publication of research achievements

None.

Attach reference materials as necessary.

1. Hakimi, H., et al., *Novel Babesia bovis exported proteins that modify properties of infected red blood cells*. PLoS Pathog, 2020. **16**(10): p. e1008917.
2. Li, W., et al., *A splitCas9 phenotypic screen in Toxoplasma gondii identifies proteins involved in host cell egress and invasion*. Nat Microbiol, 2022. **7**(6): p. 882-895.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 23, 2023
Project no: 2022-joint-19

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:

Establishment of DiCre parasite lineages to study essential aspartyl peptidases of *Babesia*

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)

01/04/2022 -31/03/2023, one year

5. Purposes and objectives

The primary goal of this project is to develop innovative functional genomic tools for tick-borne *Babesia* parasites. Specifically, we aim to create a stable transgenic strain(s) of *Babesia* that expresses the DiCre recombinase. The DiCre conditional recombinase system allows for the functional analysis of essential parasite genes, which cannot be effectively studied using conventional non-inducible knock-out systems. Although this technique has been successfully employed in model species like *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* from the Apicomplexa group, it has not yet been introduced in *Babesia*.

The individual objectives of this project are as follows:

- (i) Designing and cloning *Babesia* plasmid constructs that enable the integration of both Cre subunits into the same genomic locus of selected *Babesia* species.
- (ii) Generating "parental" DiCre parasite line(s) and optimizing the transfection strategy for *Babesia*.
- (iii) Implementing the loxP sites into the parasite using both episomal and intra-genomic approaches to confirm recombinase activity.

(iv) Conducting conditional knock-out experiments on selected *Babesia* target genes.

By achieving these objectives, we aim to advance our understanding of *Babesia* parasites and their associated diseases, ultimately contributing to the development of improved diagnostic and therapeutic strategies.

6. Outline of research process

During our work on this project and the visit of Dr. Sojka to NRCPD-OUAVM between November 6 and November 16, 2022, we prepared the initial version of the plasmid DNA vector containing the complete DiCre cassette for integration into the genome of our *Babesia divergens* strain. This construct was designed in such a way that by making only two changes in the homologous regions, we could use the same plasmid/DiCre cassette for integration into the genome of *Babesia bovis*, a related *Babesia* sensu stricto species that is of relevance to our Japanese collaborators in this project.

However, our subsequent attempts to electroporate and create *B. divergens* parental lineages through serial dilution revealed significant shortcomings in the initial design of the DiCre cassette-holding plasmid, leading to unsuccessful outcomes. Therefore, in 2022, we undertook a redesign and synthesis of a novel version of the DiCre cassette-holding plasmid to enable its integration into both *Babesia* species.

The work was also supported by our parallel CAS/JSPS joint mobility project, when two members of our team, Eliana Fernanda Galindo Cubillos (postdoc) and Ana Maria Osório De Barros De Almeida Filipe (PhD student), visited NRCPD in Obihiro for almost two months. During their internships they primarily focused on generating stable lines of *B. bovis* parasites that express the dimerizable Cre-recombinase (DiCre). This enzyme facilitates the conditional deletion of target genes, allowing for conditional knockdown (iKO). Both visiting researchers acquired practical skills related to the preparation of transgenic *Babesia* and subsequent analysis of the resulting phenotype. Additionally, they received intensive training in various knock-in/out techniques targeting specific genes in *Babesia*, which are crucial for studying gene function in this organism.

The main outcome of their two-month internship was the generation of transgenic strains of *B. divergens*/*B. bovis* carrying the updated version of the DiCre cassette. These strains are currently undergoing cloning by serial dilution and analysis through PCR.

Furthermore, our collaboration with the University of Geneva, Switzerland, regarding recombinant expression, purification, and biochemical characterization of two BdASP3 proenzymes prepared in baculovirus-infected Sf9 insect cells, has continued. Results from this collaboration were presented by team members Sojka, Jalovecká, and Šnebergerová at the International Congresses of Parasitology – ICOPA XV, held in Copenhagen, Denmark, from 21-26 August 2022.

7. Outline of research achievements

- *B. divergens* and *B. bovis* were selected as model organisms.
- Specific promoters for *B. divergens/B. bovis* were identified and their sequences were determined.
- Specific 3' untranslated regions (UTRs) for *B. divergens/B. bovis* were identified and their sequences were determined.
- The sensitivity of *B. divergens* to Blasticidin-S-Deaminase (BSD) and WR99210 selection markers was validated.
- The first and second generation of a plasmid DNA vector containing the full DiCre cassette for incorporation into the genome of *B. divergens/B. bovis* was designed and synthesized.
- Team members were intensively trained in strategies to perform knock-in/out techniques on specific genes in *Babesia* by NRCPD-OUAVM host lab members.
- Transgenic strains of *B. divergens/B. bovis* carrying the updated version of the DiCre cassette were generated. This process involved cloning by serial dilution and integration analyses through PCR.
- Aspartyl proteases recBdASP3a/b, encoded by first-choice DiCre recombinase target genes, were expressed in both *E. coli* and Sf9 insect cells. These expressed proenzymes were then biochemically characterized using Western blots and immunomicroscopy techniques. Antibodies raised against recBdASP3a/b were utilized for these analyses.

8. Publication of research achievements

Due to the COVID-19 pandemic and the closure of Japan's borders for tourism and business travels, the internships of CZ team members in Japan were initially made available only in late 2022. Consequently, there hasn't been sufficient time to publish the obtained results before the deadline of this report. However, we plan to publish the results of the ongoing collaboration between the CAS and NRCPD-OUAVM teams in 2023-2024. These publications will be based on our long-term collaboration, supported by other concurrently running projects.

Attach reference materials as necessary.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 21, 2023
Project no: 2022-joint-20

1. Principal investigator

Name: Morakot KAEWTHAMASORN

Position: Associate Professor

Affiliation: Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

2. Project title:

Identification of mosquitoes in goat farms and molecular screening of malaria parasite in mosquitoes.

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, 2022 – March 31, 2023

5. Purposes and objectives

Mosquitoes play a key role in transmitting many infectious diseases including malaria. Ungulate malaria parasites are known to be transmitted by the mosquitoes belonging to the genus *Anopheles*. There have been a few reports about mosquitoes responsible for malaria transmission in mouse deer and white-tailed deer while mosquito vector for goat malaria transmission remains unknown. The objective of this study was to identify the vectors responsible for transmitting the goat malaria parasite, *Plasmodium caprae*.

6. Outline of research process

The mosquitoes were collected from goat farms located in six districts across four provinces in northern and western Thailand. Each location has been visited only once. From each district, one or two specific localities were chosen as follows: Lao Khwan District (14° 28' 33.4" N 99° 48' 25.0" E and 14° 28' 51.1" N 99° 48' 11.7" E) in Kanchanaburi, Wiang Sa District (18° 31' 56.9" N 100° 37' 50.2" E) and Mueang Nan District (18° 49' 07.0" N 100° 46' 36.9" E) in Nan, Ban Kha District (13° 17' 32.3" N 99° 25' 06.8" E) in Ratchaburi, Kaeng Krachan District (12° 53' 45.7" N 99° 42' 45.4" E) in Phetchaburi, and Ban Mai District in Kanchanaburi (13° 53' 27.3" N 99° 37' 16.2" E and 13° 54' 40.8" N 99° 37' 52.4" E). Mosquitoes were sorted out under the stereomicroscope for unfed, blood-fed, half-gravid and gravid status as well as its group or species levels based on pictorial identification key. Then, DNA extraction

was conducted in a pool of 1-3 mosquitoes, followed by screening for *Plasmodium* spp. by PCR. Mosquito species and Plasmodium-positive samples were sequenced for confirmation.

7. Outline of research achievements

A total of 1,019 anopheline and 133 non-anopheline mosquitoes were collected from goat farms in Thailand, where goats infected with *P. caprae* were found. Molecular biological methods targeting the cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1), cytochrome c oxidase subunit 2 (cox2) genes, and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region were used to identify anopheline mosquitoes. To detect *P. caprae*, both pooled and individual mosquitoes were tested using the head-thorax parts containing the salivary glands. Primers specific to three genetic markers, namely cytochrome b, cytochrome c oxidase subunit 1, and 18S small subunit ribosomal RNA genes, were employed. Furthermore, blood samples were collected from goats during the mosquito surveys to determine their malaria infection status. The study unveiled six groups comprising nine mosquito species found on goat farms, namely Hyrcanus, Barbirostris, Subpictus, Funestus, Tessellatus, and Annularis. *Anopheles subpictus* and *Anopheles aconitus* were identified as carriers of *P. caprae* DNA. This marks the first time that *An. subpictus* and *An. aconitus* have been implicated as potential vectors for *P. caprae*.

8. Publication of research achievements

8.1 Nguyen AHL, Nugraheni YR, Nguyen TT, Aung A, Narapakdeesakul D, Kaewlamun W, **Asada M, Kaewthamasorn M. 2023.** Molecular characterization of anopheline mosquitoes from the goat malaria-endemic areas of Thailand. *Med Vet Entomol.* 37(2):381-395. doi: 10.1111/mve.12638.

8.2 Nguyen AHL, Pattaradilokrat S, Kaewlamun W, Kaneko O, **Asada M, Kaewthamasorn M. 2023.** Myzomyia and Pyretophorus series of *Anopheles* mosquitoes acting as probable vectors of the goat malaria parasite *Plasmodium caprae* in Thailand. *Sci Rep.* 13(1):145. doi: 10.1038/s41598-022-26833-4.

Attach reference materials as necessary.

Received: 27 June 2022 | Accepted: 20 December 2022

DOI: 10.1111/mve.12638

ORIGINAL ARTICLE

Medical and Veterinary
Entomology



Molecular characterization of anopheline mosquitoes from the goat malaria-endemic areas of Thailand

Anh Hoang Lan Nguyen^{1,2} | Yudhi Ratna Nugraheni^{1,2,3} | Trang Thuy Nguyen^{1,2} |
Aung Aung^{1,2} | Duriyang Narapakdeesakul^{2,4} | Winai Kaewlamun⁵ |
Masahito Asada⁶ | Morakot Kaewthamasorn²

¹The International Graduate Program of Veterinary Science and Technology (VST), Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Veterinary Parasitology Research Unit, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

⁴Veterinary Pathobiology Graduate Program, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

⁵School of Agricultural Resources, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

⁶National Research Center for Protozoan Diseases, Department of Global Cooperation, Research Unit for Global Infection Control, Obihiro University of Agriculture and Veterinary, Obihiro, Japan

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN **Myzomyia and Pyretophorus series of *Anopheles* mosquitoes acting as probable vectors of the goat malaria parasite *Plasmodium caprae* in Thailand**

Anh Hoang Lan Nguyen^{1,2}, Sittiporn Pattaradilokrat³, Winai Kaewlamun⁴, Osamu Kaneko⁵, Masahito Asada⁶ & Morakot Kaewthamasorn²

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: June 30, 2023

Project no: 2022-joint-21

1. Principal investigator

Name: Batdorj Davaasuren

Position: Researcher

Affiliation: Institute of Veterinary Medicine

2. Project title:

Investigation of parasitic strategy, especially tissue parasitism of *T. equiperdum* on horse

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Keisuke SUGANUMA

Position: Assistant Professor

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

01/04/2022 – 331/03/2023, 1 year

5. Purposes and objectives

Trypanosoma equiperdum primarily parasitizes the genital organs and causes dourine in equidae. Dourine is considered an economically important disease of horses in Mongolia. In the previous studies, we have collected autopsy samples from naturally infected horse. Autopsy sample from naturally infected horse provide only a window of information about infection at the time of euthanasia and it cannot provide dynamics of infection. Therefore, the objective of this study was to determine the parasitism of *T. equiperdum* by sequential sampling from *T. equiperdum* experimental infection in horses.

6. Outline of research process

1. *T. equiperdum* IVM-t1 strain was experimentally infected to 3 horses.
2. From two days the post infection, the infected horses' basic physiological parameters were measured, and also samples (blood, serum, milk and genital organ's swab) were collected.
3. Parasites were microscopically observed using thin blood smears.
4. DNA were extracted from blood, swab and milk samples.
5. The extracted DNA was analyzed by PCR assay using the parasite specific primers.
6. Serum samples were applied for ELISA and ICT to detect anti-trypanosome antibody.

7. Outline of research achievements

Results:

Horse 1 and Horse 2:

Physiological parameters were normal for 50 days post infection. In those horses, we made the experimental infection with 1×10^5 and 1×10^6 parasites by vagina. There is no detected parasite DNA in the blood and swab of those horses. When I analyze the horse's sera by ELISA and ICT tests which are based on recombinant antigens (rTeGM6), no detected any positive by both methods. Also, I didn't find any parasite from the blood smears.

Horse 3

In this horse, we made the experimental infection with dilution of the parasite 1×10^5 , by vein. For general blood parameters, the number of white cells has increased from 10th day post-infection. This means that inflammation has already developed in the horse. As for the PCR assay in blood samples, the positive bands have detected from the third day of post-infection in the horse. But no detected any positives from swab samples in this horse. Antibody titer has increased a little in the horse from 14th days of post infection was detected by ELISA test. But not detected any positive by ICT test. The antibody titer which against the parasite was increased a little in the horse's serum from 14th days of post infection was detected by ELISA test. But not detected any positive by ICT test and blood smear.

Discussion

In the horse, that only was made an experimental infection with *T. equiperdum* IVM-t1's culture (1×10^5) by vein, was detected as positive on the 3rd day post-infection only in blood by PCR, and at 14th days post-infection in serum by ELISA, respectively. But the ICT test did not show any positives. That means the parasite culture adapted to laboratory environment couldn't survive in vaginal condition compare to natural wild-type, while the culture is only able to survive in blood circle of the horse. The present study is the first time conducted experimental infection in a real host (horse) by the *T. equiperdum* IVM-t1 strain in Mongolia.

8. Publication of research achievements

None

Attach reference materials as necessary.

None

令和5年8月31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/>

