

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 2023 | 令和5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

<b>1. センターの概要</b>	1
①沿革	1
②設置目的等	2
<b>2. 組織等</b>	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
<b>3. 予算、決算、外部資金等</b>	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
<b>4. 研究活動</b>	10
①共同利用・共同研究の実施件数（進行中のものも含む）	10
②共同研究課題採択一覧	10
③共同利用・共同研究の参加状況	12
④学会誌、学術雑誌、国際会議等に掲載された論文数	12
⑤出版物の発行部数	13
⑥受賞状況	13
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	13
<b>5. 国際交流状況</b>	14
①国際シンポジウム等の主催・参加状況	14
②国際学術交流協定の状況	15
③国際的な研究プロジェクトへの参加状況	16
④研究者の海外派遣状況・外国人研究者の招へい状況（延べ人数）	22
⑤その他・国際研究協力活動の状況	22
<b>6. 教育活動・人材養成</b>	23
①大学院生等の受入状況	23
②留学生の受入状況	23

③本センターを利用して学位を取得した大学院学生数	23	
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	24	
<b>7. 情報発信・広報活動等</b>	<b>25</b>	
①研究活動等の公開状況（講演会、公開講座等）	25	
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	26	
<b>8. 教員の研究活動</b>	<b>27</b>	
先端治療学分野	鈴木宏志 教授	27
	西川義文 教授	33
	渡邊奈々子 特任助教	38
	窪田理恵 特任助教	41
高度診断学分野	横山直明 教授	44
	白藤梨可 准教授	52
先端予防治療学分野	井上昇 教授	56
	菅沼啓輔 助教	60
感染病理学分野	五十嵐慎 教授	65
	福本晋也 准教授	67
地球規模感染症学分野	玄学南 教授	71
	麻田正仁 准教授	79
国際協力分野	河津信一郎 教授	83
<b>9. 共同研究成果報告書</b>	<b>88</b>	
トキソプラズマ分泌性タンパク質と宿主ミトコンドリアの親和性解析	89	
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	91	
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	93	
Molecular characterization and genetic diversity of tick-borne diseases in Nepal	95	
カブリダニの卵形性の分子機構解明と人口飼料開発への応用	97	
マラリア原虫オーシスト形成・分化に関する分子機構の解明： 壁構成蛋白質の探索から	100	
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	102	
トキソプラズマの保有する2つのアクアポリン分子が関与する 病原性発現機構	104	

組換えアクアポリンを用いた抗マダニワクチンの構築	106
高増殖型マダニ細胞の作出	109
マラリア原虫のスポロゾイト形成における Brca2 の機能	111
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	113
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	115
北海道における海獣由来トキソプラズマの単離培養法の確立と全ゲノム解析	118
ヒストン修飾酵素阻害剤によるマラリア原虫増殖阻害とその分子基盤の解明	120
ウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定に向けた次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の構築	122
漢方薬構成生薬 – 特に黄芩・黄耆のフラボノイド類 – の 原虫病への応用を志向した構造活性相関研究	124
Genetic diversity of <i>Theileria equi</i> infecting equines in India and quantification of parasite loads	126
Detection and surveillance of <i>Haemaphysalis longicornis</i> (Neuman, 1901) in Mexico	129
Molecular detection and genetic characterization of <i>Babesia caballi</i> and <i>Theileria equi</i> in horses and donkeys in Malawi	131
Establishment of DiCre parasite lineages to study essential aspartyl peptidases of <i>Babesia</i>	134

# 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 m<sup>2</sup>）、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 m<sup>2</sup>）

### 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 m<sup>2</sup>）

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 m<sup>2</sup>）

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5年度 (R05.12.31 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
特任助教	2	2	0	2	2	0
合 計	13	3	1	3	2	0

### ②技術系職員数

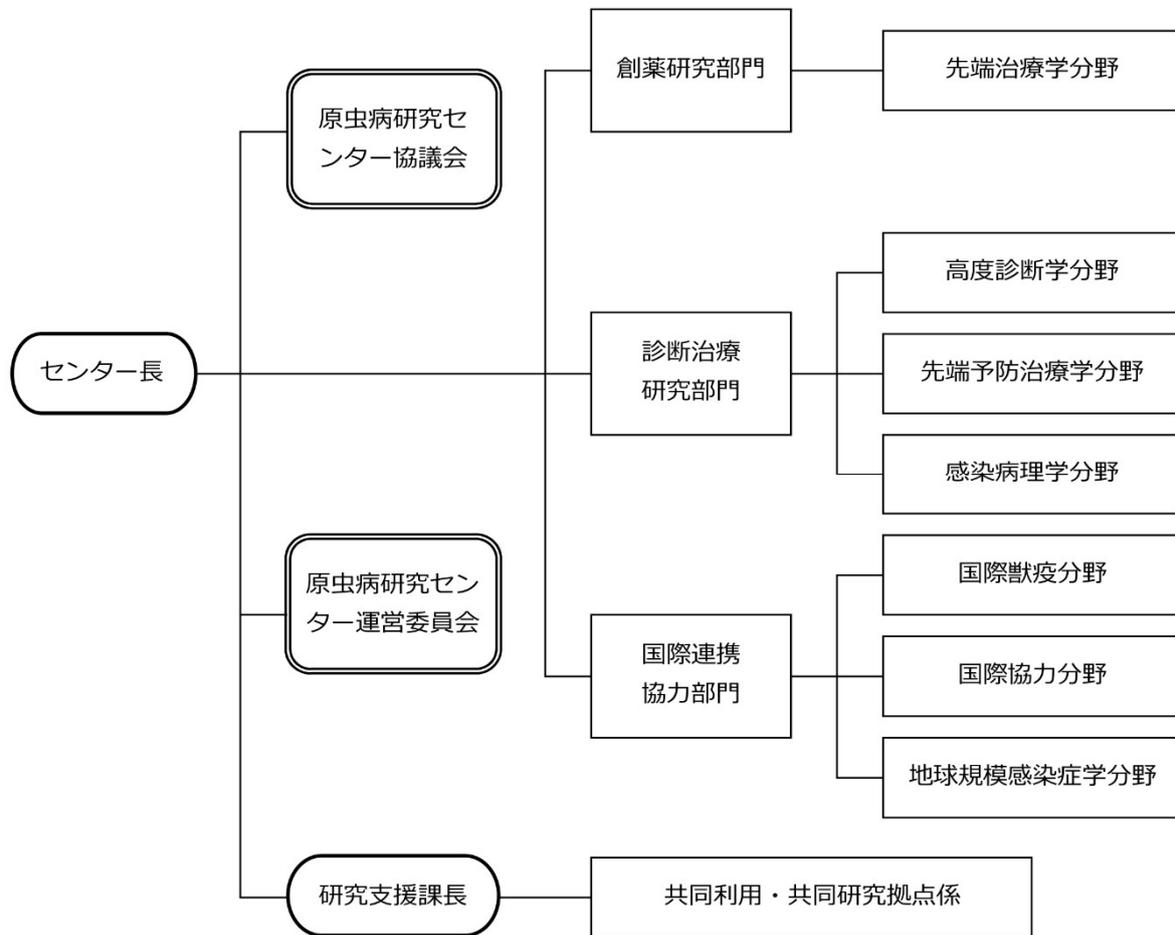
区 分	令和5年度 (人)
技術系職員数	10
うち常勤	7
うち非常勤	3

### ③事務系職員数

区 分	令和5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5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	モンゴル国立生命科学大学獣医学研究所	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 5 年度（単位：百万円）	
	決算額	うち運営費交付金
人 件 費	147	137
物 件 費	207	35
計	354	172

#### 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 5 年度 (単位：百万円)	13	354	186	27.2	14.3

### ③科学研究費等の採択状況

研究種目	研究課題番号	新規 継続	職名・代表者	金額 (直接経費) (単位：千円)
基盤研究(B)	21H02353	継続	教授・西川 義文	3,200
基盤研究(B)	22H02509	継続	教授・玄 学南	3,900
基盤研究(B)	22H02510	継続	准教授・福本 晋也	3,800
基盤研究(B)	22H02511	継続	教授・横山 直明	3,900
基盤研究(B)	22H02512	継続	准教授・白藤 梨可	3,800
基盤研究(B)	23H02377	新規	教授・井上 昇	3,700
挑戦的研究(萌芽)	22K19235	継続	准教授・福本 晋也	2,400
挑戦的研究(萌芽)	23K18071	新規	教授・西川 義文	1,600
国際共同研究強化 (B)	19KK0175	継続	准教授・福本 晋也	2,600
国際共同研究強化 (B)	20KK0152	継続	教授・西川 義文	3,000
国際共同研究強化 (B)	21KK0121	継続	准教授・麻田 正仁	4,100
国際共同研究強化 (B)	22KK0095	継続	教授・横山 直明	5,100
海外連携研究	23KK0125	新規	教授・河津 信一郎	2,300
基盤研究(C)	22K05982	継続	准教授・麻田 正仁	1,000
若手研究	22K15006	継続	特任助教・ 潮 奈々子	1,900
特別研究員奨励費	22KJ1203	継続	特任助教・ 窪田 理恵	1,100
特別研究員奨励費	22KF0015	継続	特任研究員・ MOHANTA UDAY	1,100
特別研究員奨励費	22KF0016	継続	特任研究員・ EL-SAYED SHIMAA	1,100
特別研究員奨励費	22KF0019	継続	特任研究員・ GUSWANTO	1,100
特別研究員奨励費	23KJ0074	新規	大学院生・ DO THANH THOM	1,000

特別研究員奨励費	23KF0131	新規	特任研究員・ MACALANDA ADRIAN MIKI	1,000
----------	----------	----	------------------------------------	-------

#### ④ その他の外部資金獲得状況

予算種目	番号	新規 継続	職名・代表者	金額 (直接経費) (単位：千円)
国立研究開発法人 日本医療研究開発 機構	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	3,016
国立大学法人北海 道大学	卓越大学院プロ グラム	継続	教授・西川 義文	1,800
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 研究基盤創生事 業(海外拠点活用 研究領域)	新規	教授・横山 直明	7,000
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	研究拠点形成事 業(アジア・アフ リカ学術基盤形 成型)	新規	教授・河津 信一郎	6,000
独立行政法人日本 学術振興会	二国間交流事業 共同研究(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)	継続	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(スリラ ンカ)	継続	教授・横山 直明	2,000
独立行政法人日本 学術振興会	二国間交流事業 共同研究(南アフ リカ)	継続	助教・菅沼 啓輔	2,500
A(株)	共同研究	新規	準教授・白藤 梨可	200

B (株)	共同研究	継 続	准教授・福本 晋也	5,338
(株) 白寿生科学研 究所	寄附講座	継 続	教授・鈴木 宏志	1,000
公益財団法人秋山 記念生命科学振興 財団	秋山記念生命科 学振興財団研究 助成	新 規	助教・菅沼 啓輔	500
C (株)	寄付金	新 規	教授・鈴木 宏志	2,700

## 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	5
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	5
うち国内での共同利用・共同研究数	16
うち共同利用・共同研究拠点としての実施件数	16

### 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
小柴 琢己	トキソプラズマ分泌性タンパク質と宿主ミトコンドリアの親和性解析	西川 義文
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
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
Kishor Pandey	Molecular characterization and genetic diversity of tick-borne diseases in Nepal	麻田 正仁
鈴木 丈詞	カブリダニの卵形性の分子機構解明と人口飼料開発への応用	白藤 梨可
筏井 宏実	マラリア原虫オーシスト形成・分化に関する分子機構の解明：壁構成蛋白質の探索から	福本 晋也
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
正谷 達膳	トキソプラズマの保有する2つのアクアポリン分子が関与する病原性発現機構	玄 学南
田仲 哲也	組換えアクアポリンを用いた抗マダニワクチンの構築	白藤 梨可
中尾 亮	高増殖型マダニ細胞の作出	白藤 梨可
吉川 泰永	マラリア原虫のスポロゾイト形成における Brca2 の機能	福本 晋也
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

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
彦坂 健児	北海道における海獣由来トキソプラズマの単離培養法の確立と全ゲノム解析	福本 晋也
荒木 球沙	ヒストン修飾酵素阻害剤によるマラリア原虫増殖阻害とその分子基盤の解明	河津信一郎
石崎 隆弘	ウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定に向けた次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の構築	麻田 正仁
村田 敏拓	漢方薬構成生薬 – 特に黄芩・黄耆のフラボノイド類 – の原虫病への応用を志向した構造活性相関研究	菅沼 啓輔
Sanjay Kumar	Genetic diversity of <i>Theileria equi</i> infecting equines in India and quantification of parasite loads	横山 直明
Consuelo Almazán	Detection and surveillance of <i>Haemaphysalis longicornis</i> (Neuman, 1901) in Mexico	白藤 梨可
Elisha Chatanga	Molecular detection and genetic characterization of <i>Babesia caballi</i> and <i>Theileria equi</i> in horses and donkeys in Malawi	横山 直明
Daniel Sojka	Establishment of DiCre parasite lineages to study essential aspartyl peptidases of <i>Babesia</i>	麻田 正仁

### ③共同利用・共同研究の参加状況

区 分	令和5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	62 (32)	35 (16)	45 (26)	18 (12)	971 (493)	520 (291)	723 (376)	360 (228)
国立大学	10	32 (6)	2 (2)	7 (5)	2 (2)	83 (21)	9 (9)	44 (15)	5 (5)
公立大学	1	5 (2)	0 (0)	3 (2)	1 (1)	9 (4)	0 (0)	6 (4)	2 (2)
私立大学	7	9 (0)	0 (0)	3 (0)	0 (0)	15 (0)	0 (0)	4 (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	12	24 (12)	0 (0)	4 (4)	0 (0)	43 (20)	0 (0)	6 (6)	0 (0)
民間機関	11	20 (4)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	32 (6)	0 (0)	2 (2)	0 (0)
外国機関	26	44 (20)	41 (18)	6 (4)	1 (1)	649 (296)	627 (283)	377 (224)	39 (39)
その他	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
計	74	196 (76)	78 (36)	69 (42)	22 (16)	1802 (840)	1156 (583)	1162 (627)	406 (274)

※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5年度
論 文 数	68
うち国際学術誌に 掲載された論文数	68

## 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
汲 生威	第 14 回日本獣医寄生虫学奨励賞	R5 年 9 月	Efficacy of the antimalarial MMV390048 against <i>Babesia</i> infection reveals phosphatidylinositol 4-kinase as a druggable target for babesiosis
GALON Eloiza May Saldua	第 14 回日本獣医寄生虫学奨励賞	R5 年 9 月	Characterization of bovine piroplasma populations in the Philippines using targeted amplicon sequencing (Ampliseq)
末永 羅綺	第 69 回 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 若手奨励賞	R5 年 10 月	<i>Entamoeba invadens</i> の感染はウミガメ飼育におけるリスク要因となる
水野 寛太	第 69 回 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会長賞	R5 年 10 月	フタトゲチマダニにおける Immune Deficiency (IMD) 経路構成分子の探索と <i>Babesia ovata</i> に対する免疫機能について
井上 昇	モンゴル国卓越研究者賞受賞	R5 年 11 月	「卓越研究者賞」は 50 年以上の歴史を有し、毎年モンゴル国の科学の発展と向上に貢献した研究者に贈られるもので、井上が 1015 人目の受賞者となった

## 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
2	73	10	180	0	0	12	253

## 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5年度		
主催件数	2		
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	R5.9.28	第5回国際シンポジウム マダニとマダニ媒介感染症の制御戦略	41 (32)
2	R5.10.24 ～10.26	JSPS Core to Core Program / Kick-off meeting Establishment of South-South and Triangular Cooperation Core for Elimination of Asian Zoonotic Schistosomiasis	32 (22)

#### (2)参加状況

区 分	令和5年度		
参加件数	3		
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	R5.5.1～ 5.3	3rd Joint Meeting of Veterinary Science in East Asia	3
2	R5.7.11～ 7.15	SSR 56th Annual Conference	2
3	R5.8.21～ 8.24	第29回世界獣医寄生虫学会	2

## ②国際学術交流協定の状況

協定総数	13						
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	2028年 3月	フィリピン	フィリピン大学マニラ校公衆衛生学部	MOU	原虫病	5	5
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
2016年 6月	2026年 6月	ブルキナファソ	ワガドゥーグー大学	MOU	原虫病	0	0
2017年 6月	2027年 12月	南アフリカ	ノースウェスト大学	MOU	原虫病	2	1
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	2	6
2019年 7月	2024年 7月	フィリピン	フィリピンカラバオセンター	MOU	原虫病	0	0
2019年 7月	2024年 7月	スリランカ	スリランカ動物生産健康局	MOU	原虫病	0	0
2019年 10月	2028年 2月	フィリピン	カビテ州立大学	MOU	原虫病	0	0
2021年 10月	2026年 10月	中国	新疆農業大学獣医学部	MOA	原虫病	2	3
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	0
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
2023年 7月	2028年 7月	キルギス	キルギス共和国獣医学研究所	MOU	原虫病	1	0
2023年 11月	2028年 11月	韓国	SD バイオセンサー社	MOU	原虫病	0	0
合 計						14	15

### ③国際的な研究プロジェクトへの参加状況

総 数	11		
参加期間	相手国・研究機関名	研究プロジェクト等の概要	関係研究者名
令和元年度～令和5年度	ウガンダ・マケレレ大学および Kiboga 県の農家、獣医師、畜産技師	<p>プロジェクト名:独立行政法人国際協力機構 草の根技術協力事業パートナー型、マダニ媒介感染症制御による畜産農家支援プログラム</p> <p>プロジェクト概要:これまでに蓄積した研究成果の社会還元事業である。より具体的には、科学的根拠に基づいたマダニ駆除ならびにマダニ媒介感染症対策プログラムを構築し、対象農家の生産性を改善しようとするものである。</p> <p>参加国:日本・ウガンダ</p> <p>予算見込み額:10,000万円</p>	鈴木 宏志 玄 学南 藤崎 幸蔵 ら
令和元年度～令和5年度	タイ・チェンマイ大学・プリンスオブソンクラ大学	<p>プロジェクト名:国際共同研究強化(B)、フィリ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症疫学調査を行い、どのような遺伝子応答が蚊による犬糸状虫の媒介に重要なのかフィールドレベルで解析を行うことを目指す。</p> <p>参加国:日本・タイ</p> <p>予算見込み額:1,410万円</p>	福本 晋也

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：1,450万円</p>	西川 義文
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	<p>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</p> <p>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。</p> <p>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：1,932万円</p>	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4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	<p>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</p> <p>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。</p> <p>参加国：日本・チェコ共和国            予算見込み額：475 万円</p>	河津 信一郎
3 年度～令和6年度	タイ・チュラロンコン大学	<p>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</p> <p>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。</p> <p>参加国：日本・タイ            予算見込み額：1,470 万円</p>	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	<p>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</p> <p>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。</p> <p>参加国：日本・モンゴル            予算見込み額：1,540 万円</p>	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

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5年度～令和7年度	インドネシア・インドネシア国立研究改革庁、カンボジア・カンボジア保健省国立マラリアセンター、ラオス・ラオス熱帯医学公衆衛生研究所、フィリピン・フィリピン大学マニラ校、フィリピン農業省カラバオセンター	<p>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、アジア型住血吸虫症の排除に向けた南南・三角協力拠点の構築</p> <p>プロジェクト概要：住血吸虫症は世界的に分布する人獣共通感染症で、WHOはこの感染症をNTDsの一つに指定して、そのコントロールを推進している。アジアでは、日本住血吸虫症及びメコン住血吸虫症が、それぞれ、中国・フィリピン・インドネシア及びカンボジア・ラオスの農村や漁村で流行している。住血吸虫症の排除に向けては、患者の治療及び患者への感染源となる動物（保虫宿主対策）への対策を並行して行う必要がある。一方、寄生虫病の高度流行地では患者の特効薬プラジカンテルによる治療が最優先課題になるが、診断法の不備から、この対策を巧く運用できていない。そこで、フィリピン大学との共同研究で開発した診断技術を社会実装するため、フィリピン大学マニラ校公衆衛生学部、フィリピン農業省カラバオセンター、インドネシア国立研究改革庁、カンボジア保健省国立マラリアセンター及びラオス熱帯医学公衆衛生研究所に、アジア型住血吸虫症の排除に向けた高度診断・疫学調査協力拠点を構築する。</p> <p>参加国：日本・インドネシア・カンボジア・ラオス・フィリピン</p> <p>予算見込み額：1,800万円</p>	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5年度～令和9年度	フィリピン・フィリピン大学	<p>プロジェクト名：国際共同研究加速基金(海外連携研究)、ワンヘルス・アプローチに基づく日本住血吸虫症対策の創出を目指した研究</p> <p>プロジェクト概要：日本住血吸虫症の排除を達成するには、患者の治療及び患者への感染源となる動物（保虫宿主）への対策を並行して行う必要がある。住血吸虫症の治療には特効薬プラジカンテルが用いられ、一般に、この薬による流行地住民への集団治療（MDA）が、この寄生虫病の流行が認められる国と地域での主要な対策になっている。本研究では(1)独自に開発した診断法を応用した住民と動物での有病率の調査及び(2)寄生虫ライフサイクルの推定を目的としたマイクロサテライトマーカーによる多座位の遺伝子型解析（STR/MLG）技術に立脚して、ヒトと動物の双方を対象にした集団治療（One-Health MDA）を寄生虫病対策の現場で試行し評価することを目的とする。</p> <p>参加国：日本・フィリピン          予算見込み額：1,620万円</p>	河津信一郎

#### 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5年度	
		派遣状況	招へい状況
事業区分	合計	67	40
	文部科学省事業	0	0
	日本学術振興会事業	29	24
	当該法人による事業	28	7
	その他の事業	10	9
派遣先国	① アジア	39	29
	② 北米	3	1
	③ 中南米	0	2
	④ ヨーロッパ	5	4
	⑤ オセアニア	1	0
	⑥ 中東	0	1
	⑦ アフリカ	19	3

#### 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 国別研修（エチオピア）	人獣共通感染症対策（寄生虫病含む）研究者育成コース	1	
JICA 課題別研修	人獣共通感染症コントロールのための検査技術と研究能力強化コース	10	
合計		11	

## 6. 教育活動・人材養成

### ①大学院生等の受入状況

区 分	令和5年度	
		うち外国人
博士後期課程	16	15
うち社会人 DC	0	0
修士・博士前期課程	5	4
うち社会人 MC	0	0
学 部 生	18	0
合 計	39	19

### ②留学生の受入状況

区 分	令和5年度
① アジア	12
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	2
⑧ アフリカ	4
合 計	19

### 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5年度	
	学内	学外
博士号取得者数	2	0

#### ④本センターを利用して学位を取得した大学院学生一覧

1	専攻分野名	大学院獣医学専攻	学位授与年月日	R5年3月19日
	氏名	アヘドール ビリーヴ Ahedor Believe (ガーナ)	担当教員	横山 直明
	学位論文の題名	Molecular epidemiology and genotypic diversity of equine piroplasma parasites		
	日本語訳	馬ピロプラズマの分子疫学調査と遺伝子型の多様性		
2	専攻分野名	大学院獣医学専攻	学位授与年月日	R5年3月19日
	氏名	ザファー イラ Zafar Iqra (パキスタン)	担当教員	玄 学南
	学位論文の題名	Investigating cross-species immunity and disease modulation in Babesia co-infections		
	日本語訳	バベシア共感染における種間免疫と疾患調節の研究		

## 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		セミナー 公開講座		その他 (施設等の一般公開等)		合 計	
件 数	参加人数	件 数	参加人数	件 数	参加人数	件 数	参加人数
2	280	6	349	0	0	8	629
○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		
R5.4.14	セミナー	一般	石垣島・家畜保健衛生所との学术交流セミナー	昨年の北海道の牧野調査の成果、低病原性バベシアの国内疫学調査の成果	5		
R5.5.23	セミナー	一般	石垣島・家畜保健衛生所との学术交流セミナー	牛小型ピロプラズマ病の現状と対策について	3		
R5.6.8	公開講座	一般	農林水産省家畜衛生講習会（牛疾病特殊講習会）	「Current status and control of oriental theileriosis in Japan」と言う講義タイトルで、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	47		
R5.6.30	講演会	一般	動物検疫所・業績発表会（招待講演）	OIE リファレンスラボラトリーの活動と最近の知見について	200		
R5.7.11	公開講座	一般	愛知県立半田高等学校出張講義	“獣医学”はおもしろい！	60		
R5.7.29	公開講座	一般	令和5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	214		
R6.1.19	講演会	一般	動物検疫所精密検査部報告会_特別講演会	トリパノソーマ症の基礎知識と WOH マニュアルに基づく診断に際して考慮すべき事	80		
R6.3.15	公開講座	一般	茶安別地域振興会酪農部・講習会	北海道に潜む“人にも感染する寄生虫”とは？	20		

## 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「とかちマダニじてん」を制作し、公開している。</p> <p>さらに、平成 29 年度には 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 (UDSA-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。そこで、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 $\alpha$ -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。さらに、 $\alpha$ -tocopheryloxy acid は、マラリア原虫感染に加え、トリパノソーマ感染に対しても効果的な抗原虫作用を有することを、in vivo および in vitro の実験系で証明しました。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。

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、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、抗インヒビリ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ています。

イヌではLHサージ(LH0)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LH1~2で排卵が始まり、82%の卵胞がLH2~3で排卵しました。また、排卵が2日および3日にわたって起こったサイクルが、それぞれ半数ずつで、1日以内に排卵が完了したサイクルは認めませんでした。71%のサイクルではLH2で最大数が排卵しました。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)が速いことを認めました。これらの成績は、非侵襲的な胚の性別判別法の開発につながることを期待されます。

## 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. 2023 年度研究の総括

- ・ これまでに、ミイトカンとして知られているビタミン E 誘導体  $\alpha$ -tocopheryloxy acetic acid ( $\alpha$ -TEA) が、*P. berghei* ANKA および *P. falciparum* による感染、さらには *Trypanosoma congolense* 感染に対して、効果的な抗原虫作用を発揮することを示してきました。本年度は、*T. congolense* 感染に対する  $\alpha$ -TEA 作用機序の解析を行いました。*T. congolense* は、ウシをはじめとする家畜に動物アフリカトリパノソーマ症を引き起こす原虫であります。動物アフリカトリパノソーマ症は慢性的に進行し、しばしば致死的な経過を辿る消耗性の疾患で、サブサハラアフリカを中心に経済的損失が問題となっています。トリパノソーマ症に対する治療薬は存在するものの、いずれも開発から数十年が経過しており、耐性原虫の出現が報告されていることから新たな薬剤開発が求められているところです。 $\alpha$ -TEA は、がん細胞のミトコンドリアを刺激することで酸化ストレスを発生させアポトーシスを引き起こすことが報告されている化合物ですが、すでに我々は、 $\alpha$ -TEA の経口投与が *T. congolense* 感染マウスの生存率を上昇させることを認めており、本年度は、その作用機序の解析を行いました。はじめに、*T. congolense* の in vitro 培養系を用いて  $\alpha$ -TEA (0~25  $\mu$ g/ml) の増殖抑制効果を解析することによって  $\alpha$ -TEA の原虫に対する直接作用の有無を検討しました。続いて、Annexin V (AV) 及び Propidium Iodide (PI) 染色によるアポトーシスの検出、JC-1 染色によるミトコンドリア膜電位の検出、2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) および mtSOX 染色による酸化ストレスの検出を通して抗原虫効果の作用機序を詳細に解析しました。*T. congolense* の  $\alpha$ -TEA 存在下の培養によって、培養開始後 36 時間以降、対照群と比較して *T. congolense* の増殖が有意に抑制されました ( $p < 0.05$ )。また、 $\alpha$ -TEA 50  $\mu$ g/ml 群では 25  $\mu$ g/ml 群と比較しても培養開始後 36 時間以降、増殖が有意に抑制されました ( $p < 0.05$ )。AV および PI 染色では、 $\alpha$ -TEA 処理により培養開始後 6 時間以降、AV 陽性細胞の増加が認められました。JC-1 染色では  $\alpha$ -TEA 処理により培養開始後 12 時間以降、赤色と緑色の蛍光強度比が対照群と比較して有意に低下しました ( $p < 0.05$ )。DCFH-DA および mtSOX 染色では 60 分間の  $\alpha$ -TEA 処理後、DCFH-DA の蛍光強度には対照群と比較して有意差は認められなかったものの mtSOX の蛍光強度は対照群と比較して有意に増加しました ( $p < 0.05$ )。以上、*T. congolense* の in vitro 培養系において、 $\alpha$ -TEA の直接的かつ濃度依存的な増殖抑制効果を認めました。また、この効果は、 $\alpha$ -TEA が *T. congolense* のミトコンドリアに特異的な酸化ストレスを発生させることでミトコンドリアの機能を障害し、アポトーシスを引き起こした結果であると考えられる成績でした。本研究により、 $\alpha$ -TEA は、がん細胞と同様の作用機序により抗原虫効果を示すことが示唆されたましたが、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。昨年度までに、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および過剰排卵の誘起を試みた結果、IAS と eCG の混合投与によって発情が誘起され、過剰排卵に至ること、また、eCG 単独投与で見られた P<sub>4</sub> 濃度の低値および排卵率の低下を改善できること見出し、さらには、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た結果、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頭との成績を得ました。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 P<sub>2</sub> 濃度は LH<sub>2</sub> 以降、妊娠例の1.8~3.0倍高く、E<sub>2</sub> 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 P<sub>4</sub> および E<sub>2</sub> 濃度が有意に高いことが明らかとなり、P<sub>4</sub> および E<sub>2</sub> 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。そこで本年度は、適切な P<sub>4</sub> および E<sub>2</sub> 濃度を維持できる IAS 投与量を見出すために、体表面積に基づいた IAS の投与量 (0.07 ml/kg) の妥当性を検討しました。0.07 ml/kg IAS と eCG の併用により、7頭中6頭で発情徴候が認められ、そのうち5頭で排卵が確認されました。これらの成績は IAS を 0.5 ml/kg から 0.07 ml/kg に減量しても発情を誘起できることを示しています。排卵に至った個体の平均卵胞数は11個、平均黄体数は7.2個であり、排卵率は65.5%でした。卵胞数は自然発情時の7.8個 (Tsuchida et al., 2021) よりも3個以上多い結果でしたが、黄体形成は自然発情時 (7.8個、Tsuchida et al., 2021) と同等数でした。IAS 投与量が 0.5 ml/kg の時の平均卵胞数および黄体数は12.3個で、排卵率は100%であったことから、この成績と比較すると黄体数は約5個減少した結果でした。過剰排卵となった個体 (黄体数10) の血中エストラジオール濃度は200 pg/ml を超え、0.5 ml/kg IAS 投与時の非妊娠群と同様の推移を示しました。非生理的なエストラジオール濃度の上昇はヒトやマウスで胚の着床阻害が報告されています。昨年の方々の交配実験の結果からは、イヌでも同様の現象が生じた可能性があり、本実験の過剰排卵となった個体も妊娠には至らないものと推測されました。昨年の0.5 ml/kg IAS 投与の実験では、非生理的に上昇したエストラジオール濃度が原因で妊娠阻害が起こり妊娠率は50%、平均産仔数は2.7頭でした。今年度は、IAS の量を減らすことでエストラジオール濃度の上昇を抑え、妊娠可能な範囲に留めることを目指しましたが、本実験のエストラジオール濃度は、0.5 ml/kg IAS 投与時の妊娠群に比べ上昇傾向にあるものの LH-4 以降有意差はなく、0.5 ml/kg IAS 投与時の非妊娠群より有意に低いことから、妊娠の可能性が十分にあることが期待される成績でした。0.07 ml/kg IAS と eCG の併用処置では過剰排卵処置の効果は見られなかったものの、性周期の任意なタイミングで発情を誘起できる点から効率的な繁殖が行える可能性があるため、今後、交配実験を行い妊娠率、リッターサイズを調べることで求められます。

#### 4. 学会等の活動状況

##### ① 所属学会等、役職等

- ・ 日本卵子学会常任理事・広報担当
- ・ 日本熱帯医学会評議員
- ・ 日本繁殖生物学会評議員
- ・ 日本寄生虫学会評議員
- ・ 日本獣医学会評議員
- ・ 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. 2023 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. doi: 10.3390/microorganisms11040822.

### 総説

1. 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. doi: 10.3164/jcbrn.22-61.

## **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、2021年の1年間に約2億4700万人が感染し、推計61万9,000人が死亡しています。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. 2023年度研究の総括

ネオスポラ抗原 NcSAG1 は原虫の宿主細胞への接着と侵入に関与していることが示唆されている。そこで、NcSAG1 がネオスポラ症の病因に寄与していることを確認するため、NcSAG1 の遺伝子破壊株 (NcSAG1KO) を作製し、*in vitro* および *in vivo* における解析を行った。NcSAG1 遺伝子の欠損は、感染率を有意に低下させ、原虫の宿主細胞からの脱出を低下させた。非妊娠 BALB/c マウスを用いた *in vivo* 試験では、NcSAG1KO 感染群は親株感染群に比べて生存率が有意に高く、体重変化も少なかった。また、BALB/c マウスの垂直感染モデルについては、NcSAG1 遺伝子を欠損させることにより、仔マウスの生存率が有意に向上し、仔マウスの脳内原虫感染率が大幅に低下した。以上より、NcSAG1 がネオスポラの病態形成における重要な分子であることが示唆された。(論文リスト2)

薬剤耐性マラリア原虫の増加や蔓延は甚大な問題となっているため、新たな治療薬の探索が求められている。我々のスクリーニングの結果、フェベスチン (Phebestin) を見出した。*in-silico* 試験の結果、フェベスチンはマラリア原虫の M1 アラニルアミノペプチダーゼ (PfM1AAP) およ

び M17 ロイシルアミノペプチダーゼ (PfM17LAP) に結合することが判明した。マウスマラリア原虫 *P. yoelii* 17XNL 感染マウスを用いた in vivo 評価では、20 mg/kg のフェバスチンを 1 日 1 回、7 日間投与した結果、フェバスチン投与群 (19.53%) の寄生虫血症ピークは、無投与群 (29.55%) よりも有意に低かった。また、同用量・同治療において、マウスマラリア原虫 *P. berghei* ANKA 感染マウスは無治療マウスと比較して寄生虫血症レベルが低下し、生存率も改善した。これらの結果は、フェバスチンがマラリアに対する治療薬として開発可能な有望な候補であることを示している。(論文リスト5)

#### 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

- ・ (第2回) 原虫研創薬研究プロジェクトセミナー 2024年1月24日
- ・ (第1回) 原虫研創薬研究プロジェクト・創薬シンポジウム 2024年2月16日

#### 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. 2023 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. Ruenruetai Udonsom, Poom Adisakwattana, Supaluk Popruk, Onrapak Reamtong, Charoonluk Jirapattharasate, Tipparat Thiangtrongjit, Sarinya Rerkyusuke, Aran Chanlun, Tanjila Hasan, Manas Kotepui, Sukhontha Siri, **Yoshifumi Nishikawa**, Aongart Mahittikorn, Evaluation of Immunodiagnostic Performances of *Neospora caninum* Peroxiredoxin 2 (NcPrx2), Microneme 4 (NcMIC4), and Surface Antigen 1 (NcSAG1) Recombinant Proteins for Bovine Neosporosis. **Animals (Basel)**. 2024 Feb; 14(4): 531. doi: 10.3390/ani14040531.
2. Hanan H Abdelbaky, Md Masudur Rahman, Naomi Shimoda, Yu Chen, Tanjila Hasan,

- Nanako Ushio, Yoshifumi Nishikawa, *Neospora caninum* surface antigen 1 is a major determinant of the pathogenesis of neosporosis in nonpregnant and pregnant mice. **Frontiers in Microbiology**. 2024 Jan; 14: 1334447. doi: 10.3389/fmicb.2023.1334447.
3. Ryotaro Oyama, Harumichi Ishigame, Hiroki Tanaka, Naho Tateshita, Moeko Itazawa, Ryosuke Imai, Naomasa Nishiumi, Jun-Ichi Kishikawa, Takayuki Kato, Jessica Anindita, Yoshifumi Nishikawa, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi, Kota Tange, Yuta Nakai, Yu Sakurai, Takaharu Okada, Hidetaka Akita, An Ionizable Lipid Material with a Vitamin E Scaffold as an mRNA Vaccine Platform for Efficient Cytotoxic T Cell Responses. **ACS Nano**. 2023 Oct; 17(19): 18758-18774. doi: 10.1021/acsnano.3c02251.
  4. Kazuhisa Yamada, Akira Tazaki, Nanako Ushio-Watanabe, Yoshihiko Usui, Atsunobu Takeda, Masaaki Matsunaga, Ayana Suzumura, Hideyuki Shimizu, Hao Zheng, Nanang R Ariefta, Masahiro Yamamoto, Hideaki Hara, Hiroshi Goto, Koh-Hei Sonoda, Koji M Nishiguchi, Masashi Kato, Yoshifumi Nishikawa, Shinya Toyokuni, Hiroki Kaneko, Retinal ferroptosis as a critical mechanism for the induction of retinochoroiditis during ocular toxoplasmosis. **Redox Biology**. 2023 Nov; 67: 102890. doi: 10.1016/j.redox.2023.102890.
  5. Nanang R Ariefta, Baldorj Pagmadulam, Masaki Hatano, Noriko Ikeda, Kunio Isshiki, Kazuaki Matoba, Masayuki Igarashi, Coh-Ichi Nihei, Yoshifumi Nishikawa, Antiplasmodial Activity Evaluation of a Bestatin-Related Aminopeptidase Inhibitor, Phebestin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2023 Jul; 67(7): e0160622. doi: 10.1128/aac.01606-22.
  6. Mo Zhou, Jun Xie, Osamu Kawase, Yoshifumi Nishikawa, Shengwei Ji, Shanyuan Zhu, Shinuo Cao, Xuenan Xuan, Characterization of anti-erythrocyte and anti-platelet antibodies in hemolytic anemia and thrombocytopenia induced by *Plasmodium* spp. and *Babesia* spp. infection in mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2023 Apr; 13: 1143138. doi: 10.3389/fcimb.2023.1143138.

#### 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. Brain manipulation by intracellular parasite, *Toxoplasma gondii*. Mahidol University セミナー、タイ・マヒドン大学熱帯医学部、2023年5月23日
2. Development of next generation vaccine against *Toxoplasma gondii*. 青海省獣医学研究所セミナー、中国・青海省獣医学研究所、2023年8月29日
3. トキソプラズマ感染症の新しい解釈：原虫感染は宿主動物の脳機能や行動を操作することができるのか？、第28回日本生殖内分泌学会、日本専門医機構認定 共通講習（感染対策）、大津市民会館、2023年11月18日
4. Control strategies for *Toxoplasma* infection in humans and animals. ベルン大学 DIP Seminar、スイス・ベルン大学獣医学部、2024年3月20日

## 9. 獲得研究費

1. 令和5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とクリプトスポリジウムが起こすヒト孢子虫類原虫症の病態理解・感染実態把握・制御に向けた総合的研究開発、トキソプラズマ症病態マーカーの同定（23fk0108682s0501）、分担、令和5年度～令和7年度
2. 令和5年度 挑戦的研究（萌芽）（文部科学省）、ネオスポラ感染症に対する環境を汚染しない新たな弱毒生ワクチンの開発研究（23K18071）、代表、令和5年度～令和7年度
3. 令和5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5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5年度
4. 令和5年度北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所一般共同研究（北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所）、トキソプラズマ原虫近縁種の比較トランスクリプトーム解析による病原性決定因子の遺伝子発現調節機構の解明、代表、令和5年度
5. 令和5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
6. 令和5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
7. 令和5年度 基盤研究（C）（一般）（文部科学省）、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？（22K09810）、分担、令和4年度～令和6年度

## 10. 特許申請・取得

該当なし

## 11. 学術に関する受賞状況

該当なし

## 12. 報道等

1. 日本テレビ「カズレーザーと学ぶ。」2023年4月11日、トキソプラズマの放送に関する取材協力
2. 読売新聞「みんなの科学・オオカミをリーダー志向に」2023年6月15日、取材協力
3. NOSAI ほっかいどう「帯広畜産大学を訪ねる」2023年9月、取材協力
4. 共同プレスリリース（名古屋大学）「眼トキソプラズマ症の病態に 鉄を伴う細胞死であるフェロトーシスが関与していることを発見 ～眼トキソプラズマ症の新規診断方法と治療法の確立へ～」2023年10月4日

## 13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. Hadi Kuncoro: Mulawarman University, Screening of Anti-*Toxoplasma* Agent From East Borneo Natural Resource 2018年2月5日～、共同研究契約
2. 小柴 琢己：福岡大学 理学部、トキソプラズマ分泌性タンパク質と宿主ミトコンドリアの親和性解析、2023年4月1日～2024年3月31日、2023年度原虫病研究センター共同研究
3. 兼子 裕規：名古屋大学 医学系研究科・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ーシスの研究、2023年4月1日～2024年3月31日、2023年度原虫病研究センター共同研究
4. 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、2023年4月1日～2024年3月31日、2023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、2023年4月1日～2024年3月31日、2023年度原虫病研究センター共同研究

### 1. 研究テーマの概要

トキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)とネオスポラ(*Neospora caninum*)は宿主域が異なる一方、水平感染や垂直感染によって伝播し、脳内シストとして慢性感染し、妊娠期には異常産を引き起こす点で類似点も多くあります。トキソプラズマは先天性または後天性に感染し、臨床症状としては先天性トキソプラズマ症、脳トキソプラズマ症、眼トキソプラズマ症を引き起こします。したがって、自身の研究テーマとしても中枢神経系における病態、網膜における病態、妊娠期の病態と3つを掲げ、我々の研究室で培ってきたマウスモデルや培養系の技術に、自身のもつ病理学的なアプローチを加え、解析を進めています。さらに、その病理学的知見を用いて、当研究室で発見した薬物の効果および毒性についてマウスモデルを用いて評価しています。

### 2. 主な研究テーマ

- ・ 原虫感染による中枢神経の病態
- ・ 原虫感染による網膜の病態
- ・ 原虫感染による妊娠期の病態

### 3. 2023 年度研究の総括

- ・ 原虫感染による中枢神経の病態

#### 「ネオスポラ感染における脳の病態に関与する原虫由来分子の検討」

ネオスポラ原虫は水平感染や垂直感染によって伝播され、牛には流死産などの異常産や新生子牛の神経症状を引き起こすことが問題となっています。神経症状を呈した牛では、炎症が血管周囲に限局せず脳実質に波及するという特徴を有しており、マウスでは壊死巣を伴います。今回、いくつかの原虫由来分子が感染した神経細胞の細胞体および、周囲の壊死巣に分布することを明らかにしました。このことから、原虫由来分子が感染細胞から分泌または、細胞死に伴って放出されることによって壊死巣に移行する可能性が考えられました。

- ・ 原虫感染による妊娠期の病態

#### 「先天性トキソプラズマ症における胎盤障害と細胞外小胞の評価」

妊娠期にトキソプラズマに感染すると、異常産や先天性トキソプラズマ症が引き起こされます。先天性トキソプラズマ症の確定診断は羊水 PCR 検査によって行われますが、PCR 陽性率は非常に低く、新規診断法の開発が必要です。近年、羊水の細胞外小胞が胎盤や胎児の代謝を反映するマーカーとして注目されていることから、今回マウスモデルの胎盤機能障害を病理学的に評価するとともに、羊水の細胞外小胞について発現変動遺伝子を検索しました。その結果、脂質代謝に関連する異常が胎盤機能障害に関与している可能性が示唆されました。今後は細胞外小胞で検出された遺伝子群がトキソプラズマ感染特異的かを調べるとともに、病態への関与を詳細に検討する予定です。本研究は若手研究(22K15006)の研究費で実施しています。

#### 4. 学会等の活動状況

##### ① 所属学会等、役職等

- ・ 日本寄生虫学会
- ・ 日本獣医病理学専門家協会
- ・ 日本獣医学会
- ・ 日本毒性病理学会

##### 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. 2023 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, Md Masudur Rahman, Naomi Shimoda, Yu Chen, Tanjila Hasan, **Nanako Ushio-Watanabe**, Yoshifumi Nishikawa, *Neospora caninum* surface antigen 1 is a major determinant of the pathogenesis of neosporosis in nonpregnant and pregnant mice. **Frontiers in Microbiology**. 2024 Jan: 14: 1334447. doi: 10.3389/fmicb.2023.1334447.
2. Kazuhisa Yamada, Akira Tazaki, **Nanako Ushio-Watanabe**, Yoshihiko Usui, Atsunobu Takeda, Masaaki Matsunaga, Ayana Suzumura, Hideyuki Shimizu, Hao Zheng, Nanang R Arief, Masahiro Yamamoto, Hideaki Hara, Hiroshi Goto, Koh-Hei Sonoda, Koji M Nishiguchi, Masashi Kato, Yoshifumi Nishikawa, Shinya Toyokuni, Hiroki Kaneko, Retinal ferroptosis as a critical mechanism for the induction of retinochoroiditis during ocular toxoplasmosis. **Redox Biology**. 2023 Nov: 67: 102890. doi: 10.1016/j.redox.2023.102890.

##### 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5年度 若手研究 妊娠期のトキソプラズマ症における脂質代謝調節機構とその影響についての解明（22K15006） 代表 令和4年度～令和5年度
2. 令和5年度 挑戦的研究（萌芽）ネオスポラ感染症に対する環境を汚染しない新たな弱毒生ワクチンの開発研究 分担 令和5年度～令和7年度

## **10. 特許申請・取得**

該当なし

## **11. 学術に関する受賞状況**

該当なし

## **12. 報道等**

該当なし

## **13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）**

該当なし

### 1. 研究テーマの概要

クリプトスポリジウム原虫はすべての哺乳動物に感染し、下痢を引き起こす病原体です。毎年、世界で 50 万人以上の 5 歳未満の子供が下痢性疾患によって死亡しており、クリプトスポリジウム原虫は、その原因病原体の 1 つです。ヒトだけではなく、仔牛のクリプトスポリジウム原虫感染は、重度の下痢や他の病原体との混合感染を引き起こし、衰弱・死亡リスクが上昇するため、畜産業においても問題となっています。しかし、クリプトスポリジウム原虫に有効な薬剤はなく、クリプトスポリジウム症の治療は対処療法であるため、抗クリプトスポリジウム薬や予防薬の開発が喫緊の課題です。我々の研究室では、マウス感染モデルを使って、原虫の細胞感染メカニズムや原虫の発育メカニズムの解明、抗クリプトスポリジウム薬の開発、ワクチンの抗原となる原虫因子に関する研究を行っています。

### 2. 主な研究テーマ

- ・ 抗クリプトスポリジウム原虫薬の探索
- ・ クリプトスポリジウム原虫の細胞侵入メカニズムや発育メカニズムの解明
- ・ 腸管オルガノイドを用いたクリプトスポリジウム原虫の長期 in vitro 培養系の構築
- ・ ワクチン候補原虫抗原の探索

### 3. 2023 年度研究の総括

#### ・ クリプトスポリジウム原虫の in vitro 培養系の構築

抗クリプトスポリジウム原虫薬を探索するためには in vitro 培養系の構築が必要です。クリプトスポリジウム原虫は in vitro 培養下でヒト回盲腸腺がん(HCT-8)細胞に感染し、72 時間で増殖が停止します。そこで、HCT-8 細胞を用いたクリプトスポリジウム原虫の培養系の確立ならびに、長期間の in vitro 培養が可能な腸管オルガノイドを用いてクリプトスポリジウム原虫の培養系の構築を目指しました。今回、HCT-8 細胞を用いた原虫培養系の構築および、マウス由来腸管から小腸上皮細胞の単離し腸管オルガノイドの樹立、クリプトスポリジウム原虫が感染することを確認しました。構築した in vitro 培養系を用いることで、化合物ライブラリーからクリプトスポリジウム原虫に有効な候補抗原虫薬の探索および作用機序の解明につながることを期待されます。

#### ・ クリプトスポリジウム原虫の in vivo 培養系の構築

IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスを用いて、クリプトスポリジウム原虫(*Cryptosporidium parvum*)の系統維持が可能でした。そこで本年度は、IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの導入・維持を行いました。今後は in vivo 下でも薬効効果の高い抗原虫薬の探索を実施する予定です。また、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変クリプトスポリジウム原虫を作出し、分子生物学的な手法を用いて原虫が細胞に侵入および発育するメカニズムの解明を目指します。

#### **4. 学会等の活動状況**

##### **① 所属学会等、役職等**

- ・ 日本寄生虫学会

##### **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. 2023 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**

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 5 年度 特別研究員奨励費（国内研究）（文部科学省）、マラリア原虫の新規アルテミシニン強耐性株の解析と耐性遺伝子の同定（22KJ1203）、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）**

該当なし

### 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）症は、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症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、“牛バベシア症”と“馬ピロプラズマ症”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、動物ピロプラズマ症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、ピロプラズマ症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、ピロプラズマ症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症に関する国際疫学研究
- ・ 国内に蔓延する牛ピロプラズマ症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症の診断法、治療薬、および予防法の確立に向けた基礎研究
- ・ 人バベシア症に関する国際疫学研究

### 3. 2023 年度研究の総括

- ・ Theileria equi の 5 種類の遺伝子型を鑑別できる PCR 法の開発 : *Theileria equi* は、獣医学上重要な馬ピロプラズマ症を引き起こします。*T. equi* は、18S rRNA 配列に基づいて、A、B、C、D、E の 5 つの遺伝子型に分類できます。これらの遺伝子型は、疾病の管理と制御に重要な意味を持ちます。本研究では各遺伝子型を特異的に検出できる PCR 法の開発を試みました。各遺伝子型の 18S rRNA 配列を特異的に増幅できるプライマーを設計し、各遺伝子型の配列を含むプラスミドを用いて、その特異性を評価しました。その後、計 270 頭の *T. equi*-陽性馬の血液 DNA サンプル（スリランカの口バ：92 頭、パラグアイの馬：178 頭）を用いて、本 PCR 法の感度を検証しました。その結果、本 PCR 法は目的とした遺伝子型のみを正確に検出できることが確認されました。また本法は、スリランカの口バサンプルでは 4 つの遺伝子型（A、C、D、E）を、パラグアイの馬サンプルでは 5 つの遺伝子型すべてを検出しました。特に、本 PCR 法は、スリランカとパラグアイのサンプルのそれぞれ 90.2%と 22.5%で、さまざまな組み合わせの複数の遺伝子型による重複感染を検出できる機能も備えていました。本研究で開発された PCR 法は *T. equi* 遺伝子型を特異的かつ高感度に検出できる有用な診断法であることが証明されました。本研究は、パラグアイ（Centro de Diagnostico Veterinario,

Universidad Nacional de Canendiyu) とスリランカ (Veterinary Research Institute, Department of Animal Production and Health) との国際共同研究として実施しました。

- ・ モンゴルのヤクに感染している牛バベシア種の分子疫学調査：ヤクはモンゴルの畜産業にとって重要な家畜動物です。モンゴルのヤクは、牛、ラクダ、羊、山羊、馬などの様々な家畜動物種と一緒に飼育されています。最近我々は、臨床学的に重要な牛バベシア症を引き起こす *Babesia bovis*、*Babesia bigemina*、および *Babesia naoakii* が、モンゴルの牛だけでなく、ラクダにも感染している実態を報告しました。しかし、ヤクにおける牛バベシア種の感染は未解明のままでした。そこで本研究では、モンゴルの8県で放牧されているヤクの感染疫学調査を行いました。計375頭のヤクから血液を採取しDNAを抽出した後、特異的PCR法を用いて上記3種の牛バベシア種の感染について検査しました。その結果、238頭(63.5%)と8頭(2.1%)のヤクが、それぞれ *B. bovis* と *B. bigemina* に感染していたことが示されました。一方で、*B. naoakii* は検出されませんでした。この成果は、モンゴルのヤクにおける牛バベシア種の感染を初めて報告したものととなり、ヤクを対象とした牛バベシア症の疾病対策の重要性が示唆されました。本研究は、モンゴル (Institute of Veterinary Medicine) との国際共同研究として実施しました。
- ・ キルギスの牛に感染しているベクター媒介性牛病原体種の分子疫学調査：牛はキルギス経済に大きく貢献している家畜動物です。キルギスで飼育されているほとんどの牛は、大規模な共同牧草地で放牧されています。しかしながら、キルギスの牛に感染するベクター媒介性病原体 (VBP) 種の疫学情報は不明のままでした。本研究では、キルギスで放牧されている計319頭の牛から血液DNAサンプルを調製し、*Babesia bovis*、*Babesia bigemina*、*Babesia naoakii*、*Theileria annulata*、*Theileria orientalis*、*Trypanosoma evansi*、*Trypanosoma theileri*、および *Anaplasma marginale* の特異的PCR法を用いて、感染スクリーニング診断を行いました。その結果、キルギスの牛は、*B. naoakii* と *Try. evansi* を除いた6つの病原体種に感染していたことが示されました。最も多かった病原体は *T. orientalis* (84.3%) で、次いで *B. bigemina* (47.6%)、*T. annulata* (16.6%)、*A. marginale* (11.6%)、*Try. theileri* (7.2%)、および *B. bovis* (2.5%) でした。*B. bovis* 並びに *B. bigemina* 陰性サンプルに対して、*Babesia* 属特異的PCR法で追加スクリーニング解析を行ったところ、さらに *Babesia major* と *Babesia occultans* の感染も確認されました。これらの成果は、キルギスの牛における *B. bovis*、*B. bigemina*、*B. occultans*、*Try. theileri*、および *A. marginale* 感染の最初の報告となり、キルギスの牛はVBPによる感染症のリスクが極めて高いことが示唆されました。本研究は、キルギス (Kyrgyz Research Institute of Veterinary Named After A. Duisheev, Kyrgyz National Agrarian University Named After. K.I. Scryabin) との国際共同研究として実施しました。
- ・ マイクロネーム接着リピートドメインの破壊は、*in vitro* での *Babesia bovis* の増殖に影響を与えない：赤血球内寄生性原虫である *Babesia bovis* は、最も病原性の高い牛バベシア症を引

き起こし、畜産業に悪影響を及ぼしています。その制御法の開発には、*B. bovis* の生物学に関する包括的な知識が必要です。*B. bovis* は牛赤血球に侵入し無性生殖を行います。原虫のマイクロネームタンパク質が、そのマイクロネーム接着リピート (MAR) ドメインを介して宿主赤血球上のシアル酸に結合しながら侵入を果たすと考えられています。本研究では、緑色蛍光タンパク質-ブラストサイジン-S-デアミナーゼの融合遺伝子を *B. bovis* のゲノムに組み込むことで、マイクロネームタンパク質 (BBOV\_III011730) の MAR ドメインをコードする領域を欠失させることに成功しました。その MAR ドメインを欠く遺伝子組換え *B. bovis* は、*in vitro* で牛赤血球に侵入し、親系統と同様の速度で増殖しました。我々の研究成果から、MAR ドメインが *B. bovis* の赤血球内増殖には必須ではないことが明らかとなりました。

- ・ 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: 馬ピロプラズマ症は、*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馬原虫病です。本疾病は世界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す。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、その DNA サンプルを用いて PCR による *T. equi* と *B. caballi* の感染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。

#### 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

- ・ WOA Academic Exchange Seminar (アルゼンチン) 「Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in apparently healthy horses in Argentina」、原虫病研究センター/CLINICA EQUINA SRL (オンライン)、2024 年 3 月 18 日
- ・ WOA Academic Exchange Seminar (キルギス) 「Molecular prevalence and genetic diversity of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses in Kyrgyzstan」、原虫病研究センター/Kyrgyz Research Institute of Veterinary Named After A. Duisheev (オンライン)、2023 年 12 月 21 日 (ロシア語)、2023 年 11 月 16 日 (英語)

- ・ WOAH Academic Exchange Seminar (インド) 「Inhibitory activity of Artemisia scoparia methanolic extract and its lead molecules against *Theileria equi*」、原虫病研究センター/ ICAR-National Research Centre on Equines (対面)、2023年12月8日
- ・ WOAH Academic Exchange Seminar (スリランカ) 「Epidemiology and clinical significance of *Theileria* sp. Yokoyama in cattle in Sri Lanka」、原虫病研究センター/Veterinary Research Institute (オンライン)、2023年11月2日
- ・ WOAH Academic Exchange Seminar (マラウイ) 「Molecular detection and genetic characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses and donkeys in Malawi」、原虫病研究センター/Lilongwe University of Agriculture & Natural Resources (オンライン)、2023年7月18日
- ・ WOAH Academic Exchange Seminar (モンゴル) 「Molecular biological studies on tick vectors for the bovine *Babesia* parasite species in Mongolia」、原虫病研究センター/Institute of Veterinary Medicine (オンライン)、2023年6月27日
- ・ WOAH Academic Exchange Seminar (パラグアイ) 「Molecular epidemiological survey of bovine babesiosis in Paraguay」、原虫病研究センター/Animal Health Department, SENACSA (オンライン)、2023年4月20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「牛バベシア症」専門家
- ・ WOAH リファレンスラボラトリー「馬ピロプラズマ症」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. 2023 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. Yihong Ma, Yingna Jian, Geping Wang, Xiuping Li, Guanghua Wang, Yong Hu, **Naoaki Yokoyama**, Liqing Ma\*, Xuenan Xuan\*, Molecular Identification of *Babesia* and *Theileria* Infections in Livestock in the Qinghai-Tibetan Plateau Area, China. **Animals (Basel)**. 2024 Feb; 14(3): 476. doi: 10.3390/ani14030476.
2. Yihong Ma, Yingna Jian, Geping Wang, Iqra Zafar, Xiuping Li, Guanghua Wang, Yong Hu, **Naoaki Yokoyama**, Liqing Ma\*, Xuenan Xuan\*, Epidemiological Investigation of Tick-Borne Bacterial Pathogens in Domestic Animals from the Qinghai-Tibetan Plateau

- Area, China. **Pathogens**. 2024 Jan; 13(1): 86. doi: 10.3390/pathogens13010086.
3. Believe Ahedor, Davaajav Otgonsuren, Atambekova Zhyldyz, Azirwan Guswanto, Noel Muthoni Mumbi Ngigi, Maria Fátima Rodríguez Valinotti, Hemal Kothalawala, Nizanantha Kalaichelvan, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Hemali Kothalawala, Tomás Javier Acosta, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama\***, Development and evaluation of specific polymerase chain reaction assays for detecting *Theileria equi* genotypes. **Parasites & Vectors**. 2023 Nov; 16(1): 435. doi: 10.1186/s13071-023-06045-z.
  4. Davaajav Otgonsuren, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Myagmar Zoljargal, Believe Ahedor, Thillaiampalam Sivakumar, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, **Naoaki Yokoyama\***, The First Survey of Bovine *Babesia* Species Infecting Yaks (*Bos grunniens*) in Mongolia. **Journal of Parasitology**. 2023 Oct; 109(5): 480-485. doi: 10.1645/22-93.
  5. Atambekova Zhyldyz, Kamarli Aitakin, Berdikulov Atabek, Jetigenov Elmurat, Nurgaziev Rysbek, Orozov Jailobek, Believe Ahedor, Davaajav Otgonsuren, Ngigi Noel Muthoni Mumbi, Azirwan Guswanto, Thillaiampalam Sivakumar, **Naoaki Yokoyama\***, An epidemiological survey of vector-borne pathogens infecting cattle in Kyrgyzstan. **Parasitology International**. 2023 Dec: 97: 102791. doi: 10.1016/j.parint.2023.102791.
  6. Bumduuren Tuvshintulga, Azirwan Guswanto, Arifin Budiman Nugraha, Thillaiampalam Sivakumar, Rika Umemiya-Shirafuji, **Naoaki Yokoyama\***, Disruption of a DNA fragment that encodes the microneme adhesive repeat domain-containing region of the BBOV\_III011730 does not affect the blood stage growth of *Babesia bovis* *in vitro*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 2023 Jun; 255: 111576. doi: 10.1016/j.molbiopara.2023.111576.
  7. 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 Apr; 39: 100835. doi: 10.1016/j.vprsr.2023.100835.

## 総説

該当なし

## 著書

1. **横山 直明** (2024) : “獣医学”はおもしろい！ ～やりがいのある、オンリーワンの進路を探して～、柘陵（愛知県立半田高等学校）、第 67 号、p142-147
2. **横山 直明** (2023) : 帯広畜産大学でサブモジュール 3 を実施しました。NEWS LETTER（北

海道大学大学院・獣医学研究院)、第9巻、p3

3. 森 菜々美、Sivakumar, T., 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、p22
4. 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、p23-27

## 7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. WOAH 関連学術セミナーの開催 : マラウイ、ウガンダ、キルギス、中国、モンゴル、インド、スリランカ、パラグアイ、アルゼンチン、農林水産省、沖縄県、北海道、半田高校、JICA、北海道大学、帯広畜産大学 (26 件)
2. WOAH 技術トレーニング研修会の開催 : モンゴル、スリランカ、沖縄県、愛媛県、三重県、静岡県、北海道、農林水産省、北海道大学、エランコジャパン (16 件)
3. 海外からの WOAH 診断依頼 : イギリス、ドイツ、モンゴル、中国、スリランカ、ニュージーランド、アメリカ、アルゼンチン (32 件 ; 1,817 検体)
4. 国内からの WOAH 診断依頼 : 沖縄県、静岡県、北海道、麻布大学 (21 件 ; 1,644 検体)
5. WOAH コンサルティング依頼 : イギリス、イタリア、ドイツ、チェコ、オーストリア、オランダ、モロッコ、マラウイ、アルジェリア、南アフリカ、バングラデシュ、中国、キルギス、インド、スリランカ、シンガポール、オーストラリア、アメリカ、アルゼンチン、日本 (47 件)
6. WOAH 診断用の試料提供 (IFAT スライド) : フランス、オーストリア、オランダ、中国、インド、アメリカ、アルゼンチン、日本 (11 件 ; 4,535 枚)
7. WOAH 診断用の試料提供 (DNA) : ドイツ、マラウイ、モンゴル、シンガポール、インド、キルギス、パラグアイ、アルゼンチン、日本 (9 件 ; 80 本)
8. インターンシップの受入 : マラウイ、モンゴル、キルギス、インド、インドネシア、中国、パラグアイ、日本 (10 件、12 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、中国、マラウイ、アルゼンチン、パラグアイ (8 カ国)
10. WOAH リファレンスラボラトリー「牛バベシア症、馬ピロプラズマ症」、および 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」の活動報告書を WOAH に提出

## 8. 招待講演等

1. 「北海道に潜む“人にも感染する寄生虫”とは？」酪農部講習会、茶安別地域振興会酪農部 (標茶)、2024 年 3 月 15 日
2. 「北海道における牛小型ピロプラズマ病の現状と対策」放牧衛生技術検討会、十勝家畜保健衛生所 (帯広)、2024 年 1 月 30 日
3. 「Effective management of bovine babesiosis in endemic regions」招待講演、新疆農業

大学（中国）、2023年10月27日

4. 「Effective management of bovine babesiosis in endemic regions」招待講演、JICA/マケレレ大学（ウガンダ）、2023年9月12日
5. 「Effective management of bovine babesiosis in endemic regions」招待講演、青海大学（中国）、2023年8月31日
6. 「“獣医学”はおもしろい！」出張講義、愛知県立半田高等学校（半田）、2023年7月11日
7. 「OIE リファレンスラボラトリーの活動と最近の知見について」動物検疫所・業績発表会（招待講演）、農林水産省・動物検疫所（横浜）、2023年6月30日
8. 「OIE 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」技術研修会「沖縄牧野ダニ事業」、沖縄県（那覇）、2023年6月20日
9. 「牛の放牧衛生と寄生虫による放牧病」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）、2023年6月8日

## 9. 獲得研究費

1. 令和5年度 家畜衛生対策事業（農林水産省・消費・安全局）「我が国のWOAH認定施設活動支援事業」、代表、令和5年度
2. 令和5年度 新興・再興感染症研究基盤創生事業・海外拠点活用研究領域（日本医療研究開発機構）「中国の放牧家畜が保有するマダニ媒介性の人獣共通感染症病原体を調査する疫学研究」、代表、令和5年度～令和7年度
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
6. 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
7. 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
8. 令和5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. Badgar Battsetseg: 「国際疫学調査（モンゴル）」 Institute of Veterinary Medicine, Mongolian University of Life Sciences, Mongolia, 2019年6月～（部局間国際学術交流協定）、2003年10月～（大学間国際学術交流協定）
2. Hemal Kothalawala: 「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）
3. Bayinchahan: 「国際疫学調査（中国）」 Xinjiang Agricultural University, China, 2021年10月～（部局間国際学術協定）、1999年7月～（大学間国際学術交流協定）
4. Orozov Jailobek: 「国際疫学調査（キルギス）」 Kyrgyz Research Institute of Veterinary Named After A. Duisheev, Kyrgyzstan, 2023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, 2023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, 2023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. 2023年度研究の総括

- ・ フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1901 は、その医学的・獣医学的重要性から、世界的によく知られたマダニの一種であり、主に日本を含むアジア、オセアニアに分布しています。近年では米国においてもその存在が認められており、家畜や人に対する加害が懸念されています。日本では、フタトゲチマダニは牛の赤血球に寄生する原虫（タイレリア *Theileria orientalis*）を媒介するため、特に放牧地において対策を取るべき重要種として注視されています。他にも、バベシア原虫が原因の牛、犬のバベシア症、人における日本紅斑熱やウイルス性疾病を媒介するマダニ種であることが知られています。マダニは雌雄の交尾を経て子孫を残しますが、フタトゲチマダニには両性生殖（2倍体）と産雌性単為生殖（3倍体）による2つの系統が存在します。単為生殖系統は日本全国に広く分布していますが、両性生殖系統の北限は福島県とされています。マダニとしては例外的な特徴を持つことから、フタトゲチマダニは学術的にも重要な種と考えられており、単為生殖系統（岡山県由来）は1961年から、両性生殖系統（大分県由来）は2008年から実験室内で累代飼育され、様々な試験・研究に活用されてきました。つまり、「岡山系統」は60年以上、「大分系統」は15年以上、実験

室内で安定的に維持されていることとなります。これまで、フタトゲチマダニのゲノム配列は、中国とニュージーランドで採集されたマダニについて公開されてきました。最初のゲノムは、中国の野外で採集された雌 1 匹由来の幼ダニを解析したもので、そのサイズは 2.55 Gb でした。次いで、雄ダニと雌ダニの塩基配列が決定され、2.4-2.8 Gb と 3.6 Gb のゲノムがそれぞれ作成されました。さらに、同じく中国において、野外採集の雌雄 1 ペアから 6 世代を経て発生した雌ダニが解析に用いられ、3.16 Gb のゲノム配列が決定されました。一方、ニュージーランドからは、野外で採集された雌ダニ由来の卵を用いて塩基配列が決定され、7.36 Gb のゲノムが得られたと報告されました。各国の野外採集フタトゲチマダニのゲノムサイズは一致しておらず、その理由は不明です。そこで我々は、15 年以上安定的に実験室内で累代飼育されているフタトゲチマダニ両性生殖系統を解析対象とし、そのゲノム解読を試みました。50 匹の雌ダニ（未吸血）よりゲノム DNA を精製し、イルミナおよびナノポアシーケンサーを用いて DNA の塩基配列を決定しました。その結果、2.48Gbp、98,529 コンティグからなるドラフトゲノムが得られました。（論文リスト 3）

#### 4. 学会等の活動状況

##### ① 所属学会等、役職等

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

##### ② 主催した学会、研究会等

該当なし

#### 5. 各種委員会・審議会等の活動状況

該当なし

#### 6. 2023 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. Boniface Chikufenzi, Elisha Chatanga, Eloiza May Galon, Uday Kumar Mohanta, Gift Mdzukulu, Yihong Ma, Madalitso Nkhata, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Xuenan Xuan, First report of dog ticks and tick-borne pathogens they are carrying in Malawi. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2024 Feb; 86(2): 150-159. doi: 10.1292/jvms.23-0397.
2. Zhuowei Ma, Onur Ceylan, Eloiza May Galon, Uday Kumar Mohanta, Shengwei Ji, Hang Li, Thanh Thom Do, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Iqra Zafar, Mingming Liu, Ferda Sevinc, Xuenan Xuan, Molecular Identification of

- Piroplasmids in Ticks from Infested Small Ruminants in Konya Province, Turkey. **Pathogens**. 2023 Sep; 12(9): 1123. doi: 10.3390/pathogens12091123.
3. **Rika Umemiya-Shirafuji**, Xuenan Xuan, Kozo Fujisaki, Junya Yamagishi, Draft genome sequence data of *Haemaphysalis longicornis* Oita strain. **Data in Brief**. 2023 Jun; 49: 109352. doi: 10.1016/j.dib.2023.109352.
  4. Shohei Ogata, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Kodai Kusakisako, Keita Kakisaka, Elisha Chatanga, Naoki Hayashi, Yurie Taya, Yuma Ohari, Gita Sadaula Pandey, Abdelbaset Eweda Abdelbaset, Yongjin Qiu, Keita Matsuno, Nariaki Nonaka, Ryo Nakao, Investigation of vertical and horizontal transmission of *Spiroplasma* in ticks under laboratory conditions. **Scientific Reports**. 2023 Aug; 13(1): 13265. doi: 10.1038/s41598-023-39128-z.
  5. Bumduuren Tuvshintulga, Azirwan Guswanto, Arifin Budiman Nugraha, Thillaiampalam Sivakumar, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Naoaki Yokoyama, Disruption of a DNA fragment that encodes the microneme adhesive repeat domain-containing region of the BBOV\_III011730 does not affect the blood stage growth of *Babesia bovis* in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 2023 Jun; 255: 111576. doi: 10.1016/j.molbiopara.2023.111576.
  6. Kofi Dadzie Kwofie, Emmanuel Pacia Hernandez, Anisuzzaman, Hayato Kawada, Yuki Koike, Sana Sasaki, Takahiro Inoue, Kei Jimbo, Fusako Mikami, Danielle Ladzekpo, **Rika Umemiya-Shirafuji**, Kayoko Yamaji, Tetsuya Tanaka, Makoto Matsubayashi, Md Abdul Alim, Samuel Kweku Dadzie, Shiroh Iwanaga, Naotoshi Tsuji, Takeshi Hatta, RNA activation in ticks. **Scientific Reports**. 2023 Jun; 13(1): 9341. doi: 10.1038/s41598-023-36523-4.

## 総説

該当なし

## 著書

該当なし

## 7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. 原虫病研究センター施設見学および寄生虫の標本展示、令和5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、2023年7月29日

## 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) (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

1. 受賞者：水野 寛太 (共同獣医学課程 6 年)  
受賞名：第 69 回 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 北日本支部合同大会会長賞  
受賞テーマ：フタトゲチマダニにおける Immune Deficiency (IMD) 経路構成分子の探索と *Babesia ovata* に対する免疫機能について  
受賞年：2023 年 10 月 14 日

## 12. 報道等

1. NHK 北海道 WEB サイト (2023 年 7 月 26 日) 十勝からウガンダの酪農を救え!  
<https://www.nhk.or.jp/hokkaido/articles/slug-n651fc28d7050/>
2. NHK 北海道 WEB サイト (2024 年 3 月 6 日) ウガンダのマダニ研究者 帯広畜産大で最先端研究を見学  
<https://www3.nhk.or.jp/sapporo-news/20240306/7000065373.html>

## 13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. 鈴木 文詞：東京農工大学大学院農学研究院、カブリダニの卵形成の分子機構解明と人工飼料開発への応用、2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日、2023 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、2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日、2023 年度原虫病研究センター共同研究
3. 中尾 亮：北海道大学大学院獣医学研究院、高増殖型マダニ細胞の作出、2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日、2023 年度原虫病研究センター共同研究
4. Consuelo Almazan : Autonomous University of Queretaro、Detection and surveillance of *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901) in Mexico、2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日、2023 年度原虫病研究センター共同研究
5. 共同研究 A 株式会社、2023 年度

### 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することを目指しています。

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（こうえき）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、3種のトリパノソーマは別種に分類できないほど近縁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？」という問いに答えを見出すべく、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市場の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。特に日本を含む世界中に分布するアブは *T. evansi* や *T. vivax* を機械伝播する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と比べて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のが現状

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. 2023 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。得られたヒット化合物の類縁体を入手してトリパノソーマ増殖阻害活性を精査した結果、約 10 種類の候補化合物を得ることができた。次年度も引つづき薬剤候補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。
- ・ アブ唾液腺粗抗原を用いて抗アブ唾液腺抗体の検出を試みた結果、高い抗体価が通年持続する低分子抗原とアブに吸血されている季節のみ抗体が産生される高分子抗原の 2 種類が存在することを明らかにした。

## 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
- ・ 日本獣医学会疾患名用語委員会委員
- ・ 日本獣医寄生虫学会常任理事
- ・ 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

## 6. 2023 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. Adrian Miki C Macalanda, Eloiza May S Galon, Vernadyn A Morillo, Atcharaphan Wanlop, Kevin Austin L Ona, Xuenan Xuan, **Noboru Inoue**, Shin-Ichiro Kawazu, Keisuke Suganuma, Molecular detection and internal transcribed spacer-1 sequence diversity of *Trypanosoma evansi* in goats from Cavite, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2024 Jan; 86(1): 35-38. doi: 10.1292/jvms.23-0416.
2. Nthatisi Innocentia Molefe-Nyembe, Oluyomi Stephen Adeyemi, Daisuke Kondoh, Kentaro Kato, **Noboru Inoue**, Keisuke Suganuma, In Vivo Efficacy of Curcumin and Curcumin Nanoparticle in *Trypanosoma congolense*, Broden 1904 (Kinetoplastea: Trypanosomatidae)-Infected Mice. **Pathogens**. 2023 Oct; 12(10): 1227. doi: 10.3390/pathogens 12101227.
3. Ai Yamazaki, Keisuke Suganuma, Yusuke Tanaka, Kenichi Watanabe, Shin-Ichiro Kawazu, Kiyoshi Kita, **Noboru Inoue**, Efficacy of oral administration of ascofuranone with and without glycerol against *Trypanosoma congolense*. **Experimental Parasitology**. 2023 Sep; 252: 108588. doi: 10.1016/j.exppara.2023.108588.
4. Iqra Zafar, Tomoyo Taniguchi, Hanadi B Baghdadi, Daisuke Kondoh, Mohamed Abdo Rizk, Eloiza May Galon, Shengwei Ji, Shima Abd El-Salam El-Sayed, Thom Do, Hang Li, Moaz M Amer, Ma Zhuowei, Ma Yihong, Jinlin Zhou, **Noboru Inoue**, Xuenan Xuan, *Babesia microti* alleviates disease manifestations caused by *Plasmodium berghei* ANKA in murine co-infection model of complicated malaria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2023 Jul; 13: 1226088. doi: 10.3389/fcimb.2023.1226088.
5. Afraa Elata, Eloiza May Galon, Paul Franck Adjou Moumouni, Rochelle Haidee D Ybanez, Ehab Mossaad, Caro B Salces, Gundolino P Bajenting, Adrian P Ybanez, Xuenan Xuan, **Noboru Inoue**, Keisuke Suganuma, Molecular Detection of Animal Trypanosomes in Different Animal Species in the Visayas Region of the Philippines. **Acta Parasitologica**. 2023 Sep; 68(3): 604-611. doi: 10.1007/s11686-023-00696-9.
6. Yujon Hong, Keisuke Suganuma, Yuma Ohari, Mitsunori Kayano, Kenji Nakazaki, Shinya Fukumoto, Shin-Ichiro Kawazu, **Noboru Inoue**, Seasonal Variation and Factors Affecting *Trypanosoma theileri* Infection in Wild Sika Deer (Ezo Sika Deer *Cervus nippon yesoensis*) in Eastern Hokkaido. **Animals (Basel)**. 2023 May; 13(10): 1707. doi: 10.3390/ani13101707.

## 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「顕微鏡検査用トリパノソーマ標準ギムザ染色標本」(令和 5 年度) : イランと南アフリカへ計 14 件
2. WOH 診断に関するコンサルタント・情報提供「スーラ病」(令和 5 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、モロッコ、オーストラリア、南アフリカ、イラン、中国へ計 11 件
3. 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(2023 年 5 月)

## 8. 招待講演等

1. 「Dourine and surra」、国際獣疫事務局(WOH)主催ウエビナー、Webinars on equine diseases (<https://rr-asia.woah.org/en/events/dourine-and-surra-webinar/>)、2023 年 12 月 1 日
2. 「トリパノソーマ症の基礎知識と WOH マニュアルに基づく診断に際して考慮すべき事」、農林水産省・動物検疫所・精密検査部報告会特別講演会(横浜・ハイブリッド)、2024 年 1 月 19 日

## 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

1. モンゴル国「卓越研究者賞」受賞、受賞年：2023 年 11 月 24 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)

該当なし

## 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での宿主哺乳類と媒介吸血昆虫の疫学調査を通じてその感染状況の時空間的動態を明らかにするとともに、実際に流行国で被害をもたらしている“野外流行型トリパノソーマ”を感染動物から分離、実験室で実験を行えるように培養馴化させた株を独自に確立し、野外流行型トリパノソーマのゲノム解析、病原性解析、薬剤感受性試験などの基礎的研究を行っています。また、このようにして得られた野外流行型トリパノソーマの基礎研究成果をもとに、トリパノソーマ及びその他の病原体を媒介する吸血昆虫の制御法の開発及び新規トリパノソーマ症治療薬の探索と実用化に向けた研究を進めています。さらに 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
- ・ 吸血昆虫及び吸血昆虫媒介性病原体の分散・発生動態の時空間的解析

## 3. 2023 年度研究の総括

- ・ 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。フィリピンにおいては、動物トリパノソーマ症（主としてスーラ病）は肝蛭について畜産業に被害をもたらしている寄生虫病として知られ、その対策が望まれています。本年はビサヤ諸島地域で飼養されているスイギュウ、ウシ、ヤギ、ウマ及びルソン島カビテ州で飼養されているヤギを対象としたスーラ病の調査を行いました。その結果、どちらの調査でも調査対象の家畜に明確な臨床症状はないものの 30 - 40%の家畜が PCR 検査で陽性となりました。フィリピンでは薬剤耐性トリパノソーマ症の流行と、特にスイギュウに対して高致死率なスーラ病の流行が認められることから、スイギュウに対しての感染源となりうる多種多様な家畜における感染状況の調査の重要性が示唆されました（論文リスト 3, 11）。
- ・ 野生動物は家畜への病原体の感染源として注意が必要な対象です。*T. theileri* は本邦のウシにも広く感染し、明確な臨床症状を示さないものの乳牛の生産性を低下させる病原体です（Suganuma et al., 2022）。一方、ホンシュウジカやエゾシカにも *T. theileri* (-like trypanosome) が感染していることが知られていますが、その感染状況は不明です。今回、十勝地方で捕獲されたエゾシカを対象に、2 年間にわたって *T. theileri* の感染状況調査を行いま

した。その結果、エゾシカにおける *T. theileri* の感染は季節変動を示すとともにエゾシカの年齢が上がるにつれて有意に上昇することがわかりました。またエゾシカにおける *T. theileri* の感染は、ベクター候補であるアブの活動と一致した夏季に有意に上昇しました。アブは家畜動物のみならず野生動物も吸血するため、アブの吸血行動に伴う野生動物から家畜動物への病原体移動の可能性が示唆されました（論文リスト 12）。

- ・ 予防・治療薬に乏しいトリパノソーマ症対策のために、新規治療薬・予防薬の開発が求められています。トリパノソーマに特異的な I 型ニトロレダクターゼを薬剤標的とした創薬のために、ニトロフラン関連化合物の *in vitro* での抗トリパノソーマ活性評価及び *in vivo* マウスモデルを用いた治療効果評価を行いました。その結果、 $IC_{50} < 1 \text{ uM}$  以下と高い抗トリパノソーマ活性を有する複数の化合物を特定しましたが、これらは *in vivo* での治療効果は認められませんでした。今後の治療薬開発に向けて、*in vivo* での治療効果を得るための更なるニトロフラン関連化合物の評価が必要になります（論文リスト 2, 7, 8）。また、トリパノソーマ特異的な呼吸鎖酵素（*Trypanosoma alternative oxidase*）を薬剤標的とした抗トリパノソーマ活性化化合物アスコフラノンの経口投与による動物トリパノソーマ症に対する *in vivo* マウスモデルを用いた治療効果評価を行いました。その結果、アスコフラノンに対する感受性の低い *T. congolense* による動物トリパノソーマ症であってもアスコフラノン 100 mg/kg の経口投与で完治させることができることが明らかになりました（論文リスト 6）。さらに、動物トリパノソーマ症感染ウシモデルに対するアスコフラノン筋肉内注射による薬効評価試験を実施しました。その結果、25 mg/kg を 7 日間連続投与することで *T. vivax* による動物トリパノソーマ症は再燃することなく完治しました。一方で *T. congolense* による動物トリパノソーマ症は投与後一時的に血中からトリパノソーマが検出されなくなりましたが、その後再燃しました（論文リスト 1）。これらの結果を踏まえ、今後の動物トリパノソーマ症予防・治療薬開発への貢献が期待されます。

#### 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. 2023 年度研究成果発表等 (原著論文、総説・著書)

### 原著論文 (\*責任著者)

1. Keisuke Suganuma, Mochabo Kennedy Miyoro, Chemuliti, Kiyoshi Kita, Noboru Inoue, Shin-ichiro Kawazu. Ascofuranone antibiotics is a promising trypanocidal drug for nagana. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. 2024 Feb; 91(1): e1-e6. doi: 10.4102/ojvr.v91i1.2115.
2. Helena D Janse van Rensburg, David D N'Da, Keisuke Suganuma, *In vitro* trypanocidal potency and *in vivo* treatment efficacy of oligomeric ethylene glycol-tethered nitrofurantoin derivatives. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2024 Jan; 192: 106668. doi: 10.1016/j.ejps.2023.106668.
3. Adrian Miki C Macalanda, Eloiza May S Galon, Vernadyn A Morillo, Atcharaphan Wanlop, Kevin Austin L Ona, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Shin-Ichiro Kawazu, Keisuke Suganuma, Molecular detection and internal transcribed spacer-1 sequence diversity of *Trypanosoma evansi* in goats from Cavite, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2024 Jan; 86(1): 35-38. doi: 10.1292/jvms.23-0416.
4. Helena D Janse van Rensburg, David D N'Da, Keisuke Suganuma, *In vitro* and *in vivo* trypanocidal efficacy of nitrofuryl- and nitrothienylazines. **ACS Omega**. 2023 Oct; 8(45): 43088-43098. doi: 10.1021/acsomega.3c06508.
5. Nthatsi Innocentia Molefe-Nyembe, Oluyomi Stephen Adeyemi, Daisuke Kondoh, Kentaro Kato, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma, *In vivo* efficacy of curcumin and curcumin nanoparticle in *Trypanosoma congolense*, Broden 1904 (Kinetoplastea: Trypanosomatidae)-infected mice. **Pathogens**. 2023 Oct; 12(10): 1227. doi: 10.3390/pathogens 12101227.
6. Ai Yamazaki, Keisuke Suganuma, Yusuke Tanaka, Kenichi Watanabe, Shin-Ichiro Kawazu, Kiyoshi Kita, Noboru Inoue, Efficacy of oral administration of ascofuranone with and without glycerol against *Trypanosoma congolense*. **Experimental Parasitology**. 2023 Sep; 252: 108588. doi: 10.1016/j.exppara.2023.108588.
7. Helena D Janse van Rensburg, Keisuke Suganuma, David D N'Da, *In vitro* trypanocidal activities and structure-activity relationships of ciprofloxacin analogs. **Molecular Diversity**. 2023 Jul. doi: 10.1007/s11030-023-10704-9.
8. Anna Seetsi, David N'da, Nthatsi Molefe-Nyembe, Keisuke Suganuma, Tsepo Ramatla, Oriel Thekiso, *In vitro* anti-trypanosomal activity of synthetic nitrofurantoin-triazole hybrids against *Trypanosoma* species causing human African trypanosomiasis. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. 2023 Jul. doi: 10.1111/fcp.12940.
9. Aya Yoshimura, Rio Saeki, Ryusuke Nakada, Shota Tomimoto, Takahiro Jomori, Keisuke Suganuma, Toshiyuki Wakimoto, Membrane-vesicle-mediated interbacterial communication activates silent secondary metabolite production.

- Angewandte Chemie International Edition.** 2023 Jul; e202307304. doi: 10.1002/anie. 202307304.
10. Zhichao Wang, Ben-Yeddy Abel Chitama, **Keisuke Suganuma**, Yoshi Yamano, Sachiko Sugimoto, Susumu Kawakami, Osamu Kaneko, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami, Two new cytotoxic sesquiterpene-amino acid conjugates and a coumarin-glucoside from *Crossostephium chinense*. **Molecules.** 2023 Jun; 28(12): 4696. doi: 10.3390/molecules28124696.
  11. Afraa Elata, Eloiza May Galon, Paul Franck Adjou Moumouni, Rochelle Haidee D Ybanez, Ehab Mossaad, Caro B Salces, Gundolino P Bajenting, Adrian P Ybanez, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, **Keisuke Suganuma**, Molecular detection of animal trypanosomes in different animal species in the visayas region of the philippines. **Acta Parasitologica.** 2023 Sep; 68(3): 604-611. doi: 10.1007/s11686-023-00696-9.
  12. Yujon Hong, **Keisuke Suganuma**, Yuma Ohari, Mitsunori Kayano, Kenji Nakazaki, Shinya Fukumoto, Shin-Ichiro Kawazu, Noboru Inoue, Seasonal variation and factors affecting *Trypanosoma theileri* infection in wild sika deer (Ezo Sika Deer *Cervus nippon yesoensis*) in Eastern Hokkaido. **Animals (Basel).** 2023 May; 13(10): 1707. doi: 10.3390/ani13101707.
  13. 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 May; 209: 113615. doi: 10.1016/j.phytochem.2023.113615.

## 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. 「動物の寄生虫を科学する！一畜大から世界へー」令和5年度オープンキャンパス

## 8. 招待講演等

1. 2024 Global Alliance for Rapid Diagnostics Forum: Bridging Technologies and Market Needs, EAST & SOUTHEAST ASIA REGIONAL WEBINAR: Current Status and Advancements in Understanding and Combating Vector-borne Diseases

## 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 国際共同研究加速基金 (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、分担、2021 年度～2025 年度
3. 2023 年度 基盤研究 (B) (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)、分担、2023 年度～2027 年度
4. 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
5. 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
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～2024 年度
7. 長崎大熱帯医学研究所 一般共同研究、アスコフラノン産生真菌経口投与によるトリパノソーマ予防法の確立、2023 年度

## 10. 特許申請・取得

1. A novel alkaloid compound with anti-trypanosomal activity from Oshima-shisone sponge (米国仮出願 63/578,496、出願日 2023 年 8 月 24 日)
2. 寄生虫によって惹起される疾患の予防剤又は治療剤 (特願 2023-216798、出願日 2023 年 3 月 3 日、PCT/JP2024/8052、出願日 2024 年 3 月 4 日)

## 11. 学術に関する受賞状況

該当なし

## 12. 報道等

該当なし

## 13. 国内外との共同研究 (共同研究契約締結分)

1. 村田 敏拓: 東北医科薬科大学薬学部、漢方薬構成生薬-特に黄芩・黄耆のフラボノイド類-の原虫病への応用を志向した構造活性相関研究、2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日、2023 年度原虫病研究センター共同研究 (番号 17)
2. 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、2023 年 4 月 1 日～2024 年 3 月 31 日、2023 年度原虫病研究センター共同研究 (番号 7)

### 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* という微孢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. 2023 年度研究の総括

- ・ *Sarcocystis neurona* の培養系を樹立し、増殖率を測定する系を確立した。

### 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
- ・ 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. 2023 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**

該当なし

**著書**

該当なし

**7. 市民講演会、アウトリーチ活動**

該当なし

**8. 招待講演等**

該当なし

**9. 獲得研究費**

該当なし

**10. 特許申請・取得**

該当なし

**11. 学術に関する受賞状況**

該当なし

**12. 報道等**

該当なし

**13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）**

該当なし

◆-----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. 2023 年度研究の総括

- ・ 野生鳥獣は人獣共通感染法の観点から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、日本で最も絶滅が危惧されている野生哺乳動物であるイリオモテヤマネコを対象に、その主要生息地域である西表島で研究を実施しました。イリオモテヤマネコ、イエネコサンプルの収集・解析を行った結果、イリオモテヤマネコには高度にトキソプラズマ原虫が蔓延していることが明らかになりました。イリオモテヤマネコとイエネコにおけるトキソプラズマの疫学情報を明らかにしたほか、イリオモテヤマネコの保全におけるトキソプラズマのリスクを解析しました。その結果、トキソプラズマ原虫がイリオモテヤマネコの個体数維持において負の要因となっていることが明らかとなりました。（論文リスト 4）。また絶滅危惧種であるオジロワシについての調査を行い、十勝に渡りで訪れるオジロワシから高病原性トリインフルエンザウイルス H5N1 Clade 2.3.4.4b の分離同定に成功しました。この結果はオジロワシ等に由来するインフルエンザウイルスが北海道十勝の養鶏産業に重大な影響を及ぼす可能性を示唆するものでありました（論文リスト 1）。
- ・ 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5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臨床検体分離法への応用、フィラリアの媒介能に関する関連すると思われる遺伝子のノックダウン解析、近交系の樹立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表現型の比較解析を行いました。

#### 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・倫理委員会委員長
- ・ 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. 2023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. James G Komu, Hiep Dinh Nguyen, Yohei Takeda, **Shinya Fukumoto**, Kunitoshi Imai, Hitoshi Takemae, Tetsuya Mizutani, Haruko Ogawa, Challenges for Precise Subtyping and Sequencing of a H5N1 Clade 2.3.4.4b Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Isolated in Japan in the 2022-2023 Season Using Classical Serological and Molecular Methods. **Viruses**. 2023 Nov; 15(11): 2274. doi: 10.3390/v15112274.
2. Asako Haraguchi, Makoto Takano, Jun Hakozaiki, Kazuhiko Nakayama, Sakure Nakamura, Yasunaga Yoshikawa, **Shinya Fukumoto**, Kodai Kusakisako, Hiromi Ikadai, Formation of free oocysts in *Anopheles* mosquitoes injected with *Plasmodium* ookinetes. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2023 Sep; 85(9): 921-928. doi: 10.1292/jvms.23-0099.
3. Yujon Hong, Keisuke Sukanuma, Yuma Ohari, Mitsunori Kayano, Kenji Nakazaki, **Shinya Fukumoto**, Shin-Ichiro Kawazu, Noboru Inoue, Seasonal Variation and Factors Affecting *Trypanosoma theileri* Infection in Wild Sika Deer (Ezo Sika Deer *Cervus nippon yesoensis*) in Eastern Hokkaido. **Animals (Basel)**. 2023 May; 13(10): 1707. doi: 10.3390/ani13101707.

4. Takahiro Shirozu, Mitsunori Kayano, Fuyuko Hirose, Sugao Oshiro, Takashi Nagamine, Yasuyuki Endo, Masako Izawa, Xuenan Xuan, **Shinya Fukumoto**, Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in endangered Iriomote cat (*Prionailurus bengalensis iriomotensis*) and simulation of the effect on population dynamics. **European Journal of Wildlife Research**. 2023 69(4). doi: 10.1007/s10344-023-01702-1

## 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

## 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：未永 羅綺（共同獣医学課程6年）  
受賞名：第69回 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 若手奨励賞  
受賞テーマ： *Entamoeba invadens* の感染はウミガメ飼育におけるリスク要因となる  
受賞年：2023年10月14日

## 12. 報道等

該当なし

## 13. 国内外との共同研究（共同研究契約締結分）

1. 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. 2023 年度研究の総括

- ・ 犬バベシア症は、バベシア (*Babesia canis*, *Babesia gibsoni*) の赤血球内寄生によって引き起こされるマダニ媒介性疾患であります。バベシアに感染した犬は、重度な溶血性貧血を引き起こし、死に至る場合も多い。日本を含む世界中に発生が認められ、その被害は深刻とされるが、いまだに副作用の少ない有効な治療法が開発されていないのが現状であります。そこで、当研究室では特に日本を含むアジア地域で流行が深刻とされる犬バベシア (*B. gibsoni*) 症に対する治療法やワクチン開発の研究に注力してきました。今回は、マラリアに対する新薬として上市したタフェノキンの抗犬バベシア症作用について調べてみました。犬を用いた治療効果試験では、1回か2回投与するだけで顕著な治療効果が認められました。また、現行の治療薬であるアトバコンとの併用療法は、現行治療薬に対する薬剤抵抗性株にも対応できる効果的方法であることを証明した。(論文リスト 1)
- ・ マウスのバベシア症・マラリア混合感染モデルをマラリア原虫感染に対する宿主防御免疫機構の解明を試みました。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、*Plasmodium berghei* ANKA (ネズミに脳マラリアを引き起こす) で再感染させると、部分的感染防御免疫が成立していることを証明しました。(論文リスト 20)。

- ・ 中国、バングラデシュ、トルコ、マラウイ、エジプトなど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 2-8）。

#### 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
- ・ 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）（2023年9月28日、ナイロビ大学、ケニア）

#### 5. 各種委員会・審議会等の活動状況

- ・ 令和5年度 JRA「子牛の感染性下痢症の対策基盤事業」推進委員会委員
- ・ 令和5年度 JRA「植物抽出物による豚飼料用抗生物質代替事業」推進委員会委員

#### 6. 2023年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

##### 原著論文（\*責任著者）

1. Mingming Liu, Eloiza May Galon, Shenwei Ji, Xuenan Xuan\*, Tafenoquine-Based Combination Therapies: A Step Toward Babesiosis Elimination. **Journal of Infectious Diseases**. 2024 May, 229: 1599. doi: 10.1093/infdis/jiae083.
2. Moaz M Amer, Eloiza May Galon, Ahmed M Soliman, Thom Do, Iqra Zafar, Yihong Ma, Hang Li, Shengwei Ji, Uday Kumar Mohanta, Xuenan Xuan\*, Molecular detection of tick-borne piroplasmids in camel blood samples collected from Cairo and Giza governorates, Egypt. **Acta Tropica**. 2024 May, 25: 107252. doi: 10.1016/j.actatropica.2024.107252.
3. Uday Kumar Mohanta, S M Abdullah, Al-Wasef, Boniface Chikufenji, Zhuowei Ma, Hang Li, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Moaz M Amer, Thanh Thom Do, Saiful Islam, Tilak Chandra Nath, Yongchang Li, Rika Umemiya-Shirafuji, Qingyong Guo, Xuenan Xuan\*, **Acta Tropica**. 2024 May; 256:107244. doi: 10.1016/j.actatropica.2024.107244.
4. Boniface Chikufenji, Uday Kumar Mohanta, Kyoko Hayashida, Elisha Chatanga, Eloiza May Galon, Nathan Kamanga, Aaron Edmond Ringo, Zhuowei Ma, Xuenan Xuan\*,

- Molecular detection and phylogenetic analysis of tick-borne pathogens in cattle from southern Malawi. **Veterinary Research Communications**. 2024 Apr; doi: 10.1007/s11259-024-10395-z.
5. Yihong Ma, Yingna Jian, Geping Wang, Xiuping Li, Guanghua Wang, Yong Hu, Naoaki Yokoyama, Liqing Ma, Xuenan Xuan\*, Molecular Identification of Babesia and Theileria Infections in Livestock in the Qinghai-Tibetan Plateau Area, China. **Animals (Basel)**. 2024 Feb; 14(3): 476. doi: 10.3390/ani14030476.
  6. Yihong Ma, Yingna Jian, Geping Wang, Iqra Zafar, Xiuping Li, Guanghua Wang, Yong Hu, Naoaki Yokoyama, Liqing Ma, Xuenan Xuan\*, Epidemiological Investigation of Tick-Borne Bacterial Pathogens in Domestic Animals from the Qinghai-Tibetan Plateau Area, China. **Pathogens**. 2024 Jan; 13(1): 86. doi: 10.3390/pathogens13010086.
  7. Uday Kumar Mohanta, Manwana Pemba Marguerite, Shengwei Ji, Zhuowei Ma, Hang Li, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Moaz M Amer, Boniface Chikufenji, Thanh Thom Do, Onur Ceylan, Rika Umemiya-Shirafuji, Xuenan Xuan\*, Molecular survey of canine tick-borne pathogens in ticks and stray dogs in Dhaka city, Bangladesh. **Parasitology International**. 2024 Jan; 100: 102860. doi: 10.1016/j.parint.2024.102860.
  8. Boniface Chikufenji, Elisha Chatanga, Eloiza May Galon, Uday Kumar Mohanta, Gift Mdzukulu, Yihong Ma, Madalitso Nkhata, Rika Umemiya-Shirafuji, Xuenan Xuan\*, First report of dog ticks and tick-borne pathogens they are carrying in Malawi. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2024 Feb; 86(2): 150-159. doi: 10.1292/jvms.23-0397.
  9. Adrian Miki C Macalanda, Eloiza May S Galon, Vernadyn A Morillo, Atcharaphan Wanlop, Kevin Austin L Ona, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, Shin-Ichiro Kawazu, Keisuke Sukanuma, Molecular detection and internal transcribed spacer-1 sequence diversity of *Trypanosoma evansi* in goats from Cavite, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2024 Jan; 86(1): 35-38. doi: 10.1292/jvms.23-0416.
  10. Shengwei Ji, Mohamed Abdo Rizk, Eloiza May Galon, El-Sayed El-Alfy, Yuki Mizukawa, Masayoshi Kojima, Mayumi Ikegami-Kawai, Motohiro Kaya, Mingming Liu, Isamu Itoh, Xuenan Xuan\*, Anti-babesial activity of a series of 6,7-dimethoxyquinazoline-2,4-diamines (DMQDAs). **Acta Tropica**. 2024 Jan; 249: 107069. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.107069.
  11. Onur Ceylan, Zhuowei Ma, Ceylan Ceylan, Muhammed Hudai Culha, Eloiza May Galon, Shengwei Ji, Hang Li, Iqra Zafar, Uday Kumar Mohanta, Xuenan Xuan\*, Ferda Sevinc, Wide bovine tick-borne pathogen spectrum: Predominancy of Theileria annulata and the first molecular detection of Ehrlichia minasensis in Turkey. **Veterinary Research Communications**. 2023 Dec. doi: 10.1007/s11259-023-10266-z.
  12. Eloiza May Galon, Adrian Miki Macalanda, Tatsuki Sugi, Kyoko Hayashida, Naoko

- Kawai, Taishi Kidaka, Rochelle Haidee Ybañez, Paul Franck Adjou Moumouni, Aaron Edmond Ringo, Hang Li, Shengwei Ji, Junya Yamagishi, Adrian Ybañez, **Xuenan Xuan\***, Bovine Piroplasma Populations in the Philippines Characterized Using Targeted Amplicon Deep Sequencing. **Microorganisms**. 2023 Oct; 11(10): 2584. doi: 10.3390/microorganisms11102584.
13. Oriel Thekiso, Tsepo Ramatla, Aron Ringo, Sifiso Mnisi, Nthabiseng Mphuthi, Lehlohonolo Mofokeng, Kgaugelo Lekota, **Xuenan Xuan\***, Molecular detection of *Rickettsia africae* from *Amblyomma hebraeum* ticks in Mafikeng city of North West Province, South Africa. **Research in Veterinary Science**. 2023 Nov; 164: 105027. doi: 10.1016/j.rvsc.2023.105027.
  14. Zhuowei Ma, Onur Ceylan, Eloiza May Galon, Uday Kumar Mohanta, Shengwei Ji, Hang Li, Thanh Thom Do, Rika Umemiya-Shirafuji, Shima Abd El-Salam El-Sayed, Iqra Zafar, Mingming Liu, Ferda Sevinc, **Xuenan Xuan\***, Molecular Identification of Piroplasmids in Ticks from Infested Small Ruminants in Konya Province, Turkey. **Pathogens**. 2023 Sep; 12(9): 1123. doi: 10.3390/pathogens12091123.
  15. Paul Franck Adjou Moumouni, Eloiza May Galon, Maria Agnes Tumwebaze, Benedicto Byamukama, Ruttayaporn Ngasaman, Saruda Tiwananthagorn, Ketsarin Kamyinkird, Tawin Inpankaew, **Xuenan Xuan\***, Tick-borne Pathogen Detection and Its Association with Alterations in Packed Cell Volume of Dairy Cattle in Thailand. **Animals (Basel)**. 2023 Sep; 13(18): 2844. doi: 10.3390/ani13182844.
  16. Ferda Sevinc, Mo Zhou, Shinuo Cao, Onur Ceylan, Mehmet Can Ulucesme, Sezayi Ozubek, Munir Aktas, **Xuenan Xuan\***, *Babesia ovis* secreted antigen-1 is a diagnostic marker during the active *Babesia ovis* infections in sheep. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2023 Aug; 13: 1238369. doi: 10.3389/fcimb.2023.1238369.
  17. Junya Yamagishi, Onur Ceylan, **Xuenan Xuan**, Ferda Sevinc, Whole genome sequence and diversity in multigene families of *Babesia ovis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2023 Aug; 13: 1194608. doi: 10.3389/fcimb.2023.1194608.
  18. Rika Umemiya-Shirafuji, **Xuenan Xuan**, Kozo Fujisaki, Junya Yamagishi, Draft genome sequence data of *Haemaphysalis longicornis* Oita strain. **Data in Brief**. 2023 Jun; 49: 109352. doi: 10.1016/j.dib.2023.109352.
  19. Uday Kumar Mohanta, Boniface Chikufenji, Eloiza May Galon, Shengwei Ji, Zhuowei Ma, Shima Abd El-Salam El-Sayed, Moaz M Amer, Thanh Thom Do, **Xuenan Xuan\***, Molecular characterization and phylogeny of *Anaplasma marginale*, *A. phagocytophilum* and *A. bovis* in livestock of Bangladesh. **Parasitology International**. 2023 Dec; 97: 102790. doi: 10.1016/j.parint.2023.102790.
  20. Iqra Zafar, Tomoyo Taniguchi, Hanadi B Baghdadi, Daisuke Kondoh, Mohamed Abdo

- Rizk, Eloiza May Galon, Shengwei Ji, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Thom Do, Hang Li, Moaz M Amer, Ma Zhuowei, Ma Yihong, Jinlin Zhou, Noboru Inoue, **Xuenan Xuan\***, *Babesia microti* alleviates disease manifestations caused by *Plasmodium berghei* ANKA in murine co-infection model of complicated malaria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2023 Jul; 13: 1226088. doi: 10.3389/fcimb.2023.1226088.
21. Rikako Konishi, Kayoko Fukuda, Sayuri Kuriyama, Tatsunori Masatani, **Xuenan Xuan**, Akikazu Fujita, Unique asymmetric distribution of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in *Toxoplasma gondii* revealed by nanoscale analysis. **Histochemistry and Cell Biology**. 2023 Oct; 160(4): 279-291. doi: 10.1007/s00418-023-02218-0.
  22. Qin Liu, Xing-Ai Guan, Dong-Fang Li, Ya-Xin Zheng, Sen Wang, **Xuenan Xuan**, Jun-Long Zhao, Lan He, *Babesia gibsoni* Whole-Genome Sequencing, Assembling, Annotation, and Comparative Analysis. **Microbiology Spectrum**. 2023 Aug; 11(4): e0072123. doi: 10.1128/spectrum.00721-23.
  23. Hang Li, Eloiza May Galon, Shengwei Ji, Iqra Zafar, Zhuowei Ma, Thom Do, Moaz M Amer, Yihong Ma, Mingming Liu, **Xuenan Xuan\***, *In vitro* screening of compounds from the Food and Drug Administration-approved library identifies anti-*Babesia gibsoni* activity of idarubicin hydrochloride and vorinostat. **Parasitology International**. 2023 Oct; 96: 102774. doi: 10.1016/j.parint.2023.102774.
  24. Uday Kumar Mohanta, Boniface Chikufenji, Eloiza May Galon, Shengwei Ji, Zhuowei Ma, Shimaa Abd El-Salam El-Sayed, Aaron Edmond Ringo, Thanh Thom Do, **Xuenan Xuan\***, Molecular Detection and Phylogenetic Analyses of *Babesia* spp. and *Theileria* spp. in Livestock in Bangladesh. **Microorganisms**. 2023 Jun; 11(6): 1563. doi: 10.3390/microorganisms11061563.
  25. Afraa Elata, Eloiza May Galon, Paul Franck Adjou Moumouni, Rochelle Haidee D Ybanez, Ehab Mossaad, Caro B Salces, Gundolino P Bajenting, Adrian P Ybanez, **Xuenan Xuan**, Noboru Inoue, Keisuke Suganuma, Molecular Detection of Animal Trypanosomes in Different Animal Species in the Visayas Region of the Philippines. **Acta Parasitologica**. 2023 Sep; 68(3): 604-611. doi: 10.1007/s11686-023-00696-9.
  26. Liang Shen, Chunhua Wang, Ruilin Wang, Xue Hu, Shiyong Liao, Wentong Liu, Aoling Du, Shengwei Ji, Eloiza May Galon, Hang Li, **Xuenan Xuan**, Juan Xiao, Mingming Liu, Serum metabolomic profiles in BALB/c mice induced by *Babesia microti* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2023 Apr; 13: 1179967. doi: 10.3389/fcimb.2023.1179967.
  27. Mo Zhou, Jun Xie, Osamu Kawase, Yoshifumi Nishikawa, Shengwei Ji, Shanyuan Zhu, Shinuo Cao, **Xuenan Xuan\***, Characterization of anti-erythrocyte and anti-platelet antibodies in hemolytic anemia and thrombocytopenia induced by *Plasmodium* spp.

- and *Babesia* spp. infection in mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2023 Apr; 13: 1143138. doi: 10.3389/fcimb.2023.1143138.
28. Zhengmao Xu, Yanan Wang, Meng Sun, Yongzhi Zhou, Jie Cao, Houshuang Zhang, Xuenan Xuan, Jinlin Zhou, Proteomic analysis of extracellular vesicles from tick hemolymph and uptake of extracellular vesicles by salivary glands and ovary cells. **Parasites & Vectors**. 2023 Apr; 16(1): 125. doi: 10.1186/s13071-023-05753-w.
29. 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 May; 241: 106890. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106890.
30. 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 Apr; 109: 105409. doi: 10.1016/j.meegid.2023.105409.

## 総説

1. Clara-Lee Van Wyk, Senzo Mtshali, Tsepo Ramatla, Kgaugelo E Lekota, Xuenan Xuan, Oriël Thekisoë, Distribution of Rhipicephalus sanguineus and Haemaphysalis elliptica dog ticks and pathogens they are carrying: A systematic review. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 2024 Jan; 47: 100969. Doi: 10.1016/j.vprsr.2023.100969.
2. El-Sayed El-Alfy, Ibrahim Abbas, Somaya Saleh, Rana Elseadawy, Ragab M Fereig, Mohamed Abdo Rizk, Xuenan Xuan\*, Tick-borne pathogens in camels: A systematic review and meta-analysis of the prevalence in dromedaries. **Ticks and Tick-borne Diseases**. 2024 Jan; 15: 102268, doi: 10.1016/j.ttbdis.2023.102268.

## 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 5 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 5 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 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
4. 令和 5 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
5. 令和 5 年度 特別研究員奨励費（文部科学省）、バングラデシュにおける家畜のマダニ媒介原虫病のゲノム疫学調査と制御対策の構築、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

1. GALON May Eloiza, 第 14 回日本獣医寄生虫学会奨励賞（令和 5 年度）
2. JI Shenwei, 第 14 回日本獣医寄生虫学会奨励賞（令和 5 年度）

## 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. 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）
4. 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）
5. Elikira KIMBITA：タンザニア・ソコイネ農業大学獣医学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020 年 4 月 1 日～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. Athanase BADOLO :ブルキナファソ・ワガドゥーグー大学理学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020年4月1日～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. Oriel THEKISOE :南アフリカ・ノースウェスト大学環境科学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020年4月1日～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. Hany IBRAHIM :エジプト・メノフィア大学理学部、アフリカにおけるマダニ媒介原虫病の制圧に向けた国際共同研究拠点の構築、2020年4月1日～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
- ・ 偶蹄類マラリアを始めとする住血原虫病の疫学及び病原性の解明

### 3. 2023 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-1 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)について機能解析を行いました。SBP1~4 のうち、SBP3 について解析を行ったところ、SBP3 が感染赤血球の Ridge に局在することが明らかとなり、SBP3 をロックダウンすると、原虫の増殖が有意に低下したほか、Ridge がほとんど形成されなくなることが明らかになりました。さらに、VESA-1 の感染赤血球側への局在が観察されなくなり、ウシ脳毛細血管内皮細胞への感染赤血球の接着が有意に減少することが明らかになりました(Fathi ら、MAM2024)。
- ・ チェコ科学アカデミーの研究者グループとの共同研究により、*B. divergens* の遺伝子組換え法の確立を行いました(論文リスト 1)。共同研究の実施に伴い、チェコ側の研究者の帯広訪問、日本側の研究者のチェコ訪問が実施されました。
- ・ 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。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、ヤギのマラリアが一部の *Anopheles* 属の蚊によって媒介されることを示唆す

る結果を得ました(論文リスト 6)。また、マラリア原虫に近縁のコウモリの住血原虫である *Polychromophilus* のミトコンドリアゲノム配列を決定し、マラリア原虫と比較解析を行いました(論文リスト 2)。さらに、ネパール・トリブバン大学の Kishor Pandey 博士から共同研究の依頼があったため、ネパールのウシの住血原虫感染状況について調査を行い、各種ピロプラズマ原虫 DNA を検出しました(論文リスト 3)。

- ・ その他、JRA 競走馬総合研究所や北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所の研究者らと共に *B. caballi* のゲノムを明らかにしました(論文リスト 4)。

#### 4. 学会等の活動状況

##### ① 所属学会等、役職等

- ・ 日本寄生虫学会評議員・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 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. 2023 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. 2023 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. Eliana F G Cubillos, Pavla Snebergerova, Sarka Borsodi, Dominika Reichensdorferova, Viktoriya Levytska, **Masahito Asada**, Daniel Sojka, Marie Jalovecka, Establishment of a stable transfection and gene targeting system in *Babesia divergens*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 2023 Dec: 13: 1278041. doi: 10.3389/fcimb.2023.1278041.
2. Juthathip Poofery, Thongchai Ngamprasertwong, Duriyang Narapakdeesakul, Apinya Arnuphappasert, Yudhi Ratna Nugraheni, Suchansa Thanee, **Masahito Asada**, Osamu Kaneko, Morakot Kaewthamasorn, Complete mitochondrial genome analyses confirm that bat *Polychromophilus* and ungulate *Plasmodium* constitute a distinct clade independent of other *Plasmodium* species. **Scientific Reports**. 2023 Nov; 13(1): 20258. doi: 10.1038/s41598-023-45551-z.
3. Medhavi Dhakal, Tulsi Ram Gombo, Prakash Devkota, Sharmila Chapagain Kafle,

- Janak Raj Subedi, Haiyan Gong, Hiroaki Arima, Richard Culleton, **Masahito Asada**, Kishor Pandey, Molecular Detection and Identification of Piroplasm in Cattle from Kathmandu Valley, Nepal. **Pathogens**. 2023 Aug; 12(8): 1045. doi: 10.3390/pathogens 12081045.
4. Akihiro Ochi, Taishi Kidaka, Hassan Hakimi, **Masahito Asada**, Junya Yamagishi, Chromosome-level genome assembly of *Babesia caballi* reveals diversity of multigene families among *Babesia* species. **BMC Genomics**. 2023 Aug; 24(1): 483. doi: 10.1186/s12864-023-09540-w.
  5. Yuho Watanabe, **Masahito Asada**, Mayu Inokuchi, Maho Kotake, Tomoyoshi Yoshinaga, Target Protein Expression on *Tetrahymena thermophila* Cell Surface Using the Signal Peptide and GPI Anchor Sequences of the Immobilization Antigen of *Cryptocaryon irritans*. **Molecular Biotechnology**. 2023 Jul. doi: 10.1007/s12033-023-00824-w.
  6. 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 Jun; 37(2): 381-395. doi: 10.1111/mve.12638.

## 総説

該当無し

## 著書

1. 獣医公衆衛生学(獣医公衆衛生学教育研修協議会編)文永堂出版 2024年3月. リーシュマニア症、バベシア症を分担執筆

## 7. 市民講演会、アウトリーチ活動

1. リーシュマニア症. 長崎大学熱帯医学研究所 熱帯医学研修課程 2023年4月

## 8. 招待講演等

1. 麻田 正仁, バベシア原虫赤血球修飾分子の同定と機能解析. 第96回日本生化学会大会シンポジウム「多様な病原体研究が生み出す 新たな生化学領域」講演 2023年11月

## 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ビ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. 人獣共通感染症国際共同研究所一般共同研究、ヒト赤血球馴化 Babesia bovis を用いたバベシア宿主域決定因子の解明、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. Daniel Sojka; Institute of Parasitology, Biology Centre CAS : DiCre Babesia lineages to study essential aspartyl peptidases、2023年4月1日～2024年3月31日、2023年度原虫病研究センター共同研究
2. Kishor Pandey, Tribhuvan University : Molecular characterization and genetic diversity of tick-borne diseases in Nepal、2023年4月1日～2024年3月31日、2023年度原虫病研究センター共同研究
3. 石崎 隆弘, ウメオ大学分子感染医学研究所/酪農学園大学 : ウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定に向けた次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の構築、2023年4月1日～2024年3月31日、2023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. 2023 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います。そこで私達は、ピロプラズマ原虫においてゲノム改変技術の基盤を確立して、その技術を活用して同原虫の発育機構をライブイメージングによって明らかにすることを目的に研究を行っています。昨年度に引き続き、バベシア・オバタにおいて、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、マダニ体内での発育ステージ（Tick stage）で発現が亢進する遺伝子群の同定を進めました。赤血球内での発育ステージ（Blood

stage) との比較 RNA シーケンス (RNA-seq) にて同定した Tick stage 細胞表在性と推定される蛋白質をコードする 14 遺伝子を対象に定量 RT-PCR による再検証を行い、うち 5 遺伝子について Tick stage における発現亢進を確認しました。また、分化を誘導 12 時間のタイミングにおいて、雄性生殖体からの鞭毛放出 (exflagellation) と思われる現象を観察することにも成功しました。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、バベシア原虫でのゲノム機能解析 (Functional genomics) で必須となる遺伝子改変技術の開発研究では、バベシア・オバタへの遺伝子導入において、新規マーカー (プラストサイジン S デアミナーゼ) の有用性を確認いたしました。

- ・ 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います。また、住血吸虫症対策の基本となるプラジカンテル (PZQ) による集団投薬 (MDA) の効率的な運用に関連した基礎研究も行っています。今年度は、マンソン住血吸虫において PZQ が transient receptor potential (TRP) チャネルを活性化することを明らかにした先行研究を踏まえて、このチャネル遺伝子 (Smp\_246790.5) の日本住血吸虫におけるオースログ (EWB00\_008853) について発現プロファイルの解析を行いました。その結果、このチャネル分子がオス成虫の虫体全体の柔組織において強く発現し、一方、メス成虫においては顕著な発現が観察されないことが解りました。加えて、このチャネルは虫卵の卵殻とその内部のミラシジアで発現していることも観察されましたが、中間宿主貝での発育ステージ (スポロシスト) ではその発現が確認できませんでした。この研究で得られた成績は、住血吸虫の PZQ に対する感受性の性差や発育ステージ間での差を示した先行研究の成績に矛盾しないものでありました。一連の研究成績を、住血吸虫症の elimination に向けた基礎研究の知見として、専門誌に公表いたしました (原著論文リスト 3)。PZQ の作用機序が明らかになることで、新規の抗寄生虫薬の創薬研究の進展が期待できます。

#### 4. 学会等の活動状況

##### ① 所属学会等、役職等

- ・ 日本熱帯医学会監事
- ・ 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

- ・ 令和 5 (2023) 年度研究拠点形成事業「アジア型住血吸虫症の排除に向けた南南・三角協力拠

点の構築」のキックオフミーティング（令和5年10月24–27日、帯広畜産大学原虫病研究センターPK-Hall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. 2023 年度研究成果発表等（原著論文、総説・著書）

### 原著論文（\*責任著者）

1. Keisuke Suganuma, Kennedy M Mochabo, Judith K Chemuliti, Kiyoshi Kita, Noboru Inoue, **Shin-Ichiro Kawazu**, Ascofuranone antibiotic is a promising trypanocidal drug for nagana. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. 2024 Feb; 91(1): e1-e6. doi: 10.4102/ojvr.v91i1.2115.
2. Adrian Miki C Macalanda, Eloiza May S Galon, Vernadyn A Morillo, Atcharaphan Wanlop, Kevin Austin L Ona, Xuenan Xuan, Noboru Inoue, **Shin-Ichiro Kawazu**, Keisuke Suganuma, Molecular detection and internal transcribed spacer-1 sequence diversity of *Trypanosoma evansi* in goats from Cavite, Philippines. **Journal of Veterinary Medical Science**. 2024 Jan; 86(1): 35-38. doi: 10.1292/jvms.23-0416.
3. Kaho Shinozaki, Masashi Kirinoki, Atcharaphan Wanlop, Kenichi Watanabe, Yuma Ohari, Saki Suguta, Kevin Austin L Ona, Naoko Ushio, Adrian Miki C Macalanda, Keisuke Suganuma, Noboru Inoue, **Shin-Ichiro Kawazu**, Expression profile analysis of the transient receptor potential (TRPM) channel, a possible target of praziquantel in *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**. 2023 Dec; 99: 102833. doi: 10.1016/j.parint.2023.102833.
4. Ai Yamazaki, Keisuke Suganuma, Yusuke Tanaka, Kenichi Watanabe, **Shin-Ichiro Kawazu**, Kiyoshi Kita, Noboru Inoue, Efficacy of oral administration of ascofuranone with and without glycerol against *Trypanosoma congolense*. **Experimental Parasitology**. 2023 Sep; 252: 108588. doi: 10.1016/j.exppara.2023.108588.
5. Yujon Hong, Keisuke Suganuma, Yuma Ohari, Mitsunori Kayano, Kenji Nakazaki, Shinya Fukumoto, **Shin-Ichiro Kawazu**, Noboru Inoue, Seasonal Variation and Factors Affecting *Trypanosoma theileri* Infection in Wild Sika Deer (Ezo Sika Deer *Cervus nippon yesoensis*) in Eastern Hokkaido. **Animals (Basel)**. 2023 May; 13(10): 1707. doi: 10.3390/ani13101707.

### 総説

該当なし

## 著書

該当なし

## 7. 市民講演会、アウトリーチ活動

該当なし

## 8. 招待講演等

1. 該当なし

## 9. 獲得研究費

1. 令和 5 年度 国際共同研究加速基金（海外連携研究）（文部科学省）、ワンヘルス・アプローチに基づく日本住血吸虫症対策の創出を目指した研究（23KK0125）、代表、令和 5 年度～令和 9 年度
2. 令和 5 年度 科学研究費助成事業（特別研究員奨励費）（日本学術振興会）、日本住血吸虫症の SE 抗原診断法開発に向けた網羅的バイオマーカー探索研究（23KF0131）、代表、令和 5 年度～令和 6 年度
3. 令和 5 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）、アジア型住血吸虫症の排除に向けた南南・三角協力拠点の構築（JPJSCCB20230008）、代表、令和 5 年度～令和 7 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 令和 6 年 3 月 11 日 顧みられない熱帯病の診断法を開発 河津信一郎教授に聞く【ちくだい×SDGs（19）】

## 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、2023年7月～2026年6月（2023年7月に延長）、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、ヒストン修飾酵素阻害剤によるマラリア原虫増殖阻害とその分子基盤の解明、2023年4月1日～2024年3月31日、2021年度原虫病研究センター共同研究（2023-共同-10）

## 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

2024年4月9日

採択番号	2023-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	トキソプラズマ分泌性タンパク質と宿主ミトコンドリアの親和性解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	こしば たくみ 小柴 琢己	福岡大学理学部化学科・教授	
研究分担者	にしごり みつひろ 錦織 充広	福岡大学理学部化学科・助教	
	にしかわ 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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>細胞内小器官の一種であるミトコンドリアは、エネルギーの産生場として働き、様々な真核生物において代謝系を中心に生命活動を支えている。近年の研究では、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の機能も発揮していることが分かってきた。私たちのグループでは、これまでミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫に関する一貫した研究を行い、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 など)。</p> <p>一方、トキソプラズマに代表される細胞内寄生虫が、哺乳動物へ感染した際の宿主内ミトコンドリアとの関わりについてはこれまでほとんど明らかになっていなかった。そこで本研究では、トキソプラズマ原虫に感染した宿主内で、宿主由来のミトコンドリアがどのような挙動を示すのか? その点を明らかにする研究を行った。特に、トキソプラズマ原虫が感染後に分泌する原虫由来の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、その際の病原性発現との関連性も明らかにしたい。さらに、本研究では原虫側の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も目指した。</p>		
研究経過の概要	<p>私たちの予備実験から、複数種類のトキソプラズマ分泌性タンパク質群が宿主ミトコンドリアと非常に強い親和性を持つことが生化学的な解析により明らかになった(学会発表を参照)。さらに、これらのタンパク質群を個別に培養細胞内で一過性発現させると、宿主由来のミトコンドリアに共局在することも見出した。これらの知見より、本研究では次の研究計画を実施した。</p> <p>(1) 宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質(TgGRA25)を恒常的に発現させ</p>		

	<p>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を行い、TgGRA25 と相互作用する宿主側のミトコンドリアタンパク質を同定した。それらの特異的抗体を用いて、免疫沈降実験により、TgGRA25 との相互作用を明らかにした。</p> <p>(2) 受入れ研究室の西川義文教授との共同研究により、TgGRA25 の欠損原虫及び遺伝子入れ戻し株を作製した。それら組換え原虫を用いた細胞への感染実験により TgGRA25 の生理的な役割を明らかにした。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>初めに、特定した宿主ミトコンドリア結合性のトキソプラズマタンパク質 (TgGRA25) の安定発現細胞株を用いてプロテオーム解析を行い、宿主ミトコンドリア側の相互作用タンパク質を網羅的に探索した。これまでの細胞分画やプロテアーゼ耐性実験などの実験結果から、TgGRA25 がミトコンドリア外膜に局在することが確認できたため、私たちはミトコンドリアの外膜タンパク質と TgGRA25 との関わりに着目してその相互作用タンパク質を探索した。その結果、免疫沈降法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できたが、外膜タンパク質群の相互作用は極めて限定的であり、タンパク質間相互作用以外の結合要因も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、私たちはリン脂質との結合解析および人工リポソームを用いてその結合様式について解析した。その結果、TgGRA25 が特定のリン脂質 (特に PA) と特異的に結合することが明らかになった。この脂質との結合性は、リン脂質の脂肪鎖長や不飽和度の違いにも変動することも明らかになった。PA 合成酵素のうち、ミトコンドリア外膜局在型の PLD6 と TgGRA25 が相互作用することは、免疫沈降実験などからも明らかとなり、ミトコンドリア外膜のリン脂質を介した相互作用様式を知ることができた。</p> <p>一方で、野生型および TgGRA25 欠損原虫を Vero 細胞に感染させ、各 24, 48, 72 時間後におけるトキソプラズマの感染率、増殖率、エグレッション率の比較を検討した。免疫染色による結果では、TgGRA25 欠損による宿主への感染率への影響は有意な差としては見られず、増殖率においても大きな差は見られなかった。しかしながら、これら原虫株を用いたプラークアッセイでは、TgGRA25 欠損によりトキソプラズマの増殖が抑制されていることが明らかとなった。さらに、PLD6 高発現細胞では原虫のエグレッション率に有意な変動が見られ、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大いに示唆された。現在、これらの研究成果は原著論文として学術雑誌に投稿中である。</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"> <li>• 錦織充広, 伴匡人, 西川義文, 小柴琢己 「トキソプラズマ原虫と宿主ミトコンドリアの膜リン脂質を介した相互作用」第96回日本生化学会大会 (2023年10月31日)</li> <li>• 錦織充広 「膜リン脂質を介したトキソプラズマ原虫・宿主ミトコンドリア間相互作用の解析」2023年度ミトコンドリア・サイエンス・ワークショップ (2023年9月4日)</li> <li>• 錦織充広, 伴匡人, 西川義文, 小柴琢己 「寄生虫由来タンパク質の宿主ミトコンドリア膜リン脂質への結合」令和5年度日本生化学会九州支部例会 (2023年6月25日)</li> </ul>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年3月31日

採択番号	2023-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	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	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	2023年4月1日 ~ 2024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>昨年の報告書に記載した実験結果</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>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、ウィ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。</li> <li>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・レーザーアブレーション ICP 質量分析 (LA-ICP-MS) 法で Fe が検出された。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> </ul> <p>これらに加え、</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>トキソプラズマ感染マウス網膜の電子顕微鏡観察の結果、視細胞のクリステの縮小などフェロトーシスと思われる所見が確認された。</li> <li>トキソプラズマ感染マウス網膜において GPx4 タンパクの減少が確認された。</li> </ul>		

	<p>などの追加結果を含め、順調に研究は進められ、論文発表された。</p> <p>現在は、特許出願内容をもとに新規検査キット・新規治療薬の共同研究を行う企業を探しており、ベルギーの会社と秘密保持契約の締結を進めている。</p> <p>競争的研究費獲得として科研費基盤 C は継続されている。</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>研究成果の概要</p>	<p>研究成果の一つとして、「研究成果の発表」に記載する論文が受理された。</p> <p>また論文発表に先立って得られた以下の特許出願 特願 2022-178619 【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 出願者: 兼子裕規・西川義文ほか2名 施設: 名古屋大学・帯広畜産大学 は出願完了していたが、今回、JST の支援を獲得し PCT 出願を完了した。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>“Retinal ferroptosis as a critical mechanism for the induction of retinochoroiditis during ocular toxoplasmosis.” Ushio-Watanabe N(3 番目), Nishikawa Y(17 番目), Kaneko H(19 番目).(合計 19 名)(筆頭 3 名は同等貢献) Redox Biol. 2023 Nov;67:102890. doi: 10.1016/j.redox.2023.102890.</p> <p>特願 2022-178619 【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 出願者: 兼子裕規・西川義文ほか2名 施設: 名古屋大学・帯広畜産大学の PCT 出願が完了した。</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年4月22日

採択番号	2023-共同-3		
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	2023年4月1日 ~ 2024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2金コロイド)とホスファチジルセリン(PtdSer)の寄生胞膜での局在を検討し、<i>Toxoplasma gondii</i>原虫の宿主細胞からの脱出機構におけるPtdSerおよびPtdEtnの役割を検討した。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>		

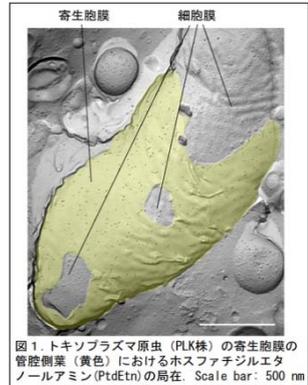


図1. トキソプラズマ原虫(PLK株)の寄生胞膜の管腔側膜(黄色)におけるホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)の局在。Scale bar: 500 nm

<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 (<b>QF-FRL: Quick Freezing &amp; Freeze-fracture Labeling</b>) によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示した。本研究では、この <b>QF-FRL</b> 法を用いることにより、宿主細胞内の <i>Toxoplasma gondii</i> 原虫の寄生胞膜におけるグリセロリン脂質であるホスファチジルセリン (PtdSer, 図1) およびホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn, 図2) の微細分布を明らかにした。細胞膜を含む生体膜では、PtdSer および PtdEtn は通常、細胞質側のリーフレット(内葉, P-face) に主に局在する。ところがヒト線維芽細胞(HFF-1)内に寄生する <i>T. gondii</i> 原虫の寄生胞膜では、PtdSer および PtdEtn は内葉と外葉(管腔側リーフレット, E-face)の両方にほぼ同じ密度で局在することがわかった。<i>T. gondii</i> 原虫は寄生膜と宿主細胞の細胞膜を破り、宿主細胞から脱出する。その後、再度、細胞に寄生して増殖を繰り返す。以前の報告では、<i>T. gondii</i> 原虫は、この脱出時に <b>perforin-like protein1 (TgPLP1)</b>を分泌し、寄生胞膜と宿主細胞膜の破壊に役立てることが考えられている<sup>1)</sup>。さらに、TgPLP1は生体膜の細胞質側の脂質に親和性を持つことを明らかにし、生体膜の破壊に寄与していることが示唆されている。本研究で明らかとなった、前述の PtdSer および PtdEtn が管腔側のリーフレット(E-face)に豊富に存在することは、TgPLP1が選択的に PtdSer あるいは PtdEtn に結合することにより、寄生胞膜の破壊に関係することが強く示唆された(投稿準備中)。</p> <p>1) Guerra, A.J. et al. Structural basis of <i>Toxoplasma gondii</i> perforin-like protein 1 membrane interaction and activity during egress. <i>PLOS Pathogens</i>, 14, e1007476, 2018</p>
<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> 160, 279-291, 2023. doi: 10.1007/s00418-023-02218-0.</p>

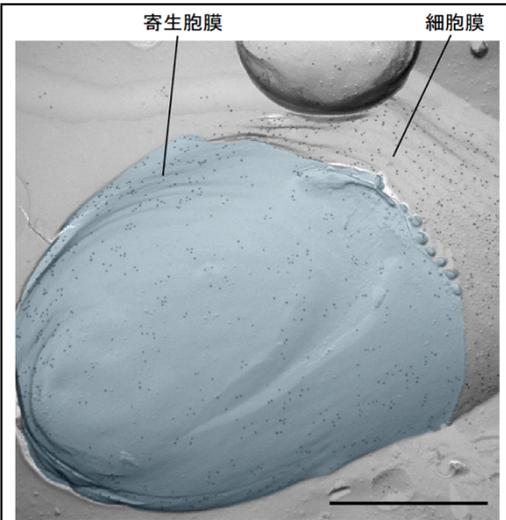


図2. トキソプラズマ原虫 (PLK株) の寄生胞膜の管腔側葉 (青) におけるホスファチジルセリン (PtdSer) の局在. Scale bar: 1 μm

# NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.15  
Project no: 2023-joint-4

## 1. Principal investigator

Name: Kishor Pandey

Position: Associate Professor

Affiliation: Central Department of Zoology, Institute of Science and Technology, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal

## 2. Project title:

Molecular characterization and genetic diversity of tick-borne diseases in Nepal

## 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)

01/04/2023 -31/03/2024: one year

## 5. Purposes and objectives

Tick-borne diseases cause significant morbidity and mortality in animals in Nepal. Piroplasm is one of the important protozoan parasites in the cattle. There have been very few studies about tick-borne parasitic diseases in Nepal. Those studies were focused on the detection of tick-borne parasites using microscopy. There were no molecular studies on tick-borne parasites in Nepal. The objective of this study was to detection of tick-borne parasites in cattle in Nepal using molecular methods.

## 6. Outline of research process

The blood samples were collected from cattle in three districts (Kathmandu, Lalitpur, and Bhaktpur) of Kathmandu Valley, Nepal. Thin blood smears were prepared, fixed with methanol, and stained with Giemsa solution. The smears were observed under a microscope for the detection of blood parasites. Then, DNA was extracted from each cattle blood sample, followed by PCR targeting piroplasm-specific primers. PCR-positive samples were further confirmed by sequencing.

## 7. Outline of research achievements

The study was conducted to detect the types of piroplasm affecting cattle in the Kathmandu Valley, Nepal using molecular methods. In this hospital-based study, 106 blood samples were collected from cattle that were brought to the hospital for proper diagnosis of blood-borne disease infections. Thin

blood smears were prepared and observed under the microscope. Similarly, blood samples were used for DNA extraction. PCR and sequencing were performed to detect and identify piroplasm present in the collected samples. This study revealed that 45 (42.5%) were positive for piroplasm (*Babesia* spp. and *Theileria* spp.) via microscope observation and 56 (52.8%) samples were positive via PCR. We were able to identify the species as *B. bigemina*, *B. bovis*, *T. annulate* and *T. orientalis* by PCR followed by sequencing. Nine samples were selected and performed for sequencing. The phylogenetic analyses of those sequenced samples showed that the *B. bovis*, *B. bigemina* and *T. orientalis* sequences belonged to each species clade. On the other hand, *T. annulate* was divided into two clades in the analysis, and our *T. annulate* sequences were also divided into these two clades. The result is the first to detect piroplasm using PCR techniques in Nepal.

## 8. Publication of research achievements

Dhakal M, Gompo TR, Devkota P, Kafle SC, Subedi JR, Gong H, Arima H, Culleton R, **Asada M, Pandey K**. Molecular detection and Identification of piroplasm in cattle from Kathmandu Valley, Nepal. *Pathogens*. 5;12(8):1045.

Attach reference materials as necessary.

> [Pathogens](https://doi.org/10.3390/pathogens12081045). 2023 Aug 15;12(8):1045. doi: 10.3390/pathogens12081045.

## Molecular Detection and Identification of Piroplasm in Cattle from Kathmandu Valley, Nepal

Medhavi Dhakal <sup>1</sup>, Tulsi Ram Gompo <sup>2</sup>, Prakash Devkota <sup>2</sup>, Sharmila Chapagain Kafle <sup>2</sup>, Janak Raj Subedi <sup>1</sup>, Haiyan Gong <sup>3</sup>, Hiroaki Arima <sup>4</sup>, Richard Culleton <sup>5</sup>, Masahito Asada <sup>6</sup>, Kishor Pandey <sup>1</sup>

Affiliations – collapse

### Affiliations

- 1 Central Department of Zoology, Institute of Science and Technology, Tribhuvan University, Kathmandu 44601, Nepal.
- 2 Central Veterinary Laboratory, Kathmandu 44600, Nepal.
- 3 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China.
- 4 Department of International Health and Medical Anthropology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852-8523, Japan.
- 5 Division of Molecular Parasitology, Proteo-Science Centre, Ehime University, Ehime, Matsuyama 791-0295, Japan.
- 6 Research Unit for Global Infection Control, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月31日

採択番号	2023-共同-5		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	カブリダニの卵形成の分子機構解明と人工飼料開発への応用		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	すずき たけし 鈴木 丈詞	東京農工大学大学院農学研究院・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	
	のるえいでいん 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	
	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	
	すずき かな 鈴木 伽奈	東京農工大学大学院生物システム応用科学府・大学院生	
	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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>捕食性天敵であるカブリダニ類は、薬剤抵抗性が発達しやすいハダニ類に対する持続可能な生物的防除資材として、半世紀以上にわたって利用されてきた。ハダニ類に対する主要な天敵製剤として、国内では、チリカブリダニ(<i>Phytoseiulus persimilis</i>) 剤およびミヤコカブリダニ(<i>Neoseiulus californicus</i>) 剤が市販されている。2017年の統計では、これらカブリダニ剤の国内出荷金額は約7億円であり、近年増加傾向である。ただし、この金額は、殺虫剤全体の国内出荷金額のわずか0.6%程度である。さらなる普及拡大のためには効率的なカブリダニ剤の生産体制の構築が必要である。ミヤコカブリダニは国内土着種であり、ハダニ類のみ摂食するチリカブリダニと異なり、その大量生産には、ハダニ類の他に、害虫とならない節足動物あるいは花粉が餌として用いられている。しかし、これら天然物の管理は煩雑であり、安定的なミヤコカブリダニ生産のボトルネックとなっている。他方、同じダニ目に属するマダニ類では、卵形成の分子機構研究が進展し、栄養シグナル伝達を担うTarget of rapamycin (TOR) 経路によって卵黄タンパク質前駆体であるピテロジェニン(Vg)の合成が制御されることが判明している。</p> <p>そこで本研究では、ミヤコカブリダニのTOR経路やVg合成系で機能する遺伝子群を分子マーカーとし、卵形成を促す栄養成分のスクリーニングと、栄養シグナル伝達の分子機構の解明を目指す。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>2021 年度には、ミヤコカブリダニのゲノム全塩基配列のショートリードシーケンシングが完了した。2022 年度には、ロングリードシーケンシングも完了し、ショートリードとのハイブリッドアセンブリにより高品質なゲノム情報を構築した。</p> <p>このゲノム情報をもとに、2023 年度からは、RNA-Seq による比較トランスクリプトーム解析や RNAi による機能解析に取り組んだ。比較トランスクリプトーム解析に加え、比較プロテオーム解析も実施した結果、当初予定していた Vg 遺伝子や TOR 経路で機能する遺伝子群だけでなく、栄養条件に応じて顕著に発現量が変化する複数の遺伝子が同定された。</p> <p>そこで 2023 年度は、その遺伝子の中の一つであるミヤコカブリダニのトリアシルグリセロールリパーゼ (triacylglycerol lipase, NcTAGL) 遺伝子を標的とした機能解析について、発現レベル以外に、捕食量や産卵数など生理学的解析も進めた。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>通常状態と飢餓状態のミヤコカブリダニ間でのトランスクリプトームおよびプロテオームの比較解析より、飢餓状態における NcTAGL の遺伝子およびタンパク質の顕著な発現減少が確認された。TAGL はエネルギー源として体内に貯蓄されているトリアシルグリセロール (TAG) を加水分解し、遊離した脂肪酸が <math>\beta</math> 酸化とクエン酸回路を経て ATP が産生される。血リンパ中の脂肪酸のレベルは摂食行動の制御因子でもあるため、NcTAGL 遺伝子の RNAi によって飢餓様状態を誘導できる可能性がある。そこで、ミヤコカブリダニの NcTAGL 遺伝子に対する二本鎖 RNA (dsNcTAGL) の経口投与による RNAi 誘導試験を実施した。</p> <p>その結果、dsNcTAGL 摂取 12 h 後に NcTAGL 遺伝子の発現量は低下し、RNAi の有効性が認められた。一方、dsNcTAGL 摂取 72 および 120 h 後では、予想に反して NcTAGL 遺伝子の発現量は上昇した。この原因として、NcTAGL 遺伝子の一時的な発現抑制に、上流因子 (転写因子など) が応答して、NcTAGL 遺伝子の発現を促進するフィードバック調節が生じた可能性がある。</p> <p>ここで、昆虫では、中腸細胞内で発現するリパーゼの上流因子として神経ペプチド F (Neuropeptide F, NPF) や NPF 受容体 (NPFR) が知られている。ミヤコカブリダニにおける NPFR のホモログ (NcNPFR) 遺伝子の発現量を解析した結果、dsNcTAGL 摂取 72 および 120 h 後において、NcNPFR 遺伝子の発現量の有意な上昇が確認された。これは、NcTAGL 遺伝子の RNAi に応答し、NcNPFR を介したフィードバック調節が生じた可能性を示唆する。</p> <p>他方、dsNcTAGL 摂取個体における捕食行動や産卵数に有意な影響はみられなかった。</p> <p>今後は、NcTAGL の上流因子として機能する可能性が示唆された NcNPFR 遺伝子の発現抑制による NcTAGL 遺伝子の発現変動や表現型に加え、NcNPF 遺伝子の発現変動も調査し、これら遺伝子による脂質代謝の恒常性維持のためのフィードバック調節機構の解明を進めていく必要がある。このフィードバック調節機構が解明され、そこで機能する遺伝子をゲノム選抜における分子マーカーとして利用すれば、高い捕食圧と定着率を兼ね備えたミヤコ系統の作出が期待できる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>【国際会議での発表】</p> <p>Takeda, N., K. Kataoka, Y. Arai, K. Suzuki, K. Yura, and T. Suzuki (2023) The draft genome of the predatory mite, Neoseiulus californicus: Pesticide resistance and feeding behavior. 13th Spider Mite Genome Meeting, Logrono, La Rioja, Spain, September 11 to 14, 2023 (口頭、招待講演)</p>

**【国内学会での発表】**

武田直樹, 新井優香, 片岡孝介, 由良敬, 白藤 (梅宮) 梨可, N.A. Ghazy, 森光太郎, 刑部正博, 日本典秀, 鈴木丈詞 (2024) ミヤコカブリダニのゲノム全塩基配列解読とピリダベン抵抗性因子の推定. 日本昆虫学会第 84 回大会・第 68 回日本応用動物昆虫学会合同大会, 仙台, 2024 年 3 月 28-31 日 (ポスター)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月16日

採択番号	2023-共同-6		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	マラリア原虫オーシスト形成・分化に関する分子機構の解明:壁構成蛋白質の探索から		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いかに ひろみ 俊井 宏実	北里大学獣医学部・教授 研究総括	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>マラリア原虫はオーシスト形成時に媒介蚊と相互作用する事により、オーシスト壁という特殊な構造物を形成する。</p> <p>本研究は、マラリア原虫のオーシスト形成・分化に関する分子機構の解明を目的とし、オーシスト形成期における、①オーシスト壁構成蛋白質の探索、②それらオーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析、③原虫オーシスト形成期のトランスクリプトーム解析、④オーシスト形成抑制ワクチン抗原への応用検討を行なう事によって、媒介蚊体内における原虫オーシスト形成期に関する生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>本研究はネズミマラリア原虫 (<i>Plasmodium berghei</i> GFP 発現組換え原虫) とハマダラカ (<i>Anopheles stephensi</i>) を用いて、研究を実施した。</p> <p>ハマダラカに、<i>in vitro</i> 培養したネズミマラリア原虫のオーキネートを血体腔にインジェクションを行い感染させた。インジェクションしたハマダラカの血体腔から浮遊したオーシストを合計 2,077 個回収した。回収したオーシストは、膜タンパク質の粗精製として凍結融解を実施し、ショットガンプロテオミクス解析を行った。その結果、<i>P. berghei</i> タンパク質 197 個が同定され、これらの中には、PbCap380 など既知のオーシスト壁構成タンパク質が含まれていた。これら同定されたタンパク質から、オーシスト壁を構成し、且つ物質輸送に関連すると推測される候補タンパク質を 8 種類選出した。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>選出した候補タンパク質 8 種類について、それぞれペプチド抗体の作製を試み、7 種類の候補タンパク質についてそれぞれペプチド抗体が得られ、1 種類の候補タンパク質については現在作製中である。</p> <p>作製された 7 種類のペプチド抗体は、感染血の吸血により中腸に形成されたオーシストを用いて免疫蛍光染色法を実施し、その局在を調べた。7 種類のペプチド抗体すべて、オーシストでの発現が確認された。これら 7 種類のうち 4 種類について、共焦点レーザー顕微鏡観察により局在の詳細を調べたところ、1 種類はオーシスト壁に、2 種類はオーシスト壁およびその内膜に、1 種類はオーシスト壁内膜には局在していることが明らかとなった。他の抗体に関しても、引き続き局在解析は実施していく予定である。</p> <p>さらに、インジェクションした雌雄ハマダラカを用いて次世代シーケンズを行い、その遺伝子発現変動からハマダラカにおける原虫保有数を規定する分子候補を選別した。これら候補遺伝子に関しては、siRNA 等を用いた解析を引き続き実施していく予定である。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>原口麻子, 平田るりこ, 中山和彦, 箱崎純, 中村咲蓮, 草木迫浩大, 筏井宏実, 第 93 回日本寄生虫学会大会(順天堂大学), <i>Plasmodium berghei</i> の新規オーシスト壁構成タンパク質の探索, 2024 年 3 月 9 日</p> <p>原口麻子, 高野真, 箱崎純, 中山和彦, 中村咲蓮, 吉川泰永, 福本晋也, 草木迫浩大, 筏井宏実, 第 46 回日本分子生物学会年会(神戸ポートアイランド), ハマダラカのマラリア原虫感染に対する新たな応答分子の探索, 2023 年 12 月 6 日</p> <p>Kodai Kusakisako, Asako Haraguchi, Kazuhiko Nakayama, Jun Hakozaki, Sakure Nakamura, Hiromi Ikadai, The 21st Protein Island Matsuyama International Symposium (PIM2023) (愛媛大学), Investigation of novel <i>Anopheles</i> mosquitoes-derived responsive factors against <i>Plasmodium</i> infection, 2023 年 9 月 13 日</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月23日

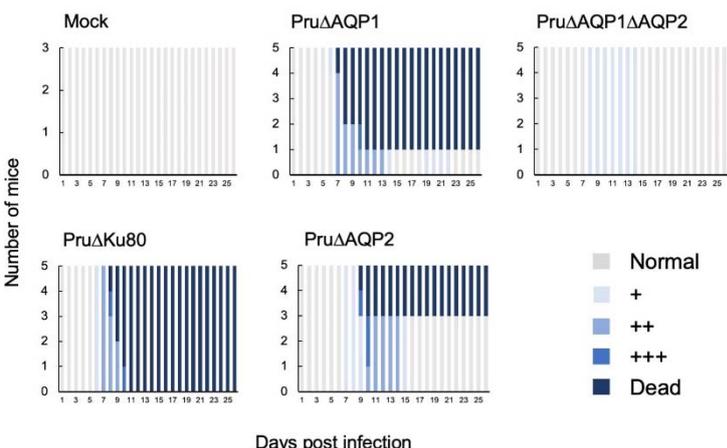
採択番号	2023-共同-7		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と作用機序解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なかお よういち 中尾 洋一	早稲田大学理工学術院・教授 研究統括、作用機序解析	
研究分担者	なかむら ふみあき 中村 文彬	早稲田大学大学院先進理工学研究科・招聘研究員 活性化化合物の精製・構造決定	
	かみひら りえ 神平 梨絵	早稲田大学大学院先進理工学研究科・助教 活性化化合物の精製・構造決定	
	あきづき こうた 秋月 孝太	早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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>トリパノソーマ症に対する現行の治療薬は薬剤耐性株の出現や副作用などの問題が指摘されているため、依然として新たな治療薬開発には高いニーズがある。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。</p> <p>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、抗トリパノソーマ活性スクリーニングを行い、ヒットサンプルから活性本体を探索する。また、植物由来の抗トリパノソーマ活性を有する天然化合物の探索を行う。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活性試験を担当する。</p>		
研究経過の概要	<p>大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿 (S07140) から得られた <i>T. evansi</i> および <i>T. congolense</i> に対して強い抗原虫活性 (IC<sub>50</sub> = 0.60, 0.61 μg/mL) を示す新規アルカロイドについて、立体化学を含めた構造の詳細な解析を行っている。また、原虫内での薬剤の局在を特定するための傾向プローブ分子および標的タンパク質の同定のためのプローブ分子の合成を行っている。</p> <p>長崎県産の海綿 <i>Siliquariaspongia japonica</i> からは、新規の抗リーシュマニア原虫活性化化合物として、aurantoside L (IC<sub>50</sub> 0.74 μM) を得た。</p> <p>薬用植物としても知られる春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> について、活性本体の探索を行った結果、coronararin D のほか複数の抗トリパノソーマ活性を有する新規成分が得られた。これらについて MS スペクトルならびに NMR スペクトルを測定し、得られたスペクトルを解析することで 5 種類の新規抗トリパノソーマ活性化化合物の構造を明らかにした。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿(S07140)から単離した新規化合物については、これまで報告されている活性化化合物とは異なる構造モチーフを与えるものであったため、米国特許仮出願を行った。</p> <p>現在トリパノソーマ原虫感染マウスを用いて、in vivo 抗原虫活性試験を行っている。ここで有効な in vivo 活性が認められたら、特許の本出願の手続きを進める。また、合成したプローブ分子をビーズに結合させ、トリパノソーマ原虫抽出物から標的分子をつり上げ、プローブ分子に結合したタンパク質について SDS-PAGE および MS/MS 解析を行って、各標的候補タンパク質を同定する。得られた標的タンパク質候補の情報をもとに、パスイ解析を行って作用メカニズム解析を行う。</p> <p>長崎県産の海綿 <i>Siliquariaspongia japonica</i> からは、新規の抗リーシュマニア原虫活性化化合物として、aurantoside L (<i>L. amazonensis</i> IC<sub>50</sub> 0.74 μM)を得た。本化合物はトリパノソーマ <i>T. congolense</i> に対する抗原虫活性は示さなかった。</p> <p>埼玉産春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> 抽出物から、<i>T. congolense</i> に対する抗トリパノソーマ活性成分の探索を行った。<i>C. aromatica</i> の抽出物を溶媒分画に付し、得られた活性画分を各種クロマトグラフィーを用いて活性成分を精製した。得られた複数の活性成分について、MS スペクトルおよび NMR スペクトルを測定した。得られたスペクトルをもとに構造解析を行って、活性本体として coronarin D (IC<sub>50</sub>=1.5 μM)ならびにその新規類縁体 (IC<sub>50</sub>=9.0 μM)、4 種類の新規ジアリールヘプタノイドダイマー (IC<sub>50</sub>=6.1~10.4 μM) を同定した。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>(論文発表)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Oyadomari, Y.; Goto, Y.; Kawazu, S.; Becking, L. E.; Fusetani, N.; Nakao, Y. Aurantioside L, a New Tetramic Acid Glycoside with Anti-Leishmanial Activity Isolated from the Marine Sponge <i>Siliquariaspongia japonica</i>, <i>Marine Drugs</i>, 22, 171, (2024). <a href="https://doi.org/10.3390/md22040171">https://doi.org/10.3390/md22040171</a></li> </ol> <p>(学会発表)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>秋月孝太, 菅沼啓輔, 伊藤駿, 高橋伶奈, 中村文彬, 河津信一郎, 中尾洋一, 『大島新曾根産海綿に含まれる新規アルカロイドの構造と生物活性』, 第 65 回天然有機化合物討論会, 東京, 2023 年 9 月 15 日.</li> <li>Oeda, K.; Suganuma, K.; Nakamura, F.; Nakao, Y. “Anti-trypanosomal Terpenoids from Wild Turmeric, <i>Curcuma aromatica</i>” 13<sup>th</sup> International Symposium on Bioorganic Chemistry (IsBOC-13), シンガポール, 2023 年 12 月 18 日.</li> <li>Akizuki, K.; Suganuma, K.; Ito, S.; Takahashi, R.; Nakamura, F.; Kawazu, S.; Nakao, Y. “Structure and Biological Activity of a Novel Alkaloid from the Marine Sponge <i>Theonella</i> sp.” 13<sup>th</sup> International Symposium on Bioorganic Chemistry (IsBOC-13), シンガポール, 2023 年 12 月 18 日.</li> <li>Oyadomari, Y.; Goto Y.; Suganuma, K.; Kawazu, S.; Becking, L. E.; Fusetani, N.; Nakao, Y. “A New Tetramic Acid Glycoside with Anti-Leishmanial Activity Isolated from a Japanese Marine Sponge <i>Siliquariaspongia japonica</i>” 13<sup>th</sup> International Symposium on Bioorganic Chemistry (ISBOC-13), シンガポール, 2023 年 12 月 18 日.</li> </ol> <p>(特許)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>発明の名称:A novel alkaloid compound with anti-trypanosomal activity from Oshima-shinsonne sponge、出願日:令和 5 年 8 月 24 日、発明者:中尾洋一、中村文彬、秋月孝太、菅沼啓輔、出願番号:PCT/ US 63/578,496、出願人:学校法人早稲田大学、国立大学法人帯広畜産大学</li> </ol>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月15日

採択番号	2023-共同-8		
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	トキソプラズマの保有する2つのアクアポリン分子が関与する病原性発現機構		
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人獣共通感染症学研究室・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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	トキソプラズマはこれまで、「水チャネル」であるアクアポリン分子を2種類持つことが知られている。本研究は、申請者が最近発見した事象である、「2つのアクアポリン分子の欠損によるトキソプラズマ病原性の著しい減弱」を掘り下げ、そのメカニズム解明を目的とする。		
研究経過の概要	<p>実験 1</p> <p>トキソプラズマ Pru Δ Ku80 株を親株とし、相同組換え法によって作出された TgAQP1 と TgAQP2 のそれぞれのノックアウト原虫株について、C57BL/6 マウスに腹腔内投与し、その病原性を評価した。</p> <p>実験 2</p> <p>トキソプラズマ Pru Δ Ku80 株を親株とし、相同組換え法によって TgAQP1 と TgAQP2 の両方をノックアウトしたダブル KO 原虫株: Δ TgAQP1 Δ TgAQP2 株について、そのマウスに対する病原性を同様に感染実験によって評価した。</p> <p>実験 3</p> <p>それぞれの株の生体内における増殖、シスト形成効率を評価するため、各株感染マウスの脳を破碎し、形成シスト数を計数した。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>結果</p> <p>TgAQP1 と TgAQP2 のそれぞれのノックアウト原虫株 (<math>\Delta</math>TgAQP1 株、<math>\Delta</math>TgAQP2 株)の作出に成功した。</p> <p>これらをマウスに腹腔内接種した結果、いずれの KO 株も病原性はやや減弱した。そこで、両方の AQP をノックアウトしたダブルノックアウト原虫 <math>\Delta</math>TgAQP1 <math>\Delta</math>TgAQP2 株を作出し、その病原性を検討した結果、マウスへの病原性が顕著に減弱することを明らかにした (図 1)。</p> <p>各株感染マウスの脳を破砕し、形成シスト数を計数した結果、<math>\Delta</math>TgAQP1 <math>\Delta</math>TgAQP2 は親株および単独欠損株に比べ、シスト数が少ない傾向がみられた。</p>  <p>図 1 各株のマウスに対する病原性</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

2024年5月20日

採択番号	2023-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	組換えアクアポリンを用いた抗マダニワクチンの構築		
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	2023年4月1日 ～ 2024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 AQP ペプチドをモルモットに免疫することによって、マダニ AQP を標的とした抗マダニワクチンとしての可能性を検討す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><b>1. 研究目的</b> 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。吸血節足動物の吸血行動においてアクアポリン(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。一方で、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、AQP ペプチドを用いた抗マダニワクチンとしての可能性について検討することを目的とした。</p> <p><b>2. 材料と方法</b> <b>①フタトゲチマダニにおける AQP の特性解明</b> フタトゲチマダニにおける AQP の特性を解明するために、AQP 遺伝子の同定および</p>		

	<p>AQP の分子特性を解析した。また、AQP の分子特性および AQP 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。さらに、RNA 干渉法による AQP 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 AQP の役割について検討した。</p> <p><b>②AQP ペプチドによる免疫実験</b></p> <p>我々は AQP のアミノ酸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、AQP 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。そのため、MODELAGON による抗体に対する AQP のエピトープ予測を行った。次に、AlphaFold2 によるエピトープとなりうる AQP ペプチドの予測構造の解析を行った。これらの解析結果に基づいて、ワクチン抗原として相応しい 2 種類の AQP ペプチドを合成した。合成された AQP ペプチドはモルモットに 3 回免疫を行い、抗血清を回収した。得られた抗血清については、AQP ペプチドおよびフタゲチマダニの抽出抗原に対する抗体価を測定した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p><b>3. 結果</b></p> <p><b>①フタゲチマダニにおける AQP 遺伝子の同定および AQP の分子特性</b></p> <p>フタゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから完全長 AQP cDNA を得、塩基配列解析を行ったところ、3,341 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 N-型糖鎖結合部位が存在することが推定された。</p> <p><b>②フタ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</b></p> <p>フタゲチマダニの臓器における AQP 遺伝子の発現動態を調べたところ、AQP 遺伝子発現レベルは、中腸では未吸血期と緩慢吸血期で高く、急速吸血期から徐々に低下した。唾液腺では吸血開始から徐々に上昇し、急速吸血期をピークに徐々に低下した。マルピーギ管では急速吸血期まで発現は低く、飽血時に急激に上昇した。</p> <p>RNA 干渉法による AQP 遺伝子発現の抑制を行ったところ、飽血時体重、産卵準備期間、卵重量/飽血時体重、卵期には有意な差は認められなかった。しかし、AQP 遺伝子抑制群のマダニを解剖したところ、コントロール群に比べて、体の黄色化、中腸の直径減少、マルピーギ管の直径の減少、外皮の軟化、中腸と直腸囊の脆弱化、成熟卵母細胞数の減少、異常な形態の卵母細胞の出現、ジェネ氏器官の形態異常が観察された。</p> <p><b>③AQP ペプチドに対する抗体価の変化</b></p> <p>2 種類の AQP ペプチドに対する抗体価の変化を調べるために、ELISA を行ったところ、AQP(AQP#122-132)および(AQP#202-214)に対する各々の抗体価は、免疫後上昇した。しかし、各々の AQP から得られた抗体はマダニ抽出抗原に対する反応性は弱かった。</p> <p><b>4. 考察</b></p> <p>AQP 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、AQP 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。一方、免疫した AQP ペプチドに対する抗体価の上昇は確認できたが、マダニ抽出物に対する抗体の反応性は弱かった。この原因として、全タンパク量中の AQP の含量および AQP ペプチドの構造が、実際の AQP 構造を模倣していないことによる影響も推測された。今後は抗 AQP 抗体を用いて、唾液腺、中腸、マルピーギ管、卵巣における AQP の局在を調べることで、AQP の詳細な特性解明が期待される。</p>

研究成果の 発 表	<b>学会発表</b> 佐藤萌子, 佐藤成子, 水野寛太, <u>田仲哲也</u> , 玄 学南, 鈴木宏志, 白藤(梅宮)梨可, フ タトゲチマダニにおけるアクアポリンの機能解析, 第 32 回日本ダニ学会大会, 北海道立 道民活動センターかでの 2・7, 2023 年 9 月(北海道)
--------------	--

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月28日

採択番号	2023-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	白藤 梨可
研究課題名	高増殖型マダニ細胞の作出		
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	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	
	にわ しほ 丹羽 志萌	北海道大学獣医学部・学部学生	
	かただ ゆき 片田 雪	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	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニはウイルス、細菌、原虫など様々な病原体を媒介するため、多くの感染症研究分野で研究対象となっている。マダニに由来する細胞はマダニ媒介性病原体の分離やその性状解析にとって有用な実験ツールである。しかしながら、本邦を含めたアジア地域に優占するチマダニ属マダニの細胞が開発されていないことが、研究遂行の大きなボトルネックとなっている。本研究では、フタゲチマダニなどの国内の重要チマダニ属マダニ種の細胞作出を目的とした。マダニ初代培養細胞の作出時に、化合物や人工基質を培地に添加することで、マダニ細胞の高増殖化を試みた。</p>		
研究経過の概要	<p><b>【マダニ細胞材料】</b>                  実験室マダニ維持株(フタゲチマダニ、キチマダニ、ヤマアラシチマダニ)および野外採集株(フタゲチマダニ、タカサゴチマダニ)を実験に用いた。雌成ダニをウサギに吸血させ、飽血マダニを得た。25度のインキュベーター内で飼育し、産卵させた。発育卵を経時的に観察し、産卵後約21日後に卵塊を回収し、細胞作出材料とした。</p> <p><b>【マダニ初代培養細胞の調整】</b>                  マダニ卵塊の表面を滅菌したのちに、ハンドホモジェナイザーを用いて乳剤を作製した。ハンクス平衡塩類溶液を用いて複数回の洗浄し、卵殻構成物等を除去した。L-15培地をベースとした培養液中に、抗真菌剤、抗生物質、ビタミン類を添加し、マダニ乳剤を懸濁した。初代培養細胞は、28度または32度で静置し、増殖をモニタリングした。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p><b>【マダニ細胞増殖モニタリング】</b>  マダニのアクチンタンパク質をコードする遺伝子の保存領域にプライマーを設計し、その遺伝子発現を RT-PCR 系により評価した。また、株化マダニ細胞では、増殖に従って培地の pH が低下することが報告されている。RT-PCR による活性評価に加えて、培地の pH を測定した。</p> <p><b>【高増殖化マダニ細胞の作出試験】</b>  マダニの高増殖化を目的に、①染色体の分裂阻害剤の添加、②人工基質の添加、という2つ方法を試みた。</p> <p>① 染色体の分裂阻害剤の添加実験  これまで開発され広く用いられている株化マダニ細胞では染色体の異数性が観察されている。本実験では、上述のマダニ初代培養細胞の作成時に、染色体分配を阻害することが知られている 2 種の化合物を複数の濃度で添加し、マダニ細胞の増殖をモニタリングした。その結果、化合物1添加群では非添加群と比べて遺伝子発現強度に有意な差はみられなかった。一方、化合物2添加群では、添加濃度が高いロットほど、遺伝子発現強度が高い傾向にあった。培地の pH 変化については、全ての群間で有意な差は得られなかった。</p> <p>② 人工基質の添加試験  マダニ細胞は、接着系と浮遊系の多様な細胞種が混じり合った形で増殖することが報告されている。また、細胞濃度が低い状態では、容易に細胞死につながるものが観察されている。そこでヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) のフィーダーフリー培養などにも有効性が示されているハイドロゲルの人工基質を培地に添加して、上述の手法でマダニ初代培養細胞を作出した(図1)。RT-PCR 系による遺伝子発現解析、培地の pH 測定の両方で、人工基質の添加群と非添加群の間に有意な差はみられなかった。</p> <div data-bbox="826 1025 1372 1388" data-label="Image"> </div> <p>図1. ハイドロゲルを用いた人工基質の添加試験</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

2024年5月27日

採択番号	2023-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	マラリア原虫のスポロゾイト形成における Brca2 の機能		
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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>マラリア原虫は蚊が吸血した際に雌雄ガメートサイトが雌雄ガメートとなり接合する。そして減数分裂を行い、中腸の基底膜にオーシストを形成して、次世代のスポロゾイトを形成する。</p> <p>マラリア原虫において相同組換えは減数分裂時の組換え反応や DNA 二本鎖切断時の相同組換え修復に必須な機構なので、マラリア原虫においても重要な機構である。我々は、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に注目し、研究を行ってきた。この研究の過程でマラリア原虫では Brca2 は雌ガメートサイトへの分化に貢献していることが推測された。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、および、ネズミマラリア原虫における DNA 損傷に対する Brca2 の機能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から分与いただいた EGFP を発現するマラリア原虫に Brca2 のアミノ酸配列の一部を強制発現するマラリア原虫の作製を試みている。</p> <p>1月に貴研究センターを訪問した際に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>研究成果の 概 要</p>	<p><b>Brca2 のドメインの機能解析</b></p> <p>前回の共同研究における成果として <b>Brca2</b> 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alaria原虫 <b>Brca2</b> のどの領域がスポロゾイト形成に必要であるか解析するために <b>Brca2</b> のドメインの一部をクローニングし、野生型ネズミマalaria原虫に導入する計画を考えた。現在までにマalaria原虫 <b>Brca2</b> のドメインとして、相同組換え酵素 <b>Rad51</b> と相互作用する領域である <b>BRC repeats</b> と呼ばれるドメインと DNA と相互作用する可能性がある <b>OB-Tower</b> 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 <b>DsRed-Monomer</b> 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alaria原虫にトランスフェクトすることを試みているが、成功までには至っていない。</p> <p><i>in vitro</i>での DNA 結合解析</p> <p>ネズミマalaria原虫 <b>Brca2</b> の <b>OB-Tower</b> ドメインは、<b>AlphaFold2</b> による立体構造解析により、ヒト <b>BRCA2</b> の <b>OB-Tower</b> 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構築し、現在組換えタンパク質の発現および精製を試みている。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>本研究課題に関わる成果発表は未だ行っておりません。</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月30日

採択番号	2023-共同-12		
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	2023年4月1日 ~ 2024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 <math>\gamma\delta T</math> 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 <math>\gamma\delta T</math> 細胞の重要性を検証する。また、子宮 <math>\gamma\delta T</math> 細胞の誘導・維持機構についても検証する。</p>		
研究経過の概要	<p>昨年度、妊娠中に <i>Toxoplasma gondii</i> を感染させると、<math>\gamma\delta T</math> 細胞欠損マウスでは分娩異常による死亡が起きること、<i>T. gondii</i> の胎児への垂直感染が増加することを見出していた。本年度は <math>\gamma\delta T</math> 細胞が妊娠中の <i>T. gondii</i> 感染から母子を保護するメカニズムの解析を進めた。</p> <p>また、子宮 <math>\gamma\delta T</math> 細胞が母体の共生細菌依存的に維持されていることを見出したことから、<math>\gamma\delta T</math> 細胞誘導細菌の探索を進めた。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>SPF 環境下で飼育したマウスと無菌環境下で飼育したマウスの比較から、子宮 <math>\gamma\delta</math>T 細胞が母体の共生細菌依存的に維持されていることを見出したことから、スペクトラムの異なる種々の抗生物質を投与する実験、および、無菌マウスに候補細菌を移植するノバイオート実験を実施し、責任細菌の特定を進めた。また子宮 <math>\gamma\delta</math>T 細胞の維持に関わることが期待された複数のパスウェイについて遺伝子改変マウスを用いて検証を行った。</p> <p>子宮 <math>\gamma\delta</math>T 細胞が <i>T. gondii</i> 感染から母子を保護するメカニズムを明らかにするために、母子境界面に位置する胎盤における <i>T. gondii</i> の量を調べたところ、野生型マウスと <math>\gamma\delta</math>T 細胞欠損マウスで有意な差は認められなかった。したがって、<math>\gamma\delta</math>T 細胞は <i>T. gondii</i> の排除ではなく、<i>T. gondii</i> 感染に伴う組織傷害の抑制や、組織修復の促進に関わっている可能性がある。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>The 51<sup>st</sup> Naito Conference にて発表予定 (採択済み)</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月21日

採択番号	2023-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	2023年4月1日 ~ 2024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 M1 アミノペプチダーゼ阻害剤 PBT を見出した。PBT は、MCF 同様にペプチド由来の天然化合物である。</p> <p>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>PBT は、トキソプラズマに対して有効な抗原虫活性を示さなかった。さらに、PBT は重症化マラリア感染モデルに対して有効な抗原虫作用を示した。従って、PBT は、マラリア原虫のアミノペプチダーゼにより特異的に作用することが考えられ、今後の抗マラリア薬のリード化合物候補として期待が持てる(Ariefta NR et al. AAC. 2023)。</p> <p>世の中でマラリア既存薬に対する耐性株が出現している現状を踏まえると、MCF だけでなく PBT も次世代の新規マラリア薬の発展に繋がるのが期待できる。</p> <p>抗原虫剤 MCF の抗原虫作用において、これまでに我々の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、トキソプラズマ原虫の小胞体、ゴルジ体周辺オルガネラを可視化し、MCF の作用点を突き止めるために各々の局在マーカー抗体を調製し、間接蛍光抗体法で共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。</p> <p>MCF の原虫に対する作用点を考える上で、重要な Sar1GTPase に対するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の小胞体局在化シグナル KDEL を認識するレセプターと考えられる Erd2 ホモログ2種類に対する抗体、小胞体シャペロン BiP, PDI, その他、HSP70, 90 の抗体を調製し観察に用いた。その結果、Sar1GEF が一方の Erd2 と共局在することが明らかとなった。その局在性は、核周りに存在するトキソプラズマの小胞体のパターンと言うよりドット状のパターンを示した。おそらく、ゴルジ体に近い部位もしくはゴルジ体に局在する可能性が示された。現在、ゴルジ体マーカーに対する抗体を調製し、さらに解析を進める予定である。</p>

<p>研究成果の 発 表</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>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.</li> <li>5. Arieftha 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.</li> <li>6. Arieftha NR, Pagmadulam B, Hatano M, Ikeda N, Issiki K, Matoba K, Igarashi M, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Antiplasmodial Activity Evaluations of a Bestatin-related Aminopeptidase Inhibitor, Phebestin. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy.</i> 67 (7):1-14. 2023.</li> </ol>
----------------------	--

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月30日

採択番号	2023-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	福本 晋也
研究課題名	北海道における海獣由来トキソプラズマの単離培養法の確立と全ゲノム解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ひこさか けんじ 彦坂 健児	千葉大学大学院医学研究院感染生体防御学・准教授	
研究分担者	こばやし まり 小林 万里	東京農業大学生物産業学部・教授	
	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	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>本研究の目的は、海棲哺乳類に寄生するトキソプラズマを分離培養することで、その全ゲノムによる系統解析及びマウス感染による病原性の評価を可能とし、海棲哺乳類が有する本原虫の感染動態を明らかにすることである。海洋におけるトキソプラズマ感染の報告は、鰭脚類や鯨類などの海棲哺乳類、魚類、軟体動物、甲殻類などに散見される。しかし、そのほとんどが抗体検査による疫学調査の報告であり、遺伝子型などの分子系統学的情報は極めて少ない。また、ラッコを対象とした大規模なトキソプラズマ感染の調査では、陸上のネコ科動物では同定されずラッコでのみ同定される遺伝子型が検出されている。以上より、海洋環境において陸上とは異なった独自の原虫生態系を形成している可能性が考えられ、本研究で得られる原虫生態系情報は公衆衛生・野生動物保護対策の立案に貢献することが期待できる。</p>		
研究経過の概要	<p>今年度は 65 頭のゼニガタアザラシを用い、以下の 1～3 の項目について研究を実施した。</p> <p>1. PCR によるトキソプラズマ感染状況の調査</p> <p>研究開始当初は、ヒトのトキソプラズマ PCR 検査で用いられている B1 遺伝子を標的とした PCR を実施したが、条件検討の結果、当研究室で設計した <i>cox1</i> 遺伝子を標的とした PCR の方が検出感度は高く、シーケンスによる種同定にも使えることから、検出方法を <i>cox1</i>-PCR に変更した。PCR に用いる鋳型 DNA は、捕獲したゼニガタアザラシ 65 頭のうち、23 頭からは血液のみ、42 頭からは脳、心臓および血液を採取し、それぞれの試料から抽出したものを使用した。PCR およびシーケンスの結果、65 頭中 10 頭(15.4%)でトキソプラズマ特異的配列が同定された。また、PCR 陽性試料より抽出した DNA を用い、種分類に利用される ITS1 領域の塩基配列を決定したところ、こちらもトキソプラズマ特異的配列であることが確認された。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>2. マウスを用いたトキソプラズマ株の樹立  ゼニガタアザラシ 20 頭(うち 6 頭は心臓が PCR 陽性)の心臓のホモジネートを作成し、それぞれの試料を 8 週齢の ICR マウス 1 匹ずつ計 20 匹に経口投与した。その後、感染経過を 2 ヶ月間観察した。20 匹中 2 匹のマウスは途中で斃死したため、トキソプラズマの PCR 検査を実施したが、原虫 DNA は検出されなかった。残りのマウスについては、脳を分離しホモジネートを作成後、検鏡によりシストの有無を観察したが、シストは検出されなかった。2023 年度のマウス感染実験においてトキソプラズマの感染は確認されなかったが、次年度は、より新鮮な試料の使用、シスト保存温度の検討などを行い、マウス感染によるゼニガタアザラシ由来トキソプラズマ株を樹立したいと考えている。</p> <p>3. ELISA によるゼニガタアザラシ血清中の抗トキソプラズマ抗体検出系の確立  PCR 法による原虫 DNA の検出方法では検出に使用するサンプル量が微量であるため、PCR 陰性の場合でもトキソプラズマに感染しているかどうか判断がつかない場合がある、そのため、ELISA による抗トキソプラズマ抗体の検出を併用することとした。抗原は、地球規模感染症学分野の玄学南教授より供与を受けたトキソプラズマ表面抗原である SAG2 の遺伝子を発現するプラスミドを用い精製した。現在、トキソプラズマ感染/非感染マウスの血清を用いた ELISA 検出系の条件検討を行っており、次年度にはゼニガタアザラシの血液試料を用いた抗トキソプラズマ抗体保有調査が可能となる予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>彦坂健児, Chen F Xue, Bai Jingrun, 松崎素道, 坂本寛和, 小林万里, 福本晋也. 北海道のゼニガタアザラシにおけるトキソプラズマの感染調査. 第 93 回日本寄生虫学会大会(ポスター発表), 2024 年 3 月, 東京.</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月21日

採択番号	2023-共同-15		
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	河津 信一郎
研究課題名	ヒストン修飾酵素阻害剤によるマalaria原虫増殖阻害とその分子基盤の解明		
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	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	本研究では、マalaria原虫の増殖メカニズムを明らかにするために、原虫のヒストンへの化学修飾に着目し、研究を展開している。具体的には、ヒストンの化学修飾を行う酵素を阻害する化合物ライブラリーを独自に調整し、それらを用いてマalaria原虫のすべてのライフステージ(赤内期・肝内期・昆虫体内期)における増殖阻害評価を行う。そして、各発育ステージ間における感受性の差異を明確にし、マalaria原虫のライフサイクル間における、ヒストン化学修飾に関連した増殖制御メカニズムの全貌を明らかにすることを試みる。		
研究経過の概要	申請者の所属する研究室では、すでに独自に調整した、マalaria原虫ヒストン修飾阻害酵素阻害化合物全 200 種類のライブラリーを用いた実験を開始している。赤内型原虫では、ネズミマalaria原虫 ( <i>Plasmodium berghei</i> : Pb)、熱帯熱マalaria原虫 ( <i>P. falciparum</i> )、サルマalaria原虫 ( <i>P. cynomolgi</i> ) の増殖阻害効果を確認しており、前年度の共同研究報告書にて報告している。また、熱帯熱マalaria原虫を用いて、ガメトサイト(生殖母体)のみをターゲットとした殺原虫効果の解析も行っている。その結果、ガメトサイト特異的に効果を示す化合物の存在を明らかにしており、赤内型内でもステージ特異的なヒストン修飾酵素の役割の違いが示唆された。そこで、本研究ではガメトサイト期の次のステージである「昆虫体内型」における増殖阻害効果を検討した。昆虫体内型原虫の薬物評価実験系は、化合物を加えたスクロースを事前に給餌させたハマダラカに、Pb 感染血液を吸血させ、14 日後にハマダラカ中腸内のオーシスト数や形態観察を行うことで阻害効果を評価する。		

<p>研究成果の概要</p>	<p>また、感染させる Pb は Luciferase を発現する株を用いることで、Luciferase アッセイにより、オーシストの増殖阻害効果を Luciferase のシグナルとして数値化することが可能である(図1)。</p> <p>本研究の薬剤評価に使用した化合物は、ガトサイトへ殺滅効果が非常に高かった化合物 SE1・SE2・SE3 を選定した。ネガティブコントロールとしては、DMSO を摂取させた群と感染血を吸血させない 2 群を設定した。結果、大変驚いたことに、ガトサイトでは非常に強い殺原虫効果を示した 3 化合物であったが、Pb の昆虫体内型では全く効果を示さないことが明らかとなった(図2)。SE1・SE2 は、先の実験にて Pb の赤内型にも非常に強い増殖阻害効果を示していることが明らかとなっている。以上の結果を踏まえると、本結果は、原虫種によるヒストン修飾酵素の違いによるものではなく、マalaria原虫は増殖ステージ特異的にヒストンの修飾を制御していると示唆された。</p> <p>現在、赤内型で増殖阻害効果のあった化合物に関しても、昆虫体内型での検討を行っている。また、肝内型への効果も順次解析を開始しており、本研究の遂行により各発育ステージ間における感受性の差異を明確にし、マalaria原虫のライフサイクルにおける、ヒストン修飾に関連した増殖制御メカニズムの全貌を明らかにすることを試みる。</p> <div data-bbox="367 851 1412 1198"> </div>
<p>研究成果の発表</p>	<p>論文発表</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Araki T</b>, Koyama A, Yoshimura H, Arai A, Kawai S, Sekizawa S, Umeki Y, Saito-Nakano Y, Imai T, Okamoto M, Sato M, Thabthimthong W, Kemthong T, Hisaeda H, Malaivijitnond S, Annoura T*. Ultrasensitive malaria detection system for Anopheles mosquito field surveillance using droplet digital PCR. <i>Parasitol Int.</i> 2024 Mar 26;101:102891. doi: 10.1016/j.parint.2024. 102891.</li> <li>2. Tateishi YS, <b>Araki T</b>, Kawai S, Koide S, Umeki Y, Imai T, Saito-Nakano Y, Kikuchi M, Iwama A, Hisaeda H, Coban C, Annoura T*. Histone H3.3 variant plays a critical role on zygote-to-oocyst development in malaria parasites. <i>Parasitol Int.</i> 2024 Jun;100:102856. doi: 10.1016/j.parint.2024.102856.</li> </ol>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年6月7日

採択番号	2023-共同-16		
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	ウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定に向けた 次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の構築		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いしざき たかひろ 石崎 隆弘	ウメオ大学分子感染医学研究所・特任研究員 (現:酪農学園大学獣医学類医動物学ユニット)	
研究分担者			
	あさだ まさひと 麻田 正仁	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p><i>Babesia bovis</i> はウシ赤血球内に寄生する原虫であり、感染宿主に発熱、貧血、血色素尿といった症状を引き起こすことから獣医学領域においてその制圧が課題となっている。バベシア原虫は全長 8.2Mbp からなる 4 つの染色体に約 3700 個のタンパク質をコードしているが、有用な薬剤やワクチン標的候補抗原の網羅的な探索は未だなされていない。この問題を解決するために感染宿主へ病原性を示す赤内期における原虫の遺伝子必須性を明らかにするハイスループット(HiT)スクリーニングシステムが必要であると考えた。申請者はバベシア原虫と同様に赤血球へ寄生するネズミマラリア原虫において HiT-CRISPR スクリーニング系の開発に成功している。本共同研究では、この手法をバベシア原虫へと応用することで次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の開発を目的とする。</p>		
研究経過の概要	<p>HiT-CRISPR スクリーニングに用いるプラスミドのサイズを小さくして遺伝子効率の向上及び、プラスミドクローニングの簡便化を目的として Cas9 発現バベシア原虫の作製を試みた。</p> <p>また、遺伝子組換えに必要な最小相同配列鎖の長さ、及び最少必要プラスミド量についても検討した。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>Cas9 発現原虫作製に必要なプラズミドの構築及び Cas9 発現カセットを挿入する原虫遺伝子領域に関して決定した。当該プラズミドは作製済みであり、2024 年度に遺伝子組換え原虫の作出を原虫病研究センターと酪農学園大学それぞれで実施する予定である。</p> <p>遺伝子組換えに必要な最小相同配列鎖の長さ及び最少必要プラズミド量の検討実験に使用するプラズミドも作製済みである。5 <math>\mu</math>g のプラズミド量を用いて実施した組換え実験では、遺伝子組換え原虫を得ることができなかった。この結果は申請者がネズミマラリア原虫を用いて得た結果とは異なっており、その原因として使用する機器の違いが推測された。そこでネズミマラリア原虫の遺伝子組換えに使用した Nucleo factor 4D を用いたバベシア原虫の遺伝子導入プロトコルの最適化を 2024 年度に実施する。当該機器は既に購入済みであり、現在はバベシア原虫の移管手続きを行っている段階である。移管後に条件の最適化実験を速やかに実施した後に、2023 年度に作製したプラズミドを用いて最小相同配列鎖と最少必要プラズミド量の最適化実験を進める。</p> <p>また、ネズミマラリア原虫の HiT-CRISPR スクリーニングに関する研究成果は bioRxiv へ投稿し、現在査読を受けている。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>&lt;プレプリント&gt;</p> <p>1. T.K. Jonsdottir, M.S. Paoletta, <u>T. Ishizaki</u>, S. Hernandez, M. Ivanova, A.H. Curbelo, P.A. Saiki, M. Selinger, D. Das, J. Henriksson, E.S.C. Bushell. A scalable CRISPR-Cas9 gene editing system facilitates CRISPR screens in the malaria parasite <i>Plasmodium berghei</i>. bioRxiv, 2024.</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年4月5日

採択番号	2023-共同-17		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	漢方薬構成生薬－特に黄芩・黄耆のフラボノイド類－の 原虫病への応用を志向した構造活性相関研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	むらた としひろ 村田 敏拓	東北医科薬科大学薬学部・准教授	
研究分担者	なりた こういち 成田 紘一	東北医科薬科大学薬学部・講師	
	こんの たいすけ 金野 太亮	東北医科薬科大学薬学部・助教	
	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	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>これまでに展開した国際共同研究で、外国資源から多様な天然由来抗トリパノソーマ活性化化合物を多数見出した実績と知見を基盤とし、本課題では応用実現性を視野に、使用実績があり材料確保や安全性の観点から有利な漢方薬を構成する日本薬局方収載生薬に着目する。従来の研究の経緯から、局方生薬の黄芩（オウゴン）と黄耆（オウギ）のフラボノイド類を対象を絞り、合成により化学的多様性を創出して構造活性相関研究を展開する。また獣医学領域での漢方薬・生薬の応用可能性を検討する。</p>		
研究経過の概要	<ol style="list-style-type: none"> <li>「黄芩（オウゴン）」と「黄耆（オウギ）」のフラボノイドを対象とした成分探索を行った。これまでの継続的な課題として進めてきた「オウゴン」と同属のモンゴル国 <i>Scutellaria scordiifolia</i> から抗トリパノソーマ活性フラボノイドを見出したことから（2023年2月発表）、「オウゴン」中のバイカレインなど関連化合物について定性・定量し、当課題期間内に情報収集を行った。</li> <li>漢方薬を構成する実際に販売され流通する生薬40種類を所定の溶媒にて成分抽出し、それぞれ化合物の性質ごとに分面を行うことで4～5通りの試料を作製した。これら試料について、優先順位を付けた上で、抗トリパノソーマ活性試験、抗セリンプロテアーゼ試験を行った。</li> <li>化学合成によるフラボノイドの構造多様性創出の試みとして、1で述べた <i>Scutellaria</i> 属植物フラボノイドの全合成を試みた。現時点で全合成は達成されていないものの、関連化合物をいくつか得ることができ、抗トリパノソーマ活性試験を実施した。</li> <li>漢方薬・生薬の獣医学領域での使用実績の初期調査の準備を行った。</li> </ol>		

<p>研究成果の概要</p>	<p><b>経過 1 の成果</b></p> <p>生薬「オウゴン」由来の試料については、いくつかの画分にわたって複数種のトリパノソーマに対して生育阻害活性が認められた。一方で、マメ科植物イソフラボノイドで着目した「オウギ」や「シンギ」はエキスの段階で有力な活性は認められなかった。オウゴンの成分としては、オウゴニンやクリシンなど <i>Scutellaria</i> 属に共通するフラボン類が抗トリパノソーマ活性を示すことを見出しており、これらが画分中の活性本体成分であることが推察された。</p> <p><b>経過 2 の成果</b></p> <p>今回、評価に用いた生薬由来試料のうち、「オウゴン」以外にもいくつかの生薬の特定の画分に抗トリパノソーマ活性が認められた。これらの試料が、「オウゴン」由来エキスやその活性フラボンと同様の機序で活性を示すのかどうかは現時点ではわからないが、今後複数種の試料の組合せにより活性が増強するか、また個々の作用メカニズムはどのようなものかを追求する必要がある。</p> <p><b>経過 3 の成果</b></p> <p>現時点で目的物質の (<i>S</i>)-2-(2', 5'-dihydroxyphenyl)-5,7,8-trihydroxychroman-4-one の合成は達成できていないが、関連化合物としてフラバノン骨格を持つ目的物質に近い構造の化合物をいくつか合成することができた。構造活性相関の検討を行うために、これら関連化合物についても抗トリパノソーマ活性を評価している。</p> <p><b>経過 4 の成果</b></p> <p>調査用アンケートを作成し、これに係る倫理指針と個人情報の適正な取扱方法など必要手続き書類を東北医科薬科大学倫理審査委員会に提出して承認された。また東北医科薬科大学研究分担者と帯広畜産大学獣医学研究部門研究者とで、医薬品を動物に使用した時の薬物動態学的研究について連携を図ることとなった。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>Phytochemical investigation of <i>Scutellaria scordiifolia</i> and its trypanocidal activity. S. Nurbyek, B. Buyankhishig, K. Suganuma, Y. Ishikawa, M. Kutsuma, M. Abe, K. Sasaki, B.-O. Davaasuren, J. Batkhuyag, T. Murata. <b><i>Phytochemistry</i>, 209, 113615 (2023).</b></p> <p>内容:シソ科植物 <i>Scutellaria scordiifolia</i> から抗トリパノソーマ活性フラボノイドを新規イリド配糖体類とともに見出した。また生薬オウゴン <i>S. baicalensis</i> と本種について、特徴的フラボノイドの HPLC 分析による含有量の比較を行った。</p>

## NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.24  
Project no: 2023-joint-18

### 1. Principal investigator

Name: Dr Sanjay KUMAR

Position: Principal Scientist

Affiliation: ICAR-National Research Centre on Equines, Hisar 125 001. Haryana. India

### 2. Project title:

Genetic diversity of *Theileria equi* infecting equines in India and quantification of parasite loads

### 3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Dr. Naoaki YOKOYAMA

Position: Professor

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

01/04/2023 -31/03/2024: one year

### 5. Purposes and objectives

Theileriosis is an economically important, tick-transmitted protozoan disease of livestock. The disease can cause high mortality rates of 70% to 80% in susceptible animals. In India, equine theileriosis caused by *Theileria equi* is widespread, causing severe economic losses. Therefore, control of equine theileriosis is vital in this country. However, lack of understanding the role of carrier animals in the *T. equi* epidemiology is a stumbling block for designing the control strategies in India. Despite the low parasitaemia in latently infected equines, *T. equi* can be tick-transmitted from these carrier animals to naïve animals, where the infection may result in severe clinical theileriosis. Therefore, detecting the carrier animals and estimating the parasite loads are important for the risk assessment and effective management of equine theileriosis, using the available resources in India.

The strategies to control equine theileriosis will be more effective, if they consider the genotypic diversity of *T. equi*. In common with other hemoprotozoan parasites, *T. equi* is genetically diverse, and consists of five genotypes, including genotypes A-E. The merozoite surface antigens, which have been frequently used to develop several diagnostic assays, are highly diverse among the *T. equi* genotypes, sometimes leading to false negative diagnostic test results. For example, the EMA-1, based molecular and serological assays, is found in the genotype A, but not in the genotype C. Therefore, assessment of the genetic diversity of *T. equi* is important for selecting diagnostic assays in the endemic countries. Additionally, the genotype A of *T. equi* is reported to be more commonly associated with clinical theileriosis, as compared to the other genotypes. Similarly, recent studies found that repeated

treatment with anti-theilerial drugs may clear the genotype A from the infected horses, but not the genotype C. Therefore, a comprehensive understanding of *T. equi* genetic diversity is vital for designing effective disease control programs. In India, however, the genetic diversity of *T. equi* has not been fully investigated, rendering the control methods less effective.

Therefore, the proposed study has been designed to investigate the genetic diversity of *T. equi* infecting equines in India and to determine the parasite loads in equines with latent infection.

### **Objective**

To study genetic diversity of *Theileria equi* infecting equines in India and quantify the parasite loads in carrier animals using a qPCR assay.

## **6. Outline of research process**

### **Materials and Methods**

**Blood sampling:** Blood samples were collected from 84 equines bred in two Indian states, including Haryana (n=28) and Rajasthan (n=56), into EDTA-coated vacuum tubes. DNAs were extracted from the blood pellet using a commercial kit. From each animal, blood samples were also collected into plain tubes without any anti-coagulants, and sera were obtained. Both the DNA and serum samples were then stored at -20°C until further use.

**ELISA:** An EMA-2-antigen-based ELISA that we had developed in our laboratory at the NRCE was used to screen all 84 sera for detecting antibodies against *T. equi* (Kumar et al., 2013. Vet Parasitol. 198, 10-7.). Final ELISA OD<sub>492</sub> cutoff point was determined by calculating the relative percent positivity (RPP). Samples showing RPP >20 considered as positive.

**PCR detection of *T. equi* and its genotypes:** All of the 84 equine blood DNA samples were initially screened using a *T. equi*-specific PCR assay (Alhassan et al., 2007. Vet Parasitol. 143, 155-60.). The positive samples were further analyzed with PCR assays specific to genotype A – E (Ahedor et al., 2023. Parasit & Vectors. 16, 435.).

## **7. Outline of research achievements**

Of 84 samples tested, 42 (50.0%) were positive for *T. equi*-antibodies with RRP values ranged from 67 % to 189%. On the other hand, 27 samples (32.1%) were positive for *T. equi* infection in the screening PCR assay. These 27 *T. equi*-positive samples were further analyzed with the genotype-specific PCR assays. We found that the surveyed equines were infected with the genotypes A and D of *T. equi*. In brief, 7 and 5 equines had single infections with genotypes A and D, respectively, while the remaining 15 were co-infected with the genotypes A and D. The present study is the first to report the *T. equi* genotype D in India, highlighting the potential challenges associated with the management of equine theileriosis. With the results obtained from this collaborative research, we are currently in the process of cultivating the genotype D *in vitro* to explore its diagnostic, clinical, and therapeutic implications.

**8. Publication of research achievements**

In Progress

Attach reference materials as necessary.

# NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.27  
Project no: 2023-joint-19

## 1. Principal investigator

Name: Consuelo Almazán

Position: Adjunct Professor

Affiliation: Immunology and Vaccines Laboratory (LINVALS), College of Natural Sciences, Autonomous University of Queretaro. Queretaro, Mexico.

## 2. Project title:

Detection and surveillance of *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901) in Mexico

## 3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Rika Umemiya-Shirafuji

Position: Associate Professor

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

01/04/2023 -31/03/2024: one year

## 5. Purposes and objectives

Since the first report on 2017 in New Jersey, US, the Asian tick *Haemaphysalis longicornis* has been detected in at least 18 states from North America. This tick is exotic in Mexico. However, in 2019 it was detected on a horse that was entering the country. The horse was originally from Texas, US, and the tick was detected during the inspection point of Coahuila, in the border of US-Mexico. Due to this finding, special attention to inspection of imported live animals is being paid in all ports of entry to the country. Because of the rapid distribution and range extension of *H. longicornis* towards the US southern states, and the free crossing of wild animals that may be carrying the tick, the risk of entrance and establishment of longhorned tick in the country is very high. Furthermore, predicting models performed by Raghavan et al. (2019), have shown that areas from southeastern US to central and southern Mexico are environmentally suitable for development and future distribution of *H. longicornis*. Finally, because climate change affects the distribution of ticks, it is very likely that *H. longicornis* will continue migrating to the south. Early detection of ticks is critical to prevent their establishment and to implement control measures against these parasites and the diseases they transmit. For this early detection, surveillance studies are required. Therefore, **the objective of this project is to establish methods of rapid detection and surveillance of *H. longicornis* tick by morphological and molecular identification** following training and collaboration with researchers at the National Research Center for Protozoan Diseases (NRCPD) in Obihiro, Japan.

## 6. Outline of research process

### *Tick collection and Identification*

A preliminary collection of ticks attached to wild animals and domestic animals, in collaboration with wildlife and livestock associations as well as animal health authorities working at the inspection points in Northern Mexico has been performed. In addition, a collection of questing ticks from three geographical points in three states from Northern Mexico (Tamaulipas, Nuevo Leon, and Coahuila) by using the tick dragging method has been performed. Collected ticks were preserved in 30 % ethanol and transported to the Laboratory of Immunology and Vaccines (LINVAS), University of Queretaro (UAQ), for identification.

Morphological identification of ticks has been performed according to established guides (Barker & Walker, 2014). In addition, ticks images from different developmental stages obtained from a colony maintained at the Tick-BioBank from the NRCPD, in Obihiro University, Japan (Umemiya-Shirafuji *et al.* 2022) were used.

### *Genetic studies*

Because none of the identified ticks corresponded to *Haemaphysalis* spp., genetic studies have not been performed. However, tick collection and surveillance will continue, and if *Haemaphysalis* ticks are detected, molecular identification and sequencing of 10S rDNA, 12S rDNA, and CoxI genes.

## 7. Outline of research achievements

- A collection of ticks on domestic and wild animals and in the environment has been performed. Ticks have been morphologically identified and are kept at the LINVAS for future studies.

- On February 2024, I visited the National Research Center for Protozoan Diseases (NRCPD) in Obihiro, Japan, where I took a training on identification and manipulation of *H. longicornis* ticks at the Tick-BioBank under Dr Rika Umemiya-Shirafuji. A series of images of ticks were obtained and these images are used as reference for morphological identification of ticks collected in Mexico.

-The images are included in a document to be used for Veterinarians and other professionals involved in animal health and tick control to prevent incursions and infestations of *H. longicornis* in Mexico.

## 8. Publication of research achievements

A manuscript written in Spanish is under review. The main objective of this manuscript is to contribute with information on *H. longicornis* biology, life cycle, and provide useful identification for morphological identification of this tick that is not available in Mexico. The published document will be used for Veterinarians and other professionals involved on animal health and tick control in the country. The title of the manuscript is: **The Asian tick *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901): Actions to prevent its incursion and establishment in Mexico**, authors: Almazán C, Umemiya-Shirafuji R, Rosario-Cruz R, Cortés García B, Mosqueda J.

# NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.25  
Project no: 2023-joint-20

## 1. Principal investigator

Name: Elisha Chatanga

Position: Lecturer

Affiliation: Lilongwe University of Agriculture and Natural Resources, Malawi

## 2. Project title:

Molecular detection and genetic characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses and donkeys in Malawi.

## 3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Naoaki Yokoyama

Position: Professor

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

01/04/2023 -31/03/2024: one year

## 5. Purposes and objectives

The purpose of this study was to detect and genetically characterize *Babesia caballi* and *Theileria equi* infecting donkeys and horses in Malawi. Secondly, our study aimed at identifying the vector ticks of *B. caballi* and *T. equi* in Malawi.

The specific objectives were to 1) detect *B. caballi* and *T. equi* in blood samples collected from donkeys and horses, using microscopy and species-specific PCR assays, 2) identify the genotypes of *B. caballi* and *T. equi*, and 3) identify the tick vectors transmitting *B. caballi* and *T. equi* to donkeys and horses in Malawi.

## 6. Outline of research process

### Research in Malawi

**Blood sampling:** Blood samples were collected from a total of 185 equines, consisting of 178 donkeys and 7 horses, using EDTA-coated vacutainer tubes in Dedza and Lilongwe districts in central Malawi.

**Preparation of blood smears:** Thin blood smears were prepared from all of the 185 samples collected. The blood smears were fixed with methanol, and then stained with Giemsa.

**DNA extraction:** Approximately 125 µL of blood from each animal was transferred onto an FTA card, and allowed to dry at room temperature. The genomic DNA samples were then extracted from the FTA cards, and preserved at -20°C until use.

The prepared blood smears and DNA samples were then transferred to National Research Centre for Protozoan Diseases (NRCPD) at the Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan.

### **Research at the NRCPD**

**Microscopy:** Blood smears were observed under a light microscope for detecting *T. equi* and *B. caballi* parasites within the infected erythrocytes.

**PCR screening:** The DNA samples were subjected to previously described *T. equi*- and *B. caballi*-specific PCR assays.

**Genotyping of *T. equi*:** The DNA samples that had tested positive for *T. equi* in the screening PCR assay were analyzed with the type-specific PCR assays for detecting the genotypes of *T. equi*.

**Cloning, sequencing, and phylogenetic analyses:** Amplicons obtained from the *T. equi* genotype-specific PCR assays were randomly selected, cloned, and then sequenced. The resultant sequences were subjected to phylogenetic analysis to verify the PCR results.

## **7. Outline of research achievements**

The present study analyzed a total of 185 equines bred in Malawi for the infections of *T. equi* and *B. caballi* using microscopy and PCR. The microscopy results showed that 91 (49.2%) animals were positive for *T. equi*, but none for *B. caballi*. Our results from the PCR assays demonstrated that 156 (84.3%) animals were positive for *T. equi* infection. In contrast, all surveyed animals were PCR-negative for *B. caballi*. Subsequently, the *T. equi*-positive DNA samples were screened with the type-specific PCR assays for detecting the *T. equi*-genotypes A, B, C, D, and E. We found that the surveyed equines were infected with all five genotypes (A – E) of *T. equi*. Our findings indicate that the infection of *T. equi* is common among equines in Malawi, highlighting the need for strategies to control equine piroplasmiasis in this country. Our findings additionally imply that such control strategies should be developed in light of the genotypic diversity of *T. equi*.

A manuscript summarizing these findings and research achievements has been prepared and will soon be submitted for publication in a peer-reviewed scientific journal. With the necessary permission, I transferred some of the reagents acquired for this project to Malawi, where they will be used for my future research activities and capacity building. As the next step, we have planned to collect tick

samples from the equine farms investigated in this study, in order to identify the tick vectors capable of transmitting *T. equi* in Malawi.

#### **8. Publication of research achievements**

In progress

# NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.23  
Project no: 2023-joint-21

## 1. Principal investigator

Name: RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.

Position: Research Scientist – Laboratory of Molecular Biology of Ticks

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)

01/04/2023 -31/03/2024, one year

## 5. Purposes and objectives

The primary objective of the 2023 NRCPD OUAVM Joint Research Proposal was to advance our previous collaborative efforts from 2019 and 2022. In these earlier projects, we successfully developed a transgenic *Babesia bovis* parasite lineage expressing the DiCre recombinase, which enables rapamycin-controlled excision of loxP-flanked DNA sequences. This technology facilitates the functional analysis of essential parasite genes, previously demonstrated in model species such as *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. The 2023 proposal aimed to leverage the stable DiCre parasite lineages of *Babesia divergens/bovis* to perform conditional knockouts of aspartyl proteases BdASP3a (023140) and BdASP3b (006490) of the C clade of apicomplexan aspartyl proteases, which are analogous to plasmepsins X/IX for *Plasmodium falciparum* and thus represent the potential master regulators involved in invasion and egress during *Babesia*'s asexual blood stages. Project aimed at phenotypical characterization of the ASP3a/b deleterious phenotypes, with the aim to validate the critical roles of these enzymes in the erythrocytic lifecycle of *Babesia*. This work builds up on our preliminary findings with plasmepsin X/IX and TgASP3 specific inhibitor 49c, supporting Bd/BbASP3 as promising drug targets for *Babesia* control.

The individual objectives of this 2023 joint project were as follows:

- (i) verification of the Cre/lox recombination in novel DiCre Babesia lineages using episomal loxP sites holding plasmids
- (ii) use of the DiCre transgenic *Babesia divergens/bovis* lineages to create conditional knock-outs(iKO) of BdASP3a/b proteases
- (iii) validation of BdASP3a/b as essential and druggable proteases
- (iv) phenotypization - determination of their specific roles in invasion/egress of host erythrocytes during Babesia RBC cycle
- (v) biochemical characterization of recombinantly expressed BdASP3a/b

By achieving these objectives, we aimed to advance our understanding of Babesia parasites and the associated disease, ultimately contributing to the development of improved therapeutic strategies.

## 6. Outline of research process

In line with the proposed plan, we utilized the extended year of the project to obtain cloned populations of DiCre *Babesia bovis* and *Babesia divergens*. During our work on this project and the visit of Dr. Sojka to NRCPD-OUAVM between October 6-16, 2023, we improved the design and prepared novel version of the DiCre holding cassette for the integration into the *Babesia bovis* genome using homology-based recombination. 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 divergens*, a related *Babesia sensu stricto* species that is of relevance for us back in the Czech laboratory at IoP BC CAS. PCR confirmed the correct integration of plasmids into parasite genomes, and expression of DiCre recombinase subunits was confirmed via quantitative PCR. Additionally, control GFP/mCHERRY holding plasmid vectors were prepared for episomal control of LoxP site excision by the DiCre recombinase in both *Babesia* species and the Cre/lox excisions are currently being confirmed by transfection of these plasmids to *B. bovis* / *B. divergens* DiCre lineages. The final plasmid for BdASP3 iKO containing the floxed *bdasp3* gene sequence was designed and prepared. The ASP3 iKO plasmid transfection will be performed upon the successful Cre/lox episomal excision tests. Resulting iKO BdASP3a/b lineages will serve for the induction of *bdasp3a/bbasp3b* gene excision by rapamycin treatment and subsequent phenotypic observations will be performed.

The work was parallelly supported by the CAS/JSPS (2021-23) joint mobility project. This enabled one member of the Czech team. Ms. Pavla Šnebergerová (PhD student of Dr. Sojka) visited NRCPD in Obihiro for a short internship of two months during October-November 2023. Oppositely, the PhD student of Dr. Asada, Atefe Fathi completed a 7-week long internship supported by the JSPS as part of the project at IoP BC CAS, Ceske Budejovice, Czechia in November-December 2023. During both exchange visits/internships the students primarily focused on generating stable lines of *B. bovis* parasites that express the dimerizable Cre-recombinase (DiCre). Both visiting students further acquired practical skills related to the design and preparation of loxP holding plasmid cassettes and the

preparation of transgenic *Babesia* and subsequent analysis of the resulting ASP3 deleterious phenotype. Additionally, and the associated biochemical and immunostaining work as a part of the biochemical characterization of babesia ASP3 enzymes. Furthermore, we completed the characterization of the two *BdASP3* isoenzymes recombinantly expressed as C-terminal 6x(His) tagged proteins in insoluble form in *E. coli* DE3. This is in contrast with previous plans of expression of these isoenzymes in baculovirus infected insect cells as this method was successful, but we had been observing issues with insufficient recombinant protein yields and their overall instability. The *E. coli* expressed ASP3 proteins were further purified and refolded via step-down dialysis from 8 M urea denaturing buffers and served as active proteases in kinetic assays with fluorescent peptidyl substrates. Inactive mutants of both enzymes were also prepared for large-scale production to obtain protein 3D structures via protein crystallography. All the listed results obtained in 2023 will be part of a forthcoming publication in a high impact factor journal by the end of 2024, with P. Šnebergerová as the first, and Dr. Sojka as the last and corresponding author.

Additionally, our findings were presented at several international conferences in 2023. Dr. Sojka made two active contributions at the 15th International Symposium on Ticks and Tick-borne Diseases in Weimar, Germany, presenting on 'Proteasome inhibitors effectively combat ticks as well as transmitted pathogens' and 'Clade C aspartyl proteases in *Babesia divergens* and their validation as novel drug targets.' Furthermore, at the 12th General Meeting of the International Proteolysis Society in Singapore, our team presented a poster on 'Deciphering the roles of *Babesia* Plasmepsin X/IX homologues and their validation as druggable targets.' Dr. E.F.G. Cubillos also presented at the Fourth International Babesiosis Meeting at Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA.

## 7. Outline of research achievements

- we successfully obtained cloned populations of DiCRE *Babesia bovis* and *Babesia divergens*
- we PCR confirmed their integration to the parasite genome
- we confirmed the expression of DiCre recombinase
- we prepared loxP-flanked GFP/mCHERRY holding plasmid vectors for episomal control of LoxP site excision by the DiCre recombinase in both *Babesia* species
- we designed and prepared the final plasmid for *BdASP3* iKO using the DiCre approach
- we transfected the parental *B. divergens/B. bovis* DiCre lines with the recipient DNA plasmid containing the loxP-flanked *bdasp3* gene sequence
- we prepared *dASP3a/b* DiCRE lineages by serial dilutions
- we verified the Cre/lox excision and perform phenotyping
- In parallel, we successfully expressed *BdASP3a/b* isoenzymes as C-terminal 6x(His)-tagged proteins in *E. coli* and we are using them for 3D structure studies using protein crystallography

## **8. Publication of research achievements**

By the end of 2023, we published our first joint publication: Cubillos, E. F. G., Snebergerova, P., Borsodi, S., Reichensdorferova, D., Levytska, V., Asada, M., Sojka, D., & Jalovecka, M. (2023). Establishment of a stable transfection and gene targeting system in *Babesia divergens*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1278041. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1278041>).

Attach reference materials as necessary.

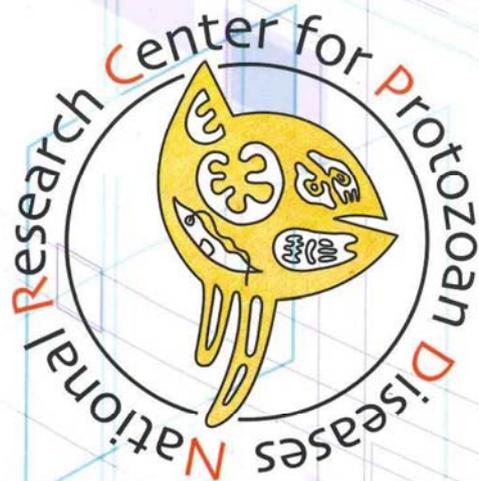
令和6年7月20日発行

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/>

