

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

2026 年 5 月 31 日

採択番号	2025 共同-1		
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	ハダニの卵黄形成における光周性の分子機構		
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	りすまやに Rismayani	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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	殺虫剤抵抗性が発達しやすい難防除害虫であるナミハダニ(以下、ハダニ)は、温帯および冷帯地域では秋から春にかけて休眠状態で越冬する。ハダニは産雄性単為生殖であり、その休眠は雌のみ成虫の段階で長夜により誘導される。休眠が誘導された雌成虫では、体色がアスタキサンチンの蓄積により黄緑色からオレンジ色に変化するとともに、生殖が停止する。近年のゲノム解析により、体色変化に関与するカロテノイド合成遺伝子や卵黄タンパク質前駆体ビテロジェニン(Vg)が同定されているが、体色変化と生殖停止(卵黄形成)を協調させる共通の上流因子は不明である。マダニでは卵形成の分子機構研究が進展していることから、本研究では、マダニの卵黄形成の専門家である白藤博士との共同研究により、休眠雌・非休眠雌の比較プロテオーム解析と RNAi を組み合わせ、光周期に応答して両形質を結びつける分子機構の解明を目指す。		
研究経過の概要	孵化直後から休眠誘導条件(長夜:16 時間/日)および非誘導条件(短夜:8 時間/日)下、18 °C でハダニ雌個体を飼育した。成虫後 0～7 日目まで経時的にサンプリングして、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析(LC・MS/MS)による比較プロテオーム解析を実施した。得られた発現変動タンパク質の中から、休眠雌で顕著に増加するカロテノイド合成酵素(TuPDS・TuLCPS)、および機能未知の単一 PLAT ドメインタンパク質(TuPLAT10)を候補因子として選抜した。続いて、これら候補遺伝子に対する二本鎖 RNA(dsRNA)の経口投与による RNAi で各遺伝子をノックダウンし、体色(オレンジ・黄・緑の判別)、β-カロテンおよびアスタキサンチン含量、産卵数・生存率への影響を評価した。本成果は bioRxiv でプレプリントとして公開済みであり、現在は国際専門誌で査読中である。		

研究成果の 概要	比較プロテオーム解析により、休眠雌では非休眠雌に比べてカロテノイド合成酵素 TuPDS および TuLCPS の発現量が増加することを確認した。RNAi によりこれらを抑制するとオレンジ色素形成、β-カロテンおよびアスタキサンチン含量がいずれも顕著に低下し、これらの酵素が休眠特異的な色素形成に必須であることを機能的に示した。さらに、休眠雌で最も強く増加するタンパク質の一つとして TuPLAT10 を同定した。TuPLAT10 の RNAi は、色素形成を抑制すると同時に、休眠誘導条件下でも産卵を再開させ、配列相同性がないにもかかわらず TuPDS および TuLCPS のタンパク質量を低下させた。これらの結果は、TuPLAT10 が色素形成と生殖停止の双方を上流で制御する協調因子であることを示す。この協調機構を脂質代謝の観点から解釈した。PLAT ドメインは脂質結合モジュールであり、配列解析から TuPLAT10 は酵素活性を持たず、膜に係留されてホスファチジン酸 (PA) と結合するキャリアと推定された。ハダニは独立した脂肪体や発達した血リンパを欠き、消化・脂質貯蔵・Vg 合成が中腸上皮に集約されており、オレンジ色の原因となるアスタキサンチン脂肪酸エステルも同じ中腸上皮細胞の脂質滴に蓄積する。このため PA は、ジアシルグリセロールを経て膜リン脂質・貯蔵脂質 (卵黄への脂質供給) へ向かう経路と、遊離脂肪酸として放出されアスタキサンチンのエステル化に用いられる経路との分岐点に位置する。実際、TuPLAT10 をノックダウンするとエステル型アスタキサンチン量が減少しており、エステル化への脂肪酸供給の低下が示唆された。以上より、光周期情報に応じた TuPLAT10 の発現が、PA 由来脂肪酸をアスタキサンチンのエステル化 (長夜・休眠) と卵黄脂質供給 (短夜・生殖) の間で振り分ける「脂質配分スイッチ」として働き、生殖停止と色素形成を協調させるとするモデル (PA 配分モデル) を発表した (Rismayani et al., 2026, <i>bioRxiv</i>)。
研究成果の 発表	【論文】 <u>Rismayani</u>, K. Sai, T. Ohsako, K. Murata, Y. Arai, N. Takeda, M. Yamamoto, <u>R. Umemiya-Shirafuji</u> and <u>T. Suzuki</u> (2026) A single PLAT domain protein couples reproductive arrest and carotenoid pigmentation during diapause in the two-spotted spider mite, <i>Tetranychus urticae</i> Koch. <i>bioRxiv</i> 2026.05.13. 724795. DOI: 10.64898/2026.05.13.724795 【学会発表】 <u>Rismayani</u>, K. Sai, T. Ohsako, K. Murata, Y. Arai, N. Takeda, M. Yamamoto and <u>T. Suzuki</u> (2025, October 27–29). Proteomic evidence for carotenoid and lipid metabolism associated with photoperiodic induction of diapause in the two-spotted spider mite, <i>Tetranychus urticae</i> Koch. 15th Spider Mite Genome Meeting, Logroño, Spain. (口頭) <u>Rismayani</u>, K. Sai, T. Ohsako, K. Murata, Y. Arai, N. Takeda, M. Yamamoto and <u>T. Suzuki</u> (2025) Carotenoid and lipid metabolism associated with diapause induction in the two-spotted spider mite, <i>Tetranychus urticae</i> Koch. 第 34 回日本ダニ学会東京大会, 東京, 2025 年 9 月 26-28 日 (口頭)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 31 日

採択番号	2025 共同-3		
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	抗トキソプラズマ剤標的の原虫リサイクリングエンドソームにおける創薬基盤の構築		
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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	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、トキソプラズマおよびマラリアモデルに対して有効な治癒効果を示すメタサイトフィリン(MCF)を初めとする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、MCF の作用機序解析から原虫のオルガネラ機能が混沌とするエンドソーム系の中でも Rab11 が局在マーカーとして知られる分泌との分岐経路のリサイクリングエンドソームを含む輸送経路が有効な標的の一つであることを突き止めている。さらに、広域の抗原虫活性を示すゴルジ体ストレス剤類縁体キジマイシン(KJM)もゴルジ体、エンドソーム系周辺の膜系が標的と考えられる。しかしながら、原虫の膜交通経路における小胞輸送の実態、オルガネラ機能の身元について未だ解明されない点が残っている。 本研究は、抗原虫剤の有効な標的と考えられるトキソプラズマのリサイクリングエンドソームの実体を解明することを目的とし、原虫創薬の基盤構築に繋げる。		
研究経過の概要	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、広域の抗原虫活性を示す MCF, KJM, 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すフェベスチン(PBT)を見出してきた(1-6)。マラリアの有効な既存薬アルテミシニンの標的(Kelch-12)が分泌とエンドソームの分岐経路が標的であることも最近の研究から分かっている。しかし、標的の明確な膜系の局在性について明らかにされていない。		

	おそらく我々が見出している有効と考えている薬剤標的と近い部位であり、本研究の解明により明らかになると予測している。
研究成果の概要	昨年度までに MCF の標的部位の一つが原虫の Sar1GEF ホモログに含まれる Cys リピートドメイン周辺であることを実験および計算機化学を用いて確認した。 今年度は、トキソプラズマのリサイクリングエンドソーム (RE) の実体を明らかにするために、種間で保存されている局在マーカーである Rab11 に対する抗体を調製した。トキソプラズマは、Rab11 を 2 種類 (a, b) 持つことから各々の抗体をウサギ、モルモットを用いて各々ポリクローナル抗体を調製した。しかしながら抗体価が上がらず、実験で用いることが可能な抗体が得られなかった。現在、再調製を進めている。一方、原虫の RE を捉える目的でエンドサイトーシス経路から蛍光標識した栄養体 (トランスフェリン) カーゴ、その対照に蛍光標識した毒素 (コレラ毒素サブユニット B) カーゴの取り込みによるパルスチェイス検出系の構築を進めた。しかし、原虫数と蛍光カーゴとのバランスが未だ捉えられていない現状であり、継続して解析を進めている。 一方、これまでの原虫研究で感染率が低いために <i>in vitro</i> 系培養による生育の検出が困難であったクリプトスポリジウムの化学発光タンパク質の発現系を利用し、生育を指標に、薬剤スクリーニング可能な系の構築に成功した。更に、ゴルジ体が標的の KJM が高い抗原虫活性を示すことも明らかになった (8)。
研究成果の発表	1. Leessombun A, Iijima M, Umeda K, Kondoh D, Pagmadulam B, Abdou AM, Suzuki Y, Ohba SI, Isshiki K, Kimura T, Kubota Y, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis. <i>J Infect Dis</i>. 221 (5).pp764-776. doi: 10.1093/infdis/jiz501. 2020. 2. Leesombun A, Iijima M, Pagmadulam B, Orkhon B, Doi H, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin has potent anti-malarial activity. <i>Parasitol Int</i>. 2021 81, 102267. doi:10.1016/parint.2020.102267. 2021. 3. <u>Nihei C</u>, Nakanishi M. Cargo selection in the early secretory pathway of African trypanosomes. <i>Parasitol Int</i>. 84, 102379. doi: 10.1016/j.parint.2021.102379. 2021. 4. Leesombun A, Kondoh D, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Polyether ionophore kijimicin inhibits growth of <i>Toxoplasma gondii</i> and controls acute toxoplasmosis in mice. <i>Parasitol Res</i>. doi: 10.1007/s00436-021-07363-w. 2021. 5. Ariefta NR, Pagmadulam B, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Sparsomycin Exhibits Potent Antiplasmodial Activity In Vitro and In Vivo. <i>Pharmaceutics</i>. 14(3):544. doi: 10.3390/pharmaceutics14030544. 2022. 6. Ariefta 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.

	7. Chen Y, Shimoda N, <u>Nihei C</u>, Sawa R, Takahashi Y, Nishigori M, Nakamura M, Koshiba T, Ushio N, Nishikawa Y. Mitochondrial damage and IL-18 production of monocytes by <i>Neospora caninum</i> infection is mediated by dense granule protein 7 and prohibitins. <i>Frontiers in Immunology</i>. Nov 20:16:1408992. doi: 10.3389/fimmu.2025.1408992. 2025. 8. Kubota R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Development of a Luciferase-Based In Vitro Assay to Evaluate the Efficacy of Anti-Cryptosporidial Drugs Against <i>Cryptosporidium parvum</i>. <i>Pharmaceuticals</i> (Basel). 2026 Apr 3;19(4):576. doi: 10.3390/ph19040576. PMID: 42075832. 2026.
--	--

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 25 日

採択番号	2025 共同-6		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	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	
	さかもと ともひろ 坂本 知優	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士 1 年 活性化化合物の細胞内局在確認	
	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・准教授	
研究期間	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トリパノソーマ原虫によって引き起こされるアフリカトリパノソーマ症は、主にアフリカ中南部において深刻な社会問題となっており、新規治療薬の開発が急務である。そこで本研究では、抗トリパノソーマ活性化化合物の分子プローブ化による作用メカニズムの解明を行うことを目的とする。 具体的には、抗トリパノソーマ活性を有することが知られている化合物の分子プローブ化および活性の保持の確認を行ったのち、得られたプローブを蛍光標識化して細胞内における化合物の局在を確認する。また、プローブをビーズと結合させることで原虫抽出物からタンパク質のプルダウンを行い、解析することで標的タンパク質の推定を行う。 研究代表者は研究分担者と協力して化合物の精製・分子プローブ化・作用メカニズム解明を担当し、貴センター菅沼啓輔准教授が活性試験を担当する。代表者の研究については一部を本共同研究経費により実施する。		
研究経過の 概要	本研究室では、薬用植物として知られる春ウコン (<i>Curcuma aromatica</i>) の多様な機能性に着目し、抗トリパノソーマ活性を指標とした活性成分の探索を行ってきた。その結果、既知化合物 coronarin D に強い抗トリパノソーマ活性が認められている。この化合物の作用メカニズム解明のために標的タンパク質の探索に用いるアルキンプローブの合成を行った。 その後、得られたプローブを原虫細胞 (<i>T.brucei.brucei</i>) に投与しそこに蛍光色素を加え、色素のアジド基との間で細胞内 click 反応を実施したのちに、蛍光顕微鏡下で原虫細胞内におけるプローブの局在観察を行った。 また、磁気ビーズを結合させたプローブを用いて、<i>T.bb</i> 由来抽出タンパク質に対するプルダウン実験を行った。現在、標的タンパク質の同定を目指し研究を進めている。		

研究成果の 概要	まず合成した抗トリパノソーマ活性化合物 coronarin D のアルキンプローブについて、5 種のトリパノソーマ原虫に対する発育阻害活性試験を行ったところ、いずれも化合物と同程度の抗原虫活性を保持していることを確認した。 次に、プローブと色素のアジド基との間で <i>T.bb</i> 細胞内 click 反応を行い、蛍光顕微鏡下で活性化合物の局在観察を行ったところ、核とキネトプラストの間の領域に蛍光シグナルが集積する傾向が観察された。 また、アジド基をもつ磁気ビーズとプローブを反応させ、リガンド結合磁気ビーズを得た。そこに <i>T.bb</i> 抽出タンパク質を加え、タンパク質のプルダウン実験を行い、塩溶出画分および加熱溶出画分を得た。これらの画分について SDS-PAGE および銀染色を行ったところ、加熱溶出画分に、特異的なバンドが確認された。 現在、得られたバンドを切り出してトリプシン消化を行ったのち、LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析を進めており、標的タンパク質の同定および作用メカニズムの解明を目指して研究を進めている。
研究成果の 発表	1. 坂本知優, 菅沼啓輔, 大枝一喜, 中村文彬, 中尾洋一, 『抗トリパノソーマ活性化合物 coronarin D の分子プローブを用いた細胞内局在の観察』, 第 95 回日本寄生虫学会大会, 神奈川, 2026 年 3 月

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 31 日

採択番号	2025 共同-7		
研究部門	国際連携協力部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	麻田 正仁
研究課題名	バベシアにおけるオートファジー関連因子 ATG8 の局在オルガネラの解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	さかもと ひろかず 坂本 寛和	千葉大学大学院医学研究院 助教	
研究分担者	やん じゃふえい Yang Jiahui	千葉大学大学院医学研究院 修士1年	
	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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マラリア原虫などのアピコンプレクサ門原虫は、細胞内に葉緑体由来オルガネラであるアピコプラストをもつ。アピコプラストの表面膜には、オートファジー関連因子 ATG8 が恒常的に局在しており、その局在は厳密に制御されている。ATG8 の局在は、ATG12-5-16 複合体によって制御されるモデルが確立されているが、我々はピロプラズマ(バベシア・タイレリア)ではその複合体因子が欠損していることを発見した(Lin et al, Cells, 2025)。ピロプラズマでは ATG8 局在の既存モデルが適用できないため、もし彼らの ATG8 が機能的であれば、その局在制御の新規機構の解明が期待される。 そこで本研究では、<i>Babesia bovis</i>(Bb)を研究対象として、以下の項目の解明に取り組んでいる。 課題 1. BbATG8 は細胞内でユビキチン様共有結合反応をするか？ 課題 2. BbATG8 は特定のオルガネラに局在するか？ 課題 3. BbATG8 の局在はどのように制御されるのか？		
研究経過の概要	バベシアを含むピロプラズマでは、ATG8 の局在を制御する ATG12-ATG5-ATG16 が喪失している。そこで本研究では、<i>Babesia bovis</i> (Bb)を研究対象として、BbATG8 のユビキチン様(UBL) 共有結合反応がバベシア細胞内で機能しているかを、BbATG8 変異体を用いて検証した(課題1)。その結果、BbATG8 が細胞内で UBL 反応に依存的な局在パターンを示すことが分かった。 次に、BbATG8 が局在するオルガネラの検証を実施した(課題2)。アピコプラス移行シグナル配列を mCherry に融合させてバベシアで発現させた「アピコプラスト標識バベシア細胞」の作出を試みたが、mCherry のシグナルは検出されず、当該細胞の作出には至っていない。ドット状に観察される BbATG8 がどのオルガネラに局在するかの確定が目下の解決課題である。		

研究成果の 概要	これまでに、バベシアを含むピロプラズマにおけるATG8の細胞内局在を解析した報告はない。ATG8は、E1-like 酵素(ATG7)およびE2-like 酵素(ATG3)を介したユビキチン様(UBL)共通結合反応によって、そのC末端グリシンが脂質膜上のリン脂質(ホスファチジルエタノールアミン)と共有結合を形成することで細胞膜に局在する。 我々はすでに <i>Babesia bovis</i> (Bb)を対象として、BbATG8とBbATG3の二次構造およびAlphaFold 予測による三次元立体構造を解析して、それぞれの機能ドメインが保存されていること、さらにBbATG8がBbATG3と結合することを実証した(Lin et al, Cells, 2025)。これは、ATG8の局在を制御するATG12-ATG5-ATG16が喪失しているバベシアにおいてもBbATG8が機能的であることを強く示唆している。 本研究では、BbATG8がバベシア細胞内で実際にUBL反応を受けているか検証した。我々は複数種の蛍光タンパク質を融合させたBbATG8(Venus-BbATG8 およびmCherry-BbATG8)が細胞内でドット状に観察されることを確認した。このドット状シグナルが、UBL反応に依存的かを検証するために、野生型BbATG8とC末端グリシン欠損変異体(BbATG8ΔG)をクローニングし、そのN末端へモノマーGFP(mGFP)を融合させてバベシア細胞で発現させた。その結果、野生型BbATG8はドット状に観察されたのに対して、BbATG8ΔGは細胞質に拡散したパターンで観察された。これは、他の生物でも普遍的に観察されるATG8とATG8ΔGの典型的な局在パターンであり、バベシアにおいてもBbATG8がUBL共有結合反応によって膜局在していることが強く示された。 現在は、BbATG8が局在するオルガネラの検証とともに、遺伝子発現抑制によるBbATG8の機能解析を進めている。
研究成果の 発表	招待講演 2件 1. 〇坂本寛和.「モデル生物の常識が通じない!? 原生生物のオートファジー」 第73回 原生生物・寄生虫・進化セミナー、2025年10月東京 2. 〇坂本寛和.「アカデミアの使命としての寄生虫感染症創薬」 第48回 日本分子生物学会年会、2025年12月、横浜

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 4 月 13 日

採択番号	2025 共同-8		
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分子病態学分野・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	
	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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	遺伝的解析に端を発した研究によって動物細胞において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虫体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。原虫を含め、これまでのオートファジーの研究では蛋白質やそれをコードするDNAやRNAを中心に研究が進められ、機能解明がなされてきた。オートファゴソームの形成には、他のオルガネラと同様に脂質膜が中心的な役割を担っており、その形成に不可欠なATG8タンパク質にリン脂質のホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn) が結合することが発端となることが明らかにされている。生体膜を構成する脂質分子は、ホルマリンなど一般的な固定法では固定できないため、観察するには特殊な方法が必要となる。そこで本研究では、申請者らが開発した急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法を駆使することで、トキソプラズマのオートファゴソームの微細構造及び脂質分布をナノスケールレベルで可視化し、オートファゴソームでの構成脂質成分を明らかにする。このアプローチで従来とは異なる次元の情報を獲得することにより、原虫におけるオートファゴソームの機能解明に大きく貢献すると確信し、さらには、その成果に基づく新たな創薬に繋がると予想される。		
研究経過の概要	本研究では、膜脂質のリーフレット特異的分布を高分解能で解析可能な quick-freeze freeze-fracture replica labeling (QF-FRL) 法を用いた。ヒト線維芽細胞 (HFF-1) に感染させた <i>T. gondii</i>、およびヒト赤血球に感染させた <i>P. falciparum</i> を試料として、急速凍結・割断後にレプリカを作製し、脂質特異的プローブを用いて電子顕微鏡レベルで局在解析を行った。 PtdSer の検出には GST-MFGE8-C2 ドメイン、PtdEtn には duramycin、GM3 には特異抗体を用いた。これらのプローブに対して金コロイド標識抗体を用いることで、各脂質の膜内分布を定量的に評価した。また、比較対象として宿主細胞のプラズマ膜における脂質分布も同様に解析した。		

研究成果の 概要	本研究により、<i>Toxoplasma gondii</i> の寄生包膜(PV 膜)において、ホスファチジルセリン(PtdSer)、ホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)、および糖脂質 GM3 がいずれも細胞質側リーフレット(PF)と内腔側リーフレット(EF)の両方にほぼ同程度に存在する、すなわち対称的な分布を示すことが明らかとなった。これは、従来の真核細胞膜に見られる強い脂質非対称性とは著しく異なる結果である。 実際に、同一実験系において解析した宿主細胞のプラズマ膜では、PtdSer および PtdEtn は主に細胞質側リーフレットに局在し、GM3 は外側リーフレットに限定されるという典型的な非対称分布が確認された。このことから、PV 膜における脂質対称性は、単なる測定上のアーティファクトではなく、PV 膜特有の性質であることが強く示唆された。 また、PV 膜は宿主細胞膜由来であるにもかかわらず、膜タンパク質(特に膜貫通タンパク質)がほとんど存在せず、intramembrane particles (IMPs)が著しく乏しいことも確認された。このことは、脂質のリーフレット間移動(flip-flop)が通常よりも起こりやすい物理的環境が形成されている可能性を示唆する。 機能的観点からは、本研究で明らかとなった PtdSer および PtdEtn の内腔側リーフレットへの露出が、寄生虫の脱出機構に重要な役割を果たしていると考えられる。<i>T. gondii</i> が分泌する膜孔形成タンパク質 TgPLP1 は、これらのリン脂質に対して特異的な結合能を有しており、PV 内腔側から膜に結合・挿入することで膜破壊を誘導する。本研究の結果は、TgPLP1 が標的とする脂質が PV 膜内腔側に存在することを直接支持するものであり、寄生虫の egress 機構の分子基盤を理解する上で重要な知見である。 さらに、PV 膜における脂質対称性の形成機構についても考察を行った。通常、リン脂質のリーフレット間移動はエネルギー障壁が高く、フリッパーゼやスクランブラーゼといったタンパク質によって制御される。しかしながら、PV 膜ではこれらの膜タンパク質の存在が乏しいこと、また感染初期において宿主細胞内カルシウム濃度の上昇が顕著でないことから、従来型のスクランブラーゼ依存機構は関与しにくいと考えられる。そのため、寄生虫侵入時の膜陥入過程における物理的再編成や、膜曲率変化に伴う受動的な脂質再配置が関与している可能性が示唆された。 以上の結果から、PV 膜は単なる宿主膜の延長ではなく、脂質構造の観点からも高度に再構築された特殊な膜であることが明らかとなった。本研究は、寄生虫と宿主の相互作用における膜脂質の役割を新たな視点から理解する基盤を提供するものであり、今後の創薬標的の探索や寄生虫生物学の発展に寄与することが期待される。
研究成果の 発表	本研究成果は現在、以下の論文として投稿中である。 Konishi R., Masatani T., Asada M., et al. Symmetrical localization of phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and GM3 in cytoplasmic and luminal leaflets of the parasitophorous vacuole membrane of <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Plasmodium falciparum</i>(投稿中)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 29 日

採択番号	2025 共同-9		
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	バベシア症「再発」げっ歯類モデルの確立と原虫潜伏感染臓器の特定		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	まさたに たつり 正谷 達磨	岐阜大学応用生物科学部・准教授	
研究分担者	あさだ まさひと 麻田 正仁	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	バベシア症はマダニ媒介性原虫であるバベシア原虫によって引き起こされる人および動物の感染性疾患である。ヒトおよび犬のバベシア症治療は、抗原虫薬(ジミナゼン、クリンダマイシンなど)による治療が行われ、血中の原虫数を検出限界以下まで抑制し寛解状態へと導くことが出来る。しかし、加齢やストレス等による免疫力の低下が起こると原虫の再活性化が起こり、症状が再発する。すなわち本病の克服には再発メカニズムを明らかにすることが必須である。バベシア症の再発メカニズムを解明するためには、薬剤治療後に残存した原虫が宿主体内のどの臓器に、どのくらい潜伏しているかを知る必要がある。そこで本研究では、マウスに感染する人獣共通感染バベシア・ <i>Babesia microti</i> を用いた「バベシア症再発実験動物モデル」を確立し、これを駆使することで潜伏臓器を特定することを試みる。		
研究経過の 概要	潜伏感染モデル作出のため、2025 年度は、11 匹の 6 週齢メス ICR マウスに <i>B.microti</i> (Peabody 株)を 1×10 ⁸ 個/mouse となるよう腹腔内接種し、原虫がどれくらいの期間血中から検出されるのかを検討した。 具体的には、経時的に採血しギムザ染色を行うことで血中の原虫数をカウントした。原虫数が確認できなくなつてからは、原虫 18SrRNA を標的とした PCR を行い、血液中の原虫遺伝子の検出を行った。		
研究成果の 概要	ギムザ染色による虫体観察に基づく血中原虫数を経時的に測定したところ、バベシア数は感染 2 週以降に検出限界以下となった。しかし、バベシア 18SrRNA を標的とした PCR の結果、全個体からバンドが検出された(下表)。さらに継続してモニタリングしたところ、感染 10 週および 20 週でも 10/11 の個体 PCR 陽性となり、30 週でようやく陽性個体が半分程度となった。すなわち、ギムザ染色による虫体観察が検出限界以下となった後も長期間の間、血中にバベシア原虫の DNA が存在することが示唆された。今後、全個体が PCR 陰性となつてから、免疫抑制剤を投与することで原虫の再活性化が見られるかどうか確認して		

いく。

表:11 個体のマウス血中における原虫 DNA の PCR による検出

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
2025/8/5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2025/8/28 (接種後10週)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2025/11/9 (接種後20週)	+	－	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2026/1/15 (接種後30週)	－	－	+	－	－	+	+	+	－	+	+
2026/3/26 (接種後40週)	－	－	+	*	－	+	+	+	－	+	－

+：陽性　－：陰性　＊：死亡

研究成果の
発表

なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 4 月 13 日

採択番号	2025 共同-10		
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	フェルトーシスを標的としたトキソプラズマの新規診断・治療法開発		
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	浜松医科大学眼科・教授・研究統括	
研究分担者	すずむら あやな 鈴木 文那	名古屋大学大学院医学系研究科眼科・病院助教 フェルトーシス解析	
	たぎき 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 鉄分析	
	いとう せいな 伊藤 聖奈	名古屋大学大学院医学系研究科眼科・実験助手 培養.WB.動物実験	
	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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	フェルトーシスは 2012 年に提唱された細胞死の新概念であり、鉄(Fe)の関与を特徴とし、またこれを阻害することによって細胞死を抑制できる可能性がある。研究代表者らが 2023 年の本申請で計画した内容に対し、トキソプラズマ感染における網膜障害・脳障害におけるフェルトーシスの関与を国際誌に発表し(Redox Biology, 2023 [IF:10.7])、さらに国内特許出願および PCT 出願(JST 支援)を完了した。さらに、眼トキソプラズマ症に対する研究で発見された新病態が、眼科手術時に使用する医療材料でも生じている(医療材料を微生物と誤認して網膜フェルトーシスを起こしている)可能性が確認され、申請当時には論文投稿中であった。本研究の目的は、研究代表者が教授とした着任した浜松医科大学眼科と帯広畜産大学、名古屋大学との共同研究として、脳障害や眼障害において、医療材料を微生物と誤認して生じる網膜フェルトーシスについて明らかにすること、さらには、これまでに得られた研究成果から新規検査キット・治療薬の開拓を共同研究する国際企業の選定と、学術的な国際研究協力施設の設定を進めることであった。		
研究経過の概要	2025 年度共同研究を進める期間中に、投稿中であった原著論文が受理された(以下項目参照)。 帯広畜産大学・名古屋大学(申請者の前所属施設)などによる特許の活用や、今後の共同研究の選定を目的として申請者がブラジルサンパウロ大学に赴き、共同研究のための会議や各部局の観察を行なった。 研究拡大を目的として地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム(SATREPS)		

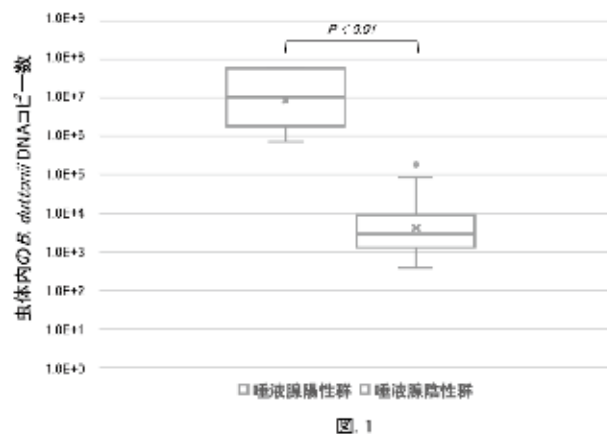
	に申請した(研究代表者(兼子)・研究分担社(西川))。 網膜フェロトーシスの更なる研究を目的として、申請者が帯広畜産大学に赴きマウス眼球摘出の手法や硝子体注射の手技について技術提供した。
研究成果の概要	ブラジルサンパウロ大学では、眼科主任教授との面会、日本領事館への訪問だけでなく、ライブ手術を行い、実際の症例から硝子体液を正確に採取する方法を共有した。 網膜フェロトーシスが関与する眼疾患の拡大を予想し、他大学を追加して共同研究を進め、眼トキシプラズマ症による変化と類似した生物学的変化が眼トキシプラズマ症以外の感染性ぶどう膜炎でも生じることが確認された。
研究成果の発表	“Silicone oil, an intraocular surgical adjuvant, induces retinal ferroptosis” Ushio-Watanabe N(7 番目), Nishikawa Y(11 番目), Kaneko H(18 番目).(合計 18 名) <i>Free Radic Biol Med.</i> 2025;228:33-43.doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2024.12.039

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 28 日

採択番号	2025 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	白藤 梨可
研究課題名	ヒメダニ科 <i>Ornithodoros moubata</i> の人工吸血法による 回帰熱ボレリア <i>Borrelia duttonii</i> 感染実験系の樹立		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	さとう こずえ 佐藤 梢	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 細菌第一部・研究員	
研究分担者	かわばた ひろき 川端 寛樹	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 細菌第一部・室長	
	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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	ダニの唾液には宿主免疫を調節する生理活性物質が含まれるが、近年、ダニ媒介性の病原体の一部は、これらのダニ唾液成分の一部と結合することで宿主の免疫機構を回避し、感染を成立させることが明らかとなってきた。他方、ヒメダニの一種であるオルニソドロス属ダニが媒介する回帰熱群ボレリアについても、同様のメカニズムが存在する可能性があるが、これに関する研究は未だ報告がない上に、それらを調べる手法の開発も遅れている。 そこで本研究では、ヒメダニの唾液を介した病原体伝播メカニズムの全容解明から導き出される、ヒメダニ媒介性感染症の新規対策法の考案を目標とする。その研究に着手するための基盤として、実験室系統株として飼育されているヒメダニ科 <i>Ornithodoros moubata</i> と <i>O. moubata</i> が媒介する病原体 <i>Borrelia duttonii</i> の感染実験モデルの樹立を試みる。前年度は、本実験方法により、人工的に飽血させた <i>O. moubata</i> を得ることができた。しかしその一方で、<i>B. duttonii</i> 感染の <i>O. moubata</i> の作出は不成立となった。前年度の結果を踏まえて、本年度は人工吸血法の条件検討をより詳細に実施する。		
研究経過の概要	<i>B. duttonii</i> を感染させた <i>O. moubata</i> の作出するためには、<i>O. moubata</i> が吸血時に <i>B. duttonii</i> を獲得し、経発育期感染が成立することを確認する必要があると考えられた。そこで、以下の方法で実験を実施した。 【実験 1: 発育期の影響】 <i>O. moubata</i> は 2～6 回の若虫期を経て脱皮を繰り返し、最終的に雄または雌の成虫へ成熟する。また、生涯にわたり複数回吸血を行う。各発育段階において吸血量は異なり、それに伴って取り込まれる <i>B. duttonii</i> の量も変化すると考えられる。前年度は実験条件の制約から第 2 若虫のみを用いていたが、本年度は 第 2 若虫および第 3 若虫を対象とし、<i>B. duttonii</i> を含む血液を吸血させた。 吸血後、脱皮した個体を顕微鏡下で解剖し、唾液腺を摘出した。摘出した一对の唾液腺のうち、一方は <i>Borrelia</i> 用培地で培養に供し、もう一方からは DNA を抽出した。抽出		

	した DNA を用いて qPCR 法を実施し、各サンプル中の <i>B. duttonii</i> DNA 量を検出・定量した。 【実験 2: 吸血回数の影響】 <i>B. duttonii</i> の獲得効率を向上させることを目的として、吸血回数の異なる条件を設定した。具体的には、吸血 2 回群(第 2→3→4 若ダニ)、ならびに吸血 3 回群(第 2→3→4→5 若ダニ)を設けた。各群において経発育後の若ダニから唾液腺を摘出し、実験 1 と同様に培養および qPCR 法による <i>B. duttonii</i> の検出・定量を行なった。
研究成果の概要	【実験 1: 発育段階の影響】 第 2→3 若ダニ群では、14 匹中 2 匹(14.3%)、第 3→4 若ダニ群では、13 匹中 1 匹(7.7%)が、培養および qPCR の両方で陽性を示した。 【実験 2: 吸血回数の影響】 吸血 2 回群では、3 匹が第 4 若ダニまで経発育し、そのうち 1 匹(33.3%)において、唾液腺からの培養および qPCR の両方で陽性が確認された。一方、吸血 3 回群では、途中で吸血不良ならびに経発育不全が認められたため、実験を中止した。 以上の実験から、全 30 個体中 22 個体(73.3%)において虫体内から <i>B. duttonii</i> DNA が検出され、そのうち 5 個体(16.7%)では、唾液腺からの培養および qPCR の両方で陽性が確認された。さらに、唾液腺陰性群(n=17)における虫体内の <i>B. duttonii</i> DNA 量は平均 2.3×10^4 copies/個体であったのに対し、唾液腺陽性群(n=5)では平均 2.6×10^7 copies/個体であり、唾液腺陽性群の方が有意に高い DNA コピー数を示した(図.1)。これらの結果から、<i>B. duttonii</i> は人工吸血法により <i>O. moubata</i> 体内へ取り込まれ、虫体内の菌量が多いほど、唾液腺への移行・定着が成立しやすいことが示唆された。 【まとめ】 本研究により、人工吸血法を用いることで、<i>B. duttonii</i> が <i>O. moubata</i> 体内へ取り込まれ、経発育的に維持された後、唾液腺へ移行・定着することが確認された。しかしながら、<i>O. moubata</i> 唾液腺への <i>B. duttonii</i> の侵入・生着率は 16.7%と低頻度にとどまった。その一因として、ボレリアは哺乳類宿主およびダニ体内という異なる環境下で生存するため、菌体表層抗原の発現変換を介して、宿主適応性やダニへの生着効率を変化させている可能性が考えられる。したがって、本実験で使用した <i>B. duttonii</i> Ly 株は、<i>O. moubata</i> 唾液腺への定着効率が低い性質を有している可能性が示唆された。一方で、実験1において摘出した唾液腺から <i>B. duttonii</i> Ly-SG 株の再分離に成功したことから、次年度はこの <i>B. duttonii</i> Ly-SG 株を用いて、<i>O. moubata</i> 唾液腺への侵入・生着効率の向上について検討を行う予定である。
研究成果の発表	該当なし



帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 31 日

採択番号	2025 共同-12		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	岡島 美鈴
研究課題名	ゲノム編集マウスを用いた原虫感染における血液凝固因子の新規機能探索		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	みやわき しんご 宮脇 慎吾	岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科・准教授	
研究分担者	みずの とめえ 水野 智絵	岐阜大学共同獣医学研究科・博士課程 1 年	
	おかじま みすず 岡島 美鈴	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教	
	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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	CAS は 4 つの血液凝固因子(プレカリクレイン、第 XI 因子、第 XII 因子、高分子量キニノーゲン)により構成される内因系血液凝固機構のひとつである。これまで、それぞれの因子を単独で欠損しても自発出血などの症状を示さないことから、止血における役割が軽視されてきた。また、近年、CAS 因子は自己免疫反応や組織修復に関与することが明らかになり(Gobel et al., <i>Nat. commun.</i> 2016, and <i>PNAS</i> 2018)、CAS の止血以外の機能に注目が集まっている。本研究では、申請者が作製した CAS 因子を欠損させたマウスを宿主とした感染実験を、マラリア原虫をはじめとする住血原虫を対象として実施することにより、これまで未知であった「感染応答における真の CAS の機能」を明らかにする。		
研究経過の概要	プレカリクレインと第 XI 因子をコードする <i>Klkb1</i> と <i>F11</i> は同じ染色体に隣り合って存在するため、それぞれの KO マウスを交配して2重欠損マウスは作出できず、CAS の生理・病態解析を阻む問題となっていた。申請者はゲノム編集で <i>Klkb1</i> を欠損させ、系統化したマウスの <i>F11</i> をゲノム編集することで2重欠損マウス(<i>Klkb1/F11</i>-dKO)の作製に成功した。本研究では、申請者が作製した <i>Klkb1/F11</i>-dKO にネズミマラリア原虫(<i>Plasmodium berghei</i>)またはネズミバベシア原虫(<i>Babesia microti</i>)を実験的に感染させ、マウスのリンパ節、末梢血サンプルを対象として、フローサイトメトリーによる免疫細胞の動態を解析する。本共同研究経費を用いて、帯広畜産大学へのマウス胚の移動および実験動物施設で胚からマウス個体に戻す胚操作実験を立ち上げる(担		

	当:宮脇、岡島)。マウスの感染実験に関しては、帯広畜産大学で実施する(担当:岡島、麻田)。
研究成果の 概要	本研究期間において、代表者が所属する岐阜大学で作製したマウスを帯広畜産大学へ移送するパイプラインを確立することができた。具体的には、人工授精(IVF)、偽妊娠マウスの作製および受精卵移植等の発生工学技術基盤を整備し、岡島が帯広畜産大学・原虫病研究センターの動物施設に実体顕微鏡および培養関連の機器・試薬を導入することで、IVF と受精卵移植が可能な実験環境を整備した。さらに、本研究予算により受精卵輸送システムを整備し、岐阜・帯広間におけるマウス受精卵の輸送および動物個体への復元を実現した。2025 年 12 月には宮脇が帯広畜産大学・原虫病研究センターを訪問し、整備した実験環境を確認するとともに、マウス移送計画および感染実験プロトコールについて具体的な協議を行い、2026 年度からの本格実験に向けた準備を完了した。 帯広畜産大学での感染実験に向けた重要な進展として、岐阜大学においても成果が得られた。これまで 2 因子の欠損マウスの作出にとどまっていたが、今年度、4 つの CAS 因子(4 因子)全てを欠損させたマウス(4 重欠損マウス)の作出に成功した。この 4 重欠損マウスは、CAS の感染応答における機能解析に不可欠な研究材料であり、今後の感染実験の実施により、本研究の核心的な成果が期待される。
研究成果の 発表	本研究課題に関わる成果発表は未だ行っておりません。

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2026.5.26

Project no: 2025-joint-13

1. Principal investigator

Name: Kishor Pandey

Position: Associate Professor

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

2. Project title:

Molecular detection of tick-borne pathogens in Cattle from different altitudes of 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)

04/01/2025 – 03/31/2026, one year

5. Purposes and objectives

The purpose of this study is to investigate the prevalence, and distribution of tick-borne pathogens (TBPs), with particular emphasis on *Babesia* and *Theileria* species, among cattle reared at different altitudinal in central part of Nepal. Tick-borne diseases represent a major challenge to livestock production and animal health, especially in rural and resource limited farming communities where access to veterinary services, diagnostic facilities, and disease control measures is often inadequate. These pathogens can cause significant economic losses through reduced milk production, weight loss, anemia, and increased mortality in affected cattle. The study aims to assess the epidemiological status of TBPs across varying ecological and climatic conditions associated with altitude. Both microscopic examination and molecular method were employed to detect, identify, and characterize the TBPs in cattle populations. Furthermore, this research generated baseline epidemiological data on the distribution of *Babesia* and *Theileria* infections in central Nepal, where information regarding TBPs remains limited.

6. Outline of research process

The study was conducted in three districts of central Nepal, Chitwan, Kaski, and Mustang District, representing low, mid, and high altitude. The study area covered an altitudinal range of approximately 200 to 4,000 meters above sea level. This study provides the first molecular evidence of TBPs in cattle across different altitude in Nepal. Approximately 3 mL of blood was drawn from the jugular vein of each cattle using sterile syringes and placed in EDTA vials. Thin blood smears were prepared immediately after sample collection, fixed with methanol, and stained with Giemsa stain for microscopic examination. The stained smears were observed under a light microscope for the detection of TBPs. For molecular analysis, genomic DNA was extracted from selected blood sample from commercially available DNA extraction kit. The extracted DNA was then subjected to PCR assays to detect the presence of specific TBPs, particularly *Babesia* and *Theileria* species. PCR-positive samples were further subjected to sequencing analysis to confirm pathogen identity.

7. Outline of research achievements

Cattle blood samples were collected from both the lowland Terai region of Chitwan and the hilly region of Kaski, while sample collection from the Mustang, mountain region is still in progress. In Chitwan, a total of 50 blood samples were collected, including 18 samples from Jersey and 32 samples from Holstein cattle. Among these, 7 samples were found positive through microscopic examination. These positive samples were further subjected to PCR analysis, and all were confirmed positive for piroplasma infection. Similarly, 191 cattle blood samples were collected from Kaski district. At present, samples from both study areas are undergoing microscopic examination and molecular analysis to detect TBPs. Similarly, hematological parameters were collected and it will also be analyzed and compared between TBPs-positive cattle and healthy cattle to determine the correlation between TBPs infection and changes in hematological profiles.

Besides the above study, microscopy and molecular analyses were also performed in the Terai region near Chitwan, particularly in Nawalparasi West, a district located in Lumbini Province. It lies at an altitude ranging from 100 to 1,491 meters above sea level. The cattle selected for the study were reared under confined management systems. A total of 100 samples were collected from 10 selected farms in different wards of Bardaghat Municipality of Nawalparasi West. Microscopic examination revealed 7% (7/100) positivity for TBPs. Fifty samples were DNA extracted and PCR analysis was performed. PCR analysis identified 50% (25/50) samples as positive TBPs from Bardaghat Municipality.

The manuscript from our previous year's research work has already been submitted to a journal and is currently under revision. Similarly, a manuscript based on the current study will also be prepared and will be submitted in the near future. In addition, the author has ongoing research

collaboration with Dr. Asada on other parasitic diseases, and recently a research paper on toxoplasmosis was successfully published.

8. Publication of research achievements

Thapa M, Gombo TR, Sugi T, **Asada M**, Arima H, **Pandey K** (2025). Seroprevalence and associated behavioral factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Pokhara Valley, Nepal. Tropical Medicine and Health. 53(1): 128. doi:10.1186/s41182-025-00803-8

Attach reference materials as necessary.

> Trop Med Health. 2025 Sep 30;53(1):128. doi: 10.1186/s41182-025-00803-8.

Seroprevalence and associated behavioral factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in Pokhara Valley, Nepal

Mamata Thapa ¹, Tulsi Ram Gombo ^{2 3}, Tatsuki Sugi ⁴, Masahito Asada ⁵, Hiroaki Arima ⁶, Kishor Pandey ⁷

Affiliations [+ expand](#)

PMID: 41029759 PMCID: PMC12486815 DOI: 10.1186/s41182-025-00803-8 [✉](#)

T

Abstract

Background: *Toxoplasma gondii* is a protozoan parasite that can cause congenital infections with serious health implications. In pregnant women, *T. gondii* infection poses significant risks, including miscarriage, stillbirth, and congenital abnormalities in the fetus. The burden of toxoplasmosis is often underrecognized in many developing countries, including Nepal, where awareness and routine screening are limited. This study was aimed at determining the prevalence of *T. gondii* infection among pregnant women in Pokhara Valley, Nepal, and to identify behavioral risk factors associated with the transmission of this parasite.

Methods: A cross-sectional study was conducted at Gandaki Medical College Teaching Hospital, Pokhara Valley, Nepal, from October 2024 to January 2025. A total of 257 serum samples were collected, 91 of which were randomly selected and tested for anti-*T. gondii* IgG/IgM antibodies using a rapid diagnostic test (RDT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Sociodemographic

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2026.5.29

Project no: 2025-joint-14

1. Principal investigator

Name: Iromy Dhananjani Amarasiri

Position: Veterinary Research Officer

Affiliation: Veterinary Research Institute, Peradeniya, Sri Lanka

2. Project title:

Identification of tick vectors transmitting *Theileria* sp. Yokoyama to cattle

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Naoaki Yokoyama

Position: Professor

4. Research period

4/1/2025 – 3/31/2026, One year

5. Purposes and objectives

Bovine theileriosis is an economically significant disease of cattle. A previous study conducted by NRCPD discovered a novel *Theileria* species in cattle and designated it as *Theileria* sp. Yokoyama. Subsequently, our recent study conducted in collaboration with NRCPD demonstrated that *Theileria* sp. Yokoyama causes anemia in cattle (Amarasiri et al., 2024). Despite these developments, control of *Theileria* sp. Yokoyama is currently not possible, as its tick vectors remain unknown. The objective of this study is therefore to identify potential tick vectors of *Theileria* sp. Yokoyama.

6. Outline of research process

Questing ticks were collected from five districts in Sri Lanka, including Nuwara Eliya, Galle, Matara, Monaragala, and Kurunegala. These districts represent different climatic zones, including the up-country wet zone, low-country wet zone, and dry zone. In each district, questing ticks were collected in and around cattle farms using the flagging method. The collected ticks were preserved

in ethanol and are currently being identified to the species level using morphological keys. Subsequently, DNA samples will be prepared from individual ticks and screened using the *Theileria* sp. Yokoyama-specific PCR assay that we developed previously.

7. Outline of research achievements

- A total of 650 questing ticks were collected from the five surveyed districts, including 90 from Nuwara Eliya, 100 from Galle, 150 from Matara, 180 from Monaragala, and 130 from Kurunegala.
- Morphological identification of the collected tick species is currently in progress.
- Researchers at the Veterinary Research Institute, Sri Lanka, were trained in the collection and species identification of questing ticks.
- Collaboration with NRCPD was enhanced by the exchange of technical expertise and research experience.

8. Publication of research achievements

None

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2026.5.27

Project no: 2025-joint-16

1. Principal investigator NRCPD Joint Research Fellow

Name: María Cecilia Venturini.

Institution: Faculty of Veterinary Sciences/La Plata National University – (FCV-UNLP)

Position: Head Professor (period 2025/ February 2026)

2. Project title:

Comparison study of the whole genome sequencing of Toxoplasma gondii strains isolated from Argentina and Japan

3. Collaborating research group members at NRCPD

PI: principal investigador

First name: Juan Manuel. Family Name: Unzaga

Position: Professor

Affiliation: Faculty of Veterinary Sciences, La Plata National University. Argentina

Co-I

First name: Lais Luján. Family name: Pardini

Position: Associate Professor. Researcher CONICET

Co-I

First name: Mariana. Family name: Bernstein

Position: Researcher CONICET

Counterpart investigator at NRCPD Yoshifumi Nishikawa

4. Research period

April 1, 2025, ~ March 31, 2026. Total: 2025-2027

5. Purposes and objectives

Toxoplasmosis is a worldwide zoonotic disease caused by the parasite *Toxoplasma gondii*, which can induce different types of lesions depending on the host species and the immune response. A wide diversity of non-clonal genotypes has been identified in South America. Whole genome sequencing (WGS) analysis may provide further information on Argentine strains and allow comparative analyses

with Japanese strains contributing to a better understanding of the phylogeny, epidemiology, and genetic markers associated with parasite virulence. This project established an initial collaboration with Dr. Nishikawa's laboratory through a three-year collaborative study focused on:

- the evaluation of the virulence of non-clonal Argentine isolates obtained from different geographic areas, and
- the development of affordable diagnostic kits for toxoplasmosis

6. Outline of research process

Isolates were obtained and genetically characterized using a multilocus nPCR-RFLP approach based on 10 standardized genetic markers. Samples were collected from different Argentine provinces (Buenos Aires, Misiones, Entre Ríos, and San Luis) and included:

- Free-range chickens (environmental sentinels)
- Cats, pigs, goats, and other domestic animals
- Wildlife and zoo animals
- Human cases, including congenital infections

During this initial year (April 2025 – March 2026), the most relevant *Toxoplasma gondii* isolates were selected. DNA samples were extracted at LAINPA and subsequently sent to the National Research Center for Protozoan Diseases (NRCPD) for WGS analysis.

Approximately 5 µg of DNA from each strain were obtained from VERO cell cultures under standard conditions. Tachyzoites (10^8) were purified by filtration, and DNA was extracted using a commercial kit (InbioHighway). DNA samples were stored at 4 °C until shipment.

DNA from the isolates TgHm17-1Arg (ToxoDB #14) and TgHm12-1Arg (ToxoDB #285), obtained from cases of congenital human toxoplasmosis in Buenos Aires Province, as well as TgCk11-9Arg (ToxoDB #19) from a chicken in Misiones Province and TgMy1Arg (ToxoDB #163) from a squirrel monkey in Buenos Aires Province, was sent to Dr. Nishikawa's laboratory.

DNA concentration was measured using Qubit dsDNA BR (Thermo Fisher). Libraries were prepared with the Illumina DNA Prep kit using a minimum of 100 ng of DNA, and sequencing was performed on the Illumina NextSeq 1000 platform using SBS chemistry. Preliminary results are currently under analysis.

Future analyses will include the isolates TgCkC24Arg (#123), TgCkP22Arg (clonal type II), TgWb1Arg (#14), TgCk13-5Arg (#116), TgCk14-5Arg, TgCk14-6Arg (#283), and TgCk14-7Arg (#283). The inclusion of these strains will expand the available genomic information on Argentine isolates and further support the molecular characterization of relevant genetic variants and SNPs potentially associated with differences in the biological behavior and pathogenicity of the parasite.

To this end, DNA shipment to Japan is planned in two batches during 2026. DNA samples will be prepared as previously described.

7. Outline of research achievements

This collaborative project has strengthened scientific cooperation in toxoplasmosis research between Argentine and Japanese research groups.

Between March 9 and March 23, 2026, the principal investigator of the research group, Dr. Juan Manuel Unzaga visited NRCPD, where he delivered two lectures on March 13 and 17, presenting recent studies conducted by the LAINPA research group, Faculty of Veterinary Sciences, National University of La Plata (FCV, UNLP), La Plata, Argentina.

The lectures presented were:

- **Advances in Toxoplasmosis Research at LAINPA–Argentina:**

Genetic diversity and population structure of Toxoplasma gondii in animal and human isolates in a South American context

- **LAINPA–Argentina: Integrality and Co-Creation in Territorial Intervention and Science Communication**

In addition, Dr. Unzaga's visit provided an opportunity to meet the research team and become familiar with the research facilities and working environment of the NRCPD. This experience highlighted the importance of continuing the exchange of LAINPA researchers during the next two years of the collaborative project.

As part of this collaboration sequencing and preliminary bioinformatic analyses were performed in Dr. Nishikawa's laboratory, generating approximately 24 Gb of sequencing data, including two reference strains, using the Illumina NextSeq 1000 platform. Future analyses will include ancestry inference and population structure analysis based on SNP and CNV polymorphisms using the POPSICLE software. In addition, principal component analysis (PCA) and phylogenetic network analyses will be performed to investigate evolutionary relationships and identify shared genomic regions and variants.

8. Publication of research achievements

The achievements derived from this collaborative project will be presented at scientific meetings and conferences, and the related works are currently under preparation.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

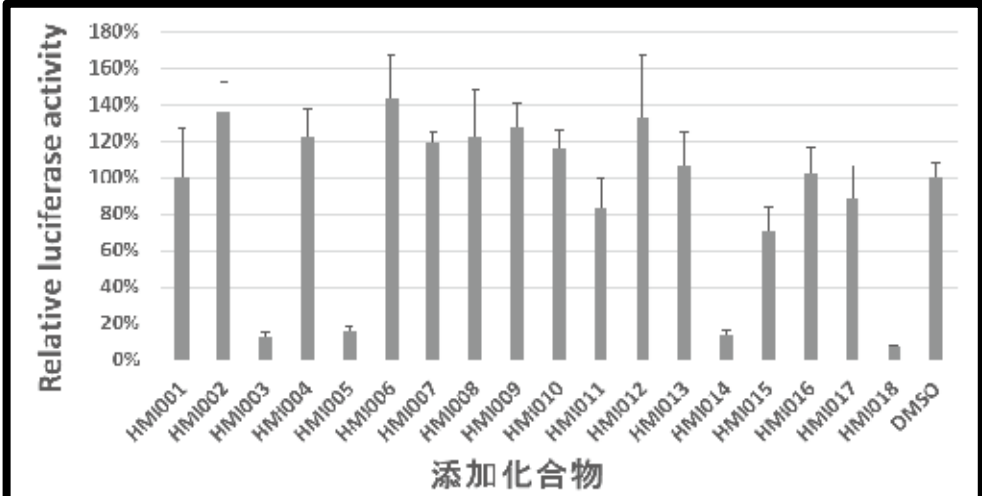
2026 年 5 月 29 日

採択番号	2025 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	岡島 美鈴
研究課題名	組織透明化とライトシート顕微鏡を利用したマダニ体内の原虫動態の可視化		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ないとう きよただ 内藤 清惟	鹿児島大学共同獣医学部・准教授	
研究分担者	おかじま みすず 岡島 美鈴	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教	
研究期間	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	近年、組織を透明にすることで、三次元構造を破壊することなく、内部構造が見える化する技術が目覚ましい発展を遂げている。さらに、組織透明化とライトシート顕微鏡を組み合わせることで、サンプルの全ての細胞について、短時間で位置情報や構造および三次元的な配置を特定できる。本研究では、この技術の獣医領域への応用・発展を目指し、マダニ体内における原虫の動態が見える化することで、原虫伝播の仕組みの解明に取り組む。		
研究経過の 概要	共同研究の開始にあたり、研究代表者および共同研究者間による打合せを実施し、組織透明化とライトシート顕微鏡に関する技術情報および研究遂行に必要な各種資料の共有を行った。また、共同研究者間から提供されたサンプルを用いて、マダニの透明化手法の最適化の検討を開始した。		
研究成果の 概要	マダニの透明化に関しては、哺乳類組織の様に脂質の除去だけでは実施することが困難であり、マダニに最適化した透明化手法を確立する必要があることが確認された。		
研究成果の 発表	なし		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 31 日

採択番号	2025 共同-18		
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	ヒストン制御機構に着目したマラリア原虫のガメトサイト転換・発育機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	あらき たまさ 荒木 球沙	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 寄生動物部/安全管理研究センター・主任研究員	
研究分担者	せきざわ しゅうと 関澤 秀斗	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 寄生動物部・研究補助者	
	あんのうら たけし 案浦 健	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 寄生動物部・室長	
	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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	本研究では、マラリア原虫のガメトサイトへの転換・発育メカニズムの詳細な解明を通して、新規マラリア伝播阻止法の開発に発展する基盤研究を行うことを目的とした。マラリア原虫は、ヒト体内において一部の虫体のみが伝播ステージである生殖母体(ガメトサイト)に移行して、ハマダラカにより媒介される。したがって、マラリア原虫のガメトサイトは、マラリア伝播阻止の標的として非常に重要なステージであるが、赤内期からの転換や、発育を制御する分子機構の詳細に関しては不明な点が多い。しかし、近年の複数の研究により、マラリア原虫のガメトサイト転換や発育には、ヒストン修飾などのエピジェネティック制御が関与していることが明らかとなってきた。そこで本研究では、ヒストン修飾酵素(HME)阻害剤をツールとして用い、これらがマラリア原虫のガメトサイトに引き起こす各種表現系を解析することにより、「化合物を利用して原虫を理解する」ケミカルバイオロジーの観点から、マラリア原虫のガメトサイト転換と発育に関わる分子基盤の解明を目的とした。		
研究経過の概要	本研究では、独自に調製した HME 阻害剤ライブラリー(18 化合物)を用いて、熱帯熱マラリア原虫(<i>Plasmodium falciparum</i>;以下 Pf)ガメトサイトに対する <i>in vitro</i> 殺原虫効果のスクリーニングを行った。本スクリーニングにおいては、ガメトサイト期にルシフェラーゼを発現する Pf 株を使用し、ガメトサイト誘導開始後、10 日目の原虫をアッセイに用いた。アッセイの方法としては、当 Pf 株のガメトサイトに HME 阻害剤(終濃度:1 μM)を添加後、48 時間培養した後に、ルシフェラーゼアッセイを用いて、ガメトサイトの生存率を測定した。スクリーニングにより検出した殺ガメトサイト効果を有する化合物について、ヒト細胞における標的酵素や、マラリア原虫の他発育ステージに対する効果などの情報を統合し、ガメトサイト期におけるヒストン制御機構の基盤情報の整備を試みた。		

研究成果の概要	スクリーニングの結果、HMI003、HMI005、HMI014、HMI018 の合計 4 化合物において、Pf ガメトサイトに対する殺原虫効果を検出した(図 1)。また、本結果を、申請者らが既に実施済みの Pf 赤内期におけるスクリーニング結果と比較したところ、HMI003,014,018 は赤内期とガメトサイト期の双方において殺原虫効果を示す化合物であったが、HMI005 は、赤内期では殺原虫効果を示さず、ガメトサイト期特異的に効果を有する化合物であった。一方で、HMI017 については、ガメトサイト期においては殺原虫効果を示さなかったが、赤内期原虫に対しては殺原虫効果を示す化合物であった。本研究結果を総合すると、Pf ガメトサイトの発育には、ヒストン修飾が大きく関与し、それらの制御機構の一部は、赤内期と異なる可能性が示唆された。今後、上記 4 化合物の Pf における標的酵素の同定や作用機序の調査などを実施し、マラリア原虫のガメトサイト発育に関わるより詳細な分子基盤の解明を試みる。  図1 HME阻害剤のPfガメトサイトに対する殺原虫効果
研究成果の発表	1) 関澤 秀斗、荒木 球沙、梅木 優子、立石 祐樹、長谷川 早悠里、中野 由美子、川合 覚、久枝 一、案浦 健、「マラリア原虫のガメトサイト期特異的な分子動態の解明:ヒストン修飾阻害剤を用いた基盤解析」第 95 回日本寄生虫学会大会、相模原市、2026 年 3 月 2) 荒木 球沙、角田 宗一郎、川合 覚、小林 宏尚、梅木 優子、立石 祐樹、関澤 秀斗、中野 由美子、岡本 宗裕、保富 康宏、久枝 一、案浦 健、「マラリア原虫における増殖制御メカニズムの解明」2025 年度医科学研究所・大気海洋研究所合同奄美シンポジウム、奄美市、2025 年 11 月 3) 関澤 秀斗、荒木 球沙、梅木 優子、立石 祐樹、長谷川 早悠里、中野 由美子、久枝 一、案浦 健、「マラリア原虫種および発育ステージ特異的な分子動態の解明:ヒストン修飾酵素阻害剤ライブラリーを用いた基盤解析」2025 年度医科学研究所・大気海洋研究所合同奄美シンポジウム、奄美市、2025 年 11 月

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 31 日

採択番号	2025 共同-19		
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	ウシバベシア原虫細胞内超微細構造を解明するための 反復拡大顕微鏡法(iU-ExM)の確立		
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	酪農学園大学・獣医学群・獣医寄生虫学ユニット・講師	
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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	近年、分子間の距離を 4 倍にすることができる拡大顕微鏡法(U-ExM)の確立により、広視野顕微鏡や共焦点顕微鏡で 70 nm オーダーの解像度を得ることができるようになった。獣医学領域でその制圧が課題となっているウシバベシア原虫は 1-2.5μm のサイズであり、原虫先端部において侵入関連分子分泌制御を司るコノイド構造や、感染赤血球内部を再構造化することで原虫由来タンパク質を赤血球表面へと輸送する分子が存在すると考えられている。しかしながら、従来の共焦点顕微鏡の解像度では細胞内超微細構造構成分子の詳細な解析に限界があった。この問題を克服するために申請者は本共同研究で<u>ウシバベシア原虫における反復膨張顕微鏡法(iU-ExM)の確立を目的</u>とする。本手法は従来の U-ExM 法における膨張と標識の過程を繰り返す手法であり、13-21 倍のサンプル拡大により電子顕微鏡と遜色のない解像度を示すことが期待できる。確立した手法を用いて原虫先端部のオルガネラ構造、原虫間における ER-Goldi ネットワーク、原虫のタンパク質輸送機序といった従来のイメージング技術で微細解析が困難であった分子機序の解明に挑戦する。		
研究経過の 概要	本課題は 2024 年度からの継続課題であり、前年度は非感染赤血球を用いた iU-ExM の予備実験と並行して原虫の移管と培養順化を実施した。2025 年度は原虫感染赤血球を用いた U-ExM 法と iU-ExM 法の手法を検討した。U-ExM 法を用いて原虫の細胞核と赤血球膜を染色し、細胞核の面積及び赤血球膜の周囲の長さの画像解析を実施した。U-ExM 法では観察対象の拡大及び蛍光シグナルが観察された。一方で、iU-ExM 法により明視野条件下で原虫感染赤血球を膨張させることには成功したものの、十分な蛍光シグナルの検出には至らなかった。今後は抗体の反応濃度、反応タイミング等の検討を行い、iU-ExM 法が実用可能な実験系であるかを精査していく。		
研究成果の 概要	今年度は原虫感染赤血球を用いた U-ExM 法と iU-ExM 法の手法を検討した。U-ExM 法を用いて原虫の細胞核と赤血球膜を核染色試薬と細胞膜染色試薬を用いて染色し、細胞核の面積及び赤血球膜の周囲の長さを ImageJ を用いた画像解析を実施した。U-ExM 法により得られた結果は、拡大処理を行っていない対照群と比較して、細胞核の面積にして約 4 倍、赤血球膜周囲の全長は約 3 倍となった。さらに、iU-ExM 法により明視野条		

	件下で原虫感染赤血球が約 12 倍に膨張することは確認できたものの、十分な蛍光シグナルの検出には至らなかった。今後は蛍光プローブ・抗体の反応濃度、反応タイミング等の検討を行い、実用可能な実験系としての確立を目指す。
研究成果の 発表	本共同研究で得られた研究手法を用いた局在解析結果を今後国際誌へ投稿予定である。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 4 月 17 日

採択番号	2025 共同・20		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	抗トリパノソーマ活性物質の動物生体内動態解析・安全性評価に向けた 分析方法の応用		
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	あぼし たかこ 網干 貴子	山形大学農学研究科・准教授	
	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	
	くろさわ ななみ 黒澤 七海	東北医科薬科大学薬学部・博士課程大学院生	
	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・准教授	
研究期間	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	現在展開中の諸外国との国際共同研究で、多様な天然・合成抗トリパノソーマ活性物質を見出し、構造活性相関を検討した実績を基盤に当課題を進める。従来の共同研究で有力視している抗トリパノソーマ活性物質の 2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole をはじめ、原虫病対策に資するアルカロイドやテルペノイド類の動物生体内動態解析と安全性評価の方法の確立を目標とする。対象物質の溶解性など物理・化学的性質の検討から、LC や GC/MS 等での、対象物質や代謝物質の分析方法(前処理法や検出法など)について 2024 年度から継続的に研究を進める。分析効率化と技術継承を期して博士課程大学院生も従事する。		
研究経過の 概要	当課題を進めるにあたり、対象化合物に適した動物実験計画、液体・ガスクロマトグラフィー (LC・GC) 分析用前処理方法や分析条件の再検討をチーム内で行った。特に経皮吸収を評価するにあたり、実験マウスへの基剤を用いた塗布方法について検討が重ねられた。次に各担当者の専門に応じて次の手順で各種実験を行った。 ① 東北医薬大で対象化合物(オキサゾールアルカロイド: 2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole 並びに細胞毒性を減弱させたメチル化体の 2 種類の化合物が合成され提供された。 ② 上記 2 種類の化合物について、緩衝液や実験動物への負荷が少ない有機溶媒への溶解性が検討された。結果、メチル化体の方は今回の実験で選択し得る有機溶媒で		

	は十分に溶解させることができず、代謝実験には 2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole を使用することとなった。またテルペノイド含有エキス(特定の精油混合物)を調整した。 ③ 調整した試験用サンプルのオキサゾール (2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole) 及びテルペノイド(特定の精油混合物)について、マウスに経皮投与、経口投与、腹腔内投与でそれぞれ与え、経時的に採血しサンプルを得た。 (「動物実験等に関する規程」に従い、帯畜大「動物実験委員会」の承認済) ④ 血液サンプル中の対象化合物と代謝化合物をターゲットに東北医薬大で HPLC/PDA を、また山形大で GC/MS を使用して検出条件や分析方法を検討した。
研究成果の概要	<実験用化合物の合成> 今回の一連の実験に供するためのオキサゾールアルカロイド 2 種類を化学合成により確保しており、投与用に準備した。 <投与・採血・試料化> マウスに各化合物群別【オキサゾール (2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole) 及びテルペノイド(特定の精油混合物)】に経皮・経口・腹腔内で投与し、投与前・30 分・60 分・2 時間・4 時間・1 日・2 日・3 日後に Dry Blood Spot (DBS) 法により採血。試料保存した。 <HPLC 分析・GC/MS 分析> ・オキサゾールアルカロイド: HPLC/PDA 分析を行った。 今回の群では、腹腔内・経口・経皮いずれもマウス血中成分と考えられる全てに共通する成分ピークはやや良好に認められたものの、投与後に特徴的で固有なピークは認められなかった。すなわち、投与試料(オキサゾールアルカロイド)由来のピークは認められなかったことになり、昨年の結果と合わせて考えるに、対象物質は極めて吸収されにくい、代謝が速やかに行われることが示唆された。なおいずれの投与群でもマウスの生存に影響を及ぼさなかった。 ・テルペノイド: GC/MS により分析を行った。 経皮投与→4 時間後血清サンプルから成分 A を検出、他サンプルは検出無し。 腹腔内投与→試料のテルペノイド(特定の精油混合物)由来成分は検出無し。 経口投与→投与数時間後の血清からのみ、成分 A 検出。なお、分析したサンプルによっては、成分 A 以外のテルペンは検出されず。 なお、いずれの投与群でもマウスの生存に影響を及ぼさなかった。 <考察> 今回、血清サンプル中の存在が検出されたテルペノイド(特定の精油混合物)類に議論を絞る。 ・経皮投与は、誤ってマウスが舐めてしまった可能性を検討する余地がある。腹腔内投与では関連物質が検出できなかったため動態不明である。経口投与では数時間で血清に移動し、代謝(分解?)または排泄されることが示唆された。 今回、テルペノイド(特定の精油混合物)がどの程度体内に移行し、毒性など安全性に影響するかを調べるのが、課題の一つであった。経口投与では血中に移行しているが、実験マウスの状態に問題は感じられなかった。また経皮では移行性が少ないことが確認でき、局所的な影響はあるかもしれないが、安全性検討の材料にはなると考えられた。 <今後の展開> 活性化合物のうち溶解性が乏しいものは、分子間相互作用を利用した包摂実験に従事

	する研究者(東北医薬大博士課程修了・学位取得)と行い、オキサゾール類の可溶化を試みる予定である。 HPLC・GC 分析に関しては、各種ピークの化合物同定と、より効果的な分析方法の確立が引き続きの課題である。 テルペノイド(特定の精油混合物)は、その揮発性から媒介者の忌避作用などへの応用性も期待される。経皮・経口での吸収の実際の一端をつかむことができれば、塗布時の安全性についても議論できると考える。
研究成果の 発表	ACS Omega 2025 , 10, 19665–19674

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 4 月 17 日

採択番号	2025 共同-21		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	人工感染マダニを用いた病原微生物伝播メカニズムの解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	まつの けいた 松野 啓太	北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所・准教授	
研究分担者	おはり ゆうま 尾針 由真	北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所・助教	
	みずま けいた 水間 奎太	北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所・博士研究員	
	いとう めぶき 伊藤 萌林	北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所・博士課程 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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マダニは吸血に乗じて多種多様な病原微生物を伝播する。特に、北海道に多く分布するシュルツェマダニ (<i>Ixodes persulcatus</i>) はヒトを好んで刺咬することから、公衆衛生上重要なベクターである。近年、シュルツェマダニがベクターと考えられる新興ウイルスが原因のエゾウイルス感染症が発生しているが、そのベクター能力は証明されていない。そこで本研究では、共同研究担当教員・白藤が樹立し、累代飼育しているシュルツェマダニを用いて、エゾウイルスのマダニ媒介性を実験的に証明する。		
研究経過の 概要	実験開始前に、提供されたシュルツェマダニの幼ダニを用いて、エゾウイルス・ペイジナイロウイルス・ボレリア属細菌を検出するリアルタイム PCR をそれぞれ実施し、コロニーが病原体に汚染されていないことを確認した。 次にシュルツェマダニの成ダニにマイクロインジェクションによってエゾウイルス培養液を直接接種し、マダニ体内でエゾウイルスが感染性を保ったまま保持される、あるいは増殖するかを確認した。ウイルス接種成ダニを AG129 マウス(エゾウイルス感染症のモデルマウス)に刺咬させたところ、AG129 マウスは体重減少を示し、肝臓でウイルスが増殖していることが確認された。次に、同じコロニー由来の若ダニを、エゾウイルス感染マウスから吸血させ飽血させた。この若ダニが脱皮し、成ダニとなることを確認した。現在、成ダニとなったウイルス感染シュルツェマダニ体内にウイルスが残存しているかを確認している。		
研究成果の 概要	シュルツェマダニおよびヤマトマダニ (<i>Ixodus ovatus</i>) にエゾウイルスを微量接種し、経時的に破碎してマダニ体内のウイルス RNA 量とウイルス力価を調べた結果、マダニ中でウイルスが増殖し、最低でも1ヶ月は保持されることが分かった。		

研究成果の 発表	なし。
-------------	-----

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2026.5.29

Project no: 2025-joint-22

1. Principal investigator

Name: Atambekova Zhyldyz

Position: Researcher

Affiliation: Kyrgyz Research Institute of Veterinary named after A. Duisheev, Kyrgyzstan

2. Project title:

Surveillance of clinical bovine babesiosis in Kyrgyzstan

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Naoaki Yokoyama

Position: Professor

4. Research period

4/1/2025 – 3/31/2026, One year

5. Purposes and objectives

Bovine babesiosis is a severe disease in cattle caused by *Babesia* species. My recent survey conducted in collaboration with NRCPD detected *B. bovis*, *B. bigemina*, and *B. occultans* in cattle in Kyrgyzstan, indicating that clinical bovine babesiosis may be prevalent (Zhyldyz et al., 2023). In consistent with this assumption, local veterinarians often encounter cattle with clinical signs consistent with bovine babesiosis, such as fever, anemia, and hemoglobinuria. However, due to insufficient diagnostic knowledge, these cases often remain untreated, resulting in cattle deaths. To address this gap, the proposed study aimed to investigate clinical bovine babesiosis in collaboration with WOA Reference Laboratory for Bovine Babesiosis at NRCPD.

6. Outline of research process

The present study defined a case of bovine babesiosis as a cow with fever, anemia, and hemoglobinuria. Based on this definition, clinical examinations were conducted on 15 cattle from four provinces in Kyrgyzstan, including Chuy, Talas, Jalal-Abad, and Batken. Blood samples were collected, and DNAs were extracted. These DNA samples were transferred to NRCPD and screened for *B. bovis* and *B. bigemina*. In addition, the DNA samples were also screened using a newly developed *B. occultans*-specific PCR assay.

7. Outline of research achievements

- All 15 babesiosis-suspected cattle were infected with at least one *Babesia* species: six with *B. bovis*, six with *B. bigemina*, one with *B. occultans*, and two co-infected with *B. bovis* and *B. bigemina*.
- Sequencing analysis of PCR amplicons confirmed the PCR results.
- Bovine babesiosis was identified as a concern for cattle health in Kyrgyzstan.
- Researchers at the Kyrgyz Research Institute of Veterinary were trained on molecular diagnosis of bovine babesiosis.

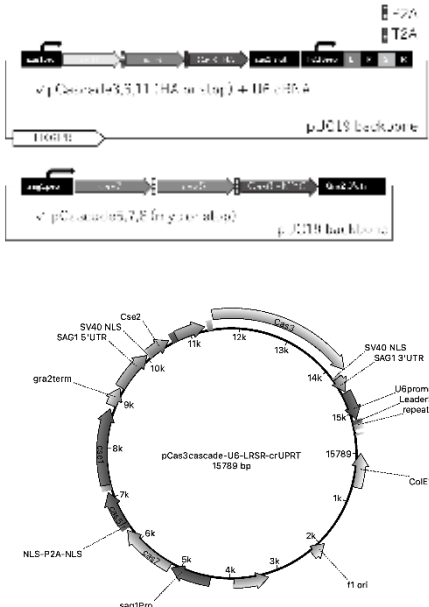
8. Publication of research achievements

None

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 26 日

採択番号	2025 共同-23		
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	新規ゲノム編集 CRISPR/Cas3 系によるトキソプラズマの ゲノム"ごそと"欠損方法の開発		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	すぎ たつき 杉 達紀	北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所 国際協力教育部門・助教	
研究分担者	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トキソプラズマは人体、家畜において病状を引き起こす重要な病原原虫である。病原性の発露においては、原虫の様々な病原性因子が働く一方で、既知の病原性因子の多くは培養条件では必須ではない。すなわち、培養に必須でない遺伝子を次々に欠損していくことで高度に弱毒化された原虫の作出が可能である。病原性因子(および培養に必須でない遺伝子)はゲノム全体にちらばっており、時には非必須遺伝子の島を形成している。このような島を、一挙にまとめて欠損させることができれば、培養に不要な病原性領域を欠失した原虫を効率よく作出することが可能となる。 CRISPR/Cas3を用いたゲノム編集技術は、①標的配列を決定するガイド RNA が長く、特異性が確保しやすい、②標的位置の PAM 上流側において最大 100 kb 程度までの領域を欠損させることができる、という特徴を有する。本技術は哺乳類細胞での再構築およびゲノム編集利用が 2019 年に報告された新しいゲノム編集技術であり、原虫において導入された報告はこれまでにない。 本研究では、新しいゲノム編集技術である CRISPR/Cas3 をトキソプラズマに導入することを目的とする。また、本技術が原虫で導入された場合に、どの程度の割合・長さのゲノム欠損を誘導できるのかについて基礎的知見を蓄積する。さらに、「培養条件で不要なゲノム領域」について、Cas3 による一括欠損を試み、その応用可能性を検証する。		
研究経過の概要	R6 年度中に、Cas3 ゲノム編集に必要な構成因子を 2 つのプラスミドに分けてトキソプラズマにおいて発現させるシステムの構築を完了した。R7 年度は、すべての Cascade 複合体の発現カセットを単一プラスミド上に搭載した発現ベクターを新たに構築するとともに、遺伝子導入効率が高い RH 株をモデル株として用いることで、ゲノム編集効率を大幅に向上させた。実証試験では、ネガティブセレクションが可能な UPRT 領域をモデル領域として選択した。 具体的には、2 つの分割プラスミドシステムにおいて、ランダムな 1 kbp を超える欠損が誘導されることを確認したものの、10^6 個規模で遺伝子導入された原虫集団において観察された欠損イベントは、数クローン由来の限られたものとどまっていた。一方、すべての構成要素を単一プラスミド上に搭載した発現ベクターでは、プラスミド保有原虫を選択的		

	に濃縮することで、ゲノム編集を受けた原虫集団を 20–80%まで濃縮可能となった。 さらに、培養条件下で非必須遺伝子とされる SAG1 およびマルチコピー遺伝子である ROP5 群のゲノム領域について、Cas3 によるゲノム欠損を試み、その欠損様式について解析を進めている。
研究成果の概要	(1) CRISPR/Cas3 システム発現原虫の改良 R6 年度に構築した、2 つのプラスミドに 3 個ずつの Cascade 構成タンパク質を発現させるシステム（右図上段）を改良し、すべての構成要素を単一プラスミド上に搭載した発現ベクター（Cas3 All in one plasmid）を構築した（右図下段）。 この改変により、プラスミドが搭載する薬剤選択マーカーHXGPRT を利用して組換え原虫を選択することで、目的ゲノム領域に欠損を有する原虫を効率よく濃縮できるようになった。 UPRT ネガティブセレクションマーカー領域を標的とした試験では、HXGPRTを保有するMPA/XA 耐性原虫のうち、およそ 20–80%の原虫において FUDR 耐性原虫の出現を認めた（3 回の独立試行で検証）。 Cas9 を用いた場合には、ほぼ 100%の原虫でゲノム編集が成立することと比較すると編集効率は低い。しかしながら、標的遺伝子領域外の選択圧（プラスミド上の HXGPRT マーカーによる選択）のみで、標的ゲノム領域への欠損導入を十分な効率で達成可能である。 (2) in vitro 培養に非必須であるゲノム領域欠損の試み 上記システムでは、標的ゲノム領域の欠損導入がプラスミド側の選択マーカーのみで達成可能である。すなわち、標的ゲノム領域の性質にかかわらず、ゲノム編集原虫を濃縮できる可能性を示している。 そこで、培養条件下で非必須とされるモデル遺伝子として、SAG1 および ROP5 多重遺伝子島の 2 領域を選択し、guide RNA の設計およびそれを組み込んだ Cas3 All in one plasmidの構築を行った。これらのコンストラクトを導入した原虫について、プラスミドが搭載する HXGPRT マーカーを用いて薬剤選択を実施し、得られた耐性原虫ゲノムの解析を進めている。 その結果、薬剤選択後に長期間培養を行うと、ゲノム欠損を有する原虫の割合が減少することが明らかとなった。この結果は、ゲノム欠損そのもの、あるいは Cas3 コンプレックスの発現自体が原虫に対して負の選択圧となっている可能性を示唆している。そのため、ゲノム編集原虫を効率よく回収するための最適な培養期間および回収タイミングを決定することが、今後の課題として抽出された。 
研究成果の発表	国際学会 [1] Tatsuki SUGI, Kyoko HAYASHIDA, Junya YAMAGISHI, Yoshifumi NISHIKAWA Application of a CRISPR/Cas3 System for Kilobase-Scale Genomic Deletion in <i>Toxoplasma gondii</i>. Molecular Parasitology Meeting XXXVI, Sep 16, 2025(Poster)