

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14862

研究課題名(和文)ウシバベシアによる赤血球侵入評価系の確立

研究課題名(英文) Establishment of an evaluation system for erythrocyte invasion by bovine Babesia parasite

研究代表者

横山 直明 (Yokoyama, Naoaki)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：80301802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：牛バベシア(*Babesia bovis*)培養物を低温感作させて、放出された赤血球外メロゾイトを回収した。次に、このメロゾイトを用いてバベシアによる赤血球侵入評価系を確立した。さらに、この評価系を用いて、牛バベシアのBOV57抗原の機能を解析した。その結果、BOV57抗原に特異的な抗体は、メロゾイトによる赤血球侵入を有意に阻害することが判明した。すなわち、BOV57抗原はメロゾイトの赤血球侵入に重要な役割を果たし、牛バベシア病に対する新たなサブユニットワクチンの候補抗原として活用できる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The *Babesia bovis* culture was subjected to a cold treatment to induce the release of merozoites from infected erythrocytes, and the free merozoites were collected. Next, an erythrocyte invasion assay for *Babesia* was established using these free merozoites. Subsequently, the erythrocyte invasion assay was used to investigate the role of *Babesia bovis* BOV57 antigen in the erythrocyte invasion by merozoites. The findings showed that the antibodies specific to BOV57 antigen significantly inhibit the invasion of merozoites into bovine erythrocytes. This observation suggested that the BOV57 antigen plays an important role in the invasion of merozoites into erythrocytes. Therefore, BOV57 is a potential candidate antigen for the development of subunit vaccines against bovine babesiosis.

研究分野：獣医原虫病学

キーワード：バベシア 赤血球 侵入 評価系 ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

ウシバベシア (*Babesia bovis*) は宿主赤血球内に寄生し、増殖～破壊～再侵入を繰り返すことで赤血球を次々と溶血させ、発熱、貧血、血色素尿、黄疸などの深刻な病害を引き起こす。しかし、いまだ有効なワクチンが開発されていない。特に、既存のバベシアの試験管内培養系では原虫のステージ別増殖(侵入 分裂 脱出)を同調化させることができず、原虫が赤血球へと侵入する様を正しく評価できない問題点があった。最近我々はバベシア培養物を低温下に感作すると大量のバベシアが赤血球外へと放出される現象を見いだした。この研究シーズを活用して、ウシバベシアによる赤血球侵入評価系を確立することとした。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、我々が最近見いだした研究シーズを応用して、その放出バベシアを用いた赤血球への侵入評価系の確立を提案する。さらに、我々は赤血球侵入に関連する原虫組換え抗原とその特異抗体のライブラリーをすでに保有しており、本評価系を活用して赤血球侵入を阻止できるバベシアワクチンの候補分子を絞り込む。

## 3. 研究の方法

バベシア培養物を低温下に感作させ、赤血球外へと放出されたバベシアを回収・精製し、非感染赤血球への感染(侵入)効率を測定することで、最適の赤血球侵入評価系を確立する。次に、赤血球侵入に関連した各種組換え抗原に対する特異抗体を単独、あるいは様々な組み合わせで介入させ、それぞれの原虫の赤血球侵入阻止効果を検証する。さらに、最も赤血球への侵入を阻止できるサブユニットワクチンを提案する。

## 4. 研究成果

牛バベシア培養物を低温感作させて回収した赤血球外メロゾイトを用いた“バベシアによる赤血球侵入評価系”を確立した(発表論文 )。

ベトナム、タイ、スリランカ、及びエジプトに分布するバベシアの赤血球侵入に関わる原虫因子の遺伝子多型について解説した(発表論文 、 、 、 、 )。

バベシアの阻害剤を簡易にスクリーニングできる評価系を確立し、阻害剤のいくつかの候補を同定した(発表論文 )。

バベシアのバイオイメーキング解析に有効な遺伝子組換え原虫の作製系の改良に成功した(発表論文 )。

牛バベシアの BOV57 がメロゾイトの赤血

球侵入に重要な役割を果たし、牛バベシア病に対する新たなサブユニットワクチンの候補抗原として活用できる可能性を明らかにした(発表論文 )。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Ishizaki, T., Sivakumar, T., Hayashida, K., Takemae, H., Tuvshintulga, B., Munkhjargal, T., Guswanto, A., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: *Babesia bovis* BOV57, a *Theileria parva* P67 homolog, is an invasion-related,

neutralization-sensitive antigen. *Infect. Genet. Evol.*, 54:138-145, 2017. (査読あり) DOI: 10.1016/j.meegid.2017.06.025

Liyanagunawardena, N., Sivakumar, T., Kothalawala, H., Silva, S.S., Battsetseg, B., Lan, D.T., Inoue, N., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: Type-specific PCR assays for *Babesia bovis* msa-1 genotypes in Asia: Revisiting the genetic diversity in Sri Lanka, Mongolia, and Vietnam. *Infect. Genet. Evol.*, 37:64-69, 2016.

(査読あり) DOI: 10.1016/j.meegid.2015.10.029

Ishizaki, T., Sivakumar, T., Hayashida, K., Tuvshintulga, B., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: RBC Invasion and invasion-inhibition assays using free merozoites isolated after cold treatment of *Babesia bovis* *in vitro* culture. *Exp. Parasitol.*, 166:10-15, 2016. (査読あり) DOI: 10.1016/j.exppara.2016.03.010

Tattiyapong, M., Sivakumar, T., Takemae, H., Simking, P., Jittapalapong, S., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: Genetic diversity and antigenicity variation of *Babesia bovis* merozoite surface antigen-1 (MSA-1) in Thailand. *Infect. Genet. Evol.*, 41: 255-261, 2016. (査読あり) DOI: 10.1016/j.meegid.2016.04.021

Weerasooriya, G., Sivakumar, T., Lan, D.T., Long, P.T., Takemae, H., Igarashi, I., Inoue, N., and Yokoyama, N.: Epidemiology of bovine

hemoprotozoa parasites in cattle and water buffalo in Vietnam. J. Vet. Med. Sci., 78: 1361-1367, 2016. ( 査読あり ) DOI: 10.1292/jvms.16-0099

Sivakumar, T., Kothalawala, H., Weerasooriya, G., Silva, S.S.P., Puvanendiran, S., Munkhjargal, T., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: A longitudinal study of *Babesia* and *Theileria* infections in cattle in Sri Lanka. Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 6: 20-27, 2016. ( 査読あり ) DOI: 10.1016/j.vprsr.2016.11.009

Mossaad, E., Asada, M., Nakatani, D., Inoue, N., Yokoyama, N., Kaneko, O. and Kawazu, S.: Calcium ions are involved in egress of *Babesia bovis* merozoites from bovine erythrocytes. J. Vet. Med. Sci., 77: 53-58, 2015. ( 査読あり ) DOI: 10.1292/jvms.14-0391

Elsify, A., Sivakumar, T., Nayel, M., Salama, A., Elkhtam, A., Rizk, M., Mosaab, O., Sultan, K., Elsayed, S., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: An epidemiological survey of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle, buffaloes, and sheep in Egypt. Parasitol. Int., 64:79-85, 2015. ( 査読あり ) DOI: 10.1016/j.parint.2014.10.002

Yokoyama, N., Sivakumar, T., Tuvshintulga, B., Hayashida, K., Igarashi, I., Inoue, N., Long, P.T., and Lan, D.T.: Genetic variations in merozoite surface antigen genes of *Babesia bovis* detected in Vietnamese cattle and water buffaloes. Infect. Genet. Evol., 30: 288-295, 2015. ( 査読あり ) DOI: 10.1016/j.meegid.2014

Rizk, M.A., El-Sayed, S.A., Terkawi, M.A., Youssef, M.A., El Said el Sel S., Elsayed, G., El-Khodery, S., El-Ashker, M., Elsify, A., Omar, M., Salama, A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Optimization of a Fluorescence-Based Assay for Large-Scale Drug Screening against *Babesia* and *Theileria* Parasites. PLoS One. 10: e0125276, 2015. ( 査読あり ) DOI: 10.1371/journal.pone.0125276.

eCollection 2015

Asada, M., Yahata, K., Hakimi, H., Yokoyama, N., Igarashi, I., Kaneko, O., Suarez, C.E., and Kawazu, S.: Transfection of *Babesia bovis* by Double Selection with WR99210 and Blasticidin-S and Its Application for Functional Analysis of Thioredoxin Peroxidase-1. PLoS One. 10: e0125993, 2015. ( 査読あり ) DOI: 10.1371/journal.pone.0125993.

eCollection 2015

Tuvshintulga, B., Sivakumar, T., Salama, A.A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Evaluation of inhibitory effect of methylene blue against *Babesia* and *Theileria* parasites. J. Protozool. Res., 25: 18-28, 2015. ( 査読あり ) DOI: なし

Tattiyapong, M., Sivakumar, T., Takemae, H., Simking, P., Jittapalapong, S., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: Analysis of the genetic diversity of *Babesia bovis msa-1* in Thailand using type-specific polymerase chain reaction. J. Protozool. Res., 25: 38-43, 2015. ( 査読あり ) DOI: なし

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

石崎隆弘、Sivakumar Thillaiampalam、林田京子、五十嵐郁男、横山直明、*Babesia bovis* BOV57, a *Theileria parva* P67 homolog, is an invasion-related, neutralization-sensitive antigen、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年 9 月、鹿児島大学 ( 鹿児島県鹿児島市 )

Sivakumar Thillaiampalam、五十嵐郁男、横山直明、スリランカ国の牛におけるバベシア及びタイレリアの分子疫学調査、第 57 回日本熱帯医学学会大会、2016 年 11 月、一橋大学 ( 東京都千代田区 )

Yokoyama Naoaki、The molecular diagnostic tools for bovine piroplasmosis、57<sup>th</sup> Annual Convention of the Sri Lanka Veterinary Association、2015 年 7 月、Oak-Ray and Earl's Regency (Kandy, Sri Lanka) ( 招待講演 ) ( 国際学会 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

( 1 )

横山 直明 (YOKOYAMA Naoaki)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授  
研究者番号：80301802

(2) 研究分担者

( 0 )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( 0 )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( 0 )