

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02336

研究課題名(和文) マダニ体内におけるバベシア原虫発育の分子基盤の解明と伝播阻止ワクチンの開発

研究課題名(英文) Analysis of the life cycle of Babesia in ticks and development of transmission-blocking vaccines

研究代表者

玄 学南 (Xuan, Xuenan)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：10292096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1) *B. gibsoni*の全ゲノム解析：日本分離株NRCPD株の全ゲノムを解読し、ゲノムデータベースを構築した。(2) GFP-*B. gibsoni*の作製：マダニと犬体内で追跡可能な組換えGFP発現*B. gibsoni*を作製した。(3) *B. gibsoni*の有性生殖期の誘導：キサントレン酸を用いて、*B. bisoni*の有性生殖期を誘導することに成功した。(4) ワクチン候補分子の特定：有性生殖期特異発現分子であるCCp1、CCp2、CCp3をゲノムデータベースより特定し、抗組換えCCp1、CCp2、CCp3の抗体が、有性生殖期の*B. gibsoni*の増殖を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬のバベシア症は世界的に広く認められており、その経済的損失は莫大との試算もあり、臨床獣医学領域において最も重要な感染症のひとつとして取り上げられている。また、一部のバベシア属原虫は人にも感染し、新興人獣共通感染症として近年公衆衛生上注目されている。しかしながら、バベシア症に対する有効なワクチンはいまだに開発されていないのが現状である。そこで、本研究では有性生殖期の虫体を特異的に抑制する組換えワクチン開発の可能性を検討し、将来的にはペット産業に大きな脅威を与えている犬バベシア症の制圧に繋がるものと予想され、学術的な貢献のみならず、大きな社会的貢献にもなるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：(1) Whole genome analysis of *B. gibsoni*: the whole genome of the Japanese isolate NRCPD strain has analyzed, its genome database has been established. (2) construction of GFP-*B. gibsoni*: Recombinant GFP-expressing *B. gibsoni* traceable in ticks and dogs were constructed. (3) Induction of sexual stages of *B. gibsoni*: the sexual stages of *B. bisoni* was successfully induced by xanthrenic acid. (4) Identification of vaccine candidate molecules: CCp1, CCp2, and CCp3, which are sexual stage-specific expression molecules, were identified from the genome database, and anti-recombinant CCp1, CCp2, and CCp3 antibodies have shown to suppress the growth of sexual stage of *B. gibsoni*.

研究分野：獣医原虫病学

キーワード：Babesia gibsoni マダニ 媒介機構 ライフサイクル 組換えワクチン

1. 研究開始当初の背景

家畜バベシア症流行実態調査の重要性: 海外で多発している多種多様な動物感染症のなかで、マダニ媒介原虫感染症はその畜産業に与える被害の深刻さから獣医学領域では特に注目されている。実際、マダニにより媒介されるバベシア症とタイレリア症による被害は、それぞれ「発展途上国における家畜疾病トップ 20」の上位にランクインされている [de Waal, OIE, 2000]。特にバベシア原虫は牛・馬・羊など家畜に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死感染を引き起こし、世界中の畜産業の脅威となっている。家畜バベシア症の多くは日本では法定伝染病（海外悪性伝染病）として指定されており、一旦国内に侵入すれば広く蔓延・浸潤することが懸念される（実際媒介能をもつマダニ種は国内にも存在する）。したがって、海外における家畜バベシア症の流行実態の調査と有効な制御戦略の確立は、「国際貢献」のみならずこれら原虫の侵入から日本を守るための「自己防衛」（先回り研究）としても重要である。

トルコを疫学調査地域として選んだ背景: 家畜バベシア症を効率良く制御するには、「バベシア原虫がいつ、どのようにある地域に定着し、そしてどのように周辺地域に拡散して行くのか？」をグローバルかつ歴史的視点から俯瞰し、流行実態を解析することが重要となる。トルコは、ヨーロッパとアジア大陸に跨っており、また、南から西及び北の三方は、地中海、エーゲ海、黒海に囲まれている。昔から東（西アジア）西（東ヨーロッパ）南（中東・北アフリカ）北（旧ソ連）の家畜交易の中心地（シルクロードの中継地）として栄えてきた[図 1 を参照]。このような地政学的特徴から、トルコにおける家畜バベシア症の疫学調査は、グローバルな視点（空間的）だけでなく歴史的視点（時空的）から流行実態を俯瞰し、制御戦略を講ずる上で極めて重要な意義を持つ。

研究課題の核心をなす学術的な「問い」

家畜バベシア症の疫学調査や制御法に関する報告は、研究代表者によるものも含め数多く報告されている。しかし、「流行実態の解明」と「有効な制御法の開発」をリンクした体系的な研究はほとんど見当たらない。本研究課題における核心をなす学術的「問い」は、「バベシア原虫がいつ、どのようにある地域に定着し、そしてどのように周辺地域に拡散していくのか？」という疫学・進化的視点の問いと、その知見に立脚した「流行地域即応型制御法の創出は可能か？」という対策構築視点の問いの二つである。この二つの「問い」に科学的な答えを見出すことにより、家畜バベシア症を有効に制御できる真のブレイクスルーの実現が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、古来よりアジア・ヨーロッパ・中東などの家畜交易中継地として知られるトルコにおける家畜バベシア症の流行実態の解明と、現地即応型の実践的制御戦略の構築を目指して企画した。具体的達成目標として、広範囲の実地疫学調査と主要流行原虫株の特定・分離、主要流行株の全ゲノム解読とデータベースの構築、流行地域に適した新規治療薬・組換えワクチンの開発を掲げる。

3. 研究の方法

広範囲の実地疫学調査と主要流行原虫株の特定・分離: トルコ全国 15 県において、家畜(牛・馬・羊・山羊)の血液サンプルとマダニサンプルを採集し、家畜体内とマダニ体内に寄生しているバベシア属原虫を検出した。

主要流行株の全ゲノム解読とデータベースの構築：羊に流行している *Babesia ovis* を分離し、実験室で羊による体内継代系を確立した。*B. ovis* の全ゲノム DNA を抽出し次世代シーケンサー（MinION）による全塩基配列を解読した。

流行地域に適した新規診断法の確立と社会実装：ゲノムデータベースより分泌抗原と推定される BoSA1 と BoSA2 を特定し、クローニングした。組換え BoSA1 と BoSA2 をベースとした抗体検出用 ELISA 法と血液中の循環抗原検出用 ELISA を確立し、トルコにおける羊バベシア症の野外調査に適した実践的診断法として提案した。

4．研究成果

（１）トルコ中部地域を中心に、広範囲にわたり、馬・牛・羊・山羊におけるマダニ媒介原虫病の分調査を行った。その結果、*Babesia* 属とタイレリア属の原虫がこれらの家畜に高率に感染していることが判明した。（２）トルコに最も広く分布し、経済的に脅威になっている羊バベシア（*B. ovis*）を特定分離し、羊を用いた実験感染系を確立した。（３）*B. ovis* の全ゲノム配列を解読し、ゲノムデータベースを構築した。（４）ゲノムデータベースに基づいて主要抗原解析を行い、有望な抗原分子を特定した（BoSA1/BoSA2：メロゾイト表面・分泌抗原）。（５）組換え BoSA1/BoSA2 をベースとした特異抗体検出用 ELISA と血液中に循環している分泌抗原 BoSA1/BoSA2 検出用 ELISA を確立した。（６）これらの方法の有効性を実証し、今後トルコにおける羊バベシア症の迅速診断法の社会実装の実現のための基盤作りに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 10件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Li et al.	4. 巻 241
2. 論文標題 Identification of three members of the multidomain adhesion CCp family in Babesia gibsoni	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Acta Trop	6. 最初と最後の頁 106890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2023.106890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zafar et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 The Cross-Species Immunity During Acute Babesia Co-Infection in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol	6. 最初と最後の頁 885985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2022.885985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Liu et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 Babesia gibsoni	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trends Parasitol	6. 最初と最後の頁 815-816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pt.2022.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Lee et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Subolesin vaccination inhibits blood feeding and reproduction of Haemaphysalis longicornis in rabbits	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasit Vectors	6. 最初と最後の頁 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-020-04359-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zheng et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Porin expression profiles in <i>Haemaphysalis longicornis</i> infected with <i>Babesia microti</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Physiol	6. 最初と最後の頁 502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.00502. eCollection 2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zheng et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of <i>Haemaphysalis longicornis</i> genes differentially expressed in response to <i>Babesia microti</i> infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9050378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Efstratiou et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 <i>Babesia microti</i> confers macrophage-babed cross-protective immunity against murine malaria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol	6. 最初と最後の頁 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.00193. eCollection 2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 Transient transfection of the zoonotic parasite <i>Babesia microti</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 E108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9020108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu et al.	4. 巻 265
2. 論文標題 Inhibitory effects of the phytohormone inhibitors fluridone and inabenfide against <i>Babesia gibsoni</i> in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vet Parasitol	6. 最初と最後の頁 19~23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetpar.2018.11.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of a stable transfection system for genetic manipulation of <i>Babesia gibsoni</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasite Vectors	6. 最初と最後の頁 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-018-2853-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Liu et al.
2. 発表標題 Genome editing in the human <i>Babesia</i> parasite <i>Babesia microti</i> using the CRISPR-Cas9 system
3. 学会等名 第65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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lee et al.
2. 発表標題 Identification and expression of subolesin in <i>Haemaphysalis longicornis</i>
3. 学会等名 27th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liu et al.
2. 発表標題 Genome editing of Babesia microti using the CRISPR-Cas9 system
3. 学会等名 27th Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liu et al.
2. 発表標題 Inhibitory effects of the phytohormone inhibitors fluridone and inabenfide against Babesia gibsoni in vitro
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Liu et al.
2. 発表標題 Establish of a stable transfection system for genetic manipulation of Babesia gibsoni
3. 学会等名 第161回日本獣医学会(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Lee et al.
2. 発表標題 Identification and expression of subolesin in Haemaphysalis longicornis
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Lee et al.
2. 発表標題 Prevalence and molecular characterization of tick-borne pathogens amongst sheep and goats in Sudan
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	白藤 梨可 (Shirafuji Rika) (00549909)	帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教 (10105)	申請時の役職。現在の役職は准教授である。
研究分担者	正谷 達膳 (Masatani Tatsunori) (70614072)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	
研究分担者	山岸 潤也 (Yamagishi Junya) (80535328)	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------