

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02335

研究課題名(和文) 家畜病原性原虫ネオスポラの感染による流産発症機構の解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism of abortion caused by infection with the livestock pathogenic protozoan Neospora

研究代表者

西川 義文(Nishikawa, Yoshifumi)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：90431395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ネオスポラの感染による家畜動物の流産対策のため、ネオスポラ誘発性異常産の発症メカニズムを解析した。感染による異常産マウスモデルを作製し、子宮胎盤組織における炎症反応を確認した。炎症反応のシグナル伝達系をもとに細胞スクリーニング系を構築し、原虫由来異常産誘発因子としてNcGRA7を見出した。NcGRA7欠損原虫株を作出し、非妊娠および妊娠マウスモデルでその病原性を検証したところ、NcGRA7欠損による原虫の病原性の低下および正常妊娠率の上昇が認められた。NcGRA7の発現はネオスポラ症のウシ由来組織サンプルでも確認され、NcGRA7がネオスポラ流産に関与することが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネオスポラの感染は世界中に拡大しており、ウシに繁殖障害を引き起こすことから、地球規模での被害額は年間約数十億USドルにのぼる。しかし、ネオスポラ感染症に対する有効な治療法は開発されていないのが現状であり、ネオスポラ感染によるウシの流産に対する予防法・治療法の開発は最重要課題である。本研究では、ネオスポラの異常産誘発因子NcGRA7を同定し、異常産発生のメカニズムの一端を明らかにしており、ワクチンを含めた流産の予防法の開発において重要な研究成果を得ることができた。従って、本研究の成果によりネオスポラの防疫対策に貢献できれば、食料の生産性の向上や人類の食の安全の向上に直結すると考える。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of Neospora-induced abnormal births was analyzed to prevent abortions in domestic animals due to infection with Neospora caninum. A mouse model of abnormal birth due to infection was established and the inflammatory response in utero-placental tissue was observed. We constructed a cell screening system based on the signal transduction of inflammatory response and found NcGRA7 as a protozoan-derived factor inducing abnormal birth. NcGRA7-deficient strain was generated and their virulence was tested in non-pregnant and pregnant mouse models, showing that NcGRA7 deficiency reduced the parasite virulence and increased normal pregnancy rates. Host protein X, which binds to NcGRA7, was also identified by mass spectrometry. Expression of NcGRA7 was also observed in tissue samples from bovine neosporosis, suggesting that NcGRA7 will be involved in Neospora abortion.

研究分野：感染免疫学

キーワード：原虫 ネオスポラ 流産 病原性

1. 研究開始当初の背景

(1) ネオスポラ (*Neospora caninum*) は犬科動物を終宿主とし、ウシ、ヒツジ、ヤギ、シカなどを中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。本感染症は、終宿主の糞便中に排出されるオーシストによる水平感染や中間宿主における垂直感染により伝搬される。特にウシには流産、死産或いは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高率に引き起こす。欧米諸国の報告では、ウシの流産の約40%の原因はネオスポラ感染によるものとされている (Anderson et al. 1995)。ネオスポラの垂直感染は何世代にも渡り成立し、このことが本原虫の感染拡大の最大の原因として挙げられる。実際、ネオスポラの感染例が世界中で報告されており、日本においてもその発生が深刻である。我々の国内調査では、約30%のネオスポラ感染牛が存在し、その感染性流産の散発的な発生を確認している。地球規模での被害額は年間約数十億 US ドルにのぼるとの試算もある (Reichel et al. 2012)。しかし、ネオスポラ感染症に対する有効な治療法は開発されていないのが現状であり、ネオスポラ感染によるウシの流産に対する予防法・治療法の開発は最重要課題の一つである。

(2) ネオスポラ感染による流産は母牛の妊娠初期に発症することが分かっているが、その詳細なメカニズムは不明である。本病態には原虫と胎盤構成細胞群との相互作用が関与していると想定され、「原虫由来の流産誘発因子の存在」が示唆される。従って、原虫因子を手掛かりに、そこから派生する妊娠期の母体の変化を解析することが、本原虫感染による流産発症のメカニズムを明らかにする鍵となる。

(3) ネオスポラは独自の寄生戦略を持ち、分泌オルガネラから様々なエフェクター分子を宿主細胞へ放出して原虫の生存に有利なように宿主細胞の機能改変を行うと推測されている。個々のエフェクター分子の機能は免疫反応の抑制・増強、宿主細胞分裂の制御など多岐にわたるが、それらの効果が合わさって寄生を成立させていると考えられる。しかし、宿主細胞の機能に影響を与えるネオスポラ分子は未だに同定されていない。本研究では、我々が最近の研究で確立した「ネオスポラの遺伝子編集技術」を導入することで流産誘発因子を同定することが可能となり、学術的独自性が高い。さらに、本研究は流産の要因として原虫因子と宿主因子の相互作用に着眼しているため、宿主因子の解析を基にした流産に関与する一般的なメカニズムの解明に貢献できる創造性の高い研究である。

2. 研究の目的

本研究の目的はネオスポラ感染による流産発生のメカニズムの解明である。流産の発生は原虫と宿主の相互作用によって引き起こされると考えられるため、原虫因子とそれに相互作用する宿主因子の同定を目指す。本研究では原虫因子の遺伝子破壊原虫株を作出し、培養細胞及び感染マウスモデルにて解析を進め、流産誘発因子の特定とその作用機序を明らかにする。マウスとウシの胎盤構造の違いなどによりマウスの感染による流産発生率が低かった場合、異常妊娠(難産、早産、垂直感染)まで解析対象を広げる。マウスモデルで同定された原虫因子の局在と宿主遺伝子の発現をネオスポラ流産牛の組織サンプルを用いて確認する。以下の研究方法に示した研究課題を実行し、流産発生(あるいは異常妊娠の誘導に関わる)のメカニズムの解明に迫る。

3. 研究の方法

(1) 流産(異常産)モデルの確立およびその病態解析

流産(異常産)発生のメカニズムを解明するためには、原虫感染に対しどのような免疫応答や組織病変が流産の発生に関与しているかを明らかにする必要がある。本来であればウシの実験感染流産(異常産)モデルを用いるべきであるが、研究資源等の制約があり現実的ではない。そこで本研究では、第一にネオスポラ感染マウスの流産(異常産)モデルを確立し、そこで得られた結果をネオスポラ流産牛の組織サンプルを用いて検証する。確立した流産(異常産)マウスモデルを用いて流産(異常産)発症時における免疫応答および組織学的変化を分子生物学的、病理組織学的に解析する。また、流産(異常産)マウスの組織を病理組織学的、免疫組織化学的に解析し、母子境界領域を中心とした原虫の感染状況、病変形成、サイトカインの発現状況を明らかにすることで、流産(異常産)の発生に関与する免疫応答および組織病変を特定する。

(2) 原虫由来流産(異常産)誘発因子のスクリーニング

(1)の解析結果を統合することで、流産(異常産)を引き起こしている経路が明らかとなるため、その原因となる宿主遺伝子群を絞り込む。例えば、過剰な炎症反応の惹起や炎症性細胞の遊走に影響を与える宿主遺伝子群が挙げた場合は、それらの反応に関与する原虫因子の同定を実施する。上記の解析結果で選定した経路について、それら遺伝子発現に対応したプロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するプラスミドを構築する。ネオスポラ由来 cDNA とともに 293T

細胞へ遺伝子導入し、ルシフェラーゼ発現を上昇させるネオスポラ遺伝子を同定する。

(3) 流産（異常産）誘発因子破壊原虫の作製と *in vitro* での性状解析

(2)において活性が認められた原虫因子を流産（異常産）誘発因子の候補とし、「CRISPR-Cas9によるネオスポラの遺伝子編集技術」を用いて当該遺伝子を破壊した原虫を作製する。樹立した原虫因子破壊株は、細胞侵入能・脱出活性能、増殖率の性状解析を行い、免疫細胞へ感染させ、サイトカイン産生の有無を検証する。これらの解析により、原虫因子破壊株で宿主細胞の活性が低下することを確認する。

(4) 流産誘発因子破壊原虫を用いたマウス感染実験による妊娠期の病態解析

(3)で活性が確認された原虫因子について、その原虫因子破壊株を非妊娠雌マウスへ感染させ、マウスの生存率と組織の病理組織学的、免疫組織化学的解析を実施し、野生型原虫の感染での結果と比較することで、遺伝子破壊による原虫の病原性の変化を解析する。ここまでの研究で得られるデータを基にして、原虫因子破壊株を妊娠初期にマウスへ感染させ、候補分子の流産（異常産）誘発因子としての機能を検証する。これらの解析により、原虫因子破壊株で流産（異常産）率が低下することを確認する。

(5) 流産誘発因子と相互作用する宿主因子の同定

FLAG タグ融合原虫因子を遺伝子欠損原虫へ導入した原虫株を作製する。この原虫株を動物細胞株へ感染させ、そのライセートをFLAG タグ抗体で免疫沈降し、質量分析 (MALDI-TOF-MS) により結合タンパク質を同定する。同定された宿主側タンパク質を siRNA 法等により宿主細胞からノックダウンし、ネオスポラ感染によるサイトカイン・ケモカイン産生の有無、(宿主遺伝子発現の変化を検証する。これらの解析により、ノックダウンで活性が低下することを確認する。

(6) ネオスポラ症のウシ組織サンプルを用いた流産誘発因子および宿主因子の同定

以上より同定された原虫由来流産（異常産）誘発因子について、ネオスポラ症の組織サンプル（胎盤、流産胎児、筋組織、脳組織等）における発現・局在を確認する。また、原虫由来流産（異常産）誘発因子が分泌タンパク質の場合、特異抗体検出酵素免疫測定法 (ELISA) の開発に加え、流産母牛の血清と流産胎児の体液中に含まれる流産（異常産）誘発因子を定量できるサンドイッチ ELISA を確立する。

4. 研究成果

(1) 流産（異常産）モデルの確立およびその病態解析（文献1）

C57BL/6 マウスを用いて、ネオスポラの妊娠期感染による妊娠・出産の影響を解析した。原虫の感染数と感染させる妊娠期を検討したところ、C57BL/6 マウスの妊娠3日目に 10^6 個および 10^5 個原虫を感染させると妊娠不成立(流産や胚吸収によると推測)の割合は20%と16.7%であった。非感染群の妊娠不成立の割合は25%であったことから、ネオスポラ感染による顕著な流産の誘導は認められなかった。しかしながら、ネオスポラの妊娠期感染により、新生マウスの生存率が顕著に低下することが明らかとなった(出生30日後の新生マウス生存率:非感染群(73.5%)、 10^6 個感染(19.4%)、 10^5 個感染(50.0%))。感染群の新生マウスの脳からはネオスポラの遺伝子が検出されたため(10^6 個感染(95.2%)、 10^5 個感染(100%))、垂直感染による先天性ネオスポラ症の影響によることが示唆された。以後、本感染モデルをもとに、異常産誘発因子の同定と解析を進めた。

妊娠13日目に前述の感染マウス及び非感染マウスの胎盤及び脾臓を採材し、リアルタイムPCRによるmRNA発現の相対比較を行った。胎盤組織ではネオスポラの感染により炎症性サイトカインのIFN- γ 及び各種ケモカイン(CCL2, CCL8, CXCL9)の発現が増加していた。一方脾臓組織では、原虫の感染により炎症性サイトカインTNF- α の発現が現象し、ケモカインCCL9の発現が増加していた。

(2) 原虫由来異常産誘発因子のスクリーニング（文献3）

過剰な炎症反応の惹起や炎症性細胞の遊走に影響を与える宿主遺伝子の発現を増強させるネオスポラ分子をルシフェラーゼアッセイ法によりスクリーニングし、候補分子としてNcGRA7を同定した(図1)。NcGRA7の293T細胞への遺伝子導入により、免疫応答に重要なNFAT(Nuclear factor of activated T-cells)の活性化が認められた。

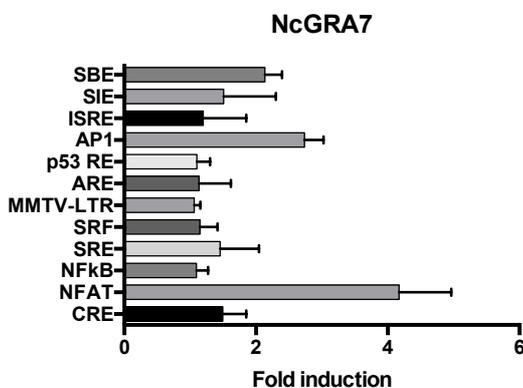


図1 NcGRA7による宿主シグナルの活性化

(3) 異常産誘発因子破壊原虫の作製と *in vitro* での性状解析 (文献3)

NcGRA7 を異常産誘発因子の候補とし、「CRISPR-Cas9 によるネオスポラの遺伝子編集技術」を用いて NcGRA7 遺伝子を破壊した原虫と NcGRA7-FLAG タグ融合タンパク質発現原虫 (NcGRA7 コンプリメント株、NcGRA7Comp) を作製した (図2)。NcGRA7 抗体を用いたウェスタンブロットで、親株原虫 (Nc1) では 33、26、18 kDa のバンドが確認されたが、NcGRA7 欠損原虫株 (NcGRA7KO) ではバンドが確認されなかった。NcGRA7Comp では、FLAG タグ融合分の分子量が増加した 39、34、25 kDa のバンドが確認された。

樹立した各種原虫株は、細胞侵入能・脱出活性、増殖率の性状解析を行い、NcGRA7KO は Nc1 に比べて感染後 72 時間での細胞からの脱出が減少していた。

腹腔マクロファージを用いて免疫反応を解析した (図3)。Nc1 の感染では IL-12p40 と IL-6 の産生が誘導されたが、NcGRA7KO 感染ではそれらの産生が有意に減少した。また、NcGRA7Comp 感染では、NcGRA7KO 感染よりも IL-12p40 と IL-6 の産生が多く誘導された。さらに、NcGRA7KO では細胞毒性 (アポトーシス誘導) の低下が認められた。以上の結果より、NcGRA7 は炎症反応の誘導に伴う組織障害に関与していることが推測された。

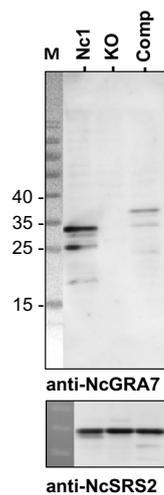
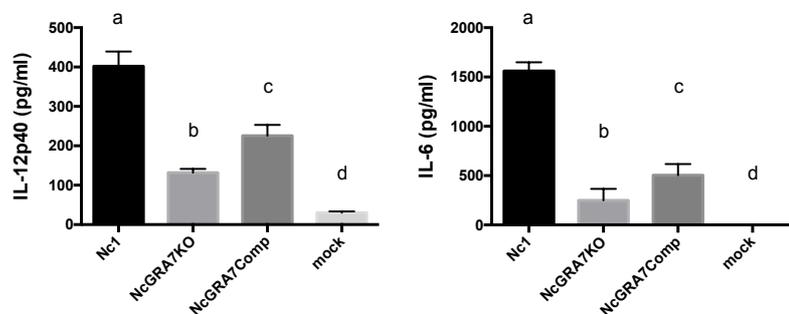


図2 NcGRA7欠損原虫株のウェスタンブロット

M: 分子量マーカー (kDa)
Nc1: 親株原虫
KO: NcGRA7欠損原虫株
Comp: NcGRA7コンプリメント株
NcSRS2: 内在性原虫マーカー



*Different letters: one-way ANOVA and a Tukey-Kramer post hoc analysis ($P < 0.05$).

図3 腹腔マクロファージのサイトカイン産生

マウス腹腔内マクロファージを分離培養し、各種原虫株を感染させた。20時間後に培養上清を回収し、炎症性サイトカイン (IL-12p40、IL-6) を測定した。N = 4

(4) 異常産誘発因子破壊原虫を用いたマウス感染実験による妊娠期の病態解析

NcGRA7KO を非妊娠雌マウスへ感染させ、マウスの生存率、原虫の体内分布、組織を調べたところ、Nc1 感染と比較してマウスの生存率が有意に上昇していたことから NcGRA7KO の病原性の低下が明らかとなった。(文献3)

次に妊娠期感染マウスモデルにて NcGRA7KO の病原性を解析した (図4)。妊娠期の Nc1 感染 (10^6 原虫の感染) により、新生マウスの 7.7%のみが生存した。一方、NcGRA7KO 感染群では新生マウスの生存率が 28%で有意に増加した。生存マウスおよび死亡マウスの脳組織では、Nc1 に比べて NcGRA7KO の原虫数が有意に低下していた。また、 10^5 原虫の感染でも同様の結果を確認した (新生マウスの生存率: Nc1 (19.4%)、NcGRA7KO (50.0%)。これら実験における垂直感染率は、 10^6 原虫 (Nc1: 95.2%、NcGRA7KO: 66.7%) および 10^5 原虫 (Nc1: 100%、NcGRA7KO: 70.0%) の感染で共に NcGRA7KO で減少していた。以上の結果より、NcGRA7 は垂直感染を誘導する異常産誘発因子の可能性が示された。(文献1)

次に、 10^6 原虫感染で妊娠 13.5 日に胎盤を中心とした組織学的検索を実施した (図

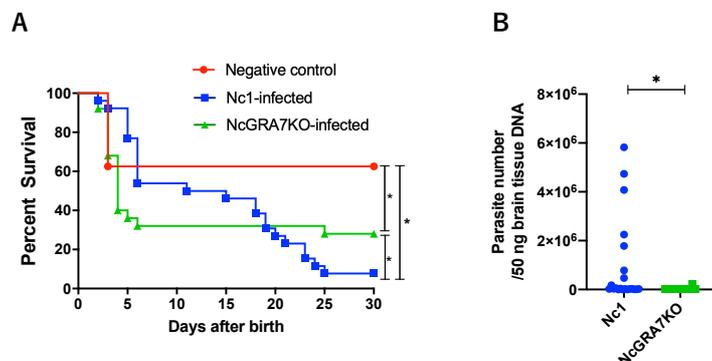


図4 妊娠マウスを用いたネオスポラの病原性解析

C57BL/6マウスの妊娠3.5日目に 10^6 個の原虫 (Nc1およびNcGRA7KO) と RPMI 培地 (Negative control) を接種した。(A) 出産後30日間新生マウスの生存を観察した。* $P > 0.05$ (カイニ乗検定) (B) 生存マウスおよび死亡マウスから脳組織を回収し、DNA抽出後に原虫数を測定する定量PCRを行った。* $P > 0.05$ (マン・ホイットニーのU検定)

5)。胎盤の脱落膜では感染による炎症反応が亢進し、T細胞とマクロファージの増加が確認された。特に、NcGRA7KO感染群では、Nc1感染群に比べてT細胞の増加が認められた。従って、胎盤で誘導された抗原虫反応により、NcGRA7KO株の妊娠期の病原性が低下したと推測され、NcGRA7依存的な免疫回避気候の存在が示唆された。(文献1)

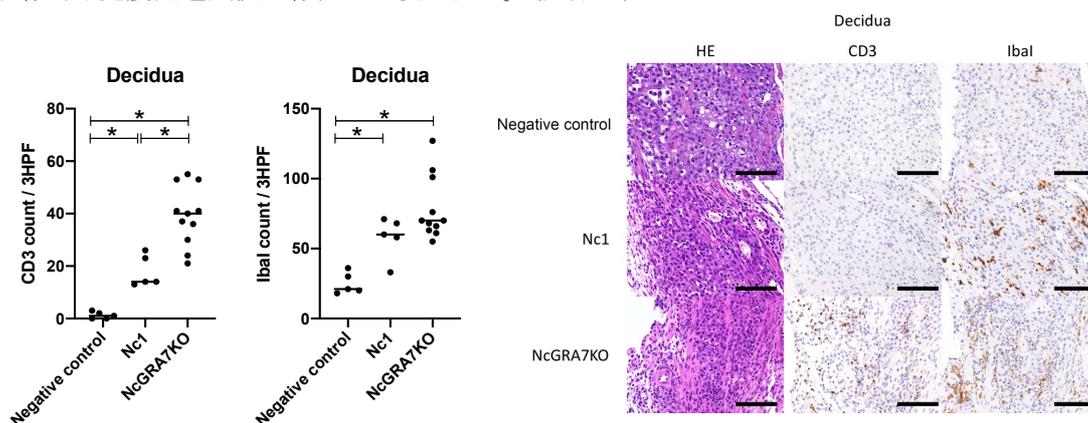


図5 感染妊娠マウスの胎盤組織の病理解析

C57BL/6マウスの妊娠3.5日目に 10^6 個の原虫(Nc1およびNcGRA7KO)とRPMI培地(Negative control)を接種し、妊娠13.5日目に組織学的解析を実施した。胎盤の脱落膜では感染による炎症反応が亢進し、T細胞(CD3)とマクロファージ(Iba1)の増加が確認された。特に、NcGRA7KO感染群では、Nc1感染群に比べてT細胞(CD3)の増加が認められた。 $* P > 0.05$ (one-way ANOVA、Tukey-Kramer)

(5) 流産誘発因子と相互作用する宿主因子の同定

FLAG タグ融合原虫因子(NcGRA7-FLAG)を導入した哺乳動物細胞(293T細胞)とNcGRA7Comp株を用いて、質量分析によりNcGRA7結合タンパク質の候補タンパク質Xを同定した。タンパク質XをsiRNA法により免疫細胞からノックダウンし、ネオスポラ感染による免疫応答を解析したところ、炎症反応の減少が認められた。従って、感染による免疫反応におけるタンパク質Xの重要性が確認された。

(6) ネオスポラ症のウシ組織サンプルを用いた流産誘発因子および宿主因子の同定

ネオスポラ症のウシ由来組織サンプル(胎盤、流産胎児、神経症状等)におけるNcGRA7の発現・局在を解析した。原虫が増殖した寄生胞にてNcGRA7の発現が確認され、壊死像にもNcGRA7のシグナルが認められた。さらに、感染した神経細胞にてNcGRA7が寄生胞から細胞質へ分泌される特徴的な局在が確認された。NcGRA7を診断用抗原としたELISA系を構築し、ネオスポラ流産牛の血清ではNcGRA7抗体レベルが上昇していることを確認した(文献2)。このことから、NcGRA7がネオスポラ流産に関与することが推測された。また、NcGRA7を定量できるサンドイッチELISAを構築した(図6)。今後、本検出系を流産母牛の血清と流産胎児の体液中に含まれるNcGRA7の検出・定量化に応用する。

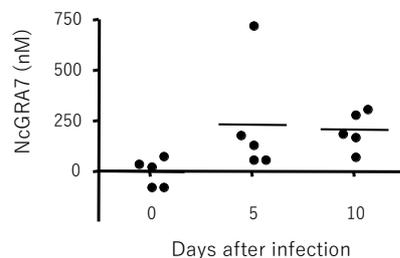


図6 NcGRA7検出用サンドイッチELISAの結果
ネオスポラ感染マウスから感染後0, 5, 10日目に腹水を回収し、NcGRA7検出用サンドイッチELISAでNcGRA7を定量した。

<引用文献>

1. Abdou AM, Ikeda R, Watanabe K, Furuoka H, Nishikawa Y. Role of dense granule antigen 7 in vertical transmission of *Neospora caninum* in C57BL/6 mice infected during early pregnancy. *Parasitol Int.* 2022;89:102576. doi: 10.1016/j.parint.2022.102576.
2. Abdelbaky HH, Nishimura M, Shimoda N, Hiasa J, Fereig RM, Tokimitsu H, Inokuma H, Nishikawa Y. Evaluation of *Neospora caninum* serodiagnostic antigens for bovine neosporosis. *Parasitol Int.* 2020;75:102045. doi: 10.1016/j.parint.2019.102045.
3. Nishikawa Y, Shimoda N, Fereig RM, Moritaka T, Umeda K, Nishimura M, Ihara F, Kobayashi K, Himori Y, Suzuki Y, Furuoka H. *Neospora caninum* Dense Granule Protein 7 Regulates the Pathogenesis of Neosporosis by Modulating Host Immune Response. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(18):e01350-18. doi: 10.1128/AEM.01350-18.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件／うち国際共著 16件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Abdou Ahmed M., Ikeda Rina, Watanabe Kenichi, Furuoka Hidefumi, Nishikawa Yoshifumi	4. 巻 89
2. 論文標題 Role of dense granule antigen 7 in vertical transmission of <i>Neospora caninum</i> in C57BL/6 mice infected during early pregnancy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102576 ~ 102576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2022.102576	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 Abdelbaky Hanan H., Nishimura Maki, Shimoda Naomi, Hiasa Jun, Fereig Ragab M., Tokimitsu Hiromi, Inokuma Hisashi, Nishikawa Yoshifumi	4. 巻 75
2. 論文標題 Evaluation of <i>Neospora caninum</i> serodiagnostic antigens for bovine neosporosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102045 ~ 102045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.102045	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 Pagmadulam B, Myagmarsuren P, Yokoyama N, Battsetseg B, Nishikawa Y.	4. 巻 74
2. 論文標題 Seroepidemiological study of <i>Toxoplasma gondii</i> in small ruminants (sheep and goat) in different provinces of Mongolia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 101996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.101996	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 Leesombun A, Iijima M, Umeda K, Kondoh D, Pagmadulama B, Abdou AM, Suzuki Y, Ohba S, Isshiki K, Kimura T, Kubota Y, Sawa R, Nihei C, Nishikawa Y.	4. 巻 221
2. 論文標題 Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 766-774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiz501	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 Kobayashi K, Umeda K, Ihara F, Tanaka S, Yamagishi J, Suzuki Y, Nishikawa Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Transcriptome analysis of the effect of C-C chemokine receptor 5 deficiency on cell response to <i>Toxoplasma gondii</i> in brain cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Genomics.	6. 最初と最後の頁 705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-019-6076-4	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 -

1. 著者名 Ichikawa-Seki M, Motooka D, Kinami A, Murakoshi F, Takahashi Y, Aita J, Hayashi K, Tashibu A, Nakamura S, Iida T, Horii T, Nishikawa Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Specific increase of <i>Fusobacterium</i> in the faecal microbiota of neonatal calves infected with <i>Cryptosporidium parvum</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 12517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48969-6	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 -

1. 著者名 Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand T, Igarashi M, Sawa R, Nihei CI, Nishikawa Y.	4. 巻 74
2. 論文標題 Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing <i>Streptomyces</i> species from Mongolian soils.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 101961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.101961	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 Ihara F, Tanaka S, Fereig RM, Nishimura M, Nishikawa Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Involvement of Toll-like receptor 2 in the cerebral immune response and behavioral changes caused by latent <i>Toxoplasma</i> infection in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0220560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220560	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 El-Alfy ES, Abu-Elwafa S, Abbas I, Al-Araby M, Al-Kappany Y, Umeda K, Nishikawa Y.	4. 巻 197
2. 論文標題 Molecular screening approach to identify protozoan and trichostrongylid parasites infecting one-humped camels (<i>Camelus dromedarius</i>).	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Trop	6. 最初と最後の頁 105060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2019.105060	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 Ybanez RHD, Busmeon CGR, Viernes ARG, Langbid JZ, Nuevarez JP, Ybanez AP, Nishikawa Y	4. 巻 14
2. 論文標題 Endemicity of <i>Toxoplasma</i> infection and its associated risk factors in Cebu, Philippines.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0217989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0217989	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 Leesombun A, Boonmasawai S, Nishikawa Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Ethanol Extracts from Thai Plants have Anti-Plasmodium and Anti-Toxoplasma Activities In Vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Parasitol.	6. 最初と最後の頁 257-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2478/s11686-019-00036-w	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 Fereig RM, Shimoda N, Abdelbaky HH, Kuroda Y, Nishikawa Y.	4. 巻 267
2. 論文標題 Neospora GRA6 possesses immune-stimulating activity and confers efficient protection against <i>Neospora caninum</i> infection in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vet Parasitol.	6. 最初と最後の頁 61-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetpar.2019.02.003.	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 Fereig RM, Abdelbaky HH, Kuroda Y, Nishikawa Y.	4. 巻 37
2. 論文標題 Critical role of TLR2 in triggering protective immunity with cyclophilin entrapped in oligomannose-coated liposomes against Neospora caninum infection in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 937-944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2019.01.005.	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 Masatani T, Fereig RM, Otomaru K, Ishikawa S, Kojima I, Hobo S, Nishikawa Y.	4. 巻 67
2. 論文標題 Seroprevalence of Cryptosporidium parvum and Neospora caninum in cattle in the southern Kyushu region of Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 763-767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.08.001.	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 Pagmadulam B, Myagmarsuren P, Fereig RM, Igarashi M, Yokoyama N, Battsetseg B, Nishikawa Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Seroprevalence of Toxoplasma gondii and Neospora caninum infections in cattle in Mongolia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vet Parasitol Reg Stud Reports.	6. 最初と最後の頁 11-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vprsr.2018.08.001.	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 Nishikawa Y*, Shimoda N, Fereig RM, Moritaka T, Umeda K, Nishimura M, Ihara F, Kobayashi K, Himori Y, Suzuki Y, Furuoka H.	4. 巻 84
2. 論文標題 Neospora caninum dense granule protein 7 regulates pathogenesis of neosporosis by modulating host immune response.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Appl Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e01350-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01350-18.	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 Abdelbaky HH, Fereig RM, Nishikawa Y	4. 巻 67
2. 論文標題 Identification of the antigenic region of Neospora caninum dense granule protein 7 using ELISA.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 675-678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.06.012.	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 Ruenruetai Udonsom, Yaowalark Sukthana, Yoshifumi Nishikawa, Ragab M. Fereig, Charoonluk Jirapattharasate.	4. 巻 48
2. 論文標題 Current situation of Neospora caninum and Toxoplasma gondii infection among beef cattle in Kanchanaburi, Ratchaburi and Nakhon Patom provinces, Thailand.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Thai Journal of Veterinary Medicine	6. 最初と最後の頁 403-409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Abdou Ahmed, 池田 里奈、渡邊 謙一、古岡 秀文、西川 義文
2. 発表標題 Role of dense granule antigen 7 on vertical transmission of Neospora caninum in mice
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Abdou Ahmed, 池田里奈、古岡秀文、西川義文
2. 発表標題 Possible effects of dense granule protein 7 on vertical transmission of Neospora caninum
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Abdelbaky Hanan、西村麻紀、下田直美、日浅淳、Fereig Ragab、時光宏三、猪熊壽、西川義文
2. 発表標題 Identification of Neospora caninum serodiagnostic antigens for bovine neosporosis
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西川義文
2. 発表標題 妊娠期トキソプラズマ感染の病態発症機序の解明
3. 学会等名 第27回分子寄生虫学ワークショップ / 第17回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiaki Ihara, Kosuke Umeda, Masahiro Yamamoto, Yoshifumi Nishikawa.
2. 発表標題 Toxoplasma gondii conducts NF B pathway of host cells, dense granule protein 14 is a novel member of the orchestra
3. 学会等名 第18回あわじ感染と免疫国際フォーラム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川義文、下田直美、Ragab Fereig、森高智弥、梅田剛佑、西村麻紀、猪原史成、小林薫、檜森結羽、鈴木穰、古岡秀文
2. 発表標題 Neospora caninum dense granule protein 7 regulates pathogenesis of neosporosis by modulating host immune response.
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arpron Leesombun、飯島正富、梅田剛佑、近藤大輔、Baldorj Pagmadulam、Ahmed Abdou、鈴木穰、大庭俊一、一色邦夫、木村智之、久保田由美子、澤竜一、二瓶浩一、西川義文
2. 発表標題 Effect of metacytofilin against <i>Toxoplasma gondii</i> .
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ragab Fereig、西川義文
2. 発表標題 Development of potent and safe vaccine candidates against <i>Neospora caninum</i> infection.
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Pagmadulam Baldorj、Myagmarsuren Punsantsogvoo、Ragab Fereig、五十嵐 慎、横山 直明、Battsetseg Badgar、西川 義文
2. 発表標題 Sero-epidemiological study of <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Neospora caninum</i> infections in cattle in Mongolia.
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川義文
2. 発表標題 <i>Neospora caninum</i> の病原性因子の同定
3. 学会等名 第26回分子寄生虫学ワークショップ / 第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hanana H. Abdelbaky, Maki Nishimura, Naomi Shimoda, Jun Hiasa, Hiromi Tokimitsu, Hisashi Inokuma, Yoshifumi Nishikawa
2. 発表標題 Evaluation of serodiagnostic antigens of Neospora caninum for bovine neosporosis.
3. 学会等名 第 64 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 2018年

1. 発表者名 森高智弥, 下田直美, 西川義文
2. 発表標題 ネオスポラ症の病態に関するNcGRA6 の機能解析
3. 学会等名 第 64 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 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帯広畜産大学・原虫病研究センター・生体防御学分野・西川研究室 https://sites.google.com/site/nishihdlab/ 帯広畜産大学・原虫病研究センター http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html 帯広畜産大学 https://www.obihiro.ac.jp 帯広畜産大学・原虫病研究センター・生体防御学分野・西川研究室 https://sites.google.com/site/nishihdlab/ 帯広畜産大学・原虫病研究センター http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html 帯広畜産大学 https://www.obihiro.ac.jp 未踏の領野に挑む、知の開拓者たち vol.61 http://shochou-kaigi.org/interview/interview_61/
--

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

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			
モンゴル	モンゴル生命科学大学			
タイ	マヒドン大学			
エジプト	South Valley University	Mansoura University		
フィリピン	University of the Philippines Cebu	Cebu Technological University	University of the Visayas	