

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292169

研究課題名(和文)ウシ小型ピロプラズマの増殖メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the growth mechanism of bovine small piroplasma

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) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：シゾン期の小型ピロプラズマを認識する抗体を作製しそのシゾン感染細胞の観察を試みたが、検出されなかった。しかしながら、1) 小型ピロプラズマ2株の全ゲノムの解読、2) SCIDマウスを用いた小型ピロプラズマのマダニ実験感染系の確立とスポロゾイト期の遺伝子発現のプロファイルの解読、3) ピロプラズマ期原虫の原虫膜蛋白質(p23とMPSP)の標的受容体の推定、4) 牛小型ピロプラズマの国内外の発生状況の解明など、牛小型ピロプラズマの増殖メカニズムの解明に向けて多くの有益な学術成果を得た。さらに、その小型ピロプラズマの生態、疫学、遺伝子多型、進化等について国際学術論文の総説としてとりまとめた。

研究成果の概要(英文)：We prepared an antibody that recognizes the schizont stage of small piroplasm to observe the schizont-infected cells, but such cells were not detected. However, we were able to 1) Sequence the whole genome of two genotypes small piroplasm, 2) Establish a "tick-SCID mouse" model for experimental infection and thereby analyze the gene expression profiles of sporozoite stage, 3) Identify the RBC receptors targeted by protozoan membrane proteins (p23 and MPSP), and 4) Investigate the epidemiology and genetic diversity of small piroplasm in Japan and several endemic countries. Resultantly, we have gained a more thorough understanding of the mechanisms involving the growth of bovine small piroplasm. Furthermore, we have comprehensively reviewed the ecology, epidemiology, genetic polymorphism, and evolution of the small piroplasm in an article that was published in an international scientific journal.

研究分野：獣医原虫病学

キーワード：小型ピロプラズマ シゾン ピロプラズム スポロゾイト 牛

1. 研究開始当初の背景

ウシの小型ピロプラズマ病は日本全国で広く発生し、マダニによって媒介される小型ピロプラズマ(タイレリア原虫: *Theileria orientalis*)によって引き起こされる。感染したウシの赤血球内に小型の原虫が出現し、感染動物に慢性経過の消耗性貧血を引き起こす。この時、確実に肥育効率を低下させることから、大きな経済的被害を生じる。しかしながら、現在のところ有効で安全なワクチンや治療薬はない。

今日までに解釈されてきた小型ピロプラズマのウシ体内の増殖メカニズムは以下の通りである。マダニ唾液腺細胞中のスポロゾイトが吸血時にウシに侵入し、単球を含むリンパ球に感染して多数分裂した虫体群(シゾン)を形成する。その後、放出されたメロゾイトは赤血球に侵入しピロプラズマとなり、赤血球内で分裂～脱出～再感染を繰り返し、虫体を増やしていく。そして、ピロプラズマの一部が吸血マダニに取り込まれて、次のウシへと伝播していく。

しかしながら、この増殖メカニズムは不明な点が多い。本研究課題では、病態制御法の確立に欠かせない“ウシ小型ピロプラズマの増殖メカニズムの真実”を解読する。

2. 研究の目的

ウシ小型ピロプラズマ病は日本で広く発生し、我が国の畜産業に多大な経済的被害を与えている。申請者はかねてよりこの原虫病の対策に向き合ってきたが、どうしても解明しなければならない小型ピロプラズマ原虫の増殖メカニズムの問題に至った。特に、「どのようにして小型ピロプラズマがウシ体内で増殖しているか?」は不明のままとなっている。本研究課題では、本原虫病の病態制御法の確立に欠かせない“ウシ小型ピロプラズマの増殖メカニズム”の全体像を解明する。

3. 研究の方法

初年度は、小型ピロプラズマのシゾンとを認識できる高感度な特異抗体を作製し、小型ピロプラズマ感染ウシの病理組織標本や末梢血液有核細胞を用いて、シゾン感染細胞や増殖原虫を検出する。次年度以降は、シゾン感染細胞の単離と標的有核細胞の同定と、感染赤血球と標的有核細胞を用いた試験管内でのシゾン感染細胞の再現培養を行う。さらに、標的細胞の赤血球取り込みに伴う免疫応答、特に液性免疫へのシフトのメカニズム解読、シゾン増殖を標的とした薬剤のスクリーニング、シゾン感染細胞に提示される細胞性免疫の標的ペプチド群の同定等の応用研究を実施する。

4. 研究成果

本研究期間中にシゾンとを認識するであろう MPSP 抗体を作製し、小型ピロプラズマのシゾン感染細胞の観察を試みたが、検出されなかった。しかしながら、牛小型ピロプラズマの増殖メカニズムの解明に向けて、いかに示すように多くの有益な学術成果を得た。

- 小型ピロプラズマ 2 株の全ゲノムの解読に成功した。
- SCID マウスの小型ピロプラズマ実験感染系を確立し、マダニの唾液腺内のスポロゾイトを形態学的に観察し、その遺伝子発現のプロファイルを解読した。
- 小型ピロプラズマのピロプラズマ期原虫の原虫膜蛋白質 p23 は赤血球や白血球との吸着活性を示さないものの、牛腎臓細胞膜上のヘパリン様糖鎖と吸着する可能性が示唆された。一方で、小型ピロプラズマのスポロゾイト期及びピロプラズマ期の原虫膜蛋白質である MPSP は赤血球と吸着することが判明し、その吸着はヘパリンで競合阻害されることも明らかとなった。
- 国内公共牧野で放牧されている牛、エジプトの牛、ベトナムの牛、スリランカの牛、及びモンゴルの牛およびそれぞれの生息マダニにおける牛小型ピロプラズマや牛大型ピロプラズマの寄生状況と原虫の遺伝学的特徴、通年の発生状況等について、それぞれ明らかにした。
- ピロプラズマ期原虫の感染・増殖が引き起こす、牛種別(ホルスタイン、ヘレフォード、日本短角種、アングスなど)の小型ピロプラズマ病の貧血病態の違いについて明らかにした。
- 小型ピロプラズマの感染と発病は、ヘモプラズマが共感染すると抑えられることが判明した。
- ピロプラズマ原虫の排除エフェクターとして宿主マクロファージが重要な役割を果たしていることが判明した。
- ピロプラズマ原虫に対する抗原虫薬の探索に有効な薬剤スクリーニング系を確立し、その候補原虫薬のいくつかを同定した。
- スポロゾイト期原虫が寄生するマダニを標的としたマダニ対策プログラムを考案し、その実行が北海道共同牧野の放牧育成牛の繁殖成績に良好な影響を与えることを明らかにした。
- 我が国に分布する牛大型ピロプラズマの分類、系統、増殖、疫学に関する最新の動向を、国際学術論文の総説としてまとめた。
- 馬のピロプラズマ病の現状と対策をとりまとめ、総論として学術的に発信した。
- 小型ピロプラズマの生態、疫学、遺伝子多型、進化等について国際学術論文の総説としてまとめた。

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)

〔雑誌論文〕(計 21 件)

1. 前野和利、松井伸一、河合孝弘、鈴木真生、千葉友行、横山直明、猪熊 壽 (2016): 牛小型ピロプラズマ病対策を目的としたマダニ対策プログラムが北海道共同牧野の放牧育成牛の繁殖成績に与えた影響、産業動物臨床医誌、第 7 巻、p169-174. (査読有)
2. Sivakumar, T., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: *Babesia ovata*: Taxonomy, phylogeny and epidemiology (Review). Vet. Parasitol., 229: 99-106, 2016. (査読有)
DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.10.006.
3. 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. (査読有)
DOI: 10.1292/jvms.16-0099.
4. 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. (査読有)
DOI: 10.1016/j.vprsr.2016.11.009.
5. 前野和利、松井伸一、河合孝弘、吉川真生、横山直明、猪熊 壽 (2015): 北海道・釧路管内の 2 共同牧野における放牧牛及び生息マダニの *Theileria orientalis* 感染状況とマダニ対策の効果、日獣会誌、第 68 巻、p231-238. (査読有)
6. 五十嵐郁男、横山直明 (2015): 馬ピロプラズマ病 (総説)、Jpn. J. Vet. Parasitol., 14: 83-92. (査読有)
7. Tuvshintulga, B., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Narantsatsral, S.O., Enkhtaivan, B., Battur, B., Hayashida, K., Okubo, K., Ishizaki, T., Inoue, N., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: The PCR detection and phylogenetic characterization of *Babesia microti* in questing ticks in Mongolia. Parasitol. Int. 64:527-532, 2015. (査読有)
DOI: 10.1016/j.parint.2015.07.007.
8. 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. (査読有)
DOI:10.1371/journal.pone.0125276.eCollection2015.
9. 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. (査読有)
DOI: 10.1016/j.parint.2014.10.002.
10. Terkawi, M. A., Cao, S., Herbas, M., Nishimura, M., Li, Y., Moumouni, P., Pyarokhil, A., Kondoh, D., Kitamura, N., Nishikawa, Y., Kato, K., Yokoyama, N., Zhou, J., Suzuki, H., Igarashi, I., and Xuan, X.: Macrophages are the determinant of resistance to and outcome of non-lethal *Babesia microti* infection in mice. Infect. Immun., 83: 8-16, 2015. (査読有)
DOI: 10.1128/IAI.02128-14.
11. 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. (査読有)
12. Tuvshintulga, B., Battsetseg, B., Battur, B., Myagmarsuren, P., Narantsatsral, S., Sivakumar, T., Takemae, H., Igarashi, I., Inoue, N., and Yokoyama, N.: First detection of *Babesia venatorum* (EU1) in *Ixodes persulcatus* ticks in Mongolia. J. Protozool. Res., 25: 29-37, 2015. (査

- 読有)
13. Sivakumar, T., Hayashida, K., Sugimoto, C., and Yokoyama N.: Evolution and genetic diversity of *Theileria* (Review). *Infect. Genet. Evol.* 27: 250-263, 2014. (査読有)
DOI: 10.1016/j.meegid.2014.07.013.
 14. Sivakumar, T., Tattiyapong, M., Fukushi, S., Hayashida, K., Kothalawala, H., Silva, S.S., Vimalakumar, S.C., Kanagaratnam, R., Meewewa, A.S., Suthaharan, K., Puvirajan, T., de Silva, W.K., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: Genetic characterization of *Babesia* and *Theileria* parasites in water buffaloes in Sri Lanka. *Vet. Parasitol.*, 200: 24-30, 2014. (査読有)
DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.11.029.
 15. 横山直明、林田京子 (2014): 小型ピロプラズマの生態と疫学 (総説) 臨床獣医、第32巻第3号、p21-24。(査読無)
 16. Takemae, H., Sugi, T., Kobayashi, K., Murakoshi, F., Gong, H., Recuenco, F.C., Ishiwa, A., Inomata, A., Horimoto, T., Yokoyama, N., and Kato K.: Interaction between *Theileria orientalis* 23-kDa piroplasm membrane protein and heparin. *Jpn J. Vet. Res.*, 62: 17-24, 2014. (査読有)
 17. Takemae, H., Sugi, T., Kobayashi, K., Murakoshi, F., Recuenco, F.C., Ishiwa, A., Inomata, A., Horimoto, T., Yokoyama, N., and Kato, K.: Analyses of the binding between *Theileria orientalis* major piroplasm surface proteins and bovine red blood cells. *Vet. Rec.*, 175:149, 2014. (査読有)
DOI: 10.1136/vr.102535.
 18. Sivakumar, T., Yoshinari, T., Igarashi, I., Kothalawala, H., Abeyratne, S. A. E., Vimalakumar, S. C., Meewewa, A. S., Kuleswarakumar, K., Chandrasiri, A. D. N., and Yokoyama, N.: Genetic diversity within *Theileria orientalis* parasites detected in Sri Lankan cattle. *Ticks Tick Borne Dis.*, 4: 235-41, 2013. (査読有)
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.11.009.
 19. Tagawa, M., Ybanez, A.P., Matsumoto, K., Yokoyama, N., and Inokuma, H.: Interference between *Theileria orientalis* and hemotropic *Mycoplasma* spp. (hemoplasmas) in grazing cattle. *Vet. Parasitol.*, 195: 165-8, 2013. (査読有)
DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.12.041.
 20. Ybañez, A.P., Sivakumar, T., Ybañez, R.H., Vincoy, M.R., Tingson, J.A., Perez, Z.O., Gabotero, S.R., Buchorno, L.P., Inoue, N., Matsumoto, K., Inokuma, H., and Yokoyama, N.: Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. *Vet. Parasitol.*, 196: 13-20, 2013. (査読有)
DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.02.013.
 21. Sivakumar, T., Lan, D.T., Long, P.T., Yoshinari, T., Tattiyapong, M., Guswanto, A., Okubo, K., Igarashi, I., Inoue, N., Xuan, X., and Yokoyama, N.: PCR Detection and Genetic Diversity of Bovine Hemoprotozoan Parasites in Vietnam. *J. Vet. Med. Sci.*, 75: 1455-62, 2013. (査読有)
DOI: 10.1292/jvms.13-0221.
- [学会発表](計6件)
1. Sivakumar Thillaiamapalam, 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27回日本熱帯医学学会大会、2016年(一橋大学、東京都千代田区)
 2. Sivakumar, T., Kothalawala, H., Silva, S.S.P., and Yokoyama, N. 「Molecular epidemiology of *Babesia*, *Theileria*, and *Trypanosoma* in cattle and water buffaloes in Sri Lanka」57th Annual Convention of the Sri Lanka Veterinary Association (国際学会) 2015年(Kandy, Sri Lanka)
 3. Naoaki Yokoyama 「The molecular diagnostic tools for bovine piroplasmosis」57th Annual Convention of the Sri Lanka Veterinary Association(国際学会、招待講演) 2015年(Kandy, Sri Lanka)
 4. 横山直明、Sivakumar Thillaiamapalam、林田京子、杉本千尋「Genetic diversity of *Theileria*」第157回日本獣医学会学術集会、2014年(北海道大学、北海道札幌市)
 5. 林田京子「タイレリア原虫の比較ゲノム解析と病原性進化に関する研究」157回日本獣医学会学術集会、2014年(北海道大学、北海道札幌市)
 6. 林田京子、原雄一郎、阿部貴志、服部正平、横山直明、杉本千尋「*Theileria orientalis* 原虫2株の全ゲノム解読とタイレリアの病原性に関わる遺伝的多様性の解明」第83回日本寄生虫学会、

2013年(愛媛大学、愛媛県松山市)

〔図書〕(計5件)

1. 横山直明(分担執筆)(2014):馬ピロプラズマ病、馬トリパノソーマ病、p263-265、獣医内科学(第2版)猪熊壽ら監修、文永堂出版。
2. 横山直明(分担執筆)(2014):Theileria、ウィルス・細菌・真菌・寄生虫同定便覧(初版)技術情報協会。
3. 横山直明(分担編集・執筆)(2014):タイレリア、バベシア、p51-57、獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠 寄生虫病学、寄生虫病学共通テキスト編集委員会、緑書房。
4. 横山直明(分担執筆)(2015):感染に対する獲得免疫、p108-119、獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠 獣医免疫学、池田輝雄ら監修、緑書房。
5. 横山直明(分担執筆)(2016):犬・猫のバベシア症(P161)、犬のネオスポラ症(P164)、犬・猫のクリプトスポリジウム症(P164)、犬・猫のトキソプラズマ症(P169)、獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠 動物感染症学、福士秀人ら編集、近代出版。

〔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

6. 研究組織
(1) 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

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

(4) 研究協力者
()