

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380154

研究課題名(和文) 宿主赤血球の膜分子から見るバベシア原虫固有の寄生戦略の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the interaction between Babesia parasites and host erythrocytes

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) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：バベシア原虫固有の寄生戦略を解読するために以下の主な研究成果を得た。

1) 赤血球膜酵素の一部が原虫膜周囲にも局在する。2) バベシア原虫のスペリカルボディ抗原は、感染赤血球内に分泌される。3) バベシア原虫のマイクロネーム抗原は宿主の赤血球膜に吸着する。4) バベシア原虫の表面抗原は赤血球の骨格分子であるアクチンと相互作用する。5) バベシア原虫の赤血球侵入時には独特な滑走運動(Gliding motility)を示す。6) バベシア原虫は宿主の制御性T細胞を利用して宿主免疫から回避する。7) 原虫リガンドと赤血球膜受容体との間の分子相互作用を阻害するとバベシア原虫の赤血球侵入が阻害される。

研究成果の概要(英文)：This research project had been conducted to elucidate the interaction between Babesia parasites and host erythrocytes during their asexual growth. The findings are summarized below.

1) Na, K-ATPase, an erythrocytic enzyme, is found on the surface of Babesia parasite. 2) A spherical body protein (SBP) expressed by Babesia parasite is released into the cytoplasm of the infected erythrocytes at the late phase of infection. 3) Micronemal proteins of Babesia parasites act as adhesion molecules to the receptors of host erythrocytes. 4) A surface antigen of Babesia parasite can interact with the erythrocytic actin during the infection. 5) Babesia parasite shows a unique "Gliding motility" during erythrocyte invasion. 6) Babesia parasite can escape from host immunity by activating host Treg cells. 7) Erythrocyte invasion of Babesia parasites can be inhibited by disturbing the molecular interactions between the protozoan ligands and host receptors.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 / 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：バベシア 赤血球 寄生 制御性T細胞 免疫回避 アクチン スペリカルボディ マイクロネーム

1. 研究開始当初の背景

ウシやウマのバベシア症は、マダニによって媒介されるバベシア原虫が宿主赤血球内へ寄生し、増殖・破壊を繰り返すことで発熱、貧血、脾腫、血色素尿、神経症状などの重篤な病態を引き起こす。いずれのバベシア症も有効な治療法や予防法が確立されておらず、一旦汚染されれば清浄化が極めて難しい。このバベシア症を克服するためには、バベシア原虫が持つ独自の赤内型増殖の分子機構を理解し、治療法・予防法の開発に繋がる重要なターゲットを見いだしていくことが重要となる。

これまでのバベシア原虫に関する我々の研究成果から、1) グライコフォリン A、シアル酸、ヘパラン硫酸様多糖などの赤血球膜分子が原虫による赤血球侵入期や内在期の受容体として機能していること、2) 受容体分子の機能を介入できる類似多糖や膜修飾薬剤などが赤内型増殖を阻止できること、3) 原虫独自の細胞内小器官であるロプトリーやマイクロネームには赤血球膜の受容体分子と相互作用する原虫リガンド分子が存在すること、4) 赤血球外に脱出した原虫は宿主赤血球膜分子を纏っており、その纏いを不能にした変異原虫は弱毒化することなどを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バベシア原虫はたとえ赤血球外に脱出した後も宿主赤血球膜を常に纏っており、巧みに宿主免疫から回避しているという原虫固有の生物学的特性を足がかりに、宿主赤血球膜の再構築を引き起こすバベシア原虫固有の寄生戦略を解読することである。

3. 研究の方法

上記研究目標を達成するために、1) バベシア原虫の試験管内培養の解析、2) 各種遺伝子クローニングとその解析、3) 各種組換え蛋白質及びその特異抗体の作製、4) 免疫組織学的解析、5) 蛋白質の活性解析、6) 原虫のマウス感染試験、7) 野外病態調査等を行った。

4. 研究成果

(1) 各種赤血球膜分子に対する特異抗体を作製し、バベシア原虫の培養物に対する免疫組織学的解析を行った結果、赤血球膜に局在する宿主由来酵素 Na, K-ATPase は赤血球内に寄生した内部原虫や赤血球外に脱出した外部原虫の原虫膜周囲にも局在することが観察された。赤血球外へ脱出したバベシア原虫は赤血球膜由来のシアル酸や脂質に加えて、Na, K-ATPase をも纏っていることが判明した。一方で、バベシア原虫は赤血球が保有する Catalase 活性を阻害し、赤血球膜を溶解させる因子を産生していることも判明した。

(2) バベシア原虫の Spherical body protein (SBP) は、他のアピコンプレックス原虫にはないバベシア原虫固有の蛋白質で、赤内型ステージのメロゾイト内で発現していることが明らかとなった。さらに、

SBP はメロゾイト内の Spherical body と呼ばれる細胞内小器官で合成され、赤血球寄生後期には感染赤血球内に原虫から分泌され、さらには赤血球脱出期に培養上清に放出されることが判明した。その局在動態から赤血球膜骨格の再構築に関わっている可能性が示唆された。また、SBP は免疫原性が高く、かつ SBP 遺伝子は株間で高度に保存されていることから、ロプトリー抗原 (RAP, AMA) (遺伝子) と同様に診断用抗原 (遺伝子) としても活用できることが判明した。

(3) バベシア原虫のマイクロネーム抗原である Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) は宿主の赤血球膜に高い吸着活性を有し、AMA 抗原と同様に、その特異抗体の存在下では、バベシア原虫は赤血球に侵入できなくなることを明らかにした。

(4) バベシア原虫の表面膜蛋白質 (EMA) は赤血球内で増殖する際に赤血球の骨格分子である Actin と相互作用していることが明らかとなった。また、バベシア原虫の表面膜蛋白質 (EMA, MSA) は野外株間で高度に遺伝子多型を示すことも判明した。これらの原虫膜分子が多彩な牛種の赤血球膜を認識し、赤血球侵入を果たすために重要な役割を担っていると考えられる。

(5) バベシア原虫内の原虫抗原の膜輸送や複合体形成に関与していると考えられているシャペロン分子 (HSP-70) の遺伝子単離に成功し、赤内型増殖時の HSP-70 の細胞内局在を明らかにした。

(6) 人工蛍光蛋白質を永続的に発現する組換えバベシア原虫の作出に成功し、バベシア原虫の赤内型増殖のバイオイメーキングが可能となった。さらに、バベシア原虫の赤血球侵入時には独特な滑走運動 (Gliding motility) を示すことが明らかとなった。

(7) 原虫のマウス感染モデル系を用いた解析の結果、バベシア原虫の排除には宿主のマクロファージが重要な役割を担っていることが明らかとなった。一方で、バベシア原虫は宿主の制御性 T 細胞を利用して宿主免疫から回避していることも判明した。

また、バベシアの感染に伴って肝臓の代謝酵素である Cytochrome P450 の活性も著しく低下することが明らかとなった。バベシア原虫が宿主赤血球膜分子を纏うことで、原虫を取り込んだマクロファージが制御性 T 細胞を誘導している可能性が想定された。

(8) 宿主体内でのバベシア原虫の赤内型増殖の進行が、同じ赤血球寄生性原虫のタイレリアによる貧血病態を悪化させることが明らかとなった。

(9) 原虫リガンドと赤血球膜受容体との間の分子相互作用を阻害できる (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) はバベシア原虫の増殖を極めて効果的に阻害することが判明した。また、バベシア原虫固有の赤内型増殖を、Epoxomicin、Terpene Nerolidol、Ciprofloxacin、Thiostrepton、Rifampin、Apicidine、Pepstatin A、Mefloquine、Fusidic acid、Resedronate、Gedunin が有意に阻害することが判明した。これらの薬剤はバベシア症

に対する新規治療薬の候補となりうる
ことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 41 件)

1. Yoshinari, T., Sivakumar, T., Asada, M., Battsetseg, B., Huang, X., Lan, D. T. B., Inpankaew, T., Ybañez, A. P., Alhassan, A., Thekiso, O. M. M., de macido, A. C., Inokuma, H., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: A PCR based survey of *Babesia ovata* in cattle from various Asian, African, and South American countries. *J. Vet. Med. Sci.*, 75: 211-214, 2013. doi: 10.1292/jvms.12-0329
2. Salama, A.A., Aboulaila, M., Moussa, A.A., Nayel, M.A., El-Sify, A., Terkawi, M.A., Hassan, H.Y., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Evaluation of *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects of fusidic acid on *Babesia* and *Theileria* parasites. *Vet. Parasitol.*, 191: 1-10, 2013. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.08.022
3. Ueno, A., Terkawi, M.A., Yokoyama, M., Cao, S., Aboge, G., Aboulaila, M., Nishikawa, Y., Xuan, X., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Farnesyl pyrophosphate synthase is a potential molecular drug target of risedronate in *Babesia bovis*. *Parasitol. Int.*, 62: 189-92, 2013. doi: 10.1016/j.parint.2012.12.005
4. Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Aboulaila, M., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D., Byambaa, B., Terkawi, M.A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect. Genet. Evol.*, 16: 178-85, 2013. doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.005
5. 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. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.02.013
6. Sivakumar, T., Okubo, K., Igarashi, I., de Silva, W.K., Kothalawala, H., Silva, S.S., Vimalakumar, S.C., Meewewa, A.S., and Yokoyama, N.: Genetic diversity of merozoite surface antigens in *Babesia bovis* detected from Sri Lankan cattle. *Infect. Genet. Evol.*, 19: 134-40, 2013. doi: 10.1016/j.meegid.2013.07.001
7. Nagano, D., Sivakumar, T., de DE Macedo, A.C., Inpankaew, T., Alhassan, A., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: The Genetic Diversity of Merozoite Surface Antigen 1 (MSA-1) among *Babesia bovis* detected from Cattle Populations in Thailand, Brazil and Ghana. *J. Vet. Med. Sci.*, 75: 1463-70, 2013. doi: 10.1292/jvms.13-0251
8. 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. doi: 10.1292/jvms.13-0221
9. Simking, P., Saengow, S., Bangphoomi, K., Sarataphan, N., Wongnarkpet, S., Inpankaew, T., Jittapalapong, S., Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: The molecular prevalence and MSA-2b gene-based genetic diversity of *Babesia bovis* in dairy cattle in Thailand. *Vet. Parasitol.*, 197:642-8, 2013. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.07.015
10. Terkawi, M.A., Ratthanophart, J., Salama, A., Aboulaila, M., Asada, M., Ueno, A., Alhasan, H., Guswanto, A., Masatani, T., Yokoyama, N., Nishikawa, Y., Xuan, X., and Igarashi, I.: Molecular Characterization of a New *Babesia bovis* Thrombospondin-Related Anonymous Protein (BbTRAP2). *PLoS One*, 8: e83305, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0083305
11. Salama, A. A., Terkawi, M. A., Kawai, S., Aboulaila, M., Nayel, M., Mousa, A., Zaghawa, A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Specific antibody to a conserved region of *Babesia* apical membrane antigen-1 inhibited the invasion of *B. bovis* into the erythrocyte. *Exp. Parasitol.*, 135: 623-8, 2013. doi: 10.1016/j.exppara.2013.09.017
12. Sivakumar, T., and Yokoyama, N.: *Babesia ovata* in cattle: A review. *Jpn. J. Vet. Parasitol.*, 12: 11-20, 2013.
13. Azirwan, G., Thillaiampalam, S., Muncharee, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: In vitro inhibitory effect of gedunin on *Babesia* and *Theileria* parasites. *J. Protozool. Res.*, 23: 1-6, 2013. <http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/journal.html>
14. Shimamoto, Y., Sasaki, M., Ikadai, H., Ishizuka, M., Yokoyama, N., Igarashi, I., Hoshi, F., and Kitamura, H.: Downregulation of Hepatic Cytochrome P450 3A in Mice Infected with *Babesia microti*. *J. Vet. Med. Sci.*, 74: 241-5, 2012. doi: 10.1292/jvms.11-0036
15. Altangerel, K., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Battur, B., Ueno, A., Igarashi, I., and Yokoyama, N.: Phylogenetic relationships of Mongolian *Babesia bovis* isolates based on the merozoite surface antigen (MSA)-1, MSA-2b, and MSA-2c genes. *Vet. Parasitol.*, 184: 309-316, 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.09.021
16. Li, Y., Terkawi, M. A., Nishikawa, Y., Aboge, G. O., Luo, Y., Ooka, H., Goo, Y.-K., Yu, L., Cao, S., Sun, Y., Yamagishi, J., Masatani, T., Yokoyama, N., Igarashi, I., and Xuan, X.: Macrophages are critical for cross-protective immunity conferred by *Babesia microti* against *Babesia rodhaini* infection in mice. *Infect. Immun.* 80: 311-320, 2012. doi: 10.1128/IAI.05900-11
17. Asada, M., Tanaka, M., Goto, Y., Yokoyama, N., Inoue, N., and Kawazu, S.: Stable expression of green fluorescent protein and targeted disruption of thioredoxin peroxidase-1 gene in *Babesia bovis* with the WR99210/*dhfr* selection system. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 181: 162-170, 2012. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.11.001
18. Terkawi, M., A., Alhasan, H., Huyen, N. X., Sabagh, A., Awier, K., Cao, S., Goo, Y.-K., Aboge, G., Yokoyama, N., Nishikawa, Y., Kalb-Allouz, A. K., Tabbaa, D., Igarashi, I.,

- and Xuan, X.: Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from central region of Syria. *Vet. Parasitol.*, 187: 307-11, 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.12.038
19. Sivakumar, T., Altangerel, K., Battsetseg, B., Battur, B., Aboulaila, M., Munkhjargal, T., Yoshinari, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Genetic detection of *Babesia bigemina* from Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene-based PCR assay. *Vet. Parasitol.*, 187: 17-22, 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.01.008
 20. Aboulaila, M., Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Ueno, A., Nakano, Y., Yokoyama, M., Yoshinari, T., Nagano, D., Katayama, K., EL-Bahy, N., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Apicoplast-targeting antibacterials inhibit the growth of *Babesia* parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56: 3196-206, 2012. doi: 10.1128/AAC.05488-11
 21. Sivakumar, T., Tagawa, M., Yoshinari, T., Ybañez, A. P., Igarashi, I., Ikehara, Y., Hata, H., Kondo, S., Matsumoto, K., Inokuma, H., and Yokoyama, N.: PCR Detection of *Babesia ovata* from Cattle Reared in Japan and Clinical Significance of Co-Infection with *Theileria orientalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 50: 2111-3, 2012. doi: 10.1128/JCM.00220-12
 22. Terkawi, M. A., Alhasn, H., Ueno, A., Katthanaphart, J., Luo, Y., Cao, S., Kamyngkird, K., Aboulaila, M., Youn-Kyoung, G., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: C-terminal region of 48-kDa rhoptry protein for serological detection of *Babesia caballi* antibodies in horses. *Parasitol. Int.*, 61: 493-6, 2012. doi: 10.1016/j.parint.2012.02.006
 23. Asada, M., Goto, Y., Yahata, K., Yokoyama, N., Kawai, S., Inoue, N., Kaneko, O., and Kawazu, S.-I.: Gliding Motility of *Babesia bovis* Merozoites Visualized by Time-Lapse Video Microscopy. *PLoS ONE*, 7: e35227, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0035227
 24. Munkhjargal, T., Aboulaila, M., Terkawi, M.A., Sivakumar, T., Ichikawa, M., Davaasuren, B., Nyamjargal, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Inhibitory effects of pepstatin A and mefloquine on the growth of *Babesia* parasites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 87: 681-8, 2012. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0218
 25. Aboulaila, M., Terkawi, M. A., Seuseu, F. J., Ota, N., de Macedo, A. C., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: Expression and immunological characterization of the heat shock protein-70 homologue from *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.*, 190:401-10, 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.06.035
 26. Munkhjargal, T., Aboulaila, M., Ueno, A., Sivakumar, T., Nakano, Y., Yokoyama, M., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Cloning and characterization of histone deacetylase from *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, 190: 423-33, 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.06.026
 27. Sivakumar, T., Kothalawala, H., Abeyratne, S. A., Vimalakumar, S. C., Meewewa, A. S., Hadirampela, D. T., Puvirajan, T., Sukumar, S., Kuleswarakumar, K., Chandrasiri, A. D., Igarashi, I., and Yokoyama N.: A PCR-based survey of selected *Babesia* and *Theileria* parasites in cattle in Sri Lanka. *Vet. Parasitol.*, 190: 263-7, 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.05.014
 28. Cao, S., Aboge, G.O., Terkawi, M.A., Yu, L., Kamyngkird, K., Luo, Y., Li, Y., Goo, Y.K., Yamagishi, J., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Suzuki, H., Igarashi, I., Maeda, R., Inpankaew, T., Jittapalapong, S., and Xuan, X.: Molecular detection and identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in northern Thailand. *Parasitol. Res.*, 111: 1259-66, 2012. doi: 10.1007/s00436-012-2960-4
 29. Chiou, S.-P., Yokoyama, N., Igarashi, I., Kitoh, K., and Takashima, Y.: Serum of *Babesia rodhaini* Infected Mice down Regulates Catalase Activity of Healthy Erythrocyte. *Exp. Parasitol.*, 132: 327-33, 2012. doi: 10.1016/j.exppara.2012.08.004
 30. Kumar, S., Yokoyama, N., Kim, J.-Y., Bork-Mimm, S., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I., and Sugimoto, C.: *Theileria equi* merozoite antigen-2 interacts with actin molecule of equine erythrocyte during their asexual development. *Exp. Parasitol.*, 132: 508-12, 2012. doi: 10.1016/j.exppara.2012.09.013
 31. Terkawi, M. A., Huyen, N. X., Wibowo, P. E., Seuseu, F. J., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y.-K., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: Spherical body protein 4 is a new serological antigen for the global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, 18: 337-342, 2011. doi: 10.1128/CVI.00388-10
 32. Terkawi, M. A., Huyen, N. X., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y. K., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., Xuan, X., and Igarashi, I.: Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet. Parasitol.*, 178: 201-207, 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.041
 33. Terkawi, M. A., Seuseu, F. J., Eko-Wibowo, P., Huyen, N. X., Minoda, Y., Aboulaila, M., Kawai, S., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 178: 40-45, 2011. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.02.006
 34. Terkawi, M. A., Thekisoe, O. M. M., Katsande, C., Latif, A. A., Mansb, B. J., Matthee, O., Mkize, N., Mabogoane, N., Marais, F., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: Serological survey of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle in South Africa. *Vet. Parasitol.*, 182: 337-342, 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.047
 35. Aboulaila, M., Terkawi, M. A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: *In vitro* growth inhibitory effect of (-)-Epigallocatechin-3-gallate from green tea on the growth of equine *Babesia* parasites. *J. Protozool. Res.*, 21: 30-35, 2011. <http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/journal.html>
 36. Aboulaila, M., Nakamura, K., Govind, Y., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Evaluation of the *in vitro* growth-inhibitory effect of

- epoxomicin on *Babesia* parasites. *Vet. Parasitol.*, 167: 19-27, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.049
37. Aboulaila, M., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, 169: 45-50, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.013
 38. Aboulaila, M., Sivakumar, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitol. Int.*, 59: 278-282, 2010. doi: 10.1016/j.parint.2010.02.006
 39. Iseki, H., Zhou, L., Kim, C., Inpankaew, T., Sununta, C., Yokoyama, N., Xuan, X., Jittapalpong, S., and Igarashi, I.: Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. *Vet. Parasitol.*, 170: 193-196, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.038
 40. Aboulaila, M., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. *Vet. Parasitol.*, 172: 65-70, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.04.011
 41. Yokoyama, N., Ikehara, Y., Tiwananthagorn, W., Ota, N., Igarashi, I., Kojima, N., Taguchi, O., and Tsujimura, K.: Differences in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell-depletion between *Babesia microti* and *Babesia rodhaini* infections in mice. *J. Protozool. Res.*, 20: 20-30, 2010. <http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201102212717857027>

(すべて査読有)

[学会発表](計28件)

1. Salama, A., Aboulaila, M., Terkawi, M., Ahmed, M., Ahmed, E., Allaam, M., 横山直明、五十嵐郁男: Inhibitory effect of allicin on the growth of *Babesia* and *Theileria* equi parasites. 第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20~22日、岐阜大学。
2. 麻田正仁、Carlos, S., 薄井美帆、後藤康之、横山直明、井上昇、矢幡一英、金子修、河津信一郎: *Babesia bovis* チオレドキシシンペルオキシターゼ BbTPx-1 ノックアウト原虫は活性酸素種負荷に対する感受性が上昇する。第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月20~22日、岐阜大学。
3. 五十嵐郁男、Terkawi, M.A., 横山直明: Discovery of a new *Babesia bovis* thrombospondin-related anonymous protein as a novel blood-stage vaccine candidate. 第82回日本寄生虫学会大会、2013年3月29~31日、東京医科歯科大学。
4. 麻田正仁、後藤康之、矢幡一英、横山直明、井上昇、金子修、河津信一郎: バイオイメーシングによる *Babesia bovis* メロゾイト滑走運動の研究。第82回日本寄生虫学会大会、2013年3月29~31日、東京医科歯科大学。
5. Sivakumar, T., 横山直明、五十嵐郁男: Molecular epidemiology and clinical significance of *Theileria orientalis* and *Babesia ovate* in cattle. 第155回日本獣医学会学術集会、2013年3月28~30日、東京大学。
6. 横山直明、長野太輔、Sivakumar, T., 五十嵐郁男: MSA-1 gene-based genetic diversity of *Babesia bovis* detected from cattle populations in Thailand, Brazil, and Ghana. 第155回日本獣医学会学術集会、2013年3月28~30日、東京大学。
7. 五十嵐郁男、Munkhjargal, T., Sivakumar, T., 横山直明: Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. 第155回日本獣医学会学術集会、2013年3月28~30日、東京大学。
8. Yabanez, A.P., Sivakumar, T., 井上昇、松本高太郎、猪熊壽、横山直明: Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. 第155回日本獣医学会学術集会、2013年3月28~30日、東京大学。
9. Sivakumar, T., 五十嵐郁男、横山直明: Epidemiology of bovine *Babesia* and *Theileria* parasites in Sri Lanka. 第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14~16日、岩手大学。
10. Aboge, G.O., 曹世諾、Terkawi, T., 正谷達膳、具潤景、横山直明、五十嵐郁男、西川義文、鈴木宏志、玄学南: Validating M17 leucine aminopeptidase of *Babesia* parasite as a molecular drug target. 第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14~16日、岩手大学。
11. 麻田正仁、薄井美帆、後藤康之、横山直明、井上昇、河津信一郎: H₂O₂ 蛍光プローブを用いたバベシア原虫細胞内酸化ストレスの可視化。第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14~16日、岩手大学。
12. Aboulaila, M., Terkawi, M., Fasso, J., Ohta, N., Caine, A., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: Expression and immunological characterization of the heat shock protein-70 homologue from *Babesia bigemina*. 第154回日本獣医学会学術集会、2012年9月14~16日、岩手大学。
13. Salama, A., Aboulaila, M., Mousa, A., Nayel, M.A., El-Sify, A., Terkawi, M.A., Hassan, H.Y., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Evaluation of *in vitro* inhibitory effect of fusidic acid on *Babesia* parasites. 第53回日本熱帯医学会大会、2012年9月5~6日、とちぎプラザ。
14. Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Nyamjargal, T., Purevtseren, B., Bayarsaikhan, D., Battur, B., Byambaa, B., Aboulaila, M., Terkawi, M.A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. 第53回日本熱帯医学会大会、2012年9月5~6日、とちぎプラザ。
15. Aboulaila, M., Terkawi, M.A., Susso, J.F., Ohta, N., deMacido, A.C., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Characterization of *Babesia bigemina* heat shock protein-70. 第53回日本熱帯医学会大会、2012年9月5~6日、とちぎプラザ。
16. 横山直明、Altangerel, K., Sivakumar, T., Battsetseg, B., Battur, B., 上野晃生、五十嵐郁男: Phylogenetic relationships of Mongolian *Babesia bovis* isolates based on the merozoite surface antigen (MSA)-1, MSA-2b, and MSA-2c genes. 第153回日本獣医学会学術集会、2012年3月27~29日、大宮ソニックシティ。
17. Sivakumar, T., 田川道人、吉成健志、五十嵐郁男、池原讓、秦寛、近藤誠司、松本高太郎、猪熊壽、横山直明: PCR detection of *Babesia ovata* from cattle reared in Japan and clinical significance of co-infection with *Theileria orientalis*. 第153回日本獣医学会学術集会、2012年3月27~29日、大宮ソニック

- クシティ。
18. 吉成健志、Sivakumar, T., 玄学南、五十嵐郁男、横山直明: Evaluation of a diagnostic PCR assay for the global detection of *Babesia ovata* in cattle. 第 153 回日本獣医学会学術集会、2012 年 3 月 27~29 日、大宮ソニックシティ。
 19. 麻田正仁、田中みほ、菅沼啓輔、後藤康之、川合寛、横山直明、井上昇、河津信一郎: パベシア原虫における遺伝子操作技術の確立とバイオイメージングへの応用。第 153 回日本獣医学会学術集会、2012 年 3 月 27~29 日、大宮ソニックシティ。
 20. Munkhjargal, T., Aboulaila, M., Sivakumar, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Cloning and characterization of histone deacetylase from *Babesia bovis*. 第 81 回日本寄生虫学会大会、2012 年 3 月 23~24 日、兵庫医科大学。
 21. Aboulaila, M., Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Ueno, A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Antibacterials target the apicoplast housekeeping machinery inhibited the growth of *Babesia* parasites. 第 81 回日本寄生虫学会大会、2012 年 3 月 23~24 日、兵庫医科大学。
 22. 麻田正仁、薄井美帆、後藤康之、横山直明、井上昇、河津信一郎: パベシア原虫細胞内酸化ストレスの可視化。第 81 回日本寄生虫学会大会、2012 年 3 月 23~24 日、兵庫医科大学。
 23. 五十嵐郁男、Ratthanophart, J., Terkawi, M. A., 玄学南、横山直明: Molecular characterization of a new *Babesia bovis* thrombospondin-related anonymous protein (BbTRAP2). 第 52 回日本熱帯医学会大会、2011 年 11 月 4~6 日、東京大学。
 24. Sivakumar, T., Altangerel, K., Battsetseg, B., Battur, B., Aboulaila, M., Munkhjargal, T., 横山直明、五十嵐郁男: Development and evaluation of *Babesia bigemina*-specific nested PCR method based on the gene encoding apical membrane antigen-1 (AMA-1). 第 152 回日本獣医学会学術集会、2011 年 9 月 19~21 日、大阪府立大学。
 25. 麻田正仁、田中みほ、後藤康之、横山直明、井上昇、河津信一郎: Green fluorescent protein 発現パベシア原虫を用いたバイオイメージング実験系の確立。第 80 回日本寄生虫学会大会、2011 年 3 月 29~30 日、東京慈恵会医科大学。
 26. Terkawi, A., Ueno, A., Goo, Y.-K., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: An improved immunochromatographic test based on the C-terminal 48-kDa rhoptry protein for rapid detection of *B. caballi* infection in horses. 第 80 回日本寄生虫学会大会、2011 年 3 月 29~30 日、東京慈恵会医科大学。
 27. Terkawi, M.A., Seuseu, J., Wibowo, P., Aboulaila, M., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: Validation and evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of *Babesia bovis* infection. 第 79 回日本寄生虫学会大会、2010 年 5 月 20~21 日、旭川市大雪クリスタルホール。
 28. 河津信一郎、田中みほ、後藤康之、横山直明、玄学南、井上昇: GFP 発現パベシア原虫作製の試み。第 79 回日本寄生虫学会大会、2010 年 5 月 20~21 日、旭川市大雪クリスタルホール。

〔図書〕(計 1 件)

Xuan, X., Inoue, N., Suzuki, H., Yokoyama, N., Fukumoto, S., Igarashi, M., and Nishikawa, Y. (分担執筆) (2011): Veterinary Protozoology. P141-165, In Textbook of Food Safety and Animal Health, Kono, H., Nishida,

T., Nishikawa, Y., Fukuda, K., Kanayama, T., and Umetsu, K. (eds.), Textbook Editorial Committee of Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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

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