

C. 日本獣医寄生虫学会

シンポジウム

4月1日(火) 13:00~15:00 第10会場

C-S-1-4

最近のコクシジウム症

4月1日 13:00-15:00

齊藤康秀 (麻布大)

C-S-1 人のコクシジウム症
松井利博¹

(¹杏林大・医・感染症)

C-S-2 牛のコクシジウム症
小田憲司¹

(¹畜産安全研)

C-S-3 豚のコクシジウム - - 最近の報告から - -
志村亀夫¹

(¹動衛研)

C-S-4 鶏のコクシジウム症
大永博資¹

(¹日生研)

一般口演

4月1日(火)(8:50 -) 9:00~12:10 第10会場

C-1-19

4月1日 9:00-9:40

野上貞雄 (日大)

C-1 テニア科条虫類の遺伝子同定法開発の試み
野中成晃¹、江越健太郎¹、奥祐三郎¹、神谷正男¹

(¹北大・獣医・寄生虫)

C-2 ペットにおけるエキノコックス感染状況調査(1997~2002年)
神谷正男¹、野中成晃¹、奥祐三郎¹、安東聡子¹、立花徹²、玉井聡²

(¹北大・獣医・寄生虫、²北小獣)

C-3 都市周辺部におけるエキノコックス感染源対策 - 小樽における野生キツネへの集団駆虫の試み -
井上貴史¹、大出武²、金井祐太¹、巖城隆¹、水野文子¹、野中成晃¹、奥祐三郎¹、神谷正男¹

(¹北大・獣・寄生虫、²北海道猟友会小樽支部)

C-4 北海道のエキノコックス感染源対策-駆虫薬入りバイト散布法の検討-
奥祐三郎¹、巖城隆¹、野中成晃¹、金井祐太¹、水野文子¹、神谷正男¹(¹北大・獣医・寄生虫)

4月1日 9:40-10:20

早崎泰夫 (山口大)

C-5 東京の荒川河川敷で採集したクロベンケイガニからの大平肺吸虫メタセルカリアの検出
杉山広¹、森嶋康之¹、川中正憲¹、亀岡洋祐² (¹感染研・寄生動物、²感染研・遺伝子資源)

C-6 スリランカの象から採取された肝蛭類(*Fasciola*属)のミトコンドリアゲノム解析
佐藤雪太¹、鈴木牧¹、石上盛敏²、Rajapakse R.P.V.J.³、Perera B.V.P.⁴、湯川眞嘉¹、吾妻健²
(¹日大・獣医・実験動物、²高知医大・環境保健、³Univ. Peradeniya・スリランカ共和国、⁴Dept. Wildlife Conservation・スリランカ共和国)

C-7 犬糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) 抽出物ショックにおける原因物質の解明について
太田緑¹、足立吉数¹、小川恭喜¹ (¹茨大・農)

C-8 *Setaria* 属線虫に特異的な 73 kDa 蛋白質の虫体内局在
石田哲平¹、小川恭喜¹、中島弘美¹、足立吉数¹ (¹茨城大学農学部)

4月1日 10:20 -11:00

藤崎幸蔵 (帯畜大)

C-9 ヤクに寄生するウシバエの第三期幼虫の走査型電顕的観察
李偉¹、那須哲夫¹、馬有泉²、朱喜艶¹、牧村進¹ (¹宮崎大・農、²青海大学青海畜牧獣医科学院)

C-10 Cloning, expression and characterization of a *Haemaphysalis longicornis* calreticulin gene
ダシルバ バスイタバジャラ¹、中島千絵¹、大橋和彦¹、小沼操¹ (¹北海道大・獣医・感染症)

C-11 人工吸血によって *Ornithodoros moubata* に摂取された GFP *Escherichia coli* の中腸内における動態
大古田佳子¹、松尾智英¹、井上昇¹、藤崎幸蔵¹ (¹帯畜大・原虫研)

C-12 *Ornithodoros moubata* 成ダニにおける抗ヘモサイト単クローン抗体作製およびその殺ダニ効果
松尾智英¹、井上昇¹、塚本大輔²、藤崎幸蔵¹ (¹帯畜大・原虫研、²農水省)

4月1日 11:00 -11:40

長澤秀行 (帯畜大)

C-13 リーシュマニアの新規 MDR 型 ABC トランスポーターの発現と細胞内局在
片倉賢¹、鈴木守¹、金子修²、鳥居本美²、藤瀬 浩³、橋口義久⁴
(¹群馬大学・医・寄生虫、²愛媛大・医・寄生虫学、³麻布大・獣医・病態生化学、⁴高知医大・寄生虫学)

C-14 Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP)法を用いたアフリカトリパノソーマ
検出法の確立
久保木基高¹、井上昇¹、櫻井達也¹、鈴木宏志¹、杉本千尋¹、五十嵐郁男¹ (¹帯畜大・原虫研)

C-15 *Trypanosoma congolense* 抵抗性および感受性マウスの肝における遺伝子発現の比較
中村義男¹、ナッセンズヤン²、キールシュタインソニア²、ギブソンジョン²、イラクフィアド²
(¹国際農研センター、²国際家畜研究所)

C-16 動物より分離した *Giardia duodenalis* の遺伝子型
板垣匡¹、栗林一博¹、伊藤直之²、青木美樹子¹、佐藤直人³
(¹岩手大・農・寄生虫病、²かもめ獣医科医院、³岩手県環境保健研究センター)

4月1日 11:40 -12:10

片倉賢 (群馬大)

C-17 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 2-Cys 型ペルオキシレドキシンの原虫細胞内寄生性
成立における役割の解析
駒木-安田加奈子¹、河津信一郎²、池ノ上望¹、狩野繁之¹
(¹国立国際医療センター・研究所、学振・科技特、²国立国際医療センター・研究所)

C-18 トキソプラズマ原虫感染における自然免疫機構の解析
古田隆久¹、菊地たかね¹、吉川泰弘² (¹東大医科研・感染遺伝学、²東大院・農・実験動物)

C-19 トキソプラズマにおけるコレステロール代謝関連遺伝子の同定及び解析
西川義文¹、Quittnat Friede²、Stedman Timothy²、Joiner Keith²、Coppens Isabelle²
(¹帯広畜産大学原虫病研究センター、²Yale University School of Medicine)

4月1日(火) 15:10~18:10 第10会場
C-20-37

4月1日 15:10-15:50

中井裕 (東北大)

- C-20 PCR-DGGE法を用いた環境サンプルからの *Cryptosporidium* の検出
佐藤正明¹、佐々木貴子¹、中井裕¹ (¹東北大・院・農)
- C-21 日本の豚におけるクリプトスポリジウム遺伝子型の解析
河本麻理子¹、川島健司¹、勝田賢¹、恒光裕¹、寺田裕¹ (¹動衛研・七戸)
- C-22 抗 *Eimeria* 鶏型モノクローナル抗体の *Cryptosporidium* との交差反応性と宿主細胞への侵入抑制効果
松林誠¹、笹井和美²、木俣勲³、中西輝雄¹、谷浩行²、井関基弘⁴、Lillehoj H. S.⁵、馬場栄一郎²
(¹大阪女子学園短大、²大阪府立大・獣医内科、³大阪市立大・医動物、⁴金沢大・寄生虫、⁵U.S.D.A.)
- C-23 ニワトリ由来 *Cryptosporidium* sp. の分子生物学的手法による種の同定
木村明生¹、鈴木定彦¹、松井利博²
(¹大阪府公衛研・医動物、²大阪府公衛研・病理、³杏林大・医・感染症)

4月1日 15:50-16:10

神尾次彦 (動衛研)

- C-24 PCRを用いたフタトゲチマダニ唾液腺内の小型ピロプラズマ原虫遺伝子検出法の検討
寺田裕¹、大田方人¹、金平克史¹、河本麻理子¹、神尾次彦¹ (¹動衛研)
- C-25 *Babesia odocoilei* または *Babesia divergens* に近縁な *Babesia* DNA のヤマトマダニからの検出
吉崎友佳子¹、猪熊壽¹、島田洋二郎²、坂田義美³、奥田優¹、大西堂文¹
(¹山口大・農、²(株)ゼノアック、³メリアル・ジャパン(株))

4月1日 16:10-16:40

五十嵐郁男 (帯畜大)

- C-26 Cloning and characterization of 3 novel cDNA encoding for cysteine protease-like proteins from *Theileria orientalis*
何偉勇¹、大橋和彦¹、杉本千尋²、小沼操¹ (¹北海道大・獣医・感染症、²帯畜大・原虫研)
- C-27 Expression and immunological characterization of a novel antigenic protein 'ToORFb' gene of *Theileria orientalis*
金廷娟¹、横山直明¹、クマールサンジャイ¹、井上昇¹、藤崎幸藏¹、杉本千尋¹
(¹帯畜大・原虫病研究センター)
- C-28 IFN- γ によるウシ小型ピロプラズマの増殖抑制
馬場智久¹、萩原 克郎¹、徳田雅史¹、山中仁木¹、桐沢力雄¹、岩井滋¹ (¹酪農大・獣医微生物)

4月1日 16:40-17:00

杉本千尋 (帯畜大)

- C-29 *Babesia microti* および *Babesia rodhaini* 感染マウス赤血球におけるグルコース取り込み機構
福田尋充¹、大森崇¹、松木直章¹、小野憲一郎¹ (¹東大・獣医臨床病理)
- C-30 Evaluation of the Antiprotozoan Drugs, Clotrimazole, Ketoconazole, and Clodinafop-propargyl, against the *In Vitro* Growth of *Babesia* Parasites
ポルクサビーネ¹、横山直明¹、松尾智英¹、クラベリアアフローレシア¹、藤崎幸藏¹、五十嵐郁男¹
(¹帯畜大・原虫病研究センター)

4月1日 17:00 -17:30

河津信一郎 (国際医療セ)

- C-31 High-level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential in immunodiagnosis
黄曉紅¹、玄 学南¹、横山直明¹、鈴木宏志¹、杉本千尋¹、長澤秀行¹、藤崎幸蔵¹、五十嵐郁男¹
(¹帯広大・原虫研)
- C-32 Stage-Specific Expression of *Babesia equi* EMA-1 and -2 in the Merozoite Developmental Cycle in Erythrocytes
KumarSanjay¹、横山直明¹、キムジョンヨン¹、ファンシャホン¹、井上昇¹、玄学南¹、五十嵐郁男¹、杉本千尋¹
(¹帯畜大・原虫研センター)
- C-33 *Babesia caballi* 53 kDa タンパク質の発現
筏井宏実¹、塚田竜介¹、高城良子¹、玄学南²、工藤上¹、小山田隆¹、五十嵐郁男²
(¹北里大・獣医寄生虫、²帯畜大・原虫研)

4月1日 17:30 -18:10

松本芳嗣 (東大)

- C-34 抗バベシアギブソニーP50 蛋白血清は、本原虫に対する増殖抑制活性を示す
福本晋也¹、玄学南¹、鈴木宏志¹
(¹帯広大・原虫研)
- C-35 *Babesia gibsoni* 培養上清抗原および培養メロゾイト抗原の防御免疫効果
須永藤子¹、杉山大樹¹、柏原さやか¹、小久保聖子¹、早瀬理恵¹、並河和彦¹、菅野康則¹
(¹麻布大・伝染病)
- C-36 培養 *Babesia gibsoni* メロゾイトの生ワクチンとしての可能性
須永藤子¹、清谷萬里¹、小嶋友子¹、正道依理子¹、並河和彦¹、菅野康則¹ (¹麻布大・伝染病)
- C-37 ヘパリンによるバベシア原虫メロゾイトの赤血球侵入阻害について
横山直明¹、ボルクサビーネ¹、池原譲²、クマールサンジャイ¹、杉本千尋¹、五十嵐郁男¹
(¹帯畜大・原虫研センター、²愛知がんセンター・腫瘍病理)

C-S-1 人のコクシジウム症

松井利博¹
(¹杏林大・医・感染症)

ヒトを終宿主として寄生するコクシジウムには、*Cryptosporidium*属の *C. parvum* と *C. muris*、*Cyclospora*属の *C. cayetanensis*、*Isospora*属の *I. belli*、*Sarcocystis*属の *S. hominis* と *S. suis* の4属6種が知られている。日本で患者から認められたのは *C. parvum*、*C. cayetanensis* および *I. belli* の3種で、いずれも水溶性の下痢と発熱（微熱・高熱）が主症状である。症例としては前者が約30例、後2者が10から数十例報告され、数年前から増加傾向がみられるが、一般検診などの調査はなく、報告されていない症例や、コクシジウムに対する検査可能な機関が少ないことから誤診による症例もかなりあるものと考えられ、推定患者数は不明である。*C. parvum* では水系感染による集団発症が最も重要視されており、1994年に平塚市の雑居ビルの関係者461人が、1996年には越生町の町民8,812人が水道水からの感染で下痢や腹痛を呈した。この他原因は不明だが、2002年に北海道へ修学旅行に出かけた洲本市の高校生と教職員が帰宅後に、また宿泊施設でオリエンテーションを行った札幌市内の専門学校新入生と教職員が札幌にもどった後に集団発症したとの報告がある。*C. cayetanensis* では、現在のところ患者はすべて海外旅行による旅行者感染症で、国内感染の報告は見当たらない。*I. belli* では下痢と改善を繰り返すのが特徴で、成人T細胞白血病の患者に多く検出されている。これらの症例の一部を紹介し、実験動物感染試験の成績を加えて報告する。

C-S-3 豚のコクシジウム - -最近の報告から - -

志村亀夫¹
(¹動衛研)

豚のコクシジウムは、病原性の明瞭な鶏や牛のそれに比べて重要度が低いと見なされて、情報が少ない。インターネットで [pig,coccidia] を文献検索すると、1965年以降で462報がヒットするが、うち約200報はトキソプラズマで、他にクリプトスポリジウムやサルコシスティスがあり、狭義のコクシジウムは100報以下である。豚固有のコクシジウムには、*Eimeria* 9種、*Isospora* 3種がある。*I. suis* は、近年病原種として注目されており、我が国でも広島、長崎、秋田、千葉などでは乳豚の下痢症として報告され、現在でも散発的に発生がみられる。発症は1-2週齢のほ乳豚が中心で、オオシスト保有率は20-60%になる。諸外国での調査では、1週齢で保有率の低い農場では3週齢でも低い傾向があり、中小規模の農場で発生率が高い。また、豚房の床の性状によって発生率は異なっている。実験感染では、下痢の発生は、免疫的な抵抗力よりもAge factorに強い関連があり、オオシスト排出は感染数に関係なくOPGは最大で100,000程度であり、3,000個のオオシスト感染で斃死が認められている。toltrazurilを3または6日齢で投与した豚では、コクシジウム症の発生が71%から22%に、うち*I. suis*感染は84%から6%に減少し、抗生物質の投与回数や下痢期間の短縮が認められている。*I. suis*の人工培養が可能になったことから今後対策などでの研究の進展が期待できる。豚のコクシジウムで注目すべきは、人にも感染するとされていた*Cryptosporidium parvum* genotype1がノトバイオートの子豚に感染するとされた点で、豚のコクシジウムについては今後も注意が必要である。

C-S-2 牛のコクシジウム症

小田憲司¹
(¹畜産安全研)

牛のコクシジウムは、牛下痢症の重要な原因の一つとして知られ、世界各地に広く分布し、その経済的損失も大きい。日本でも、家畜衛生技術指導事業の報告によると、近10年間における牛のコクシジウム症は、毎年80~100戸で200~300頭の発生があり、死産率は10~20%となっている。これに加えて寄生虫、ウイルスあるいは細菌性腸炎との合併症が毎年10件程度みられる。1980年代までの牛のコクシジウム症の発生は年間50戸に満たなかったことから、近年の集約化に伴ってその発生は増加する傾向にあると考えられる。牛のコクシジウムのうち、出血性下痢を起こす*E. bovis*と*E. zuernii*が病原性種として知られ、症例に関する報告もほとんどが両種のいずれかによるものである。しかし、その他の種も非出血性下痢の原因となることが確認されており、これらを含めれば、実際の発生数は一般に認識されているものよりはるかに多いと考えられる。牛のコクシジウムは極めて高頻度に認められ、生後1年以内にほぼ100%の牛が感染を受けていると考えられる。しかし、日本では牛のコクシジウム症の予防剤として実用化されているものではなく、感染を防止することは現実的に不可能である。牛のコクシジウムの発症要因はまだまだ十分に解明されていないが、発症の過程にはオーシストの摂取数だけでなく、環境要因が大きく関与している。高い飼育密度は感染の伝播を助長し、離乳や移動等の飼育環境の変化によるストレスが発症の危険性を増大させる。従って、飼育環境の整備と特に離乳後の飼育密度の調整などによって、発症をある程度コントロールできる可能性がある。発症要因についての調査・研究が望まれる。

C-S-4 鶏のコクシジウム症

大永博資¹
(¹日生研)

鶏のコクシジウム症は原虫寄生による腸炎であり、通常、ブロイラーおよび種鶏で発生し、飼料要求率の低下、死亡率の上昇、産卵率の低下などを起こす養鶏産業における重要疾病である。原虫は7種類が知られているが、病原性が強く、産業上問題視されるものは*Eimeria tenella*、*E. acervulina*、*E. maxima*および*E. necatrix*である。前の3種はブロイラー及びその他の鶏種においてごく一般的であるが、*E. necatrix*による発病は長期間の飼育鶏で中離期以降に見られる。原虫の蔓延は世界中に及び、原虫の諸性状に感染源となるオーシストの諸種消毒剤に対する抵抗力の強さから絶滅のはなはだ困難な疾病と理解されている。診断は、血便、臨床症状、腸の病変、オーシスト排泄状況などにより実施されるが、分離した原虫種の同定等に関しては最近PCRが使用できるようになった。また、*E. necatrix*の感染確認については組換え蛋白抗原を用いた特異的ELISAが開発されている。本病予防には良好な衛生管理が不可欠であり、これに加え、ブロイラーでは飼料添加の予防剤、主にイオン透過担体抗生物質が広範に用いられている。しかし新薬開発の困難性から、今後多品目の出現は望めず、これに反し、諸種の生ワクチンが登場している。国内でも、6年前から*Eimeria tenella*、*E. acervulina*、*E. maxima*の弱毒株を用いた3価生ワクチンが一部のブロイラーに使用されてきた。また最近、*E. necatrix*に対する弱毒生ワクチンも開発され、実用に供しうることとなった。

C-1 テニア科条虫類の遺伝子同定法開発の試み

野中成晃¹、江越健太郎¹、奥祐三郎¹、神谷正男¹
(¹北大・獣医・寄生虫)

重要な人獣共通寄生虫である多包条虫が含まれるテニア科条虫類は、虫卵が形態的に類似しているため虫卵検査による種の同定ができない。そのため、遺伝子を利用したテニア科条虫類の同定法の開発を試みた。

候補遺伝子として、ミトコンドリアの COI 領域を選定し、*Echinococcus* 属 3 種 8 株および *Taenia* 属 7 種 22 株を用いて、それぞれの遺伝子に対するプライマーセットを利用してダイレクト PCR を試みた。その結果、虫種・株によらず約 450bp の増幅産物が得られた。そこで、用いた条虫全ての塩基配列を決定し、その配列をもとに多包条虫特異的なプライマー-E.mSP-1A、E.mSP-1B を構築し、PCR で検証した。その結果、全ての多包条虫 (5 株) で増幅を確認し、他のテニア科条虫では増幅は認められなかった。また、得られた塩基配列をもとに種特異的に PCR 産物を切断する制限酵素を検索し、多包条虫、猫条虫 (2 系統)、胞状条虫、*Taenia crassiceps* を特定しうる制限酵素を選定した。この中で、猫から検出される頻度の高い猫条虫の 2 系統に対する制限酵素 *EagI*、*XhoI* を選出し、PCR-RFLP を試みた。*EagI* により一つの系統は約 260bp と約 200bp に切断され、*XhoI* により他の系統は約 280bp と約 170bp に切断された。他のテニア科条虫では全く切断されず、猫条虫の系統鑑別も含めた特異的同定法として有用であることが示唆された。

以上の結果から多包条虫と猫条虫が他のテニア科条虫種と DNA で鑑別可能であることが示唆された。

C-2 ペットにおけるエキノコックス感染状況調査 (1997~2002年)

神谷正男¹、野中成晃¹、奥祐三郎¹、安東聡子¹、立花徹²、玉井聡²
(¹北大・獣医・寄生虫、²北小獣)

多包条虫は終宿主 (キツネや犬) から排泄される虫卵が人への感染源となる。現在、北海道全域でキツネの高率感染が認められ、人との行動圏の重なりにより人やペットの感染リスクが増しており、ペットが人への感染源となることも予想される。

我々は 1997 年より北海道および本州のペット (主に犬・猫) におけるエキノコックス感染状況調査を糞便内抗原および虫卵 (テニア科条虫卵) 検査によって実施してきた。2002 年 12 月までに道内では、犬 1,649 頭の検査を行い、抗原陽性 18 頭、虫卵陽性 6 頭を確認した。虫卵陽性犬はすべて抗原陽性であった。2002 年 12 月には札幌市内の飼犬から陽性例が確認され、初めての室内犬虫卵陽性例となった。この他、2000 年 3 月の有珠山噴火時の避難住民の放逐犬 (>116 頭) から糞便内抗原陽性犬 2 頭を確認している。猫については 170 頭を検査し、抗原陽性 4 頭、虫卵陽性 6 頭を検出しているが、多包条虫卵の排出は認められていない。道外の犬および猫についてはそれぞれ 64 頭および 2 頭の検査を行い、犬 2 頭が抗原および虫卵陽性を示した。このうちの 1 頭は北海道からの移住犬であった。これまでに確認された抗原陽性犬全 22 頭の内、駆虫後の再検査を行ったものは 14 頭で、すべて陰転している。そのうち、駆虫後の再感染に対する追跡検査の依頼のあったものが 3 頭あり、2 頭が陽転 (再感染) した。

感染機会の少ない室内犬の感染例、および再感染例が確認されたことは、北海道でのペットへの高い感染圧を示すものである。アンケート調査では、市部よりも郡部での飼育、屋外飼育、放し飼いが犬の抗原陽性率を高めていることが示唆され、ペットの飼育管理と感染予防の重要性を啓蒙する必要がある。

C-3 都市周辺部におけるエキノコックス感染源対策 - 小樽における野生キツネへの集団駆虫の試み -

井上貴史¹、大出武²、金井祐太¹、巖城隆¹、水野文子¹、野中成晃¹、奥祐三郎¹、神谷正男¹
(¹北大・獣・寄生虫、²北海道猟友会小樽支部)

農村地帯における多包条虫症の感染源対策として、駆虫薬 (ブラジカンテル) 入りベイトの野外散布が実施され、キツネへの駆虫効果が報告されている。今回は都市周辺部でのベイト散布を試み、さらに、個々のキツネによるベイト摂取の確認のため、バイオマーカーとしてテトラサイクリン (TC) をベイトに添加し、ベイト摂取と寄生虫感染状況の関係を調べた。調査期間は 2001 年と 2002 年の 4~10 月で、ベイトは 5~7 月に 2 回調査地域の道路沿いに自動車から 1km あたり 20 個の割合で散布した。駆虫効果の判定は有害鳥獣駆除により捕獲されたキツネの剖検 (2001 年) および直腸便の糞便内抗原検出および虫卵検査 (2001 年および 2002 年) により行った。

2001 年および 2002 年の散布区域でのキツネの多包条虫感染率はそれぞれ、18.5%、14.8% であり、ベイト散布前年 (2000 年) の同区域の感染率 (46.5% および 43.6%) に比べ減少していた。しかし、感染率の年次変動等の影響も考えられ、駆虫薬のみによる影響とは断定できなかった。

ベイト散布後に捕獲されたキツネ 87 検体中 17 検体 (19.5%) の犬歯から TC が検出され、これらのキツネのベイト摂取が確認された。TC 陽性 17 検体のうち、犬歯のラベル像からその年にベイトを摂取したと推測される 15 検体中 14 検体において、多包条虫が感染していないことが剖検と直腸便の検査により確かめられ、散布したベイトの摂取により野生キツネの駆虫がなされたことが示唆された。

今後は、キツネによるベイト摂取率の向上と散布効果の正確な評価のため、ベイト散布方法、ベイト散布回数、バイオマーカーの検出法などを改善する必要がある。

C-4 北海道のエキノコックス感染源対策- 駆虫薬入りベイト散布法の検討 -

奥祐三郎¹、巖城隆¹、野中成晃¹、金井祐太¹、水野文子¹、神谷正男¹
(¹北大・獣医・寄生虫)

近年、北海道の野生動物におけるエキノコックス流行状況は極めて憂慮せざるを得ない状況にあり、今後の患者数の増加が危惧される。我々は、エキノコックスの主たる終宿主である野生のキツネの感染状況を抑えるために、道東のパイロット地区において駆虫薬 (ブラジクアンテル) 入りのベイトの散布を行ってきた。当初 (1998-2000) はキツネの営業穴を調査し、その周辺にベイトを設置し、その効果を野外で採取したキツネの糞便を用いて感染状況を判定して、その有効性を示してきた。2001 年及び 2002 年についてはベイト散布法の簡易化のために、ベイト散布方法を変更し、自動車を用いて道路沿いにベイトを散布することとし、2001 年には道路沿いを 50m 間隔で、2002 年には道路と防風林の交点に散布した。いずれも、散布地区全体では 40 個/平方キロメートルとした。効果は前回と同様に野外で採取したキツネの糞便を用いて判定した。散布区の大さは約 200 平方キロメートル、その周辺のほぼ同じ広さの地域を非散布区とした。2001 年 4 月から 11 月において糞便の虫卵陽性率は非散布区では 2.5% から 20.5% に上昇したが、散布区では 11.7% から 4.9% へと減少した。さらに 2002 年 (4 月、7 月、10 月のみ調査) では、両者の差が維持され、特に散布区において 2002 年 7 月及び 10 月では 0-1.2% と有意に減少した (散布区では 19.5-8.0%)。以上のことから、ベイトの散布を簡易に道路と防風林の交点に限定しても効果があることが示唆された。

C-5 東京の荒川河川敷で採集したクロベンケイガニからの大肺肺吸虫メタセルカリアの検出

杉山広¹、森嶋康之¹、川中正憲¹、亀岡洋祐²
(¹感染研・寄生動物、²感染研・遺伝子資源)

大肺肺吸虫のメタセルカリアは主に西日本を流れる河川のカニから見出されてきたが、関東地方でも千葉県で検出されており、九十九里浜で太平洋に注ぐ河川のカニからの報告がある(横川ら, 1958; 畑ら, 1987)。しかしながら関東の他の地域からは、カニにおける本虫寄生の記録は見当たらない。そこで埼玉県・東京都を流れて東京湾に注ぐ荒川を選び、カニの採集と肺吸虫の検出を試みた。東京都墨田区での調査の結果、クロベンケイガニが容易に採集できる地区が見つかり、しかもここで得た 110 匹のカニのうち 86 匹(78%)に肺吸虫メタセルカリアを認めた。メタセルカリアの検出総数は 858 個で、陽性カニ 1 匹当たりでは平均 10.0 個(最多 64 個)であった。メタセルカリアは楕円形を呈し、その大きさ(内囊の外径)は 302mm x 232mm (50 個平均)で、口吸盤背縁に穿刺棘を、体内内に赤色顆粒を認めた。試験感染ラットから得た成虫は、卵巣が複雑に分岐し、皮棘は群生していた。このようなメタセルカリアと成虫の形態学的特徴から、今回得た虫体を大肺肺吸虫と同定した。東京における本虫の分布状況を明らかにする必要があると考え、荒川流域の各地に調査地を設定して検索を進めている。

C-7 犬糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) 抽出物ショックにおける原因物質の解明について

太田緑¹、足立吉数¹、小川恭喜¹
(¹茨大・農)

【目的】犬糸状虫 (*Dirofilaria immitis*) の抽出物を犬の静脈に接種するとショック症状を起こし時には死に至る事もある。この抽出物接種により血圧の低下、呼吸困難、下痢等が認められ、また、その白血球数、及び血小板数の減少、アルカリフォスファターゼ酵素活性の増加が認められる。犬糸状虫感染犬ヘジエチルカルバマジン等の予防薬が投与された時や、寄生虫の外科的除去時に糸状虫を傷つけ内容物が放出されるとショックが起こる事が報告されており、糸状虫とショックとの関係がエンドトキシンショックやアナフィラキシーショックによるとの報告もある。ショックの原因の解明は感染犬への駆虫薬投与等の病理生理学的問題の解決につながる。そこで、私どもは人の実験モデルとして用いられているウサギに注目し糸状虫抽出物を投与する事でショックの原因の解明を試みた。【方法】犬糸状虫の SDS 抽出物をウサギの皮内に接種し皮膚反応の推移を調査した。さらに、犬糸状虫抽出物を静脈内接種し、その後の血液成分の変化を調査した。【結果】皮内接種を行ったところ、犬糸状虫抽出物による反応が強く現れたが、SDS のみ投与した場合も同様に反応が認められた。犬糸状虫抽出物の静脈内投与後、白血球数、血小板数の急激な減少が起こり、赤血球数はほとんど変動が認められなかった。また、血液中の酵素であるアルカリフォスファターゼは投与直後に減少が認められた。【考察】以上の結果から、ウサギへの糸状虫抽出物の静脈内投与においても犬を用いた報告例と同様な血液学的反応が起きることが確認された。今後はミニプレップセルにより分画したタンパクを投与しそれぞれの反応を比較し、ショックの原因物質の検索を行う予定である。

C-6 スリランカの象から採取された肝蛭類 (*Fasciola* 属) のミトコンドリアゲノム解析

佐藤雪太¹、鈴木牧¹、石上盛敏²、Rajapakse R.P.V.J.³、Perera B.V.P.⁴、湯川真嘉¹、吾妻健²
(¹日大・獣医・実験動物、²高知医大・環境保健、³Univ. Peradeniya・スリランカ共和国、⁴Dept. Wildlife Conservation・スリランカ共和国)

【背景と目的】

肝蛭類は世界各地に分布しており、家畜では反芻動物によく見られる。象などの大型動物では、南アジアのインドゾウで *Fasciola jacksoni* の感染が知られているが、遺伝子解析による *Fasciola* 属内における本寄生虫の類縁関係はまだ整理されていない。

そこで今回、系統関係推定に有効なミトコンドリア DNA (mtDNA) を用いて、肝蛭や他の吸虫類と比較し本寄生虫の分子系統学的位置付けについて検討した。

【材料と方法】

形態学的に *F. jacksoni* と分類された虫体は、2000 年 10 月に Pinnawala Elephant Orphanage で斃死したスリランカ生まれのインドゾウの胆管から採取された。なお、このインドゾウからは住血吸虫類も検出されたが、寄生虫感染と斃死との相関は不明である。70% エタノール中に保存した虫体から、常法に従い DNA を抽出し、肝蛭 mtDNA 塩基配列 (AF216697) に基づきプライマーセットを作成して PCR を行い、増幅産物の塩基配列を決定した。

【結果】

この *F. jacksoni* mtDNA について、これまでに CO1, lrRNA、srRNA および CO2 遺伝子の部分塩基配列を決定することができた。これらの配列を肝蛭 mtDNA と比較した結果、各遺伝子の塩基配列の相同性は、CO1: 86.8% (55/416bp)、lrRNA: 91.4% (46/538bp)、srRNA: 81.2% (141/766bp)、CO2: 82.3% (91/515bp)、これら 4 遺伝子の平均: 85.1% (333/2,235bp) であった() 内数字は塩基置換数/比較塩基数)。

また、CO1 遺伝子の一部について、塩基配列が明らかになっている他の吸虫類と比較したところ、塩基配列の相同性は、日本住血吸虫: 69.1%、マンソン住血吸虫: 64.5%、ウエステルマン肺吸虫: 70.4%、肝吸虫: 65.3% および肝蛭: 86.9% であり、作成した系統樹においても肝蛭と近縁であることが示された。

C-8 *Setaria* 属線虫に特異的な 73 kDa 蛋白質の虫体内局在

石田哲平¹、小川恭喜¹、中島弘美¹、足立吉数¹
(¹茨城大学農学部)

目的: 73 kDa 蛋白質は *Setaria* 属線虫に認められその蛋白質は宿主に対し強い抗原性を有している。その蛋白質の虫体内局在はほとんど知られておらず、興味深い。そこでその局在を調べることが目的に研究を実施した。材料及び方法: 虫体は牛の腹空内から採取し、SDS によって可溶化したものを粗抗原としてイムノブロット及び SDS-PAGE に用いた。またミニプレップセルで分画し SDS-PAGE で一本のバンドとなった画分について精抗原として野外調査に用いた。虫体内の局在はホルマリン固定後薄切片免疫染色し顕微鏡下で調べた。結果及び材料: 精製抗原を用いて野外の動物の血清中 *Setaria* に特異抗体を調べたところ供試血清のほとんどと反応した。この抗原と特異性は *Setaria* 以外の寄生虫を用いて調べたところその反応は *Setaria* のそれよりはるかに弱かった。以上のことから特異的と考えられた。また野外調査中鶏が 73 kDa に対する特異抗体を持っていることが分かったのでその血清を用いて虫体内 73 kDa 蛋白質の局在を免疫化学的に調べたところ迷路のようにぎざぎざの構造 (Basal labyrinth) の部位に当該抗体と強く反応する抗原の存在を確認した。これは 73 kDa 蛋白質がその部位にあることを意味している。この部位がなぜそのような強い抗原刺激を動物に与えるのかについて現在研究中である。

C-9 ヤクに寄生するウシバエの第三期幼虫の走査型電顕的観察

李偉¹、那須哲夫¹、馬有泉²、朱喜龍¹、牧村進¹
(¹宮崎大・農、²青海大学青海畜牧獣医科学院)

中国東チベット地方のヤクはほとんどがウシバエ幼虫症に感染しており、大きな経済的損失をもたらしている。ウシバエ幼虫の駆除のためには、幼虫の形態学的、生理学的特徴を調査することが重要である。今回、演者らは中国青海省で放牧されているヤクに寄生するウシバエ第三期幼虫の形態的特徴を走査型電子顕微鏡で観察した。ヤクの背部から地上に自然落下した第三期幼虫を採取し、グルタルアルおよび四酸化オスミウム溶液で二重固定後、脱水、臨界点乾燥、金蒸着を行って走査型電子顕微鏡で観察した。今回観察した第三期幼虫の形態には以下の3種類のものが見られた。タイプB: 採取した幼虫の5%に見られた。呼吸盤は腎臓又は馬蹄形を呈し、後方に凸面を形成していた。呼吸盤の内側部は漏斗状に窪み、中心に気孔が見られた。また、呼吸盤表面には無数の小さな棘が見られ、棘の基部はスリット状の小孔が見られた。虫体第10節腹面には棘が見られなかった。タイプS: このタイプは全幼虫の90%を占めた。後方の呼吸盤は扁平な腎臓形で、中心部の気孔部は窪んでいなかった。呼吸盤には無数のスリット状の小孔が見られたが小棘は存在しなかった。第10節の腹面には前縁と後縁に棘が見られた。タイプL: 後方の呼吸盤の形態はタイプSとほぼ同じであった。第10節の腹側面の棘は後縁に1列のみ見られた。このタイプは全体の5%に認められた。これまでの報告から、タイプBは *Hypoderma bovis*、タイプLは *Hypoderma lineatum* と思われるが、タイプSはヤクに特有な種類と考えられる。

C-11 人工吸血によって *Ornithodoros moubata* に摂取された GFP *Escherichia coli* の中腸内における動態

大古田佳子¹、松尾智英¹、井上昇¹、藤崎幸蔵¹
(¹帯畜大・原虫研)

Ornithodoros moubata はアフリカに棲息する大型のマダニであり、人獣の重要な疾病を引き起こす様々なウイルスやリケッチアなどのベクターとして知られている。*O. moubata* の生息環境には当然ながら様々な微生物が存在しており、腸内細菌として知られる *Escherichia coli* もその一つである。このような環境に曝されているにもかかわらず、*O. moubata* の腸内の微生物数は非常に少ないことが報告されている。本研究では、*O. moubata* に GFP (Green fluorescent protein) を発現させた *E. coli* をウシ胎子血清に混合して人工吸血によって摂取させ、中腸内における動態を検討した。その結果、蛍光顕微鏡を用いた中腸の凍結切片の観察では摂取後4日目をピークとする *E. coli* 小塊の形成とそれに続く GFP の蛍光の減少が観察され、摂取後16日目には蛍光が認められなくなった。また、中腸各部位ごとの偏在は見られなかった。現在、中腸内で小塊を形成した *E. coli* の微細構造を観察している。さらに、吸血後4日目から24日目まで4日ごとの中腸内内容を寒天培地を用いて培養したところ、GFP *E. coli* のコロニー形成数は漸減していった。加えて、マダニの血球成分であるヘモサイトはダニ自身の免疫機構全般のマーカーとなることから、血リンパにおけるヘモサイト容積率の変化を調べたところ、4日目からの小塊形成と共に容積率は減少し、8日目には *E. coli* 摂取前の平常値の約3割になった。その後16日目には平常値の2倍以上にまで増加し、24日目には元の数値に戻った。

C-10 Cloning, expression and characterization of a *Haemaphysalis longicornis* calreticulin gene

ダシルバ バスイタバジャラ¹、中島千絵¹、大橋和彦¹、小沼操¹
(¹北海道大・獣医・感染症)

The ticks are important parasites which can transmit several pathogens in many areas of the world. The current method for the control of ticks is the use of chemicals, but parasite resistance to these chemicals is a rapidly growing global problem. To overcome this problem, alternative non-chemical methods to control the cattle tick are under development. Calreticulin (CRT) is a Ca-binding protein, which is released by neutrophils during inflammation and inhibits C1q-dependent complement activity. As CRT also demonstrates the anti-coagulant activity by its binding to blood clotting factors IX, X and prothrombin, it might represent one of the components with anti haemostatic activity found in secretory products from blood-feeding parasites. Thus, we report here the isolation, sequence characterization and expression of cDNA coding for a CRT of *Haemaphysalis longicornis*. The CRT cDNA was amplified by PCR from a *H. longicornis* cDNA library using primers designed from conserved regions in the CRT gene of *Boophilus microplus*, and the cloned into the pGEM-T vector. The CRT sequence encodes an 410-amino-acid ORF with 93% similarity to the *B. microplus* CRT sequence. The predicted molecular mass and pI for CRT were 47 kDa and 4.52, respectively. In order to allow the expression and purification of CRT, the coding region of the cloned cDNA was amplified by PCR and subcloned into the pET-32b vector, and recombinant CRT was expressed as a 69 kDa fusion protein with TRX in an *Escherichia coli* strain (AD494DE3). The study of this protein can be important for the understanding of the physiology of the tick and for the development of a vaccine against the ticks.

C-12 *Ornithodoros moubata* 成ダニにおける抗ヘモサイト単クローン抗体作製およびその殺ダニ効果

松尾智英¹、井上昇¹、塚本大輔²、藤崎幸蔵¹
(¹帯畜大・原虫研、²農水省)

Ornithodoros moubata は人獣の重要な疾病を引き起こすウイルスやリケッチアなど多様な病原体のベクターとして知られており、またマダニとしては比較的大型で人工吸血を行えるため実験操作が容易である。またマダニ類の血球成分であるヘモサイトはダニ自身の免疫システムにおいて重要な役割を担っており、侵入微生物に対する防御機構としても機能していると考えられている。そこでヘモサイトの機能解明のためにより詳細な情報を得る目的で、まず *O. moubata* 成ダニの抗ヘモサイトモノクローナル抗体 (mAb) 19種を作製した。それらのヘモサイトにおける認識抗原を間接蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、および免疫沈降法によって調べた結果、形態的に類似したヘモサイトにおいてもこれらの抗体に対し異なる様々な反応を示し、さらに多様な分子量の抗原が認識されていた。これらの結果は、形態的に同一であるとされていたヘモサイトにおいて、機能的には異なっているものが存在することを示唆していた。従って、従来の形態的なヘモサイトの分類に加え、これらの機能解明のためには分子的な根拠に基づいたより詳細な分類も必要であると考えられた。さらに、これらの抗体がダニ体内に摂取されたときのダニ自身に対する影響を調べるために、人工吸血による抗体の投与を行った。その結果、今回作製されたうち mAb 31 が *O. moubata* 成ダニに対して比較的強い殺ダニ効果を持っていることが明らかとなった。すなわち、本研究で作製された抗ダニヘモサイト mAbs の作製は成ダニ期のヘモサイトのより詳細な分類の必要性を示し、またあらためてマダニ類の免疫学的なコントロールの可能性をも示唆していた。

C-13 リーシュマニアの新規 MDR 型 ABC トランスポーターの発現と細胞内局在

片倉賢¹、鈴木守¹、金子修²、鳥居本美²、藤瀬 浩³、橋口義久⁴
(¹群馬大学・医・寄生虫、²愛媛大・医・寄生虫学、³麻布大・獣医・病態生化学、⁴高知医大・寄生虫学)

アンチモン耐性のリーシュマニア株がインドを中心に顕在化しており、リーシュマニアの薬剤耐性機構の解明は耐性克服や新薬開発において重要である。実験的には、多剤耐性関連蛋白質(MRP)ファミリーの PGPA がグルタチオン抱合体輸送体としてアンチモン耐性に関与し、ピンラスチン耐性株からは多剤耐性蛋白質(MDR)ファミリーの MDR1 遺伝子が分離されている。これらトランスポーターは、ABC (ATP-Binding Cassette) 蛋白質ファミリーに分類されており、リーシュマニアの薬剤耐性における ABC 蛋白質の重要性が指摘されている。演者らは、アマゾン・リーシュマニアから新しい MDR 型の ABC 蛋白質遺伝子である LaMDR2 遺伝子を単離し、その導入組換え体は抗癌剤の 5-fluorouracil (5-FU) に対して耐性を示し細胞内の 5-FU 蓄積量が減少することを報告してきた。今回、LaMDR2 の蛋白質レベルでの発現と細胞内局在について検討した。ウエスタンブロットティング法による解析では、作成した 2 種類の抗体はいずれも組換え体の分子量約 140KDa の蛋白質と強く反応した。蛍光抗体法による光顕微鏡観察では、LaMDR2 蛋白質はリーシュマニアの細胞表面膜には局在せず、細胞内に局在することが判明したが、オルガネラの特定はできなかった。LaMDR2-GFP 融合蛋白質を発現させた組換え体では対数増殖期原虫の不定形の細胞内膜状構造に強く蛍光が認められた。このことから、LaMDR2 はリーシュマニアに特徴的なエンドソーム-リソソーム (multivesicular tubule, MVT) 系の膜に分布する可能性が示唆された。

C-15 *Trypanosoma congolense* 抵抗性および感受性マウスの肝における遺伝子発現の比較

中村義男¹、ナッセンスヤン²、キールシュタインソニア²、ギブソンジョン²、イラキフアド²
(¹国際農研センター、²国際家畜研究所)

【目的】*Trypanosoma congolense* 感染に対する抵抗性がマウス系統間で異なることが知られており、抵抗性遺伝子の同定が防除法確立にむけての重要課題となっている。網羅的解析による抵抗性遺伝子候補の選抜を目的として DNA マイクロアレイを作製し、抵抗性 C57BL/6 および感受性 A/J マウスの肝における遺伝子発現を比較した。【方法】7445 種の遺伝子断片からなるオリゴライブラリー、15 種のハウスキーピング遺伝子をスライドグラスに固定することによりマイクロアレイを作製した。C57BL/6、A/J マウスに *T. congolense* を感染させ、感染後 0、4、7、10、17 日に肝を採取して全 RNA を抽出した。系統、採材日毎に 4 つのプール RNA (各 5 匹由来) を調製し、Cy3 あるいは Cy5 標識 cDNA を合成した。各採材日における両系統の cDNA を等量混合してアレイと反応させ、蛍光強度比 2 以上のものを発現量の異なる遺伝子と判定した。【結果】計 169 遺伝子の肝における発現量が両系統間で異なっていた。内訳は感染前に差がみられた 48 遺伝子、感染にともない差が生じた 121 遺伝子であった。これらの遺伝子には急性期蛋白、サイトカイン、細胞内シグナル伝達因子、補体系、転写調節因子、電子伝達系、代謝関連酵素、イオンチャンネルなどの蛋白をコードするものが含まれた。また、連鎖解析により抵抗性と関連が推定される染色体領域に位置する 15 遺伝子が含まれた。【総括】今回選抜された 169 遺伝子は、両マウス系統間における抵抗性の相違を規定する遺伝子の候補となる。今後、他の組織についても解析し、選抜された候補遺伝子の病態への関与を調べることににより、抵抗性遺伝子が同定されるものと期待される。【謝辞】本研究は英国医学研究協会、リバプール大学との共同研究である。

C-14 Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP)法を用いたアフリカトリパノソーマ検出法の確立

久保木基高¹、井上昇¹、櫻井達也¹、鈴木宏志¹、杉本千尋¹、五十嵐郁男¹
(¹帯畜大・原虫研)

現在一般的に行なわれているアフリカトリパノソーマ病診断法は、鏡検による原虫検出法である。ラテックス凝集反応などの血清診断法は特異性・検出感度などに問題がある。ELISA および PCR 法は高価な機器を必要とする。LAMP 法は高感度な DNA 増幅法であり、等温反応のため高価な機器を必要とせず、簡便かつ迅速に増幅を行なうことができる。また、同法は DNA 合成反応副産物であるピロリン酸が反応液中の Mg²⁺ と形成する白濁沈殿によって陽性判定を行なうことができる画期的な方法である。そこで演者らは LAMP 法を用いたトリパノソーマ検出法の確立を試みた。*Trypanosoma brucei* 鞭毛抗原遺伝子である PFR A および PFR C ならびに *T. congolense* リソソーム P0 蛋白質および HSP70 を標的遺伝子とし、各遺伝子に 2 セットずつ LAMP プライマーを設計した。その結果、*T. brucei* では PFR A、*T. congolense* では P0 に対するプライマーで良好な増幅が得られた。10 ug/ul から 1 pg/ul まで 10 倍階段希釈したトリパノソーマ DNA を鋳型に、PFR A および P0 に対する PCR と LAMP 法の検出感度を比較した結果、PFR A では PCR の 1,000 倍 (1 pg)、P0 では PCR と同等 (1 ug) であった。また、P0 プライマーは *T. congolense* 特異的であったが、PFR A プライマーは *T. brucei* グループである *T. b. brucei*、*T. b. gambiense*、*T. b. rhodesiense* に加え近縁種の *T. evansi* にも反応した。次に、*T. b. gambiense* 慢性感染マウスより経時的に採取した血液サンプルを FTA ろ紙 (ワットマン) に吸収乾燥させ DNA を精製し、鋳型として PFR A に対する LAMP 法を行なった。その結果、LAMP 法は鏡検および PCR による検出法より感度が高かった。以上の結果より、LAMP 法は特異的・簡便かつ高感度なトリパノソーマ診断法として応用可能であることが明らかとなった。

C-16 動物より分離した *Giardia duodenalis* の遺伝子型

坂垣匡¹、栗林一博¹、伊藤直之²、青木美樹子¹、佐藤直人³
(¹岩手大・農・寄生虫病、²かもめ獣医科医院、³岩手県環境保健研究センター)

【目的】人獣共通感染性の *Giardia duodenalis* (syn. *G. lamblia* など) は遺伝的に異なる複数の集団 (遺伝子型) から構成され、各々の遺伝子型によって宿主特異性が異なると考えられている。ヒト分離株の遺伝子型は A 型または B 型に分類され、一方、動物由来の分離株は A 型、B 型に加えてヒト分離株ではみられない遺伝子型 (C~F 型など) が知られている。遺伝子型の解明は疫学調査における人獣共通感染性の推定など、その有用性は高いと考えられる。しかし、国内では動物由来の *G. duodenalis* の遺伝子型については全く明らかではない。今回、ウシ、ヒツジ、イヌおよびネコより分離した *G. duodenalis* の遺伝子型を解析した。

【材料と方法】*G. duodenalis* は動物病院に来院したイヌ由来の 21 分離株およびネコ由来の 2 分離株、さらに牧場のウシ由来の 19 分離株およびヒツジの 1 分離株を用いた。糞便より回収したシストからゲノム DNA を抽出し、-Giardin および Gdh 遺伝子領域の DNA を PCR によって増幅した。得られた増幅産物はダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定し、既知のヒト分離株の塩基配列と共に分子系統学的に解析した。

【結果と考察】-Giardin 領域については、イヌの 14 分離株およびウシの 9 分離株から増幅産物が得られた。それぞれの株内では塩基の変異が認められたが、系統樹ではイヌ分離株とウシ分離株は異なるクラスターに分かれた。またイヌ分離株群は既知のヒト分離株群とは最も遠縁であったことから、今回用いたイヌ分離株の人獣共通感染性は低いものと考えられた。一方、Gdh 領域については、-Giardin 領域で増幅産物が得られた分離株を含むすべての分離株において増幅産物は得られなかった。

C-17 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) 2-Cys 型ペルオキシレドキシンの原虫細胞内寄生 性成立における役割の解析

駒木-安田加奈子¹、河津信一郎²、池ノ上望¹、狩野繁之¹
(¹国立国際医療センター・研究所、学振・科技特、²国立国際医
療センター・研究所)

我々は熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)より活
性部位 Cys (システイン) の個数が異なる 2 種類のペルオキシ
レドキシ (Prx) を同定してきた。また組換え体タンパクを標
品として原虫 1-Cys 型 Prx 及び 2-Cys 型 Prx 両方に過酸化水素
還元活性を確認した。更に 2-Cys 型 Prx にはチオレドキシシ
ンペルオキシダーゼ活性が確認された。この結果を受けて、今回は
2-Cys 型 Prx の原虫細胞内での性状を解析したので報告する。
まず、2-Cys 型 Prx の遺伝子発現パターンをリアルタイム定量
RT-PCR 法によって解析したところ、同遺伝子は原虫の赤血球
侵入直後から発現の亢進が始まり、その後赤血球内期全体にわ
たりほぼ構成的に発現していることが示された。これは 1-Cys
型 Prx 遺伝子の発現がトロホゾイト期に特徴的な亢進を示すこ
とと対照的である。続いて 2-Cys 型 Prx の原虫体内での役
割を知るため遺伝子欠損マラリア原虫を作製した。遺伝子欠損
用プラスミドを培養熱帯熱マラリア原虫 FCR-3 株に導入、スク
リーニング、クローニングを経て 2-Cys 型 Prx 遺伝子欠損株の
クローン成立をゲノムレベルおよびタンパク質発現レベルの両
方で確認した。得られた 2-Cys 型 Prx 欠損原虫株の表現型を調
べる目的で、パラコート(O₂の負荷)及びニトロプルシドナトリ
ウム(NO の負荷)を原虫培養中に加え増殖率を調べたところ、
2-Cys 型 Prx 欠損原虫株ではいずれに対しても親株と比較して
感受性の上昇が認められた。以上の結果は 2-Cys 型 Prx が、赤
血球内寄生に起因して原虫細胞内に派生する活性酸素種の解毒
のみならず、活性窒素種の解毒も行っていることを示唆して
いる。

C-19 トキソプラズマにおけるコレステロール代 謝関連遺伝子の同定及び解析

西川義文¹、Quittnat Friede²、Stedman Timothy²、Joiner Keith²、
Coppens Isabelle²
(¹帯広畜産大学原虫病研究センター、²Yale University School of
Medicine)

細胞内寄生原虫トキソプラズマは、その宿主細胞から栄養素を
奪うことにより細胞内での増殖が可能になる。その一つの例に
宿主細胞から原虫へのコレステロールのエンドサイトーシスが
あり、最終的にコレステロールからコレステロールエステル
(CE) の産生がおこりエネルギー貯蔵に重要とされる脂肪滴が
観察される。原虫独自の代謝機構を解明することは、生物学的
に重要なだけでなく、その治療法の開発の点においても注目に
値する。今回、トキソプラズマにおける CE 産生に注目し、そ
の関連遺伝子の同定及び機能解析を目的とした。哺乳類ではア
シル CoA : コレステロールアシル転移酵素 (ACAT) が CE の形
成に関与しているため、ACAT に相同性のある遺伝子 (TARE :
トキソプラズマ ACAT 関連遺伝子) の探索を行い、2 つの候補
遺伝子のクローニングに成功した (TARE1、TARE2)。これら
遺伝子には ACAT に特徴的なコレステロール結合部位と脂肪酸
結合部位が保存されており、複数の膜貫通領域を有していた。こ
れら遺伝子を ACAT 欠損細胞に発現させたところ、その発現は
小胞体に局在し、TARE2 において ACAT 活性が確認された。次
に、これら遺伝子をトキソプラズマで過剰発現させたところ、
両遺伝子で ACAT 活性の上昇がみられたが、TARE2 で顕著であ
った。TARE2 の親水性に富んだアミノ末端には、複数のセリン
残基が存在し、これが両遺伝子間の ACAT 活性の差に影響を与
えるかもしれない。次に ACAT 阻害剤をトキソプラズマに作用
させたところ、原虫内の CE 産生が阻害されるとともに原虫の
増殖も顕著に抑制された。今回の結果より、トキソプラズマの
CE 産生には TARE が関与しており、コレステロール代謝機構
の制御は原虫増殖に重要であることが示唆された。

C-18 トキソプラズマ原虫感染における自然免疫 機構の解析

古田隆久¹、菊地たかね¹、吉川泰弘²
(¹東大医科研・感染遺伝学、²東大院・農・実験動物)

トキソプラズマ原虫(*T. gondii*)の感染防御機構における自然免
疫の役割について調べる目的で、Toll-like receptor (TLR) 4 の
mutant マウスである C3H/HeJ およびそのコントロールである
C3H/HeN マウスを用いて *T. gondii* の感染実験を実施した。方
法は *T. gondii* ME49 株の 10 シストをそれぞれのマウスに経口
感染させ、感染 1 ヶ月後に解剖して脳内シスト数について測定
した。その結果、C3H/HeJ マウスのシスト数は C3H/HeN に比
較し著しく多く、約 5 倍であった。また、抗 *T. gondii* 抗体の
産生は C3H/HeJ および C3H/HeN で認められたが、両群のマウ
スで有意な差はなかった。さらに、これらマウスの脾臓および
腸管膜リンパ節の cytokine 産生について調べた。*T. gondii*
感染 3、7、14 日後にマウスの脾臓と腸管膜リンパ節細胞を *in vitro*
で *T. gondii* 抗原で刺激し、培養 24 時間後の cytokine の産生
について調べた。その結果、IL-6、IL-12、IFN- γ の産生は感染 3
日後から検出され、いずれも *T. gondii* 感染抵抗性を示した
C3H/HeN で高かった。また、小腸病変については TLR 4 の
mutant である C3H/HeJ マウスで著しい炎症像が認められ、
TLR4 の発現は C3H/HeN で増加していた。次に、*T. gondii* の
TLR4 の ligand について検討した。flag タンパクでラベルされ
た TLR4 を発現している Ba/F3 細胞を可溶性後 TLR4 分子を抗
Flag 抗体結合 beads に結合させ、*T. gondii* タンパクと免疫沈
降させた。その沈降物を 2 次元電気泳動法および
MALDI-TOF/MS で解析した結果、*T. gondii* の ligand として
dense granule protein 2 の可能性が示唆された。以上の結果か
ら、*T. gondii* 感染の感染防御に自然免疫機構である TLR 4 の
関与が示唆された。現在、TLR4/MD-2 およびこれと構造的に類
似している RP105/MD-1 分子についても検討中である。

C-20 PCR-DGGE 法を用いた環境サンプルから の *Cryptosporidium* の検出

佐藤正明¹、佐々木貴子¹、中井裕¹
(¹東北大・院・農)

【目的】家畜糞便や畜舎汚水には複数種の *Cryptosporidium* が
混在することがあるが、顕微鏡観察による種の区別は容易では
ない。われわれは第 134 回大会にて PCR-DGGE 法を用いた
Cryptosporidium 種の解析を報告したが、今回この手法を環境
サンプル中の *Cryptosporidium* の検出に応用したのでその結果
を報告する。【材料と方法】本研究室で継代している *C. muris*
RN66 株および *C. andersoni* 川渡株を用いた。2 種のオーシスト
の比率を変えて混合した懸濁液サンプルおよび糞便 0.5g に
C. andersoni のオーシストをそれぞれ 1~10⁶ 個加えたサンプル
を準備し、常法により DNA を抽出し、両種の
Cryptosporidium 18S rDNA を増幅しうるプライマーを用いて
PCR を行い、増幅が確認されたサンプルについて DGGE 電気泳
動を行ってバンドパターンを観察した。【結果と考察】*C. muris*
と *C. andersoni* を混合した場合、両株を等量混合した時のみ両
者のバンドが明確に示された。糞便サンプルでは両株とも 1 個
のオーシストを加えたものでもバンドが確認された。今回の結
果より PCR-DGGE 法は、複数種のオーシストが混在する場合
の検出にはなんらかの改良が必要であるが、環境サンプルから
Cryptosporidium を検出するために有効な方法であることが示
された。

C-21 日本の豚におけるクリプトスポリジウム遺伝子型の解析

河本麻理子¹、川島健司¹、勝田賢¹、恒光裕¹、寺田裕¹
(¹動衛研・七戸)

Cryptosporidium (Cr) は幼弱動物に下痢を起こす人畜共通感染症の病原体として知られている。国内の家畜においては糞便中オオシストの検出による疫学的調査が行われているが、豚での Cr の遺伝的特性に関する研究報告はほとんどなされていない。そこで本研究では、国内各地の養豚農家から糞便を採集し、豚における Cr 感染実態を把握するとともに遺伝子多型の解析を行ったので報告する。【方法】糞便検査には、2002 年 4 月から 9 月までに 4 県 12 農場の養豚農家で採取された哺乳豚 76 頭、離乳豚 56 頭の糞便および 40 日齢以上で発育不良を呈している豚 (ひね豚) 20 頭の大腸内容物、計 152 検体を供試した。Cr オオシストの検出はシヨ糖液遠心浮遊法およびモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で行った。また、糞便から DNA を抽出し、Xiao ら (1999) のプライマーを用いて 18S-SSU rRNA 遺伝子の多型解析 (PCR-RFLP) を行った。【結果と考察】12 農場中 6 農場、152 頭中 19 頭の糞便が Cr 陽性であった。哺乳豚からは Cr は検出されず、離乳豚 56 頭中 9 頭 (16.1%) より Cr *parvum* (Cp) 様の直径 4-5 μm のオオシストが検出された。また、ひね豚の大腸内容物からは高率 (50%) にオオシストが検出された。PCR-RFLP では、すべての PCR 陽性検体が同じ遺伝子型を示し、既報の Cp の遺伝子型と比較した結果、日本の豚においては Cp-ヒト型、Cp-人獣型およびオーストラリアで分離された Cp-ブタ型のいずれとも異なる遺伝子型が存在することが示された。

C-23 ニワトリ由来 *Cryptosporidium* sp. の分子生物学的手法による種の同定

木村明生¹、鈴木定彦¹、松井利博²
(¹大阪府公衛研・医動物、²大阪府公衛研・病理、³杏林大・医・感染症)

【緒言】1984 年に板倉らにより自然感染鶏から分離された *Cryptosporidium* は (Itakura et al., 1984)、そのオオシストの形態学的解析及びニワトリやウズラへの感染実験により種の同定が試みられてきた (松井ら、1992、Matsui et al., 1996、Fujino et al., 1996)。しかしオオシストの大きさや prepatent period は、*C.baileyi* と *C.meleagridis* との間であり、寄生部位や endogenous stage の形態にも著明な差が認められないことから、本種の種名は未だ明らかにされていない。そこで今回演者らは、本種 DNA の特定の部位の塩基配列を解析することにより、その種の同定を試みた。

【材料と方法】白色レグホンの雄で継代維持している本種オオシストを、その糞便中から蔗糖浮遊法により分離精製した後、QIAGEN 社の精製用キットを用い DNA を抽出した。PCR により *Cryptosporidium* の 18S ribosomal RNA (18SrRNA) 遺伝子の一部である約 400bp 及び *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) 遺伝子の一部である約 500bp の領域を増幅した。増幅産物はダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定し、GenBank に登録されている他の *Cryptosporidium* 種の配列と比較し解析を行った。

【結果と考察】今回得られた 18SrRNA 遺伝子の塩基配列と GenBank に登録されている *C.baileyi* の 18SrRNA (AF093495) と比較した結果、その相同性は 100% であった。これと比較して *C.meleagridis* (AF112574) との相同性は 91.1% であった。更に本種の COWP 遺伝子と *C.baileyi* (AF266276) との相同性は 1 塩基違いの 99.7% であり、一方 *C.meleagridis* (AF266266) との相同性は 82.4% であった。以上の結果は、本種が *C.baileyi* である事を強く示唆するものであった。現在は更に解析を進めるべく、HSP70 遺伝子についても検討を加えている。

C-22 抗 *Eimeria* 鶏型モノクローナル抗体の *Cryptosporidium* との交差反応性と宿主細胞への侵入抑制効果

松林誠¹、笹井和美²、木俣勲³、中西輝雄¹、谷浩行²、井関基弘⁴、Lillehoj H. S.⁵、馬場栄一郎²
(¹大阪女子学園短大、²大阪府立大・獣医内科、³大阪市立大・医動物、⁴金沢大・寄生虫、⁵U.S.D.A.)

【背景・方法】演者らは、*Eimeria acervulina* を抗原とした鶏型モノクローナル抗体 (mAb) を 6 種作製した。このうち mAb 6D-12-G10 は、*Cryptosporidium parvum* および *C. muris* のスポロゾイトと交差反応を示した。今回、*in vitro* で培養した *C. parvum* のメロゾイトとこれら鶏型 mAb との交差反応性を調べ、さらに、mAb が虫体の宿主細胞侵入を抑制するかどうかについて検討した。【材料・方法】ヒト由来株を SCID マウスで継代した *C. parvum* の生鮮オオシストをヒト大腸癌由来の HCT-8 細胞に感染させる *in vitro* の系で解析した。侵入抑制試験では、次亜塩素酸処理後に抗体液または培養メディウムに浮遊させたオオシストを、24 時間培養した HCT-8 細胞に接種した。37 °C、5% CO₂ 下で 2 時間感染させた後、培養メディウムで洗浄し、さらに 22 時間培養した。これを抗 *C. parvum* ウサギポリクローナル抗体で蛍光染色し、発育したトロフォゾイトとメロントの数を計数し、虫体数を対照群 (培養メディウム浮遊オオシスト接種) と比較した。【結果】mAb 6D-12-G10 は、*C. parvum* のメロゾイトとも交差反応を示し、侵入抑制率 (%) は 75.4 ± 4.0 であった。【結論】抗 *Eimeria* 鶏型モノクローナル抗体 6D-12-G10 は、*C. parvum* の宿主細胞侵入に関わる抗原を認識している可能性が示唆された。

C-24 PCR を用いたフタトゲチマダニ唾液腺内の小型ピロプラズマ原虫遺伝子検出法の検討

寺田裕¹、大田方人¹、金平克史¹、河本麻理子¹、神尾次彦¹
(¹動衛研)

小型ピロプラズマ (小型ピロ) 原虫は主にフタトゲチマダニによって媒介される。本マダニにおける小型ピロ原虫保有状況の把握は、家兔を吸血させた後に抽出した唾液腺を染色することにより可能である。今回は新たな手法として唾液腺を抽出することなくマダニを破碎し原虫遺伝子を PCR によって検出する方法について検討した。

【材料と方法】小型ピロ原虫池田株を感染させた摘脾ホルスタイン種牛にフタトゲチマダニ岡山系統の幼ダニを吸血させて感染若ダニを作製した。これら若ダニの原虫感染率は 54%、若ダニ 1 匹が保有する平均感染腺胞数は 5.5 個であった。PCR 用材料は、1) 家兔 48 時間吸血後の若ダニ唾液腺 10 匹分、2) 家兔 48 時間吸血若ダニ 20 匹、3) 未吸血若ダニ 20 匹とした。材料の破碎は液体窒素にて凍結し、乳鉢と乳棒を用いて行った。また、マダニが保有する原虫の検出限界について、原虫非感染若ダニの核酸と原虫感染赤血球から分離精製した既知量の原虫核酸を混合して求めた。

【結果と考察】すべての材料で、いずれからも小型ピロ原虫遺伝子が検出された。また、マダニ 1 匹あたりにおおよそ 100 個相当の原虫核酸があれば計算上検出可能であることが示された。以上より、本法を用いてマダニの小型ピロ原虫保有状況を簡易に把握することが可能となり、牧野における原虫汚染状況の解明及び本病発生予察にも応用できるものと考えられた。

C-25 *Babesia odocoilei*または*Babesia divergens*に近縁な*Babesia*DNAのヤマトマダニからの検出

吉崎友佳子¹、猪熊壽¹、島田洋二郎²、坂田義美³、奥田優¹、大西堂文¹
(¹山口大・農、²(株)ゼノアック、³メリアル・ジャパン(株))

【はじめに】わが国に常在する*Babesia*として、人とげっ歯類の*B. microti*、牛の*B. ovata*、犬の*B. gibsoni*、*B. canis*などが知られているが、欧米では鹿の*B. odocoilei*あるいは人と牛に感染する*B. divergens*の発生も報告されている。今回、日本の犬寄生ヤマトマダニから*B. odocoilei*または*B. divergens*に近縁な*Babesia*のDNAが検出されたので、その概要を報告する。【材料と方法】2000年9月から2001年7月までに全国の105動物病院に来院した犬から回収されたマダニを材料とした。マダニは同定後DNAを抽出し、18S rRNA遺伝子配列に基づいて設計された*Babesia*属特異的PCRを用いて*Babesia*感染スクリーニングを行い、陽性検体について18S rRNA遺伝子の塩基配列の解析を行った。【結果と考察】*Babesia*属特異的PCR強陽性を示した秋田県と福井県の犬3頭から回収されたヤマトマダニ3個体の塩基配列(608bp)を解析したところ、既知の*Babesia*種とは異なる配列が検出され、うち*B. odocoilei*と最も高い相同性を示した(96.4%)。より長い18S rRNA遺伝子の塩基配列(1678bp)を決定したところ、3検体とも同一の塩基配列で、*B. odocoilei*および*B. divergens*とそれぞれ97.7%と97.6%の相同性を示し、これらと近縁だが別種である可能性が示唆された。また同じ犬から回収された別の吸血マダニはPCR陰性であり、本*Babesia*が犬ではなくヤマトマダニと関連して検出された可能性が高いと思われる。今後この*Babesia*の病原性、分布、宿主などを明らかにする必要があると考えられた。

C-27 Expression and immunological characterization of a novel antigenic protein 'ToORFb' gene of *Theileria orientalis*

金廷娟¹、横山直明¹、クマールサンジャイ¹、井上昇¹、藤崎幸藏¹、杉本千尋¹
(¹帯畜大・原虫病研究センター)

Theileria species are tick-borne protozoan parasites belonging to the phylum Apicomplexa. In this study, we cloned a *T. orientalis* genomic fragment having two open reading frames (ORFs). The homologous search revealed that the second ORF (ToORFb) has a high similarity with the mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) of *Plasmodium falciparum*. The ToORFb gene product of 35 kDa expressed by a recombinant baculovirus was recognizable with the *T. orientalis*-infected bovine serum, indicating that the ToORFb gene product is immunodominant during the *T. orientalis* infection. In the Western blot analysis with the anti-ToORFb gene product mouse immune serum, a 43 kDa native protein was detected from the *T. orientalis* piroplasm lysate. Confocal laser microscopy analysis revealed that the anti-ToORFb mouse serum mainly recognizes the late developmental stage in the erythrocytic cycle of the piroplasm. These findings suggested that the identified P43 of *T. orientalis* predominantly expresses in the late stage of intra-erythrocytic cycle and might be involved in the escape of piroplasm from infected erythrocytes.

C-26 Cloning and characterization of 3 novel cDNA encoding for cysteine protease-like proteins from *Theileria orientalis*

何偉勇¹、大橋和彦¹、杉本千尋²、小沼操¹
(¹北海道大・獣医・感染症、²帯畜大・原虫研)

Theileria orientalis is a tick-transmitted protozoan parasite which causes anemia due to the intraerythrocytic infection of piroplasms in cattle. During persistent infection, the parasitemia levels fluctuate in cattle. In order to control bovine theileriosis effectively, we have been seeking for vaccine candidates. Cysteine proteinases play indispensable roles in the biology of parasites including general catabolic functions and protein processing, immune evasion, and cell and tissue invasion. Parasite cysteine proteinases are immunogenic, and have been characterized as serodiagnostic markers and vaccine targets. In our study, three genes, TOCP1, TOCP2, and TOCP3, encoding cysteine protease-like proteins of *Theileria orientalis* were cloned from a cDNA library of the parasite. The TOCP1 and TOCP2 genes potentially encode for a polypeptide of 476 amino acids and the TOCP3 gene could encode for a 437-amino-acid polypeptide. All of them are different from the cysteine proteinase gene previously cloned from the same parasite (TOCPS, Sako et al., 1998, J. Vet. Med. Sci., 61: 271-273). Similarities of the deduced amino acid sequence of TOCP1 with those of TOCP2, TOCP3, and TOCPS were 93.7%, 46.7%, 43.0%, respectively. In one of the three potential active centers of TOCP1 and TOCP2, the residue in position 8 was glycine instead of an essential cysteine. The other two active centers of them were similar to those of the SERP I antigen of *Plasmodium falciparum*, which can induce the protective immune response in monkey. Southern blot analysis showed that multiple copies of these genes were present in the parasite genome.

C-28 IFN- によるウシ小型ピロプラズマの増殖抑制

馬場智久¹、萩原 克郎¹、徳田雅史¹、山中仁木¹、桐沢力雄¹、岩井流¹
(¹酪農大・獣医微生物)

【目的】ウシ小型ピロプラズマ症は *Theileria sergenti* (TS) を病原体とし、発熱や貧血を主症状とする。これまでに私たちは、本病を制御するサイトカインを調べる目的で TS 実験感染牛における血清中 IFN- 動態を比較した。その結果、原虫が増殖しなかった健常牛の感染初期血清中に IFN- が一過性に検出されることが明らかとなり、原虫増殖抑制に IFN- が重要な役割を担っていることが示唆された。そこで本研究では IFN- を前処置した脾臓摘出牛に TS を感染させ、原虫増殖と宿主防御免疫への影響を調査した。【方法】ウシリコンビナント IFN- (rbIFN-) を前処置した脾臓摘出牛 2 頭に TS 千歳株 (TS-C) を感染させ、寄生率、ConA リンパ球幼若化能ならびに TS-C 特異的抗体価 (IgG 1、IgG 2) を測定した。また rbIFN- の TS-C 原虫に対する直接的な抗原虫作用の有無を調べるため、ウシ赤血球置き換え SCID マウスに rbIFN- を投与し、SCID マウス内での TS-C 増殖への影響を調べた。【結果及び考察】脾臓摘出牛における TS-C 感染では、IFN- を前処置することで初感染時の原虫増殖を抑制することが示された。一方、SCID-Bo マウスの実験から IFN- の直接的抗原虫効果は認められなかった。また rbIFN- 前処置牛において感染初期にリンパ球幼若化能の亢進と TS-C 特異的抗体 IgG 1 及び IgG 2 サブタイプの産生が認められた。以上の結果から TS 感染初期の Th1 タイプの免疫応答がリンパ系細胞や食細胞などの活性化を促し、原虫の排除や病態に影響を与えていることが示唆された。

C-29 *Babesia microti* および *Babesia rodhaini* 感染マウス赤血球におけるグルコース取り込み機構

福田寿亮¹、大森崇¹、松木直章¹、小野憲一郎¹
(¹東大・獣医臨床病理)

【目的】げっ歯類に感染するバベシア原虫の *Babesia microti* と *B. rodhaini* は、近縁で形態的にも類似しているが、両感染血球では非感染血球と比べてグルコースの取り込み量が増加している。他の *Babesia equi* などでは赤血球内の虫体から赤血球表面をつなぐ管状の構造物が観察されており、虫体への栄養基質の取り込みに関与すると考えられている。そこで、*B. microti* と *B. rodhaini* 感染赤血球についてまず形態学的に観察し、加えて感染赤血球における糖輸送担体 (glucose transporter 1: GLUT-1) について検討した。【結果と考察】透過電子顕微鏡による観察では、両原虫とも感染血球の細胞膜の近傍に位置し、赤血球膜は虫体側へ変位していた。また同部位には赤血球膜の虫体側への陥入も観察された。SDS-PAGE による膜蛋白の解析では、両感染血球とも主要な膜蛋白に量的な変動は認められなかったが、ウエスタンブロットによる解析で GLUT-1 の細胞内領域は非感染血球と比較して両感染血球では著しく減少していた。さらに、感染経過を追って GLUT-1 の細胞内領域と細胞外領域を検討したところ、特に GLUT-1 の細胞内領域が感染経過にともなって減少していた。GLUT-1 の細胞内領域の変化はグルコースの取り込みを低下させると考えられ、感染赤血球ではグルコースの取り込みが増加していることを考え合わせると、新たな糖輸送経路の存在する可能性が示唆された。またその経路として赤血球における陥入部位がこれに関与するのではないかと考えられた。

C-31 High-level expression and purification of a truncated merozoite antigen-2 of *Babesia equi* in *Escherichia coli* and its potential in immunodiagnosis

黄曉紅¹、玄学南¹、横山直明¹、鈴木宏志¹、杉本千尋¹、長澤秀行¹、藤崎幸蔵¹、五十嵐郁男¹
(¹帯畜大・原虫研)

The gene encoding a truncated merozoite antigen-2 (EMA-2t) of *Babesia equi* was cloned and highly expressed in *Escherichia coli* as a glutathione S-transferase fusion protein (G-rEMA-2t). Both G-rEMA-2t and rEMA-2t (after the removal of Glutathione S-transferase) had good antigenicity. Either Western blot analysis with rEMA-2t or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with G-rEMA-2t clearly discriminated the sera of horses experimentally infected with *B. equi* from sera of horses infected with *B. caballi* and normal horses, although rEMA-2t was not suitable for ELISA, probably owing to its poor absorbability to the plates. The specific antibodies in *B. equi*-infected horses were detectable during both acute and latent infection (6-244 days post-infection). Horse sera from Jilin province, China, were examined by the two tests. The seroprevalence of *B. equi* was 49.2% (31/63) by Western blot analysis with rEMA-2t and 47.6% (30/63) by ELISA with G-rEMA-2t. The correspondence was 98.4% (62/63) between the two tests. The results indicate that G-rEMA-2t and rEMA-2t proteins should be suitable antigens for the development of an effective immunodiagnostic assay due to their high sensitivity, specificity, and great yield.

C-30 Evaluation of the Antiprotozoan Drugs, Clotrimazole, Ketoconazole, and Clodinafop-propargyl, against the *In Vitro* Growth of *Babesia* Parasites

ボルクサビーネ¹、横山直明¹、松尾智英¹、クラベリアフロレシア¹、藤崎幸蔵¹、五十嵐郁男¹
(¹帯畜大・原虫病研究センター)

Babesiosis is a tick transmitted protozoan disease of veterinary and medical importance, caused by intraerythrocytic parasites of the genus *Babesia* (phylum Apicomplexa). Due to its ubiquity and the damages it causes in livestock, an effective treatment is highly required. In this quest, the growth inhibitory efficacy of the imidazole derivatives, clotrimazole (CLT) and ketoconazole (KC), and the herbicide clodinafop-propargyl (CP), was evaluated against the *in vitro* cultures of the equine *Babesia equi* and *B. caballi*, and the bovine *B. bovis* and *B. bigemina*. CLT was effective in a dose range of 7.5 to 60 μ M (IC₅₀: 2 to 23.5 μ M), followed by KC (10 to 100 μ M; IC₅₀: 6 to 22 μ M), and CP (350 to 500 μ M; IC₅₀: 265 to 390 μ M). Additionally, drug combination tests were performed in order to evaluate synergistic or antagonistic effects in the parasites and subsequently compared to the results obtained in the previous experiments when each drug was applied by its own. Combinations of CLT/KC, CLT/CP and CLT/KC/CP acted synergistic, while the application of KC/CP mitigated the growth inhibition effects in all tested parasites. In transmission electron microscopy, extensive damages were observed in the cytoplasm of drug-treated parasites, leading to the entire parasitic disruption. These results offer promise for the effective treatment of bovine and equine babesiosis in the future.

C-32 Stage-Specific Expression of *Babesia equi* EMA-1 and -2 in the Merozoite Developmental Cycle in Erythrocytes

KumarSanjay¹、横山直明¹、キムジョンヨン¹、ファンシャホン¹、井上昇¹、玄学南¹、五十嵐郁男¹、杉本千尋¹
(¹帯畜大・原虫研センター)

In the present study, we investigated cellular localization and expression behaviors of *Babesia equi* merozoite antigen (EMA) -1 and -2. *B. equi* was maintained in previously described MASP cultivation system. EMA-1 and -2 truncated genes were amplified from the *B. equi*-extracted DNA template by PCR. These truncated gene products were expressed in pGEX-4T *E. coli* expression vector and respective monospecific serum was raised in mice, which was used for conducting IFAT. Results were analysed by confocal laser microscopy. Indirect fluorescent antibody test demonstrated that the EMA-1 and EMA-2 were not expressed in all the erythrocytic-developmental stages of the merozoites and these two antigens were co-expressed during the early developmental stages. At the later stage, the expression behaviors of EMA-1 and -2 were completely different, as beside fluorescence reaction on the invaded merozoite, the erythrocytic cytoplasm and/or inside membrane also showed EMA-2-specific immune-reaction, unlike of EMA-1. These results indicated shedding of only EMA-2 antigen in the infected erythrocytic cytoplasm or inside membrane surface. During the final division phase of the merozoite via the classical Maltese-cross form, it was observed that specific co-expression of EMA-1 and -2 was limited to early growing conjoined merozoites only and, once the merozoite get matured, set to apart, the EMA-1 and -2 expressions completely disappeared. Additionally, it was shown that the EMA-1 and EMA-2 were mutually expressed on the surface of extraerythrocytic merozoite. These findings would be applicable for understanding the biology of *B. equi* in future.

C-33 *Babesia caballi* 53 kDa タンパク質の発現

筏井宏実¹、塚田竜介¹、高城良子¹、玄学南²、工藤上¹、
小山田隆¹、五十嵐郁男²
(¹北里大・獣医寄生虫、²帯畜大・原虫研)

第 134 回本大会において、我々は *Babesia caballi* (*B. caballi*) の分子量 53 kDa Protein Disulfide Isomerase (PDI) 様タンパク質をコードする遺伝子 *p53* のクローニングについて報告した。PDI はタンパク質の酸化、還元、異性化などのチオール-ジスルフィド交換反応を触媒する構造形成因子の一つであり、その酵素活性以外に多くの機能が明らかにされた多機能タンパク質である。さらに、最近では PDI のシャペロン機能が注目されている。今回、*B. caballi* における同酵素の機能を解析する目的で、*B. caballi* PDI 様タンパク質 P53 の組換えタンパク質作製を試みたので報告する。

p53 の Open Reading Frame (ORF) を pGEX-4T ベクターに挿入し、GST 融合タンパク質として大腸菌 BL21 で発現を行い、この発現産物を BALB/c に免疫し抗 P53 血清を得た。この抗 P53 血清は、*B. caballi* 感染赤血球を抗原としたウエスタンブロット法により、P53 を認識するモノクローナル抗体 2H2 と同様の分子量 53 kDa タンパク質と反応した。次に、*p53* ORF をバキュロウイルス発現用ベクター pBlueBac4.5/V5-His に挿入し、6xHis tag を持つ融合タンパク質 (AcP53-His) を発現させる組換えバキュロウイルスを得た。この組換えウイルスを感染させた昆虫細胞 Sf-9 では、約 53 kDa タンパク質の発現が確認された。これは authentic な P53 とほぼ同じ分子量である事が判明した。さらに、この発現タンパク質は昆虫細胞培養上清中に分泌する事も確認された。今後は、AcP53-His タンパク質を用いて酵素活性試験を検討し、*B. caballi* PDI の機能を解析する予定である。

C-35 *Babesia gibsoni* 培養上清抗原および培養メロゾイト抗原の防御免疫効果

須永藤子¹、杉山大樹¹、柏原さやか¹、小久保聖子¹、早瀬理恵¹、
並河和彦¹、菅野康則¹
(¹麻布大・伝染病)

【目的】*Babesia gibsoni* (Bg) は犬に対して溶血性貧血を引き起こす住血原虫であり、この疾病に対するワクチンは開発されていない。私達はこの原虫を生体外で培養する方法を確立し、原虫抗原を大量に採取できるようになった。そこで今回、この原虫培養上清中に認められた原虫由来の抗原物質と培養メロゾイト原虫を免疫抗原として用い、両者のワクチン効果を比較検討した。【方法】培養上清抗原 (SA) は培養 3 日目の培養上清液を濃縮したものをを使用した。メロゾイト抗原 (MA) は培養 3 日目の沈渣赤血球を溶血バッファーで溶血させ、メロゾイトを回収し、 β -プロピオラクトンで不活化したものをを使用した。実験には 1 歳雌ビーグル犬 6 頭を用いた。SA 免疫群 2 頭は SA に QuilA を加えたものを 20 日おきに 3 回、頸部皮下に投与し免疫した。MA 免疫群 2 頭は MA に QuilA を加えたものを 20 日おきに 3 回、さらに、MA 単独で 7 日おきに 3 回、頸部皮下に投与し免疫した。両免疫群とも 1 回目の免疫後 68 日目に Bg 感染赤血球 2×10^8 個で攻撃感染を行った。同時に対照群 2 頭にも同量の Bg 感染赤血球を接種した。検査は原虫感染赤血球率、Ht 値、体温および間接蛍光抗体法で Bg 抗体価を測定した。実験期間は免疫期間および攻撃感染後 40 日間とした。【結果】SA 免疫群および MA 免疫群ともに、原虫の増殖および貧血が抑制された。また、貧血抑制効果は SA 免疫群が MA 免疫群に比べ優れていた。さらに SA は大量に回収でき、赤血球膜の混入もなく精製濃縮が容易であった。これらの結果から SA は有力なワクチン候補となる事が確認された。

C-34 抗バベシアギブソニー P50 蛋白血清は、本原虫に対する増殖抑制活性を示す

福本晋也¹、玄学南¹、鈴木宏志¹
(¹帯畜大・原虫研)

バベシアギブソニー原虫はイヌにバベシア症を引き起こす、赤血球内寄生原虫である。近年日本においてイヌバベシア症の発生地域は拡大しており、獣医領域において本症制圧は重要な課題となっている。演者らは過去の研究においてバベシアギブソニー原虫表面抗原蛋白 P50 を同定した。本報告では P50 蛋白のイヌバベシア症に対する、ワクチン抗原としての有用性を検討するため、本タンパクに対する抗血清を作製し、本原虫に対する増殖抑制効果を検討した。バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて、組換え P50 蛋白を作出した。この組換え P50 蛋白をウサギに免疫し、抗血清を作製した。得られた抗血清は本原虫に対して強い反応性を示すことが、間接蛍光抗体法及び、ウエスタンブロット法により確認された。本抗血清をバベシアギブソニー原虫感染イヌ赤血球置換 SCID マウスに投与し、原虫増殖抑制効果を調べた。対照血清として正常ウサギ血清、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて作出した組換え LacZ 蛋白免疫ウサギ血清を用いた。P50 蛋白に対する抗血清を投与した群において、対照群と比較し、原虫の増殖は有意に抑えられた。これらの結果よりイヌバベシアギブソニー原虫感染症に対するワクチンを開発するにあたり、P50 蛋白は有用な候補分子であることが示唆された。

C-36 培養 *Babesia gibsoni* メロゾイトの生ワクチンとしての可能性

須永藤子¹、清谷萬里¹、小嶋友子¹、正道依理子¹、並河和彦¹、
菅野康則¹
(¹麻布大・伝染病)

【目的】*Babesia gibsoni* (Bg) は犬に対して溶血性貧血を引き起こす住血原虫であり、この疾病に対するワクチンは開発されていない。この原虫を生体外で長期に培養する方法を確立し、400 代継代を重ねた結果、この培養原虫は非摘脾犬にほとんど病原性を示さなくなった。そこで、この継代培養原虫を生ワクチンとして用いた場合のワクチン効果を検討した。【方法】培養原虫の病原性を調べるため、400 代継代培養した原虫 1×10^9 個を摘脾ビーグル犬 1 頭および非摘脾ビーグル犬 2 頭の静脈内に接種し、原虫感染赤血球率、Ht 値、体温および間接蛍光抗体法で Bg 抗体価を測定した。非摘脾犬 2 頭は、培養原虫のワクチン効果を検討するため、培養原虫接種後 60 日目に 2×10^8 個の Bg 感染赤血球で攻撃感染し、同時に対照として 2 頭のビーグル犬にも同量の Bg 感染赤血球を接種した。実験期間は攻撃感染後 40 日間とし、検査は上記と同様の項目を行った。【結果】400 代培養原虫を接種した摘脾犬では原虫は 28 日目から増加し、増減を繰り返しながら徐々に減少した。Ht 値は原虫の増減に伴い変化したが 72 日目以降は低い値で推移した。これに対し、非摘脾犬の原虫は散発的に 0.01 - 0.4% の低い値で出現したが、Ht 値は正常範囲内であった。培養原虫のワクチン効果を検討するため、この 2 頭に攻撃感染したところ、感染を防御することはできなかったが、原虫の増殖および貧血は抑制された。

C-37 ヘパリンによるバベシア原虫メロゾイト の赤血球侵入阻害について

横山直明¹、ボルクサビーネ¹、池原譲²、クマールサンジャイ¹、
杉本千尋¹、五十嵐郁男¹

(¹帯畜大・原虫研センター、²愛知がんセンター・腫瘍病理)

バベシア原虫はダニによって媒介される赤血球内寄生型原虫であり、メロゾイトが赤血球に侵入・増殖・破壊を繰り返すことで感染個体を死に至らしめる。メロゾイトが赤血球に侵入していく過程は、様々な原虫側の因子と赤血球膜上の受容体間で多段階な分子間相互作用を形成し成り立っていると考えられる。そこで、バベシア原虫の *In vitro* 培養系及びマウスモデルを用いて、ヘパリンによる増殖抑制効果を検証し、それら相互作用へのヘパリン干渉能の一端について検討した。まず、ウシバベシア原虫 (*B. bovis*) を用いた *in vitro* 培養下では、その増殖がヘパリン濃度依存的に有意に押さえられることが示された。特に、高濃度での感作では原虫の赤血球への侵入が完全に抑制され、また、低濃度感作においては侵入後のメロゾイトが異常な過分裂形態を示すことが明らかとなった。さらに、FITC で標識されたヘパリン分子と培養感染赤血球を反応させたところ、強い蛍光陽性像が赤血球外メロゾイトの外膜上のみを観察された。ヘパリンによる増殖抑制効果は、*in vitro* 培養下での *B. bigemina*、*B. caballi*、及び *B. equi*、並びに *B. microti* を感染させたマウスにおいても観察された。以上の成果より、ヘパリンは赤血球侵入前のメロゾイト虫体の外膜上に分布する未知なる原虫因子と吸着し、赤血球への侵入能さらにはその後の赤血球内分裂能をも阻害していることが示唆された。今後はメロゾイト膜上に提示されるヘパリン親和性原虫分子の同定を試みる予定である。