



第63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 プログラム・講演要旨



Proceedings of the 63rd Joint Annual Meeting of Northern Branches of the Japanese Society of Parasitology and the Japan Society of Medical Entomology and Zoology



平成29年10月21日(土)
北海道札幌市 北海道大学獣医学部講堂

October 21, 2017
School of Veterinary Medicine, Hokkaido University.
Sapporo, Hokkaido, Nippon.

第63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 概 要

会 期：2017年10月21日（土曜日）
会 場：北海道大学獣医学部講堂
大会長：伊東 拓也（北海道立衛生研究所）

日 程

8:30 受付開始
8:50 開会の辞
9:00 一般演題
12:00 休憩・昼食，幹事会・理事会
13:30 公開講演：夏秋 優 先生（兵庫医科大学皮膚科学 准教授）
「虫による皮膚炎」
14:24 一般演題
17:40 総会
18:10 閉会の辞
18:45 情報交換会 パ・ミ・カサ（ドミニカ料理店）
北16条西4丁目2-3 TEL. 011-790-6334

会 費：当日受付にてお支払ください。

大会参加費 一般 2,000円，学生 1,000円
情報交換会費 一般 3,000円，学生 2,000円

発表形式

発表時間は、講演8分・質疑応答4分の合計12分です。Power Point (Windows版)を用いた液晶プロジェクターによる発表のみとします。Power PointファイルはUSBメモリーに保存し、必ずウイルスチェックを行ってから、当日受付にお預けください。

座 長：例年通り、前の発表者が座長を行ってください。ご協力をお願いします。

事務局・連絡先

北海道大学獣医学部感染症学教室 今内 覚 (Satoru KONNAI)
Tel. 011-706-5216 Mailto: konnai@vetmed.hokudai.ac.jp
〒060-0818 北海道札幌市北区北18条西9丁目
緊急の連絡先 伊東携帯 090-9529-3363

※ 経費節減のため、本プログラムを印刷してご持参いただきますようお願いいたします。また、当日は普段着にてご参加下さい。今年の札幌は例年より1週間ほど季節の進みが早くなっていますので、防寒にご留意ください。

会場へのアクセス

北海道大学獣医学部のホームページ<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/access/>に交通案内と大学構内マップ（下図）がありますので、ご参照ください。地下鉄南北線北18条駅から西に歩くのが一般的なルート（赤点線）ですが、天候が良ければJR札幌駅北側から北大構内を歩いてくるのも風情があります（青点線、30分くらい）。なお、駐車場がございませんので、お車でのご来場はご遠慮ください。やむを得ない場合は、北海道立衛生研究所前の来客者用駐車場をご利用ください。そこから会場まで徒歩で5分ほどです（紫点線、駐車中のトラブル等については残念ながら一切の責任を負えませんのでご了承ください）。



[交通案内]
地下鉄南北線ご利用の場合
北18条駅下車、徒歩7分
「北18条門」到着

※学部と同じ建物の大学別は名称を省略している
※1は他機関の建物を示す

プログラム

開会の辞 8:50 - 9:00 (大会長：伊東 拓也)

一般講演 9:00 - 12:00

1. 北海道のエキノコックス症対策と北海道衛研の役割.

○八木 欣平¹, 吉川 泰弘² (¹北海道立衛研・感染症, ²千葉科学大学・危機管理学部)

2. 北海道大学構内におけるエキノコックス症対策

○浦口 宏二¹, 入江 隆夫¹, 孝口 裕一¹, 八木 欣平¹, 佐鹿万里子², 坪田 敏男² (¹北海道衛研, ²北大獣医野生動物)

3. 青森県内の3農場における羊の消化管内線虫調査—糞便内虫卵の春季顕性化現象の検討—

○工藤 上, 笥 萌子, 鎌倉 佑香 (北里大・獣医寄生虫)

4. 北海道におけるコウモリの内部寄生虫相—吸虫および条虫について—

○佐々木 瑞希¹, 出羽 寛², 中尾 稔¹ (¹旭川医科大学寄生虫学講座, ²オサラッペコウモリ研究所)

5. 北海道のオカモノアラガイ *Succinea lauta* から検出された *Leucochloridium* 属幼虫における分子遺伝学的解析

○尾針 由真^{1,2}, 栗原 康裕³, 板垣 匡^{1,2} (¹岩大・農・獣医寄生虫, ²岐阜大連合獣医, ³道総研・網走水産試験所)

6. 北海道の齧歯類を終宿主とするブラキライマ属吸虫の未記載種, その中間宿主の発見

○中尾 稔¹, 佐々木 瑞希¹, 脇 司², Jason L. Anders³, 片平 浩孝⁴ (¹旭川医大, ²目黒寄生虫館, ³北大環境科学院, ⁴三重大)

7. 岩手県南部地域のサワガニから得られた宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii* のメタセルカリアについて

鈴木 勇磨¹, 尾針 由真^{1,2}, 柴原 壽行³, 板垣 匡^{1,2} (¹岩手大・農・獣医寄生虫, ²岐阜大連合獣医, ³千葉科学大)

休憩 10:24 - 10:36

8. *Plasmodium berghei* Cap494 の性状解析

○北原 優, 木村 勇太, 田中 佑佳, 筏井 宏実 (北里大学獣医学部 獣医寄生虫研究室)

9. in vitro 培養法を用いた *Plasmodium berghei* の oocyst 形成

齋藤 拓海¹, 杉山 真言², 筏井 宏実¹ (北里大学獣医学部 ¹獣医寄生虫学, ²獣医解剖学)

10. *Anopheles stephensi* の腸内細菌叢の解析

○野々垣 雄介¹, 田邊 太志², 西山 啓太³, 筏井 宏実¹ (北里大学 獣医学部 ¹獣医寄生虫学, ²獣医微生物学, ³薬学部 微生物学)

11. エゾリス寄生ノミの保有するバルトネラ属細菌

○松本 高太郎, 田仲 真之, 猪熊 壽 (帯畜大・獣医学研究部門)

12. 牛用駆虫剤エプリノメクチンが牛糞に生息する家畜寄生性ハエ幼虫と駆除対象外の糞食性コガネムシ2種の生存および繁殖に及ぼす影響
○岩佐 光啓, 石川 郁太郎 (帯広畜産大・昆虫)
13. 盛岡市市街地におけるヒトスジシマカの生息域拡大の特徴
○佐藤 卓¹, 佐々木 佑輔², 美濃部 健², 吉村 爽矢² (¹岩手県環境保健研究センター, ²岩手県立大学総合政策学部)
14. 北海道におけるクロバエ科キンパツヒメクロバエ属の一種 *Pollenia pediculata* の発生事例
○伊東 拓也¹, 井手口 菜摘² (¹北海道立衛生研究所, ²北海道江別保健所)

休憩・昼食, 幹事会・理事会 12:00 - 13:30

昼食は、北大北部食堂・中央食堂 1F, 地下鉄北 18 条駅近辺の食堂等をご利用ください。

公開講演会 13:30 - 14:20

虫による皮膚炎

Dermatitis caused by insects.

夏秋 優 (兵庫医科大学皮膚科学)

Masaru NATSUAKI (Hyogo college of medicine)

一般講演 14:24 - 17:36

15. 北海道におけるダニ媒介性疾患ライム病・*Borrelia miyamotoi* 感染症の診断について
○山野 公明¹, 伊東 拓也¹, 佐藤 梢², 川端 寛樹² (¹北海道立衛生研究所, ²国立感染症研究所)
16. *Borrelia miyamotoi* disease の新規診断抗原の探索
○佐藤 梢¹, 熊谷 由美², 山野 公明³, 大西 真¹, 川端 寛樹¹ (¹国立感染症研究所, ²順天堂大学, ³北海道立衛生研究所)
17. ゲノム情報から推定されたボレリア属細菌の進化イベント
○川端 寛樹¹, 関塚 剛史¹, 高野 愛², 黒田 誠¹, 佐藤 梢¹, 大西 真¹ (¹国立感染症研究所, ²山口大学)
18. 吸血と交尾によるのカズキダニ卵黄形成調整
○Taylor, DeMar (筑波大学)
19. 動物園におけるダニ媒介性ウイルス感染症によるチーターの死亡例
○松野 啓太¹, 笠島 和¹, 野々上 範之², 野田 亜矢子², 南 心司², 宇根 有美³, 前田 健⁴ (¹北海道大学, ²安佐動物公園, ³麻布大学, ⁴山口大学)
20. ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) 由来カテプシン L 用タンパク質の性状解析とワクチン抗原としての評価
○村田 史郎¹, 伊勢崎 政美¹, 谷口 綾香¹, 北條 巧¹, 種子野 章², 酒井 英史², 宇野 有紀子², 矢吹 卓也², 市居 修¹, 伊東 拓也³, 今内 覚¹, 大橋 和彦¹ (¹北海道大学, ²ワクチノーバ株式会社, ³北海道立衛生研究所)

21. Performance and consistency of a fluorescence-based high-throughput screening assay for use in *Babesia* drug screening in mice.

○M. A. Rizk^{1,2}, S. A. E. El-Sayed¹, N. Yokoyama¹, and I. Igarashi¹ (¹National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agri. & Vet. Med., ²Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Egypt)

22. Evaluation of in vitro inhibitory effects of clove and green tea extracts on *Babesia* and *Theileria* parasites.

○G. El-S. Betiha^{1,2}, A. M. Marey¹, N. Yokoyama¹, and I. Igarashi¹ (¹National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agri. & Vet. Med., ²Dept. of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Vet. Med., Damanhur University, Egypt)

休 憩 16:00 - 16:12

23. 牛のアナプラズマ病における免疫疲弊化機序の解明

○岡川 朋弘¹, 今内 覚¹, James R. Deringer², Massaro W. Ueti³, Glen A. Scoles³, 村田 史郎¹, 大橋 和彦¹, Wendy C. Brown² (¹北海道大学, ²Washington State University, USA, ³U.S. Department of Agriculture, USA)

24. トキソプラズマのサイクロフィリン 18 が宿主・寄生虫相互作用において果たす機能

○梅田 剛佑, 猪原 史成, 西川 義文 (帯広畜産大学原虫病研究センター)

25. *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)デンスグラニュール蛋白 7 (GRA7) による宿主細胞内制御機構の解明

○檜森 結羽, 猪原 史成, 梅田 剛佑, 西川 義文 (帯広畜産大学原虫病研究センター)

26. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* dense granule protein 9

○Huanping Guo¹, Yang Gao¹, Honglin Jia² and Xuenan Xuan¹ (¹Nationa Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan, ²Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China)

27. Knockout of SAG1-related sequence 2 (SRS2) in *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9

○Yang Gao¹, Huanping Guo¹, Honglin Jia² and Xuenan Xuan¹ (¹Nationa Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan, ²Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China)

28. コモンリスザルにおけるトキソプラズマ症の集団発生報告と分離株のゲノム解析

西村 麻紀¹, 合山 尚志², 富川 創平³, 松崎 素道⁴, 永宗 喜三郎⁴, 古林 与志安², ○西川 義文¹ (¹帯広畜産大学原虫病研究センター, ²帯広畜産大学基礎獣医学, ³おびひろ動物園, ⁴国立感染症研究所)

29. キタキツネはエゾシカに寄生する *Sarcocystis* 属原虫の終宿主となり得るか

○入江 隆夫¹, 浦口 宏二¹, 中村 鉄平^{2,3}, 市居 修³, 高井 伸二⁴, 八木 欣平¹ (¹北海道立衛研・感染症, ²日本食品分析センター千歳研究所, ³北大院・獣医解剖, ⁴北里大・獣・獣医衛生)

総 会 17:40 - 18:10

閉会の辞 18:10 - 18:20 (大会長: 伊東 拓也)

公開講演会

虫による皮膚炎

○夏秋 優（兵庫医科大学皮膚科学）

Dermatitis caused by insects. Natsuaki, M.

皮膚炎の原因となる有害節足動物（虫）はきわめて多く、ハチ、アリ、ムカデ、クモ、カ、ブユ、アブ、ヌカカ、ノミ、トコジラミ、ダニ、ケムシなどを挙げるができる。皮膚炎の発症機序としては、刺咬、吸血、接触などによって有毒成分や唾液腺成分を皮膚に注入あるいは接触させることで生じる刺激性、あるいはアレルギー性の炎症反応（即時型、遅延型）が主体と考えられる。一方で、吸血の際に病原体が生体内に侵入することで感染症を起こす場合もある。今回の講演では昨今問題になっているトコジラミ刺症とマダニ刺症を中心に様々な虫とその生息環境、そして虫によって引き起こされる皮膚炎の臨床像を紹介する。

トコジラミは室内に生息する吸血性昆虫の1種であり、昼間は壁や柱の割れ目、畳や調度品の隙間などに潜んでいる。夜になると生息場所から出て、主に就寝中に露出する部位から吸血する。吸血の際に口器を刺し変えることで、特徴的な皮疹分布を示すので診断の参考になる。近年、各地の宿泊施設でトコジラミが蔓延しており、露出部を中心とした原因不明の虫刺症を診察した場合にはトコジラミ刺症を念頭に置く必要がある。

マダニは本来、野生動物に寄生するが、ヒトへの寄生と感染症の媒介が問題となる。咬着したマダニを除去するには局所麻酔してメスで皮膚ごと切除するのが確実であるが、咬着後、早期であればワセリン法やマダニ取り用器具を用いる方法もある。

マダニ刺症ではライム病などの感染症の予防のために抗菌薬を投与する考え方もあるが、抗菌薬多用を避けるためにも一律に投与するのはなく、症例に応じた適切な判断が必要である。

マダニの刺咬を避けるためには野外活動では肌を露出しないこと、忌避剤であるディートやイカリジンを含めた虫除けスプレーを活用するとよい。

1 北海道のエキノコックス症対策と北海道衛研の役割

○八木 欣平¹, 吉川 泰弘² (¹北海道立衛研・感染症, ²千葉科学大学・危機管理学部)

The Control measures of alveolar echinococcosis conducted by Hokkaido local government and the role of Hokkaido Institute of Public Health. Yagi, K., Yoshikawa Y.

北海道で流行している多包条虫は1900年代に千島列島からのキツネの人為的移入により広がったものと考えられている。最初に北海道で患者が発見されたのは、1936年のことであった。北海道本島での流行は1965年に確認され、1983年のブタの多包虫症の発見後、1993年には北海道全域での流行の拡大が確認された。

北海道庁は1936年の最初の患者の発生からこの疾病対策に強く関与し、対策協議会を設置し、大学や保健所、研究所との協力体制を構築した。多数の患者と死者が発生した礼文島では、終宿主動物の完全な駆逐と上水道の整備により、多包条虫の生活環を断ち切る事に成功した。その後、北海道本島でも流行が確認されたため、北海道庁は、衛生教育、健康診断、媒介(宿主)動物対策、飲料水対策、学術研究を推進した。特に上水道の整備、血清診断法の開発に基づく本病の早期発見の推進、動物調査による感染状況の把握は、人の健康被害を最小限にとどめている。また、1986年には当時不明確であったこの寄生虫の生物学的性状を研究するための実験施設が北海道立衛生研究所に建設され、研究結果は衛生教育や有効な対策の構築に利用されている。またキツネに対する駆虫薬の散布により、リスク軽減を図るための技術も実施検討されている。リスクをゼロにすることは至っていないが、北海道のエキノコックス症に対する取り組みは、野生動物などが媒介する他の人獣共通感染症に対する地方自治体の行政対応モデルとして活用できる。本学会では北海道のエキノコックス症対策の経過を概説し、北海道衛研の役割とその成果・課題について言及する。

2 北海道大学構内におけるエキノコックス症対策

○浦口 宏二¹, 入江 隆夫¹, 孝口 裕一¹, 八木 欣平¹, 佐鹿 万里子², 坪田 敏男² (¹北海道衛研, ²北大獣医野生動物)

A countermeasure against echinococcosis in campus of Hokkaido Univ. Uruguchi, K., Irie, T., Kouguchi, H., Yagi, K., Sashika, M., and Tsubota, T.

エキノコックス症は、キツネやイヌの糞便に含まれるエキノコックスの虫卵をヒトが経口摂取したときに感染する人獣共通寄生虫症である。主に肝臓に幼虫が寄生し、外科的切除以外に根治療法はない。近年、北海道におけるキツネの感染率は40%前後で推移しており、患者も毎年20名ほど発見されている。この疾病の媒介動物対策として、駆虫薬(プラジクアンテル)を入れたベイトを野外に散布し、キツネに食べさせて感染個体を駆虫する方法が開発されている。

札幌市の北海道大学では、近年毎年のようにキツネが繁殖し、2014年春には構内で拾った糞の半分以上からエキノコックスの虫卵が発見された。学生や職員の学内での感染防止のため、2014年夏から無雪期に毎月1回、1個/haの密度で構内全域にベイト散布を行った。散布前後にキツネの糞を採集してエキノコックス虫卵の有無を調査したところ、散布前に53%だった虫卵陽性率は散布開始後0%になった。積雪期に散布を中止すると、翌春わずかではあるが糞便から虫卵が発見され、ベイト散布を再開すると再び0%になった。このパターンが2年に渡って観察された。また、構内でエゾヤチネズミを捕獲したところ、2014年に2頭、2015年に2頭、2016年に3頭のエキノコックス感染個体が発見された。このうち3頭は12カ月齢以上であったことから、ベイト散布実施中であっても中間宿主の感染(キツネへの感染源)は1年以上維持されうることが示された。いったん駆虫されたキツネも、これらのネズミによって再感染し、散布停止期間中に虫卵排出にまで至るものと考えられた。上記の結果を受けて、2016年夏以降は通年毎月1回のベイト散布を続けており、現在効果を検証中である。

3 青森県内の 3 農場における羊の消化管内線虫調査—糞便内虫卵の春季顕性化現象の検討—

○工藤 上, 笥 萌子, 鎌倉 佑香 (北里大・獣医寄生虫)

Spring rise in fecal nematode egg counts in sheep in Aomori. Kudo, N., Kakei, M., Kamakura, Y.

昨年我々は十和田市の綿羊で *Haemonchus contortus* の春季顕性化現象の発現を確認した。今回は、2016 年 11 月～翌年 6 月に、同現象が確認された十和田市 A 農場で昨年に続き綿羊の糞便内線虫卵検査を行うとともに、新たに青森県内の 2 農場 (B, C 農場) について同様の調査を実施した。

糞便内虫卵検査の結果、各農場において乳頭糞線虫, *Trichuris* 属, *Capillaria* 属および *Nematodirus* 属の虫卵と、形態観察による判別が困難な未同定線虫卵が確認された。平均 EPG は C 農場で乳頭糞線虫卵が他の農場と比べて高かった他は、いずれの農場においてもほぼ全調査期間を通じて未同定線虫卵が過半を占めた。未同定線虫卵の平均 EPG は A 農場では昨年と同様に 2 月まで低値を示し、その後は 5 月まで増加した。また、B 農場では全調査期間を通じて未同定線虫卵は増加傾向を示し、C 農場では調査期間中に上下に変動しながら推移した。個体別にみると、A 農場と B 農場では合計 15 頭の綿羊で未同定線虫卵の顕著な増加が認められた。内 12 頭では出産前後 1 ヶ月から虫卵数が増加し、EPG は最高値が低いもので増加前の 2~70 から 456, 高いものでは 375~848 から 21,631 となった。これらの成績は綿羊では妊娠末期に春季顕性化現象が起こるとする海外の報告に類似した。C 農場については出産の有無にかかわらず、一部で一過性の虫卵数の増加が確認された。一方、未同定線虫卵の培養で得た 3 期幼虫の rDNA-ITS 領域の解析により、いずれの農場においても昨年と同様に *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus axei* および *Tr. colubriformis* の 4 種が含まれることが判明したが、それらの経時的動態を明らかにするまでに至らなかった。併せてイベルメクチンによる冬季の駆虫試験についても報告する。

4 北海道におけるコウモリの内部寄生虫相—吸虫および条虫について—

○佐々木 瑞希¹, 出羽 寛², 中尾 稔¹ (¹旭川医科大学寄生虫学講座, ²オサラッペコウモリ研究所)

Endoparasitic platyhelminthes of bats in Hokkaido. Sasaki M., Dewa H. and Nakao M.

北海道には 19 種のコウモリが生息している。その内部寄生虫感染についての報告はあるものの、種の同定に至っていないものが多く、遺伝子学的データも得られていない。コウモリの内部寄生虫相を調査し、形態学および遺伝子学的同定を試みた。

2003 年から 2015 年北海道内において生息状況調査のため捕獲されたコウモリ 42 頭の剖検を行ったところ、消化管内より吸虫, 条虫, 線虫ならびに原虫が検出された。21 頭で吸虫あるいは条虫の寄生が確認され、複数種の重複感染や 100 匹を超える多数寄生も認められた。

12 種 42 頭のうち 7 種 19 頭のコウモリで吸虫の寄生がみられ、*Plagiorchis koreanus* ならびに *P. muelleri* が検出された。また、形態学的に識別困難な *Lecithodendriidae* の吸虫が 3 種存在することが明らかになった。*P. muelleri* は北海道において初めての報告だが、これまで類似の種と混同されてきた可能性がある。条虫は 3 種 6 頭のコウモリに寄生しており、形態学的に類似した 2 種が存在することが明らかとなった。これらの吸虫および条虫は節足動物を中間宿主とするため、昆虫類を介するコウモリへの感染が推測された。今後、形態学的な種の同定を進め、DNA バーコードを付与することで種の同定が容易になる。

内部寄生虫は単純な経口あるいは経皮感染をするもののみならず、中間宿主として節足動物や軟体動物が関与するものも多いことから、宿主の食性や生活環境と深く関わっている。小型コウモリを追跡し、その生態を調査することは難しいが、本研究によりコウモリの生態や行動範囲を推測できると考えている。

5

北海道のオカモノアラガイ *Succinea lauta* から検出された *Leucochloridium* 属幼虫における分子遺伝学的解析

○尾針 由真^{1,2}, 栗原 康裕³, 板垣 匡^{1,2} (¹岩大・農・獣医寄生虫,²岐阜大連合獣医,³道総研・網走水産試験所)

Molecular analysis of *Leucochloridium* sp. larvae that were detected from *Succinea lauta* in Hokkaido, Japan. Ohari, Y., Kuwahara, Y., and Itagaki T.

Leucochloridium 属は、主にスズメ目やキジ目の鳥類を終宿主、オカモノアラガイ科の陸生巻貝類を中間宿主とする吸虫類である。日本において終宿主への寄生は北海道、茨城県、静岡県および京都府において確認されているものの、中間宿主への寄生は北海道および沖縄県のみから報告されている。北海道では生活環が成立している可能性が示唆されているが、それを支持する分子遺伝学的情報は限られている。そこで本発表では、北海道枝幸町で採集されたオカモノアラガイ *Succinea lauta* から *Leucochloridium* 属のスポロシストを検出し若干の分子遺伝学的知見が得られたので報告する。

スポロシストが内部に多数のメタセルカリアを内包すること、先端に黒から茶色の小突起が存在することおよび前半部に太い緑色と細い黒色の帯が見られることなどから、*L. paradoxum* であると形態学的に同定された。また ITS2 および *cox1* 領域の塩基配列を解析し、Genbank に登録のある海外産 *Leucochloridium* 属の配列と比較した結果、ITS2 では *L. paradoxum* と 99%の相同性を示したが、8 塩基と 34 塩基の挿入配列が見られ、*cox1* 領域では 94.4—95.4%の相同性を示した。

これらのことから、北海道に生息する *L. paradoxum* は海外産の *L. paradoxum* とは遺伝的に異なることが明らかとなり、独自の集団を維持している可能性が示唆された。今後はさらに分子学的な情報を蓄積することにより、日本に生息する *Leucochloridium* 属の分布域や集団形成過程を明らかにしていきたい。

6

北海道の齧歯類を終宿主とするブラキライマ属吸虫の未記載種、その中間宿主の発見

○中尾 稔¹, 佐々木 瑞希¹, 脇 司², Jason L. Anders³, 片平 浩孝⁴ (¹旭川医大,²目黒寄生虫館,³北大環境科学院,⁴三重大)

On an undescribed species of the genus *Brachylaima* using rodents as a definitive host in Hokkaido, with a finding of its intermediate hosts. Nakao, M., Sasaki, M., Waki, T., Anders, J. L. and Katahira, H.

ブラキライマ属吸虫 (*Brachylaima* spp.) は哺乳類や鳥類を終宿主とし、陸貝を第一中間宿主と第二中間宿主にする寄生虫である。宿主特異性は第一中間宿主で非常に高く、特定の陸貝でしかセルカリアが産生されないが、第二中間宿主の場合は複数種の陸貝がメタセルカリアの感染に巻き込まれる。

齧歯類のブラキライマ属吸虫は北海道では 1970 年代から札幌近郊のドブネズミやアカネズミの消化管から検出されていたが、全て不明種として扱われていた。この吸虫の成虫は体両側の卵黄腺が前睾丸の下縁に達するほど長く、睾丸と卵巣が球状で大きさがほぼ等しいという形態的特徴をもっている。今回、この吸虫が帯広近郊の森林でエゾヤチネズミ・アカネズミ・ヒメネズミから再発見され、新たなサンプルから DNA 塩基配列 (mitochondrial *cox1* と nuclear 28S) を決定できた。特に *cox1* 配列は “DNA tag” として中間宿主の探索に利用した。

中間宿主の調査は主に旭川・美瑛・富良野・札幌・帯広で実施した。本年6月から9月まで様々な陸貝を採集したところ、この吸虫のメタセルカリアは道内各地のオカモノアラガイ・ヒメマイマイ・パツラマイマイの腎臓から頻繁に発見された。貝1個体あたりのメタセルカリア数はパツラマイマイで最も高く、肝臓におけるスポロシストの発育もパツラマイマイのみで観察された。従って、この吸虫の主要な中間宿主は微小貝のパツラマイマイであると結論した。

今後、マウスの感染実験で得られた成虫や陸貝由来の幼虫の形態に基づいて新種を記載する予定である。

7 岩手県南部地域のサワガニから得られた宮崎肺吸虫 *Paragonimus miyazakii* のメタセルカリアについて

鈴木 勇磨¹, 尾針 由真^{1,2}, 柴原 壽行³, 〇板垣 匡^{1,2} (¹岩手大・農・獣医寄生虫,²岐阜大連合獣医,³千葉科学大)

Paragonimus miyazakii metacercariae obtained from *Geothelphusa dehaani* in Iwate Prefecture, Japan. Suzuki, Y., Ohari, Y., Shibahara, T. and Itagaki, T.

宮崎肺吸虫はサワガニを第2中間宿主とし、ヒトや肉食動物を終宿主とする。2016年9月～10月および2017年4月～5月に岩手県南部の河川で採集したサワガニから肺吸虫のメタセルカリア (Mc) が検出された。Mcの大きさ(n=25)は377-485 μ m, 平均437.5 μ mであり、宮崎肺吸虫のMcに近似した。全DNAを抽出し、PCRによりITS2領域を増幅して塩基配列を決定した。配列(465bp)は全てのMcで一致し、GenBankの日本各地由来の*P. miyazakii*配列と99.2-100%、近縁種とされる中国由来の*P. skrjabini*と98.8-100%一致した。ミトコンドリアDNAの*cox1*領域(327bp)も全てのMcで一致し、*P. miyazakii*と97.6-100%、*P. skrjabini*と89.8-92.2%が一致した。以上から、今回検出されたMcは*P. miyazakii*と分子同定された。*cox1*領域の分子系統樹では、日本各地由来の*P. miyazakii*は同一クレイドを形成し、極めて近縁であると考えられた。一方、*P. miyazakii*は*P. skrjabini*とは別のクレイドを形成した。

8 *Plasmoium berghei* Cap494 の性状解析

〇北原 優, 木村 勇太, 田中 佑佳, 筏井 宏実 (北里大学獣医学部 獣医寄生虫研究室)

Characterization of *Plasmoium berghei* Cap494 protein. Kitahara, Y., Kimura, Y., Tanaka, Y., Ikadai, H.

昨年度の北日本支部合同大会で、*Plasmodium berghei*のPbCap494タンパク質がオーシスト形成初期に関与する重要な壁構成タンパク質であることを報告した。今回、PbCap494について新たな知見が得られたので報告する。

蚊体内ステージにおけるPbCap494のmRNA発現動態をリアルタイムPCRにて調べたところ、吸血後48時間を境に発現量が増加していた。間接蛍光抗体法を用いて赤内型から蚊吸血後2日目までの各ステージにおけるPbCap494発現を観察したところ、赤内型のリング、トロフォゾイトには発現しておらず、シャイゾント内のメロゾイト、ガメトサイトおよびオーキネートで発現していた。さらに、シャイゾント内のメロゾイトに反応を示していたことから抗PbCap494抗体を用いたメロゾイトの赤血球侵入試験を行ったところ、抑制効果は認められなかった。次に、PbCap494遺伝子KO原虫を用いてオーシストの浸透圧耐性試験を行ったところ、野生型と比べ明らかにオーシストが浸透圧に対して耐性が低下していた。KO原虫のスポロゾイト形成およびマウスへの感染能を調べるために、KO原虫感染マウスを吸血させ、唾液腺スポロゾイトがいると思われる吸血後25日目の蚊を未感染マウスへ吸血させてスポロゾイト感染試験を行ったところ、野生型スポロゾイト感染と同様に吸血後4-5日目にマウス赤血球内に原虫が出現したことから、KO原虫はスポロゾイトが形成され、そのスポロゾイトはマウスへの感染能を有していることが確認された。

以上のことからPbCap494は、形成初期に関与する主要な壁構成タンパク質であるが、スポロゾイトの感染能には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

9

in vitro 培養法を用いた *Plasmodium berghei* の oocyst 形成

齋藤 拓海¹, 杉山 真言², 〇筏井 宏実¹ (北里大学獣医学部¹ 獣医寄生虫学,² 獣医解剖学)

Observation of Oocyst formation of *Plasmodium berghei* using in vitro culture. Saito, T., Sugiyama, M., Ikadai, H.

【背景】 マラリアは *Plasmodium* 原虫によって引き起こされ、蚊は重要な媒介者である。 *Plasmodium* 原虫の gametocyte は媒介蚊に吸血されると蚊中腸内において雌雄 gamete, zygote を経て運動能を有する ookinete に分化する。 ookinete は蚊中腸細胞に侵入し、中腸基底膜下に到達した後、形態変化を始めて ookinete から oocyst を形成する。しかしながら ookinete および oocyst 形成については不明な点が多い。

【目的】 本研究では、oocyst の in vitro 培養を試みて ookinete の細胞侵入から oocyst 形成に至る形態変化を観察した。【材料と方法】 ネズミマラリア原虫 *P. berghei* とフィーダー細胞としての昆虫細胞 (*Drosophila* S2) を用いて、oocyst の in vitro 培養を行った。 *P. berghei* 感染マウスより感染血液を回収し、ookinete 誘導培養後、ookinete と S2 細胞の共培養を行った。その後、oocyst 壁のマーカートンパク質である PbCap380 に対する抗体を用いて間接蛍光抗体法 (IFA) を行い、陽性反応が認められたものを oocyst とし観察した。【結果および考察】 ookinete と S2 細胞の共培養後 2 日目に IFA を行って観察した結果、ookinete, ookinete および PbCap380 を発現する oocyst が観察された。さらに、共培養後 15 日目まで抗 PbCap380 抗体に反応する oocyst 像が認められた。15 日目の oocyst は DAPI 染色による核分裂像が観察されたが oocyst 内部に sporozoite 形成は見られなかった。さらに、電子顕微鏡を用いた観察も行った。それらの結果より、oocyst 内部で sporozoite 形成は行われず、sporoblast 形成までは行われていることが確認された。

10

Anopheles stephensi の腸内細菌叢の解析

〇野々垣 雄介¹, 田邊 太志², 西山 啓太³, 筏井 宏実¹ (北里大学 獣医学部¹ 獣医寄生虫学,² 獣医微生物学,³ 薬学部 微生物学)

Analysis of the midgut microbiota in adult female *Anopheles stephensi*. Nonogaki, Y., Tanabe, T., Nishiyama, K., Ikadai, H.

ハマダラ蚊の中腸内細菌叢が作り出す腸内環境が、マラリア原虫の有性生殖ステージにおける発育分化に影響を与えると報告されている。しかしながら、それら報告された研究グループの中腸内細菌叢は全て一致しておらず、ハマダラ蚊：中腸内細菌叢：マラリア原虫の3者における相互関係の影響を検討するには我々の研究室内で飼育維持されているハマダラ蚊の中腸内細菌叢を把握することが必要である。そこで我々の研究室内で飼育維持されているハマダラ蚊の中腸内細菌叢の分離同定および全体像の把握を試みた。

ハマダラ蚊 *Anopheles stephensi* (STE2 株) の雌から得られた中腸を PBS 内でホモジナイズし菌液を作成した。作成した菌液を、階段希釈して羊血液寒天培地に塗布を行い 27°C および 37°C で 24 時間培養した。27°C および 37°C どちらにおいても寒天培地上には形態的に同一な 1 種類のコロニーのみが発育し、1 中腸あたり 4×10^3 個が確認された。さらに同定試験を行ったところ、グラム陰性、カタラーゼ (+)、オキシダーゼ (-) を確認した。その後、得られた細菌は Api20E 同定キットによって *Serratia marcescens* と同定された。

腸内細菌叢が 1 種類の細菌のみで構成されているとは考えにくいと、中腸サンプルを 16S rRNA の次世代シーケンス法およびダクローンライブラリー法で細菌叢を解析したところ、*Asaia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Serratia* などの菌種が確認された。

今後は、各種条件下における中腸内細菌叢の変化およびハマダラ蚊：中腸内細菌叢：マラリア原虫の3者における相互関係について検討していきたい。

11 エゾリス寄生ノミの保有するバルトネラ属細菌

○松本 高太郎, 田仲 真之, 猪熊 壽 (帯畜大・獣医学研究部門)

Bartonella spp. harbored in fleas infesting Hokkaido squirrels (*Sciurus vulgaris orientis*).

Matsumoto, K., Tanaka, M. and Inokuma, H.

【背景と目的】バルトネラ属細菌は人獣共通感染症の病原体であり、ノミやマダニが媒介するとされている。一方、エゾリスは北海道において、最も人に身近な野生動物の1つであり、ノミの寄生がよく見られる。2年前の本学会でエゾリス寄生ノミからバルトネラ属細菌を検出したことを報告したが、配列決定と系統学的解析を行い、新たなバルトネラ属細菌が検出されたのでその報告を行う。【材料と方法】十勝地方でシャーマントラップにより捕獲したエゾリス、および交通事故により回収されたエゾリス死体から寄生ノミを採取した。形態学的に種を同定した後、DNAを抽出、バルトネラ属の *rpoB* 遺伝子を標的としたPCRを実施した。陽性検体については塩基配列の決定を試み、系統学的な解析に用いた。【結果と考察】エゾリス54個体からノミ359匹を採取し、PCRに用いた。ノミの内訳は、*Monopsyllus* 属ノミ274匹、*Aenigmopsylla grodekovi* 83匹、*Ctenophthalmus* 属ノミ1匹、分類不能1匹であった。PCRを行った結果、エゾリス6個体からのノミ12匹(3.3%)が陽性であった。陽性ノミは全て *Monopsyllus* 属であった。このうち5検体から部分的な配列が得られ、3検体は *Bartonella* TM21-1 と最も相同性が高く、既知の種では *B. grahamii* と最も近縁であった。残りの2検体は *B. washoensis* と最も近縁であった。本調査の結果から、エゾリスに寄生している *Monopsyllus* 属ノミは、2種類のバルトネラ属細菌を保有していることが明らかとなった。

12 牛用駆虫剤エプリノメクチンが牛糞に生息する家畜寄生性ハエ幼虫と駆除対象外の糞食性コガネムシ2種の生存および繁殖に及ぼす影響

○岩佐 光啓, 石川 郁太郎 (帯広畜産大・昆虫)

Effects of eprinomectin on survival of 2 species of dung beetles and larvae of blood-sucking fly inhabiting cattle dung. Iwasa, M., Ishikawa, I.

家畜内外部寄生虫の駆虫剤が牛糞に残留し、駆除対象外の糞食性昆虫に及ぼす影響が問題になっている。そこで、牛用駆虫剤エプリノメクチンが、糞食性コガネムシ2種、カドマルエンマコガネとダイコクコガネの生存と繁殖に及ぼす影響を調査し、あわせて家畜吸血害虫ノサンバエの幼虫に対する効果も報告する。2回のポアオン法によって牛に投与したエプリノメクチンは、投与後7日(1回目)または14日目(2回目)までの牛糞で検出され、濃度のピークは、2回とも1日目でみられた。カドマルエンマコガネの成虫生存率と糞球形成数は、投与後1,3日目で有意に減少し、羽化率は投与後1,3,7日目で著しく減少した。ダイコクコガネの成虫生存率は、投与後3日目で有意に低下し、糞球形成数は投与後3日(1回目)と7日目(2回目)で有意に減少した。成虫羽化率は、対照区では100%(1回目)と71.6%(2回目)だったが、投与区では投与後3日目の糞で産卵そのものがみられず、7日目と14日目の糞では産み付けられた卵または孵化した幼虫はすべて死亡した。またノサンバエ幼虫は、投与後1,3,7日目の糞ですべて死亡し、14日目までその生存率は有意に低下した。

13 盛岡市市街地におけるヒトスジシマカの生息域拡大の特徴

○佐藤 卓¹, 佐々木 佑輔², 美濃部 健², 吉村 爽矢² (¹岩手県環境保健研究センター, ²岩手県立大学総合政策学部)

Characteristics of *Aedes albopictus* range expansion in Morioka city urban area. Satou, T., Sasaki, Y., Minobe, T., Yoshimura, S.

我々は 2009 年より岩手県内のヒトスジシマカの幼虫調査を行っており、同蚊の県内の分布をほぼ明らかにしてきた。岩手県におけるヒトスジシマカの生息北限は盛岡市であり、2010 年に市街地南部地域においてヒトスジシマカの定着が確認されて以来、その生息域は 2017 年までに市街地内を約 10km 北上している。しかし、盛岡市市街地における同蚊の生息分布は連続的な地域の拡大ではなく、直近の生息地点から数百～数千 m 離れた地点に散在的に拡大していることが確認されている。ヒトスジシマカの飛翔範囲は半径 100m 程度であることから、同蚊の移動は飛翔のみではなく、電車や自動車等の交通機関によって移動し、定着したことが推測される。

2017 年は、盛岡市内 16 地点でヒトスジシマカの定点調査を行っている。シーズン初期の 6 月中はすべての地点において同蚊の生息が確認されなかったが、7 月末までには 6 地点、8 月末までにはさらに 2 地点でヒトスジシマカの生息が確認された。生息条件の厳しい北限地域である盛岡市市街地においては、越冬卵により繁殖ができる地点と越冬卵による繁殖はできないがシーズン中に成虫が何らかの方法で輸送され、シーズン限定で繁殖している地点が混在している可能性がある。

14 北海道におけるクロバエ科キンパツヒメクロバエ属の一種 *Pollenia pediculata* の発生事例

○伊東 拓也¹, 井手口 菜摘² (¹北海道立衛生研究所, ²北海道江別保健所)

An outbreak of *Pollenia pediculata* (Diptera, Calliphoridae) in Hokkaido. Ito, T. and Ideguchi, N.

Pollenia pediculata は欧州から極東アジアにかけての温・寒帯に分布し、米国及びカナダに侵入した種で、日本からは知られていなかった。2013 年札幌市北区において本種が採集され、2017 年まで継続して採集されている。さらにその後、札幌市東区、同市西区、江別市でも採集された。これらの採集例はいずれも 10 月から 4 月にかけての寒冷期で、家屋内や建物の外壁、二重窓の間などで採集された。なかには、マンション 10 階の窓に大量に飛来した事例や食品工場内に侵入して問題となった事例もあった。今のところ他の地域では得られていないことから、「近年道外から侵入したのでは？」との仮定の下に 14 個体について COI 遺伝子全域の塩基配列を調べたところ、複数のハプロタイプが得られ、明瞭なボトルネック効果は認められなかった。

海外では、本種を含む数種のキンパツヒメクロバエ属が秋から春にかけて越冬のため屋内に侵入することが知られている。本種の幼虫はバライロツリミズを捕食し、成虫は花の蜜に集まるとされることから、感染症を媒介するような重要な衛生害虫ではないと考えられる。しかしながら、ハエが屋内に侵入すること自体が一般住民や食品製造業者にとっては脅威であるため、今後発生動向に注意を払うとともに、発生が続く場合には行政の衛生担当者や PCO 等への情報提供も必要になると考えられる。

- 15 北海道におけるダニ媒介性疾患ライム病・*Borrelia miyamotoi*感染症の診断について
○山野 公明¹, 伊東 拓也¹, 佐藤 梢², 川端 寛樹² (¹北海道立衛生研究所, ²国立感染症研究所)

Diagnosis of tick-borne diseases, Lyme disease and *Borrelia miyamotoi* disease, in Hokkaido. Yamano, K., Ito, T., Sato, K. and Kawabata, H.

ダニ媒介性疾患は近年、西日本・南日本における SFTS や北海道におけるダニ媒介性脳炎による死亡例が報告されたことから、注目が高まっている。また、ダニ媒介性疾患を診断する場合、臨床現場では、SFTS や脳炎などのウイルス感染症や紅斑熱のようなレッチャ感染症に加えて、ボレリア感染症が鑑別対象となる場合がある。とりわけ北海道の場合、ボレリア感染症であるライム病・回帰熱（新興回帰熱、*Borrelia miyamotoi* disease : BMD）の報告例の方が、これまでのところが多い状況にあり、それらへの対策が重要視されている。よって、北海道立衛生研究所では現在、ライム病及び BMD（感染症部医動物 G）、SFTS 及びダニ媒介性脳炎（同ウイルス G）の診断を行政検査対応として行っている。本発表では演者らが実施しているライム病・BMD 診断の概要を中心に報告する。

現在、ライム病・BMD の診断法として、*Borrelia afzerii* 由来抗原及び BMD 特異的リコンビナント抗原を用いたウエスタンブロット法で抗体を検出 (IgM, IgG) する方法を用いている。その結果、2013.10~2017.3 に実施した検査の総数 73 件から、ライム病 13 件、BMD 17 件の血清学的陽性例を検出した。また、抗体検出による間接的診断のみではなく、培養と PCR も適宜行い、病原体及び遺伝子を直接捉える診断も試みている。

- 16 *Borrelia miyamotoi* disease の新規診断抗原の探索
○佐藤 梢¹, 熊谷 由美², 山野 公明³, 大西 真¹, 川端 寛樹¹ (¹国立感染症研究所, ²順天堂大学, ³北海道立衛生研究所)

Investigation of new antigen for serodiagnosis system on *Borrelia miyamotoi* disease. Sato, K., Kumagai, M., Yamano, K., Ohnishi, M. and Kawabata, H.

【目的】*Borrelia miyamotoi* disease (以下 BMD) の抗体検査には回帰熱ボレリアに特異的な GlpQ 抗原を用いるが、抗 BMD 抗体の検出感度は感染初期で 16% と報告されている。本研究では、GlpQ 抗原の低感度を補う新規診断抗原の探索とその性能評価について検討を行った。【材料と方法】*In silico* 解析により *B. miyamotoi* (以下 BM) に特異的な 59 遺伝子を抽出し、His-Tag を付加した組換え抗原を大腸菌を用いて作成後、BM 感染マウス血清と反応した抗原を BMD 新規診断抗原候補とした。これらの抗原を用いて、血液中から BM 遺伝子が検出された BMD 確定患者 8 例より得られた血清 13 検体との反応性をウエスタンブロット法により調べた。対照群として、梅毒患者 7 例ならびに健常者(国立感染研血清銀行より分与)16 例の血清を用いた。【結果と考察】BMD 診断抗原候補として *bom1470*, *bom1092*, *bom1441* の 3 遺伝子が選定された。BMD 確定患者群では、抗 GlpQ 抗体陽性 3 例(38%)に対し、抗 BOM1470 抗体陽性 4 例(50%)、抗 BOM1092 抗体陽性 2 例(25%)、抗 BOM1441 抗体陽性 4 例(50%)であった。対照群である梅毒患者群ならびに健常者群では、抗 BOM1470, BOM1092 抗体は見出されなかった一方で、抗 BOM1441 抗体が両対照群において見られたことから、新規診断抗原候補より除外した。海外の報告同様、本研究においても GlpQ 抗原単独による検査感度は低かった一方で、GlpQ 抗原に加え、BOM1470 と BOM1092 抗原を BMD 新規診断抗原として加えることで、検査感度は 38% から 63% に上昇し、その有用性が確認された。

17 ゲノム情報から推定されたボレリア属細菌の進化イベント

○川端 寛樹¹, 関塚 剛史¹, 高野 愛², 黒田 誠¹, 佐藤 梢¹, 大西 真¹ (¹国立感染症研究所, ²山口大学)

Evolutional event estimated from borrelial genomes. Kawabata, H., Sekizuka, T., Takano, A., Kuroda, M., Sato, K. and Ohnishi, M.

ボレリア属細菌は節足動物によって媒介されるスピロヘータで、人獣共通の感染症起因菌となっている。国内には、ライム病群ボレリア(LD)8種、軟ダニ媒介性回帰熱群ボレリア(STB-RF)1種の他、硬ダニ媒介性回帰熱群ボレリア(HTB-RF)が複数種確認されており、それぞれヒトを含む哺乳類や鳥類、爬虫類への感染が報告されている。これに加え、輸入爬虫類に随伴して国内侵入した爬虫類型ボレリア(REP)が複数種存在することが2010年に我々の調査研究によって明らかにされた。本研究では、REP 4株について、NGSによるdraft genomeを取得し、既知ボレリアゲノム配列(LDボレリア29株, STB-RFボレリア18株, HTB-RF5株)との比較検討を行った。使用したREPは、経代数が5以下でかつclone化したものを使用した。各々のゲノム相同性(ANI値)はLD-REP間では71.66-74.74%, RF-REP間では75.99-82.67%でありREPはRFにより近縁であることが示された。また真性細菌種で保存されている24遺伝子由来抗原のアミノ酸配列をもとにした系統解析(MLSA)においても、REPはRFに近縁であることが示された。またボレリア属細菌の重要な形質の一つである媒介節足動物との和合性は、REP群の確立後に新たな形質を獲得してきたと推定された。特にHTBRFの祖先が獲得した新たなダニ感染性が揚力となってSTB-RFが形成された可能性が示唆された。本推論はゲノム解析から得られたものであり、今後はこれら進化イベントに関係した因子、遺伝子の同定が望まれる。

18 吸血と交尾によるのカズキダニ卵黄形成調整

○Taylor, DeMar (筑波大学生命環境系)

Two Phase Regulation of Reproduction in a Soft Tick. Taylor, D.

Mating and blood feeding are essential for reproduction to occur in ticks. The soft tick *Ornithodoros moubata* provides an excellent model species to study the separate roles of feeding and mating in the regulation of reproduction, because they can mate before or after feeding. Ecdysteroid titers in the hemolymph increase after blood feeding and induce oocyte maturation in only mated females. Virgin females show low levels of ecdysteroids and egg proteins, but no mature oocytes. The site of ecdysteroid synthesis was shown to be the ovary and ecdysteroidogenesis carried out by the same enzymes as occur in insects. Expression of the egg protein gene, vitellogenin (Vg), also shows differences in mated and virgin females revealing a two phase regulation of reproduction by feeding and mating. Mated female ticks injected with rapamycin, an inhibitor of the Target of Rapamycin (TOR) kinase, show reduced concentrations of Vg proteins in the hemolymph and delayed egg laying. These results indicate the TOR nutrient pathway also provides a signal to regulate reproduction in *O. moubata*.

- 19 動物園におけるダニ媒介性ウイルス感染症によるチーターの死亡例
○松野 啓太¹, 笠島 和¹, 野々上 範之², 野田 亜矢子², 南 心司², 宇根 有美³, 前田 健⁴(¹北海道大学, ²安佐動物公園, ³麻布大学, ⁴山口大学)

Fatal cases of captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*) by the infection of an endemic tick-borne phlebovirus. Matsuno, K., Kasajima, N., Nonoue, N., Noda, A., Minami, S., Une, Y. and Maeda, K.

多種多様な生物を展示する動物園では、感染症のコントロールが重要である。しかし、動物に対する病原性が不明な病原体について、予防的措置を実施することは難しい。今回、我々は広島市の動物園において連続して死亡した2頭のチーターの死因が、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルス感染であったことを明らかにした。SFTS ウイルスはブニヤウイルス目フレボウイルス科に分類されるダニ媒介性ウイルスである。

2頭のチーターはそれぞれ、食欲不振や下痢などの症状に加え、激しい血小板減少および白血球減少を呈し、発症から1週間以内に死亡した。病理解剖では消化器管内に潰瘍と出血が認められた。リンパ節を中心に各臓器から SFTS ウイルスが検出され、特に2例目では唾液中へのウイルス分泌が確認できた。分離された SFTS ウイルスの塩基配列から、2頭共に中国地方に広く分布するウイルスに感染していたことが分かった。

本症例は、動物における初の SFTS ウイルス自然感染による死亡例である。2例目では、ほぼ毎日血液検査が実施されており、病態進行の貴重なデータが得られた。また、動物園におけるダニ媒介性感染症対策が必要であると再確認されるきっかけとなった。

- 20 ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) 由来カテプシン L 用タンパク質の性状解析とワクチン抗原としての評価

○村田 史郎¹, 伊勢崎 政美¹, 谷口 綾香¹, 北條 巧¹, 種子野 章², 酒井 英史², 宇野 有紀子², 矢吹 卓也², 市居 修¹, 伊東 拓也³, 今内 覚¹, 大橋 和彦¹(¹北海道大学, ²ワクチノーバ株式会社, ³北海道立衛生研究所)

Characterization of a Cathepsin L-like protein identified in poultry red mites, *Dermanyssus gallinae*, and assessment of its potential as a vaccine antigen. Murata, S., Isezaki, M., Taniguchi, A., Hojoh, T., Taneno, A., Sakai, E., Uno, Y., Yabuki, T., Ichii, O., Ito, T., Konnai, S. and Ohashi, K.

ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) は鳥類に寄生する吸血を行うダニの一種で、日本国内においても多くの養鶏場で汚染が確認されている。ワクモに寄生された鶏は、貧血や産卵率の低下等の症状が認められ、生産性の低下が深刻な問題となっている。ワクモの防除は殺虫剤の使用により行われているが、最近では薬剤耐性ワクモの出現も報告され、その防除は困難となっている。そのため、現行の対策手段に変わる新たな防除法の確立が望まれている。本研究室では新規防除法として、抗ワクモワクチンの開発研究に取り組んでいる。本研究では、ワクモ由来カテプシン L タンパク質 (Cat-L) について、その性状とワクチン抗原としての検討結果について紹介する。まず RACE 法により、Cat-L 遺伝子の全配列を同定した。次に、部位別およびステージ別の発現解析を行ったところ、Cat-L 遺伝子は腸管での発現、吸血を行う全ステージでの発現が認められた。得られた遺伝子情報を基に作製した組換えタンパク質には酵素活性が認められ、カテプシン L 様酵素としての機能が示唆された。最後に、組換え CatL 免疫鶏の血液をワクモに吸血させ、抗ワクモ効果を観察したところ、免疫鶏の血液を吸血したワクモにおいて高い死亡率が観察された。以上より、CatL のワクチン抗原としての有用性が示唆され、抗ワクモワクチンによる新たなワクモ制御法としての可能性が示された。

21 Performance and consistency of a fluorescence-based high-throughput screening assay for use in *Babesia* drug screening in mice.

○M. A. Rizk^{1, 2}, S. A. E. El-Sayed¹, N. Yokoyama¹, and I. Igarashi¹ (¹National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agri. & Vet. Med., ² Department of

Internal Medicine and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Mansoura University, Egypt)

マウスのバベシア薬物探索に用いる蛍光ベースのハイスループットスクリーニング法の性能および再現性.

○M. A. リズク, A. E. エルサユッド, 横山 直明, 五十嵐 郁男

In this study, we evaluated the validity of a fluorescence-based assay using SYBR Green I (SG I) stain for screening antibabesial compounds against *B. microti* in mice. Two different hematocrits (HCTs; 2.5% and 5%) were used. Correlating relative fluorescence units (RFUs) with parasitemia showed significant linear relationships with R² values of 0.97 and 0.99 at HCTs of 2.5% and 5%, respectively. Meanwhile, the Z' factors in a high-throughput screening (HTS) assay were within the permissible limit (≥ 0.5) at 2.5% HCT and lower than this value at 5% HCT. Taken together, the highest signal-to-noise (S/N) ratios were obtained at 2.5% HCT; therefore, we concluded that 2.5% was the best HCT for applying fluorescence assay in antibabesial drug screening in mice. Additionally, positive control mice and those treated with diminazene aceturate, pyronaridine tetrphosphate, and an allicin/diminazene aceturate combination showed peak parasitemia and fluorescence values on the same day post-inoculation. Moreover, using different concentrations of SG I revealed that the optimal concentration was 2x. In summary, considering that all experiments were applied under optimal laboratory conditions, fluorescence assay at 2.5% HCT using 2x SG I for *B. microti* parasite offers a novel approach for drug screening in mice.

22 Evaluation of *in vitro* inhibitory effects of clove and green tea extracts on *Babesia* and *Theileria* parasites.

○ G.El-S. Betiha^{1,2}, A. M. Marey¹, N. Yokoyama¹, and I. Igarashi¹ (¹National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agri. & Vet. Med., ²Dept. of

Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Vet. Med., Damanhur University, Egypt)

グローブ及び緑茶抽出物のバベシアとタイレリアに対する増殖抑制効果の検討. ガーバル・エルサバル・ビティハ, アマニ・マグディ・マライ, 横山 直明, 五十嵐 郁男

Babesia and *Theileria* are apicomplexan protozoan parasites that infect red blood cells and cause a haemolytic anaemia and haemoglobinuria that is sometimes followed by death. Currently available chemotherapeutics for piroplasmosis as imidocarb dipropionate and diminazine aceturate result in numerous negative impacts including toxicity and emerging of drug-resistant parasites. Therefore, it is necessary to look for other chemotherapeutics. Clove from the tree *Syzygium aromaticum* is effective as antimicrobial, anthelmintic and anti-*Plasmodium*. Green tea from *Camellia sinensis* leaves has anti-Trypanosomal effect. In the present study, growth inhibition effect of clove and green tea extracts were evaluated against *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi* and *T. equi*. The lowest IC₅₀ value was observed at 19.6±2.2 µg/ml on *B. caballi* for methanolic clove extract, while 32.7±20.3 µg/ml on *B. caballi* for methanolic green tea extract. 60±7.3 µg/ml was estimated on *T. equi* for methanolic clove extract while 60.8±7.9 µg/ml was estimated on *T. equi* for methanolic green tea extract. Methanolic clove extract and methanolic green tea extract showed high effect on *B. bovis in vitro* as we found that the IC₅₀ values at 109.8±3.8, 114±6.1 µg/ml respectively. Methanolic clove extract showed growth inhibitory effect against *B. bigemina* with IC₅₀ value at 8.7±0.09 µg/ml while methanolic green tea extract showed high effect against *B. bigemina* with IC₅₀ value at 71.3±3.7 µg/ml. These findings suggest that the methanolic clove and methanolic green tea extracts have the potential to be an alternative remedy for treating piroplasmosis.

23

牛のアナプラズマ病における免疫疲弊化機序の解明

○岡川 朋弘¹, 今内 寛¹, James R. Deringer², Massaro W. Ueti³, Glen A. Scoles³, 村田 史郎¹, 大橋 和彦¹, Wendy C. Brown² (1)北海道大学, (2)Washington State University, USA, (3)U.S.

Department of Agriculture, USA)

Mechanisms of immune exhaustion during bovine anaplasmosis. Okagawa, T., Konnai, S., Deringer, J.R., Ueti, M.W., Scoles, G.A., Murata, S., Ohashi, K. and Brown, W.C.

Anaplasma marginale はウシの赤血球に感染するリケッチアで、マダニによって媒介され、重度の貧血により感染牛の30%を死に至らしめる。生存した牛でも菌が体内から完全に排除されず、持続感染が生涯に渡る。*A. marginale* 感染牛では急性期に抗原特異的 CD4⁺ T 細胞が急激に疲弊化（機能抑制）し、臨床症状や潜伏感染への移行を助長すると考えられている。一般的に T 細胞の疲弊化は、過剰な抗原刺激に応じて、T 細胞に免疫抑制受容体 PD-1 や LAG-3 が過剰発現することで引き起こされる。そこで本研究では、*A. marginale* 感染牛における PD-1 および LAG-3 の発現解析および機能解析を行い、牛のアナプラズマ病における T 細胞疲弊化機序の解明を試みた。

A. marginale 外膜タンパク質 (OMP) を免疫して T 細胞応答を誘導したウシに同菌株を接種すると、OMP 特異的 T 細胞応答が感染後 5 週以降から著しく減弱し、同時に菌血症と貧血が認められた。一方で、CD4⁺PD-1⁺LAG-3⁺ 疲弊化 T 細胞の割合は感染後徐々に増加し、感染後 5 週目でピークに達した。さらに、ブロック抗体により PD-1 および LAG-3 経路を遮断すると、疲弊化していた CD4⁺ T 細胞応答が再活性化された。

本研究により、ウシのアナプラズマ病では、免疫抑制受容体を介して CD4⁺ T 細胞の疲弊化が急激に引き起こされ、持続感染を促進することが示唆された。今後は、アナプラズマ病をモデル疾患として、ウシの難治性感染症における T 細胞疲弊化の分子機序を詳細に解明していきたい。

24

トキソプラズマのサイクロフィリン 18 が宿主・寄生虫相互作用において果たす機能

○梅田 剛佑, 猪原 史成, 西川 義文 (帯広畜産大学原虫病研究センター)

Roles of *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18 in host-parasite interaction. Umeda, K., Ihara, F., Nishikawa, Y.

トキソプラズマのサイクロフィリン 18 (TgCyp18) は、インターロイキン 12 (IL-12) 産生の誘導など、宿主の生体防御機構を活性化する作用を持つとされている。しかし、既報の多くは組換えタンパク質や過剰発現株原虫を用いた結果に基づいており、実際の原虫感染での当該分子の機能、および作用機序についてはあまり研究が進んでいない。

そこで本研究では、Pru 株の野生型原虫から TgCyp18 の欠損型および補完型の原虫を作製し、野生型・欠損型・補完型の比較により TgCyp18 の宿主生体防御系に対する作用とその機構について解析した。in vitro 解析では、宿主細胞への侵入率、およびその後の増殖率について各遺伝子型の間に差は見られなかった。一方、マウスを用いた in vivo の感染実験では、欠損型原虫感染群は他より有意に死亡率が低く、さらに感染 30 日後における脳内の原虫量も欠損型原虫感染群では少なかった。しかし、IL-12 などのサイトカインの産生量や遺伝子発現量には野生型と欠損型原虫感染群との間で差が認められず、インターフェロン・ガンマ誘導性の抗トキソプラズマ遺伝子群の発現も同程度であった。原虫に対する免疫応答に関連し、既知のケモカイン受容体遺伝子の発現を調べたところ、欠損型原虫接種 5 日後の腹腔浸潤細胞において CXC ケモカイン受容体 2 (CXCR2) 発現の増加が認められた。このことは好中球などの CXCR2 陽性細胞が感染局所に増加したことを示唆しているが、一方でそのリガンドとなる各ケモカインの発現量には差は見られなかった。したがって TgCyp18 は、免疫細胞が原虫の感染に反応して感染局所へ浸潤する際ではなく、その後に原虫に感染した細胞が再び全身へ循環していく段階で機能している可能性が考えられる。

25 *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)デンスグラニクル蛋白7 (GRA7) による宿主細胞内制御機構の解明

○檜森 結羽, 猪原 史成, 梅田 剛佑, 西川 義文 (帯広畜産大学原虫病研究センター)

Toxoplasma gondii dense granule protein 7 (GRA7) regulates intracellular response of host cell.
Himori, Y., Nishikawa, Y.

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はネコ科動物を終宿主とし, ヒトを含む様々な温血動物を中間宿主とする. その感染は免疫不全動物における多臓器不全や妊娠動物における流産などのトキソプラズマ症を引き起こし, それらの症状の多くは宿主の炎症反応に起因する. 宿主の炎症反応を誘導する原虫因子のうち GRA7 は高い免疫原性を示し, ワクチン候補となる可能性が示唆されている. しかし, GRA7 により惹起される細胞内制御機構の多くは不明である. 今回, GRA7 の機能を明らかにするため GRA7 欠損原虫を作製し, *in vitro* および *in vivo* において親株 (WT) 原虫 (Pru) と欠損原虫の比較による性状解析を行った.

WT 原虫と比較し, 欠損原虫感染では宿主細胞内での炎症性サイトカイン産生に關与する転写因子 NF- κ B の活性化の低下, サイトカイン産生の減少が認められた. また, マウス感染実験では, 欠損原虫感染群において有意な生存率および体重の減少, クリニカルスコアおよび血中サイトカイン濃度の増加が認められた.

今回の実験により, GRA7 は細胞内シグナル伝達経路において転写因子 NF- κ B の活性化に關与し, サイトカイン産生による炎症反応の誘導に寄与していることが示唆された. GRA7 依存性炎症反応は感染初期の虫体排除に重要であると考えられるため, 欠損原虫の感染に対するマウスの感受性が増加したと推測される.

Functional analysis of *Toxoplasma gondii* dense granule protein 9.

26 ○Huanping Guo¹, Yang Gao¹, Honglin Jia² and Xuenan Xuan¹
(¹National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan, ²Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China)

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that can invade any nucleated cell in any warm-blooded animal and causes toxoplasmosis. Dense granule proteins (GRAs) of *T. gondii* are secreted largely in both bradyzoite and tachyzoite stages of the parasite. Some dense granule proteins identified play major structural functions within the parasitophorous vacuole (PV) and the cyst wall. Moreover, their particular location within the PV allows them to be involved in various interactions between parasites and the host cells. Dense granule protein 9 (GRA9) gene has been identified in *T. gondii*, although its function remains unknown. In the current study, we used CRISPR-Cas9 system to generate derivatives of *T. gondii* RH and PLK strains with a null mutation in TgGRA9. We first chose a Cas9 target site in the gene encoding *T. gondii* GRA9 and then constructed a knockout vector containing Cas9 and the single guide RNA. After transfection, single tachyzoites were cloned in 96-well plates by limiting dilution. Alignment of the amino acid indicated that RH TgGRA9 contains one amino acid substitution compared with that of PLK TgGRA9. Deficiency of TgGRA9 in both PLK and RH strains moderately decreased invasion ability relative to that of the wild-type parasites. In addition, knockout of TgGRA9 resulted in inhibition of growth and egress just in PLK strain. Mouse experiments demonstrated that TgGRA9 knockout somewhat increased the pathogenicity in PLK strain. These findings suggest that GRA9 protein is involved with growth and virulence in PLK strain but not in RH strain.

27 Knockout of SAG1-related sequence 2 (SRS2) in *Toxoplasma gondii* using CRISPR/Cas9.

○Yang Gao¹, Huanping Guo¹, Honglin Jia² and Xuenan Xuan¹ (¹National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan,

²Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, China

Toxoplasma gondii as the causative agent of toxoplasmosis is an obligate intracellular parasite belonging to the phylum Apicomplexa, and it can infect all warm-blooded animals and human beings. *T. gondii* infection causes abortion in pregnant women and congenital diseases, and fatal diseases in immunodeficient individuals. *T. gondii* infection also causes abortion, congenital diseases, and mortality in sheep, goats, and pigs, with great economic losses.

Cellular invasion by *T. gondii* is an active complex multistep event. The process is initiated by contact between the parasite and its host cell surface. The surface antigens of *T. gondii* are important for attachment to host cells in the process of parasites infection. Surface antigen1-related sequence 2 (SRS2) is differentially expressed among different *T. gondii* genotypes, although its function remains unknown. In this study, we used CRISPR-Cas9 system to generate knockout SRS2 gene of *T. gondii* RH and PLK strains. Phenotype analysis revealed that TgSRS2 knockout significantly inhibited the invasion, but did not affect the replication of parasites in PLK strain. Mouse experiments demonstrated that TgSRS2 knockout significantly reduced the pathogenicity in PLK strain. However, deficient of TgSRS2 did not show any defect in invasion, replication and virulence in vivo in RH strain. Overall, TgSRS2 knockout affected the invasion and virulence in PLK strain but not in RH strain.

28 コモンリスザルにおけるトキソプラズマ症の集団発生報告と分離株のゲノム解析
西村 麻紀¹, 合山 尚志², 富川 創平³, 松崎 素道⁴, 永宗 喜三郎⁴, 古林 与志安², ○西川 義文¹ (¹帯広畜産大学原虫病研究センター, ²帯広畜産大学基礎獣医学, ³おびひろ動物園, ⁴国立感染症研究所)

Outbreak of toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) and genome analysis of the isolated parasite. Nishimura, M., Gotyama, N., Tomikawa, S., Matsuzaki, M., Nagamune, K., Kobayashi, Y. and Nishikawa, Y.

細胞内寄生原虫トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はネコ科動物を終宿主とし、ヒトを含め多くの哺乳類や鳥類が中間宿主となる。新世界ザルのコモンリスザルはトキソプラズマ感染に対し感受性が高いとされており、その発生例も散発的に報告されている。今回、コモンリスザルにおけるトキソプラズマ症の集団発生と分離株のゲノム解析について報告する。

対象となるコモンリスザルは軽度の発咳や振戦を呈し、その後数日以内に死亡した。3頭の死体について病理解剖、病理組織学的検査を実施した。病理解剖では肺水腫がみられ、病理組織検査では全身諸臓器(肺、肺門リンパ節、腸間膜リンパ節、肝臓、心臓、脳、筋肉)にトキソプラズマのシスト/タキゾイトが認められた。

次に発症したリスザルの脳組織から乳剤を作製し、マウスに接種することで原虫株の分離を行った。分離した原虫株のDNAを抽出し遺伝子型のタイピングを実施したところ、マウスでの病原性が低いタイプII型に分類された。次世代シーケンサーによるリスザル分離株のゲノム解析の結果、タイプII型標準株のDNA配列と比較して *GRA24* 遺伝子のフレームシフト、*GRA7* 遺伝子の SNP の存在、多コピーを有する *ROP5* 遺伝子の中で新たな遺伝子の存在が確認された。これら遺伝子はトキソプラズマの病原性に関与していることが報告されており、コモンリスザルでの感染感受性への関与が示唆された。

キタキツネはエゾシカに寄生する *Sarcocystis* 属原虫の終宿主となり得るか

○入江 隆夫¹, 浦口 宏二¹, 中村 鉄平^{2, 3}, 市居 修³, 高井 伸二⁴, 八木 欣平¹ (¹北海道立衛
研・感染症, ²日本食品分析センター千歳研究所, ³北大院・獣医解剖, ⁴北里大・獣・獣医衛生)

Survey on foxes as candidate of definitive host for *Sarcocystis* spp. prevalent in deer in Hokkaido, Japan.
Irie, T., Uruguchi, K., Nakamura, T., Ichii, O., Takai, S., Yagi, K.

北海道に生息するエゾシカには *Sarcocystis* 属原虫が高率に寄生しており, 我々の調査では *S. ovalis*, *S. pilosa*, *S. elongata* や *S. tarandi* に近縁なシストが検出されている. 一方で, エゾシカへの *Sarcocystis* 属原虫の感染源となる野外の終宿主動物は明らかとされていない. 我々はその生活環の解明を目指し, 道内の野生動物体内での本属原虫の有性世代を探索している.

S. ovalis については, 昨年の本会でハシブトガラスが終宿主のひとつであることを報告した. 他の3種については, 終宿主に関する情報は世界的にも知られていないが, これらが道内の広範囲のエゾシカから検出されていること, および他種の *Sarcocystis* 属原虫で食肉目動物が好適な終宿主として機能していることから, まず, エゾシカと生息圏が重複し, かつエゾシカ肉を摂食する機会を持つキタキツネに着目し調査をした.

野外で採集した糞便 (94 検体) のスポロシスト検査および解剖により入手した小腸 (72 検体) の分子学的検査を実施した. その結果, 糞便検体は全件陰性であったが, 小腸組織からは, 鳥類を中間宿主とする *S. albifronsi* (もしくは *S. anasi*), およびシカ科動物を含む偶蹄類を中間宿主とする *Hammondia heydorni* に近縁な DNA をそれぞれ1件ずつ検出した. 残念ながら, ここまでの調査ではエゾシカを中間宿主とする *Sarcocystis* は検出されなかった. 今後も本調査を継続し, キタキツネがエゾシカに流行する *Sarcocystis* の生活環に関与しているか評価していきたい.