

(別紙1)

学位論文審査の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻 (博士後期課程)
氏名	NUGRAHA Arifin Budiman
審査委員署名	主査 云 学 南 副査 横山 直明 副査 西川 義文 副査 五十嵐 慎 副査 五十嵐 郁男
題目	Studies on epidemiology, development of chemotherapy and genetic modification of piroplasmosis (ピロプラズマ病の疫学、薬剤開発および遺伝子改変に関する研究)
審査結果の要旨	
<p>ピロプラズマ病は、バベシア属とタイレリア属の赤血球内寄生原虫の感染による疾病であり、獣医学分野では重要な家畜感染症として知られている。本研究では、インドネシア・西ジャワにおける馬ピロプラズマ病の感染状況、化合物を用いた治療薬の可能性の評価および遺伝子改変タイレリア原虫の作製について検討を行った。</p> <p>第1章では、インドネシアの西ジャワにおいて飼育されている馬の <i>Theileria equi</i> と <i>Babesia caballi</i> の感染状況について検討を行なった。西ジャワの異なる4地域 (Bandung、Depok、Tangerang、Bogor) で無作為に235頭の馬から血液試料を採集し、調査を行った。血清試験では5頭と15頭、nPCRでは1頭と5頭が、それぞれ <i>T. equi</i> と <i>B. caballi</i> 陽性であった。PCRで増幅された <i>EMA-2</i> と <i>BC48</i> 遺伝子断片について塩基配列解析と系統樹解析を行った。<i>EMA-2</i> 遺伝子配列は、フロリダ分離株とワシントン分離株の配列と全く同一で、系統樹上では1つの集団を形成していた。一方で、4サンプルの <i>BC48</i> 遺伝子配列は99.8-100%の相同性を示した。本研究は、インドネシアの馬における <i>T. equi</i> と <i>B. caballi</i> 検出の最初の報告である。</p> <p>第2章では、ピロプラズマ原虫に対する新規治療薬の評価を行った。<i>B. bovis</i>、<i>B. bigemina</i>、<i>B. caballi</i> および <i>T. equi</i> に対して Medicine for Malaria Vaccine 財団から提供を受けた Pathogen Box の400種類の化合物を評価した。その結果、50%阻害濃度</p>	

(IC<sub>50</sub>)が0.3μM以下、選択指数が100以上を示したMMV021057とMMV675968の2種類の化合物を選抜した。MMV021057とMMV675968の*B. bovis*、*B. bigemina*、*B. caballi*と*T. equi*に対するIC<sub>50</sub>は、それぞれ23、39、229、146nMと2.9、3.0、25.7、2.9nMであった。さらに、MMV021057とジミナゼン・アセチレート(DA)との併用では、4種類の原虫に対して相乗効果が認められた。マウスの実験では、50mg/kgのMMV021057、25mg/kgのMMV675968投与により、未投与対照群に比較して、感染後8日目に*B. microti*の増殖がそれぞれ54%および64%抑制された。また、DAとMMV021057の併用投与により、*B. microti*の増殖が91.6%抑制された。

第3章では、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を導入した*T. equi*の構築を試みた。RACE分析により、*T. equi*(USDA株)の*ef-1α*遺伝子の全配列を決定し、オープンリーディングフレームを同定した。次に、*ef-1α*遺伝子の遺伝子間領域、GFP-プラスチジン(BSD)融合遺伝子、*ef-1α*遺伝子、ターミネーター断片を含むプラスミドを設計し、*T. equi*ゲノムに遺伝子導入を行った。遺伝子が導入された原虫の薬剤選択は、プラスチジンを用いて行った。遺伝子導入後24時間以内に、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光の発現が認められ、薬剤の負荷なしに長期間GFPが安定的に発現していることが確認された。PCR解析により、導入プラスミドは標的のゲノム部位に(*ef-1α*遺伝子)に挿入されていることが推定された。また、遺伝子導入原虫は、野生型原虫と同様の増殖性を示した。

これらの研究成果により、インドネシアの馬ピロプラズマ病の疫学情報やピロプラズマ原虫の診断マーカー遺伝子情報が明らかになった。また、新規薬剤の発見による新たな抗ピロプラズマ病薬の開発やGFP発現*T. equi*の作製が可能になった。今後、ピロプラズマ原虫の生物学、原虫-宿主相互関係の理解、ならびにピロプラズマ病に対する有効な制御法開発につながるものと期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が帯広畜産大学大学院畜産学研究科博士後期課程畜産衛生学専攻の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

題 目 Serological and molecular prevalence of equine piroplasmosis in Western Java, Indonesia  
著 者 Arifin Budiman Nugraha, Umi Cahyaningsih, Amrozi Amrozi, Yusuf Ridwan, Srihadi Agungpriyono, Dharmawaty Muhammad Taher, Azirwan Guswanto, Sambuu Gantuya, Dickson Stuart Tayebwa, Bumduuren Tuvshitulga, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, and Ikuo Igarashi  
学術雑誌 Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports  
(巻・号・頁) (14巻・1-6頁)  
発行年月 2018年12月

題 目 Screening the medicine for malaria venture pathogen box against piroplasm parasites  
著 者 Arifin Budiman Nugraha, Bumduuren Tuvshitulga, Azirwan Guswanto, Dickson Stuart Tayebwa, Mohamed Abdo Rizk, Sambuu Gantuya, Gaber El-Saber Batiha, Amany Magdy Beshbishy, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama, and Ikuo Igarashi  
学術雑誌 International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance  
(巻・号・頁) (10巻・84-90頁)  
発行年月 2019年8月

(別紙2)

最終試験の結果の要旨	
専攻	畜産衛生学専攻（博士後期課程）
氏名	NUGRAHA Arifin Budiman
審査委員署名	主査 云学南 副査 横山直明 副査 西川義文 副査 五十嵐 哲 副査 五十嵐 郁男
実施年月日	令和2年1月17日
試験方法 (該当のものを○で 囲むこと)	<input checked="" type="radio"/> 口頭 <input type="radio"/> 筆記
要 旨	
<p>主査および副査の5名は、学位申請者に対し、4号館113-114号室において、学位申請者本人に口頭により学位論文内容の説明を行わせ、その内容について質疑応答を行った。また、関連する専門知識について口頭により試問を行った。</p> <p>その結果、申請者は、帯広畜産大学大学院畜産学研究科博士後期課程畜産衛生学専攻修了者としての学力および見識を有するものと認め、博士（畜産衛生学）の学位を与えるに十分な資格を有すると判定した。</p>	