

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780281

研究課題名（和文）犬バベシア症に対するアトバコンを中心とした多剤併用療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of multidrug therapy using Atovaquone against canine Babesiosis.

研究代表者

松鶴 彩 (MATSUU AYA)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40348595

研究成果の概要（和文）：

本研究では、犬バベシア症の原因である *Babesia gibsoni* に対してアトバコン(ATV)をより効果的に使用するためのエビデンスを確立することを目的として、申請者がこれまでに確立した野生型および ATV 耐性培養株を用いて①ATV 標的的部位と推測されるミトコンドリア機能の解析、②分子生物学的解析、③多剤に対する薬剤感受性、④ATV および併用薬剤の相互作用についての評価を行い、これらの結果をもとに⑤ATV および proguanil 製剤 (Malarone®) の急性期 *B. gibsoni* 感染症に対する治療効果の評価を行った。その結果、原虫 ATV 耐性発現はミトコンドリア *CYTB* 遺伝子における一塩基多形 121I の関与によるものであることが強く疑われ、さらにこの多型を有する原虫は ATV 以外の薬剤に対して交差耐性を示さないことが明らかとなった。また ATV および他剤との併用は原虫増殖に対して相乗～相加作用を示し、Malarone®は急性期 *B. gibsoni* 感染動物に対して高い治療効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to establish an effective usage of atovaquone (ATV) against *Babesia gibsoni*, which is a pathogen of canine Babesiosis. We performed some experiment using *B. gibsoni* continuous culture; ①analysis of mitochondrial function, ②molecular analysis, ③sensitivity test using other chemicals, ④interaction test among ATV and other drugs against *B. gibsoni*, and ⑤assessment of treatment efficacy of Malarone® against canine acute *B. gibsoni* infection. As the result, it was strongly suggested that the ATV resistance of this protozoa may related to M121I on mitochondrial cytochrome *b* gene, and also that ATV resistant *B. gibsoni* have not cross resistance against other chemicals. Combination of ATV and other drugs showed synergic to additive efficacy against the protozoal multiplication. In this study, it was also shown that Malarone® have high efficacy against acute *B. gibsoni* infection in dogs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード： *Babesia gibsoni*、アトバコン、連続培養、ミトコンドリア、Dehydroorotate dehydrogenase、多剤併用療法

1. 研究開始当初の背景

Babesia gibsoni はマダニ媒介性に伝播する犬赤血球内寄生原虫である。我が国では古くから犬における本原虫の感染が認められているが、近年その発生は拡大傾向にあり、本感染症の治療および予防法の確立は重要課題である。

申請者はこれまで、犬 *Babesia gibsoni* 感染症に対する治療方法としてアトバコン (ATV) に着目し、2004 年より研究を継続してきた。その中で ATV は *in vitro* 培養下の本原虫に対して強い増殖抑制効果を持つこと、急性感染動物に対して速やかな治療効果を有することを明らかにした。しかし ATV 単独投与後に、ミトコンドリアチトクローム *b* 遺伝子 (*CYTb*) に遺伝子多型 (M121I) を伴う原虫の再発、および ATV に対する耐性発現が問題点となった。

2. 研究の目的

ATV は原虫ミトコンドリアチトクローム *bc* 複合体への電子伝達を阻害すると推測されるが、詳細な機序は明らかにされていない。本研究では *B. gibsoni* の ATV 耐性獲得機序を明らかにするとともに、これに基づいて ATV を中心とした多剤併用療法を確立し、新たな治療方法についてのエビデンスを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

申請者は野生型および ATV 耐性原虫の培養株の確立に成功し保有している。本研究ではこれらの培養株を用いて両株の①ミトコンドリア機能についての解析、②分子生物学的な特徴の評価、③多剤に対する薬剤感受性の評価を行った (平成 22 年)。さらに④ATV および併用薬剤の相互作用についての評価を行い、これらの結果をもとに ATV および proguanil 製剤 (Malarone®) の急性期 *B. gibsoni* 感染症に対する治療効果の評価を行った (平成 23 年)。

4. 研究成果

① 両培養株の ATP 産生能についてルシフェラーゼ発酵法によって評価したところ、原虫増殖に伴う ATP 産生増加は確認されなかった。この結果は他の原虫においてこれまで報告された結果と異なるものであり、酸素濃度を含む培養条件の違いに起因する可能性が考えられる。そのためミトコンドリア機能についての新たな評価方法として、原虫ミトコンドリア酵素である Dehydroorotate dehydrogenase (DHODH) に着目し、液体クロマトグラフィーを

用いた原虫由来 DHODH 活性の測定系を確立した。今後この測定系を用いて両培養株における DHODH 活性を比較する予定である。

② 両原虫株におけるミトコンドリア遺伝子 (COX1, COX3 および *cytb*) の塩基配列を確認した結果、*cytb* における一塩基多形 (M121I) 以外にアミノ酸置換を伴う遺伝子変異は確認されなかった。続いて allele-specific real-time PCR 法による M121I 原虫の定量法を確立した。これによる解析の結果、ATV 耐性培養株における M121I 原虫は約 99% 以上の割合で存在することが明らかとなった (図 1) (Iguchi et al., 2012)。

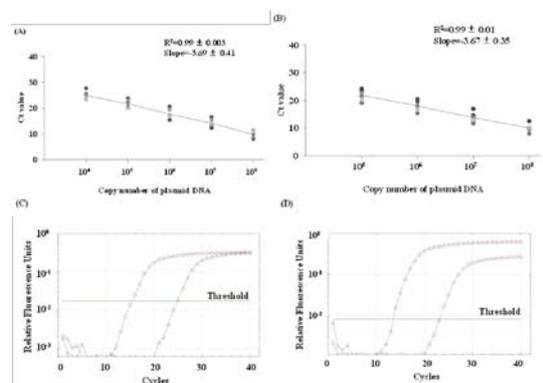


図 1. *CYTb* における M121I を引き起こす多型 (363G→363T) に対する allele-specific real-time PCR 法。363G (A) および 363T (B) に対する allele-specific PCR における Standard Curve はそれぞれ 10^6 および 10^4 倍の dynamic range を示した。本法を用いて野生型および ATV 耐性 *B. gibsoni* 培養株における 363G allele の定量を行ったところ、それぞれ $7.4 \times 10^7 \pm 5.2 \times 10^7 / \mu\text{l}$ 、 $8.6 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4 / \mu\text{l}$ を示した (C)。一方 363T allele については ATV 耐性株で $7.3 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6 / \mu\text{l}$ を示し、野生型株では検出限界以下であった ($C_t > 22$) (D)。

③ ATV に対して ATV 耐性株は野生株の約 6 倍、感受性低下を示した。一方、両原虫株に対する複数薬剤 (Diminazene aceturate、Doxycycline、Azithromycin、Clindamycin、Proguanil) の感受性を評価した結果、野生株と ATV 耐性株の間に有意な差は認められず、*B. gibsoni* の ATV 耐性は交差耐性を示さないことが明らかとなった (表 1) (Iguchi et al., 2012)。

④ 野生型および ATV 耐性原虫培養株に対して ATV と、Diminazene aceturate、Azithromycin、Doxycycline、Clindamycin、Proguanil の相互作用を確認したところ、いずれも相乗～相加作用が認められ、明らかな拮抗作用を示すものはなかった (図 2)。

表 1. 培養 2, 4, 6 日後における野生型および ATV 耐性 *B. gibsoni* 増殖に対する 6 種類の薬剤の 50%増殖抑制濃度 (IC₅₀)

Drugs (measure)	WT strain			ATV resistant strain		
	day 2	day 4	day 6	day 2	day 4	day 6
ATV (nM)	173.1±23.7	245.0±76.2	164.8±42.3	1205.2±338.5*	1342.9±443.0*	1021.5±419.7*
DA (nM)	994.4±338.8	228.1±20.7	40.6±12.5	759.6±82.3	208.9±51.0	47.5±8.5
AZM (μM)	14.1±437	11.5±2.8	9.4±3.9	11.8±4.0	8.6±0.8	7.2±0.2
DOXY (μM)	17.3±1.1	14.9±3.3	9.1±5.5	21.0±3.1	15.5±8.9	12.4±9.8
CLDM (μM)	290.3±139.5	462.9±280.6	203.0±45.1	295.0±108.4	326.3±66.3	204.0±52.3
PG (μM)	41.3±8.9	34.1±16.4	42.3±18.6	65.5±45.6	37.0±6.3	44.9±8.5

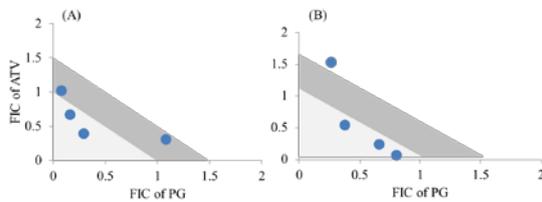


図 2. 野生型 (A) および ATV 耐性 (B) *B. gibsoni* 培養株に対する ATV および Proguanil の相互作用を Fixed Ratio 変法により評価した。各培養原虫に対して ATV 0-3200nM、Proguanil 0-100 μM の各濃度で組合せて投与し、144 時間後の各薬剤の 50%増殖抑制濃度 (IC₅₀) を算出した。各薬剤の他剤併用時 IC₅₀ および非併用時 IC₅₀ の比を FIC として算出し、図のようにプロットした。FIC が <1 の場合には相乗作用、1-2 の場合には相加作用として評価した。その結果、野生型および ATV 耐性 *B. gibsoni* はいずれも ATV および Proguanil 併用に対して相乗～相加作用を示した。

⑤ ③および④の結果を受け、ATV および Proguanil の合剤である Maralone® (GraxoSmithKline) を、実験的に感染を成立させた犬 (慢性期 2 頭、急性期 3 頭) に 10 日間投与し、その治療効果および副作用発現の有無について検討を行った。その結果、急性期および慢性期犬 *B. gibsoni* 感染症に対して本薬剤は速やかな治療効果を有することが示された。また Maralone® は犬に対して強い副作用は示さず、安全に使用できることが確認された。しかし、すべての犬において治療終了後に原虫の再出現、M121I を伴う ATV 耐性原虫の発現が確認された。急性期の 1 例については臨床症状を伴う再発が認められたため、再度 Maralone® の投与を行ったところ、貧血の改善および末梢血中原虫数 (Parasitemia) の速やかな減少が認められた (図 3) (論文投稿準備中)。

本研究では、申請者がこれまでに確立した *B. gibsoni* 培養株を用いて ATV を中心とした多剤併用療法のエビデンスを確立するとともに、新たな治療選択肢として Maralone® の有用性を示すに至った。Maralone® は野生型および ATV 耐性原虫いずれに対しても相加～相乗作用を持ち、急性期犬バベシア症に対して高い治療効果を示した。また M121I を伴う ATV 耐性

原虫による再発に対してもある程度の効果を示したことから、今後の応用が期待される。*B. gibsoni* 感染症に対する Maralone® の治療効果を検討した研究はこれまでに報告されておらず、犬においては副作用の発現が心配されていた。今回の結果により本薬剤は今後臨床現場における急性期犬 *B. gibsoni* 感染症の治療薬剤として新たな選択肢となる可能性がある。

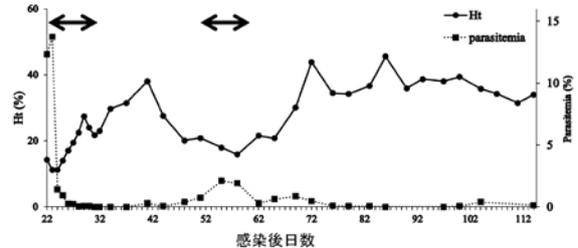


図 3. 健康なビーグルに *B. gibsoni* を血管内投与して作成した急性期 *B. gibsoni* 感染症モデル犬に対して、Maralone® を 1/2 錠ずつ (ATV: 17-25mg/kg および Proguanil 7-10mg/kg)、1 日 2 回 10 日間の投与を行った (矢印)。治療終了後、経時的に血液を採取し、全血球計算、血液生化学検査、Parasitemia の算出および M121I 発現量の定量を行った。グラフは 5 頭のうち 1 頭のヘマトクリット値 (Ht) および parasitemia の推移を示した。Maralone® 投与後 Parasitemia は速やかに減少し、また Ht は上昇に向かった。しかし治療終了後約 1 か月後には再度 Parasitemia の上昇と Ht の減少が認められたため、Maralone® の再投与を行った。この時点ですでに末梢血中の原虫には M121I の出現が認められたが、1 回目の投与と同様に Ht および Parasitemia の改善が認められた。

しかし Maralone® による短期間の治療では原虫の根治には至らず、今後これに対する対策をさらに検討する必要がある。その際、本研究において in vitro における ATV との相互作用が確認された Diminazene aceturate や Azithromycine、Doxycycline、Clindamycin が強力な候補となり、これらを 2 剤以上を組み合わせた場合の治療効果についてさらなる発展へとつながるものと確信する。

また、本研究では当初、ATV 標的部位と推測される原虫ミトコンドリア機能に対する各薬剤の作用についても検討を行う予定であったが、これまでの報告と異なり、現状の培養条件では *B. gibsoni* ATP 産生能の測定が困難であった。そのため新たに原虫由来ミトコンドリア酵素である DHODH の測定法を確立するに至った。今回の研究期間内に各種薬剤の原虫 DHODH 活性に与える影響を検討するには至らなかつたものの、バベシア原虫において DHODH 活性の測定法を確立した報告はこれまでになく、今後新たな視点による治療標的部位の解明に大いに役立つものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

①Iguchi Aiko, Aya Matsuu, Hiromi Ikadai, Muhanmad Talkuder, Yoshiaki Hikasa.
Development of in vitro atovaquone-resistant *Babesia gibsoni* with a single-nucleotide polymorphism in *cytb*.
Veterinary Parasitology 185. 145-150.
2012. 査読あり

②アトバコン耐性 *Babesia gibsoni* 培養株の確立とその解析 獣医畜産新報 63(8)
73-734 2010. 査読なし

〔学会発表〕 (計 3 件)

①井口愛子、松鶴 彩、筏井宏実、米原尚子、日笠喜朗 犬*Babesia gibsoni*感染症に対するアトバコン/プログアニル製剤 (Malarone®) の効果 日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会 2012 年大会
2012 年 2 月 18 日 横浜市

②井口愛子、松鶴 彩、筏井宏実、米原尚子、日笠喜朗 犬*Babesia gibsoni*感染症に対するアトバコン/プログアニル製剤 (Malarone®) の効果 第 152 回日本獣医学会学術集会
2011 年 9 月 20 日 泉佐野市

③井口愛子、松鶴 彩、筏井宏美、日笠喜朗 アトバコン耐性*Babesia gibsoni*培養株の確立とその解析 第 150 回日本獣医学会学術集会
2010 年 9 月 6 日 帯広市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松鶴 彩 (MATSUU AYA)
鳥取大学・農学部・准教授
研究者番号：40348595