

網状赤血球内における *Babesia gibsoni* 増殖促進物質に関する研究

学位論文内容の要旨

イヌ科の動物に寄生するバベシア原虫である *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*) は、in vitro の培養系においてイヌ成熟赤血球よりもイヌ網状赤血球内で良く増殖することから、イヌ網状赤血球は *B. gibsoni* の増殖を促進する因子を持つことが強く疑われた。よって本研究では、イヌ網状赤血球内に存在すると考えられる *B. gibsoni* の増殖促進因子について、その検索と同定を試みた。

まず、再封入赤血球膜ゴーストを使用して網状赤血球の細胞内成分と膜構造のいずれに *B. gibsoni* 増殖促進因子が存在するかの検索を行ったところ、イヌ網状赤血球の細胞内環境が *B. gibsoni* の増殖に適していることが明らかとなった。イヌ網状赤血球はイヌ成熟赤血球と異なり、Na-K-ATPase が残存することにより細胞内が高カリウムに維持されており、またグルタミン酸をはじめとする遊離アミノ酸や還元型グルタチオン（GSH）も成熟赤血球より高濃度であった。そこで、それらの遊離アミノ酸および GSH をそれぞれ添加した培養液を用いて *B. gibsoni* の培養を行ったところ、グルタミン酸および GSH を添加した場合の原虫増殖率が最も良好であった。

一方、遺伝的に細胞成熟後も高い Na-K-ATPase 活性を有するために、細胞内カリウム、GSH およびグルタミン酸が高い濃度を示すイヌ赤血球【高カリウム（HK）型イヌ赤血球】において *B. gibsoni* は正常なイヌ赤血球よりも高い増殖率を示した。また、HK 型イヌ赤血球溶血液を培養液に添加した場合にも、*B. gibsoni* の増殖が促進された。さらに、HK 型イヌ赤血球においても、細胞内により大量にグルタミン酸および GSH を含む比重の軽い細胞集団において原虫は高い増殖を示した。以上より、グルタミン酸および GSH が *B. gibsoni* の増殖を促進する重要な因子であることが確認された。

次に、*B. gibsoni* のエネルギー代謝について検討した結果、ヘキソキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼが検出されたこ

とから、同原虫が解糖系を有することが明らかとなった。また *B. gibsoni* は、グルタミン酸を α -ケトグルタル酸に酸化する酵素であるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) を有することも明らかとなった。さらに、電子顕微鏡観察により、*B. gibsoni* 内部にバベシア属原虫特有の二重膜構造をもつミトコンドリアが確認された。以上から、*B. gibsoni* は解糖系に加えて、GDH によりグルタミン酸を α -ケトグルタル酸に酸化し、さらにミトコンドリア内に存在すると考えられる TCA サイクルによる代謝によってこれをエネルギー源として利用しているものと推測された。

次に、網状赤血球内のミトコンドリアが *B. gibsoni* の増殖に与える影響を、再封入赤血球膜ゴーストを用いて検討した。その結果、細胞内にミトコンドリアを含む再封入赤血球膜ゴーストにおいて *B. gibsoni* は高い増殖を示した。ミトコンドリアを封入した再封入赤血球膜ゴースト内ではアデノシン 3 リン酸 (ATP) が増加したこと、およびゴースト内の ATP 含量と原虫寄生率は正の相関関係を示したことから、イヌ網状赤血球内に残存するミトコンドリアは ATP 産生により *B. gibsoni* の増殖を促進させるものと考えられた。

以上のように、培養条件下における *B. gibsoni* の増殖を促進する主要な因子は赤血球内のグルタミン酸、GSH および ATP であることが明らかとなった。これらの成績から、*B. gibsoni* が網状赤血球内で高い増殖率を示す原因は、網状赤血球にはそれらの物質が成熟赤血球よりも多量に含まれているためであると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	前出吉光
副査	教授	小沼操
副査	教授	稲葉睦
副査	助教授	奥祐三郎

学位論文題名

網状赤血球内における

Babesia gibsoni 増殖促進物質に関する研究

イヌ科動物に寄生するバベシア属原虫の *Babesia gibsoni* (*B.gibsoni*) は、イヌの成熟赤血球よりも網状赤血球においてよく増殖することが知られているが、その原因は明らかではない。申請者はこの現象を解明するために、まず、再閉鎖赤血球膜ゴーストを作成し、網状赤血球における *B.gibsoni* 増殖促進因子が、膜あるいは細胞質のいずれに存在するかを検討した。その結果、同因子は網状赤血球の細胞質内に多量に含有されるグルタミン酸 (Glu) および還元型グルタチオン (GSH) であると推定した。ついで、Glu および GSH を培養液に添加することにより *B.gibsoni* の増殖率が上昇することを確認した。さらに、遺伝的に赤血球内の Glu および GSH が高濃度を示すイヌ赤血球においても *B.gibsoni* はよく増殖した。以上から Glu および GSH が原虫増殖促進物質であることが証明された。次に、*B.gibsoni* のエネルギー代謝について検討した結果、同原虫から、解糖系酵素のヘキソキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼおよび乳酸脱水素酵素ならびにグルタミン酸脱水素酵素が検出された。また、電子顕微鏡観察の結果、原虫はミトコンドリアを有することが確認された。これらの成績から、*B.gibsoni* はエネルギー源としてグルコースのみならず、グルタミン酸も利用していることが明らかとなった。さらに、イヌ成熟赤血球内にミトコンドリアを封入することにより原虫の増殖率が上昇した。また、原虫増殖率は赤血球内の ATP 濃度と正の相関関係を示した。即ち、ATP もまた原虫増殖を促進させることを証明した。

以上のように、申請者は、網状赤血球内の *B.gibsoni* 増殖促進因子は、同赤血球内に多量に存在する Glu、GSH およびミトコンドリアによって産生される ATP であることを明らかにした。よって審査員一同は、上記学位論文提出者山崎真大

氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。