

学 位 論 文 題 名

Studies on the Resistance to Diminazene Aceturate
in *Babesia gibsoni* In Vitro(体外培養 *Babesia gibsoni* におけるジミナゼン耐性に関する研究)

学位論文内容の要旨

*Babesia gibsoni*により引き起こされる犬バベシア症は抗バベシア原虫薬の酢酸ジミナゼン(diminazene aceturate, DA)の投与により治療するが、原虫を犬体内から完全に排除することは困難であり、再発を繰り返すとされている。この原因として、原虫がDA耐性を獲得することが疑われているが、今まで実験的にDA耐性株の作製を行った例や、その解析を行った報告はない。そこで本研究では、DAに対して薬剤耐性を示す*B. gibsoni*の作製を試み、その耐性株の特性を解析した。

初めに、培養にて維持している*B. gibsoni*を用いて、DA耐性*B. gibsoni*株の作製を行った。このために、培養液に含まれるDA濃度を1 ng/mlから開始して徐々に増加させ、最終的に200 ng/mlまで増加させた。さらに、200 ng/mlのDAを含んだ培養液中で維持している原虫を感染赤血球から分離して200 ng/mlのDAを含む培養液に直接曝露し、原虫の赤血球への再侵入と増殖を観察した。その結果、DAに耐性を持たない*B. gibsoni* (野生株)は、同様の実験で生存できなかったが、200 ng/mlのDAで維持している原虫は、新しい赤血球に侵入し、増殖した。*B. gibsoni*に対するDAの50%の阻害濃度(IC₅₀)は45.89 ng/mlあるいは103 ng/mlと報告されているため、これはDA耐性株であると考えられた。以上より、この*B. gibsoni*はDAに対する耐性を獲得したと考えられた。

次に、このDA耐性*B. gibsoni*株の特徴を明らかにするため、様々な種類の作用機序を持つ抗バベシア原虫薬に対するDA耐性*B. gibsoni*株の抵抗性を比較した。すなわち、作製したDA耐性*B. gibsoni*株及び野生株をクリンダマイシン、ドキシサイクリン、メトロニダゾール及びペンタミジンをそれぞれ含む培養液中にて7日間培養し、各薬剤に対する抵抗性を比較した。その結果、DA耐性*B. gibsoni*株はクリンダマイシン、ドキシサイクリンに対して弱い抵抗性を示し、ペンタミジンに対して強い抵抗性を示した。特にDAと類似の作用機序を持つペンタミジンに対しては高い抵抗性を示し、同系統の薬剤に対して強い耐性を示すと考えられた。さらに、それぞれの薬剤に対するDA耐性*B. gibsoni*株のIC₅₀

は上昇した。よって、以上の薬剤の作用する代謝経路を比較することで、DAの*B. gibsoni*に対する作用機序や、DA耐性の機序が明らかになることが期待できる。

さらに、このDA耐性*B. gibsoni*株の特徴を明らかにするため、細胞機能に重要な役割を果たすとされている熱ショックタンパク質70(heat shock protein 70, Hsp70)遺伝子の転写量を定量的リアルタイムPCR法(quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; qRT-PCR)で測定した。

*Plasmodium falciparum*においてHsp70は薬剤耐性の獲得に貢献している報告があり、*B. gibsoni*のHsp70(BgHsp70)もDA耐性の獲得に貢献していることが期待された。DA耐性*B. gibsoni*株を作製する過程で、1 ng/mlから175 ng/mlまでのDA存在下で8週間以上維持しているDA耐性*B. gibsoni*変異株を分離した。これらの変異株のBgHsp70遺伝子の転写量を測定したところ、1 ng/mlのDA存在下で維持している変異株のBgHsp70遺伝子転写量は野生株に比べて有意に低く、DA濃度が1 ng/ml から75 ng/mlまで増加するにつれてBgHsp70遺伝子の転写量が増加した。さらに、培養液中のDA濃度が125 ng/ml以上で維持している変異株では、BgHsp70遺伝子の転写量が野生株と同程度であった。以上の結果より、DA耐性*B. gibsoni*変異株のBgHsp70遺伝子の転写量は低濃度でのDAに長時間曝されることで減少し、DA耐性を獲得した後に野生株と同程度に回復することが推測された。しかしながら、BgHsp70遺伝子の転写量が減少した原因はまだ解明されていない。今後、BgHsp70の機能を明らかにすることで、DA耐性の機序が明らかになるかもしれない。

本研究では、DA耐性*B. gibsoni*株の作製に成功した。このDA耐性*B. gibsoni*株は、DAのみならず、他の抗バベシア原虫薬に対する抵抗性も増加していた。さらに、低濃度のDAにより、BgHsp70遺伝子の転写量が減少することも明らかになった。しかしながら、DA耐性の機序は明らかになっておらず、さらなる研究が必要である。本研究で得られた成績は、今後*B. gibsoni*におけるDA耐性の機序を解明する上で重要な知見と考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	滝口	満喜
副査	教授	片倉	賢
副査	教授	大橋	和彦
副査	准教授	山崎	真大

学位論文題名

Studies on the Resistance to Diminazene Aceturate in *Babesia gibsoni* In Vitro

(体外培養 *Babesia gibsoni* におけるジミナゼン耐性に関する研究)

Babesia gibsoni により引き起こされる犬バベシア症は抗バベシア原虫薬の酢酸ジミナゼン (diminazene aceturate, DA) の投与により治療するが、原虫を犬体内から完全に排除することは困難であり、再発を繰り返すとされている。この原因として、原虫が DA 耐性を獲得することが示唆されているが、今まで実験的に DA 耐性株の作製を行った例や、その解析を行った報告はない。そこで申請者は、DA に対して薬剤耐性を示す *B. gibsoni* の作製を試み、その耐性株の特性を解析した。

初めに、培養にて維持している *B. gibsoni* を用いて、DA 耐性 *B. gibsoni* 株の作製を行った。このために、培養液に含まれる DA 濃度を 1 ng/ml から開始して徐々に増加させ、最終的に 200 ng/ml まで増加させた。さらに、200 ng/ml の DA を含んだ培養液中で維持している原虫を感染赤血球から分離して 200 ng/ml の DA を含む培養液に直接曝露し、原虫の赤血球への再侵入と増殖を観察した。その結果、DA に耐性を持たない *B. gibsoni* (野生株) は、同様の実験で生存できなかったが、200 ng/ml の DA で維持している原虫は、新しい赤血球に侵入し、増殖した。*B. gibsoni* に対する DA の 50% の阻害濃度 (IC₅₀) は 46 ng/ml あるいは 103 ng/ml と報告されているため、これは DA 耐性株であると考えられた。以上より、DA 耐性 *B. gibsoni* 株の作製に成功した。

次に、この DA 耐性 *B. gibsoni* 株の特徴を明らかにするため、様々な種類の作用機序を持つ抗バベシア原虫薬に対する DA 耐性 *B. gibsoni* 株の抵抗性を比較した。すなわち、作製した DA 耐性 *B. gibsoni* 株及び野生株をクリンダマイシン、ドキシサイクリン、メトロニダゾール及びペンタミジンをそれぞれ含む培養液中にて 7

日間培養し、各薬剤に対する抵抗性を比較した。その結果、DA 耐性 *B. gibsoni* 株はクリンダマイシン、ドキシサイクリンに対して弱い抵抗性を示し、ペンタミジンに対して強い抵抗性を示した。特に DA と類似の作用機序を持つペンタミジンに対しては強い抵抗性を示し、同系統の薬剤に対して強い耐性を示すと考えられた。さらに、それぞれの薬剤に対する DA 耐性 *B. gibsoni* 株の IC₅₀ は上昇した。以上より、DA 耐性 *B. gibsoni* 株は他の抗原虫薬に対する抵抗性も増加していることを証明した。

今後、これらの薬剤の作用する代謝経路を比較することで、DA の *B. gibsoni* に対する作用機序や、DA 耐性の機序が明らかになることが期待できる。

さらに、この DA 耐性 *B. gibsoni* 株の特徴を明らかにするため、細胞機能に重要な役割を果たすとされている熱ショックタンパク質 70 (heat shock protein 70, Hsp70) 遺伝子の転写量を定量的リアルタイム PCR 法 (quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction; qRT-PCR) で測定した。*Plasmodium falciparum* において Hsp70 は環境ストレスへの適応に貢献しているとの報告があり、*B. gibsoni* の Hsp70 (BgHsp70) も DA 耐性の獲得に貢献していることが期待された。DA 耐性 *B. gibsoni* 株を作製する過程で、1 ng/ml から 175 ng/ml までの DA 存在下で 8 週間以上維持している DA 耐性 *B. gibsoni* 変異株を分離した。これらの変異株の BgHsp70 遺伝子の転写量を測定したところ、1 ng/ml の DA 存在下で維持している変異株の BgHsp70 遺伝子転写量は野生株に比べて有意に低く、DA 濃度が 1 ng/ml から 75 ng/ml まで増加するにつれて BgHsp70 遺伝子の転写量が上昇した。さらに、培養液中の DA 濃度が 125 ng/ml 以上で維持している変異株では、BgHsp70 遺伝子の転写量が野生株と同程度であった。以上の結果より、DA 耐性 *B. gibsoni* 変異株の BgHsp70 遺伝子の転写量は低濃度での DA に長時間曝されることで減少し、DA 耐性を獲得した後に野生株と同程度に回復することが推測された。このことから、BgHsp70 遺伝子の転写量は、DA のストレスに対して減少することで DA 耐性の獲得に何らかの関与をしていることが示唆された。しかしながら、BgHsp70 遺伝子の転写量が減少した原因はまだ解明されていない。今後、BgHsp70 の機能を明らかにすることで、DA 耐性の機序が明らかになるかもしれない。

以上のように、申請者は、DA 耐性 *B. gibsoni* 株の作製に成功した。また、この DA 耐性 *B. gibsoni* 株は、DA のみならず、他の抗バベシア原虫薬に対する抵抗性も増加している事を明らかにした。さらに、低濃度の DA により、BgHsp70 遺伝子の転写量が減少することも明らかにした。しかしながら、DA 耐性の機序は明らかになっておらず、さらなる研究が必要である。申請者が得た知見は、今後 *B. gibsoni* における DA 耐性の機序を解明する上で重要であると考えられる。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者黄香寂氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。