

学 位 論 文 要 旨

氏名 井口 愛子

題 目 : Studies on the establishment of the treatment strategy with atovaquone for *Babesia gibsoni* infection in dogs
(犬における *Babesia gibsoni* 感染症に対するアトバコンを中心とした治療法の確立に関する研究)

論文要旨 : *Babesia gibsoni* infects the red blood cells of dogs and induces hemolytic anemia, jaundice, hemoglobinuria, and enlarged spleen. Although diminazene aceturate (DA) has been used to treat acute *B. gibsoni* infections, it often fails to eliminate the parasite from the affected dogs and causes severe adverse effects such as pain at the injection site, and nervous symptoms due to cerebral hemorrhage. Some studies have reported the effectiveness of new combination therapies such as clindamycin (CLDM)-metronidazole-doxycycline (DOXY) or DOXY-enrofloxacin-metronidazole, on experimentally infected dogs or clinical patients, but these therapies take a long time to show clinical effectiveness. As mentioned above, early treatment is required for acute *B. gibsoni* infections, but this has a number of drawbacks. Atovaquone (ATV) is effective against acute *B. gibsoni* infections, but ATV monotherapy results in relapse as well as the emergence of drug-resistant variants with some single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the cytochrome *b* (*cytb*). It is necessary to elucidate the relationship between the SNPs and ATV resistance.

It is required to elucidate relationship between ATV resistance and SNPs in *cytb* and to develop strategies for ATV resistance when ATV would be used for *B. gibsoni* infection. Therefore, ATV-resistant *B. gibsoni* was developed in vitro and the mitochondrial genes were analyzed. Subsequently the efficacy of combination therapy with ATV was evaluated based on pharmacological evaluations using ATV-sensitive and ATV-resistant *B. gibsoni*.

In chapter 1, an ATV-resistant *B. gibsoni* was developed by in vitro exposure of uncloned wild-type (WT) *B. gibsoni* to 800 nM ATV for 6 days. The ATV sensitivity of this parasite was six-fold less than that of WT *B. gibsoni*. Sequence analysis of mitochondrial genes showed a SNP at *cytb* nt363 (G to T) that resulted in the substitution of methionine with isoleucine (M121I). This ATV-resistant *B. gibsoni* displayed the same sensitivity as the WT *B. gibsoni* against 5 drugs, including DA, azithromycin, DOXY, CLDM, and proguanil (PG).

A tablet formula that combines ATV and PG, Malarone[®], is available for treatment of human malaria. Nevertheless, the interaction between ATV and PG and the therapeutic efficacy of Malarone[®] against canine *B. gibsoni* infection have not been examined. In chapter 2, the interactions of ATV and PG against two in vitro cultures strains of *B. gibsoni* (WT and ATV-resistant strain) were analyzed by using a modified fixed ratio method, and showed synergism. Administration of Malarone[®] to experimentally *B.*

gibsoni infected two dogs in chronic stage and three dogs in acute stage resulted in decreasing parasitemia, and clinical improvements were observed. However, all dogs showed relapse of parasitic infection with M121I. When the parasites re-increased, the PCV decreased to < 20% in one dog. This dog received the second Malarone[®] treatment, and it was effective as the first treatment.

Malarone[®], likewise ATV monotherapy, could inhibit *B. gibsoni*, but this drug could not inhibit the reappearance of parasites with the M121I allele. In chapter 3, the efficacy of Malarone[®] against *B. gibsoni* in acute stage of naturally infected dogs was evaluated. Additionally whether the addition of DOXY to Malarone[®] treatment can inhibit the recurrence and emergence of resistance against ATV or not was evaluated. After diagnosis of canine Babesiosis for 8 dogs, the 4 dogs received Malarone[®] therapy for 10 days, and another 4 dogs received combination therapy with Malarone[®] for 10 days and DOXY for 30 days. In 3 of 4 cases with Malarone[®] therapy and in all cases with the DOXY combination, clinical signs and anemia improved soon after initiation of the treatment. One dog developed anemia, although parasitemia decreased during Malarone[®] therapy. Two of 4 dogs with DOXY combination did not relapse, whereas, other 3 dogs with Malarone[®] therapy and 2 dogs with DOXY combination relapsed during observation period. These 5 relapsed dogs received second Malarone[®] therapy and they responded well. However, one dog relapsed again after the second treatment. This dog received third Malarone[®] administration but had a progression of anemia. Real-time PCR assays showed under 0.1% in all dogs at the start of Malarone[®] administration, but relapsed dogs showed 15-96% of M121I population at the initiation of the second treatment.

In this study, the new therapeutic strategy was tried for experimentally or naturally infected dogs, based on the data from in vitro study. The ATV-resistant *B. gibsoni* isolated in this study could be useful for further research, not only in developing a treatment strategy against the emergence of ATV resistance, but also for studying the mechanism of action of ATV against *B. gibsoni*. The in vivo study suggested that combination with ATV, PG and DOXY might be effective for canine Babesiosis, although even this combination could not eliminate the parasites from host completely. The further detailed studies about mechanism of ATV against *B. gibsoni* are required.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	井口 愛子
審査委員	主査： 鳥取大学 教授 日笠喜朗
	副査： 鹿児島大学 教授 遠藤泰之
	副査： 鳥取大学 教授 竹内 崇
	副査： 鳥取大学 教授 村瀬敏之
	副査： 鳥取大学 准教授 原田和記
題目	Studies on the establishment of the treatment strategy with atovaquone for <i>Babesia gibsoni</i> infection in dogs (犬における <i>Babesia gibsoni</i> 感染症に対するアトバコンを中心とした治療法の確立に関する研究)
審査結果の要旨： <p><i>Babesia gibsoni</i> はマダニ媒介性赤血球内寄生原虫である。宿主の犬に対して重篤な溶血性貧血、黄疸、脾腫および血色素尿を引き起こす。治療には即効性のあるジミナゼンアセチレート (DA) が古くから使用されているが、DA には注射部位の疼痛や小脳出血による神経症状などの重篤な副作用が報告されている。また、クリンダマイシン (CLDM)、ドキシサイクリン (DOXY) およびメトロニダゾールを用いた多剤併用療法も試みられているが、効果が得られるまで長期間の投薬が必要である。抗ヒトマラリア薬であるアトバコン (ATV) は犬バベシア症に対し用いた際、即効性があり副作用がほとんどみられない。しかし、投与中止後に再発し、その再発原虫は ATV に対する感受性が低下し、ATV 推定標的部であるミトコンドリアチトクローム <i>b</i> (<i>cytb</i>) 遺伝子上のアミノ酸置換を伴う一塩基多型が報告されている。ATV を <i>B. gibsoni</i> 感染症の治療薬として応用するには、原虫の耐性に関わる因子の解明と耐性発現に対する対策が必要である。そこで本研究では、まず耐性原虫培養株の確立とその遺伝子解析を行った。次いで、この培養株を用いて薬理的評価を行い、その結果を基に <i>B. gibsoni</i> 感染症に対する ATV を中心とした薬物併用療法の効果を評価したものである。</p> <p>第 1 章では ATV 耐性原虫培養株の確立を行った。未クローン化野生型 <i>B. gibsoni</i> 培養株に ATV を暴露した後に、通常培養条件下で安定した増殖を示す原虫を分離した。分離株の ATV 感受性は野生型と比べて 6.5 倍低下しており、ミトコンドリア <i>cytb</i> 遺伝子上にアミノ酸置換を伴う一塩基多型 M121I が認められた。一方、クローン化野生型原虫株に対して ATV を暴露した結果、再出現した原虫は ATV 感受性の低下を示さず、ミトコンドリア遺伝子上に明らかな多型は認められなかった。従って、ATV 耐性 <i>B. gibsoni</i> は M121I を有する原虫の ATV 暴露による選択性増殖であると考えられた。また本研究では real-time PCR を用いた M121I 定量的検出法を</p>	

確立し、今回分離した ATV 耐性 *B. gibsoni* 培養株は M121I が 99%以上を占めていることを明らかにした。この ATV 耐性 *B. gibsoni* 培養株の DA、アジスロマイシン、DOXY、CLDM、プログアニル(PG)に対する感受性は野生型培養株とほぼ同等であったことから、M121I は他剤に対する感受性に関連しないことを示唆した。従って、ATV と他剤を併用することで ATV 耐性原虫発現の抑制ができることを示唆した。

ATV は現在、PG との合剤であるマラロン(Glaxo Smith Kline, UK)として販売されている。*B. gibsoni* に対する両薬剤の相互作用は報告がなく、*B. gibsoni* 感染症に対する治療効果も明らかでない。そこで、第 2 章では、まず野生型および ATV 耐性 *B. gibsoni* 培養株を用いて、ATV と PG の併用薬剤感受性試験を行い、これらの相互作用を評価した。その結果、両培養株に対し ATV と PG は相乗的な増殖抑制効果を明らかにした。次に、5 頭の *B. gibsoni* 感染犬を実験的に作成し、マラロンの投与を行った。経時的に採血を行い、血液検査、感染赤血球の割合(parasitemia)の測定および投与後の犬赤血球由来 gDNA を用いた M121I 原虫発現率を測定した。実験的感染犬にマラロンを投与したところ、速やかな parasitemia の減少および赤血球容積の上昇が認められ、マラロンの犬 *B. gibsoni* 感染症に対する治療効果を明らかにした。しかし、全ての犬において再発がみられ、その再発原虫は M121I を有していた。

第 3 章では *B. gibsoni* 自然感染例に対するマラロンの治療効果とさらに他剤を併用することで再発の抑制ができるかを検討した。8 頭の臨床例を用い、うち 4 頭に対しマラロンを 10 日間投与した(M 群)。残りの 4 頭に対し 10 日間のマラロン投与および 30 日間の DOXY の投与を行った(MD 群)。投薬前と投薬終了後に身体検査、血液検査、M121I 発現率を測定した。その結果、M 群の 4 頭中 3 頭は速やかに改善したが、再発したため、2 回目の投与を行った。その後、2 頭の再発はなかったが、1 頭は 2 回目の再発がみられ、3 回目の投薬に反応しなかった。MD 群では 4 頭中 2 頭は初回の治療に良好に反応し、その後の再発を認めなかった。残り 2 頭は再発を認めたが、2 回目の投薬により再発を認めなかった。M121I 発現率はマラロン投与後のすべての犬で上昇した。DOXY 併用療法はマラロン単剤と比較して長期間の再発抑制ができる可能性を示唆した。

本研究は、*B. gibsoni* の ATV 耐性発現には、ミトコンドリア *cytb* 遺伝子上の一塩基多型 M121I が関与していることを示唆し、M121I 原虫は他剤への交叉耐性を示さないことから ATV と他剤の併用が M121I 原虫の増殖抑制に有用であることを示唆した。次いで、ATV と PG は *B. gibsoni* に対して相乗的な増殖抑制効果を示すことおよびその合剤であるマラロンは少なくとも急性期犬 *B. gibsoni* 感染症の治療効果を示すことを明らかにした。さらに、DOXY の長期投与を併用することでより再発を抑制できる可能性を示唆した。本研究の知見は犬の *B. gibsoni* 感染症に対して ATV を中心とした多剤併用療法を臨床応用する上で有用であり、ATV 耐性発現のメカニズムを研究する上でも有用であると判断された。以上により、本論文は博士(獣医学)の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。