

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5月28日

採択番号	30 共同-6		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南
研究課題名	犬バベシア症に対するニューキノロン系薬剤の有用性の検討		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いぐち あいこ 井口 愛子	鳥取大学農学部共同獣医学科 獣医臨床検査学教室 講師	
研究分担者			
	玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>犬バベシア症はマダニ媒介性赤血球内寄生原虫である <i>Babesia gibsoni</i> によって引き起こされ、重要な溶血性貧血、黄疸、脾腫および血色素尿を呈し死に至ることもある犬の重要な感染症の一つである。治療にはアトバコン(ATV)が用いられ即効性があることが知られているが、再発しその再発原虫は ATV に対する感受性が低下することが問題となっている。本研究では犬バベシア症に対する新規治療薬としてニューキノロン系薬剤に着目した。単剤での使用ならびに ATV との併用による治療効果を検討することを目的とし、<i>in vitro</i> にて培養株を用いた薬剤感受性試験を実施した。ニューキノロン系薬剤はすでに動物用医薬品の販売があり、犬に対する安全性が示されている薬剤である。</p>		
研究経過の概要	<p>2004 年に自然感染した犬から分離し、培養・維持している野生型 <i>B. gibsoni</i> 培養株を用いた。ニューキノロン系薬剤であるオフロキサシン(OFLX)およびエンロフロキサシン(ERFX)に対する薬剤感受性試験を実施した。続いて ATV とそれぞれの薬剤を併用した際の相互作用を評価した。評価後、薬剤を含まない培養液を用いて培養を続け、再増殖の有無を確認した。再増殖が認められた場合には gDNA を抽出し、ATV 耐性関連遺伝子 M121I の保有率を検出した。</p> <p>【薬剤感受性試験】</p> <p>各薬剤を 2 段階希釈し、最終濃度 OFLX 0~750μM、ERFX 0~80μM となるように薬剤添加培養液を作成した。各培養液を用いて 144 時間の培養を行った。培養液は 24 時間毎に上清の 50%を交換し、48 時間ごとに血液塗抹標本を作製した。血液塗抹標本はギムザ染色を行い、赤血球 1,000 個に対する</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>感染赤血球の割合である parasitemia を算出した。その結果を基に培養後 144 時間における 50%増殖抑制濃度(IC₅₀)を算出した。</p> <p>培養後 144 時間における IC₅₀ は OFLX 94.3±5.5μM、ERFX 26.0±5.3μM であった。両薬剤共に μM レベルでの増殖抑制効果が認められた。しかし各薬剤の推奨用量における血中最高濃度(OFLX 21.0μM、ERFX 4.9μM)と比較するといずれも非常に高値であり、単剤では犬へ投与する際の投与量・毒性量が懸念された。</p> <p>【併用薬剤感受性試験】</p> <p>Modified fixed-ratio isobologram 法に基づき ATV と OFLX(ATV:OFLX 0:750、0.1:375、0.2:187、0.4:94、0.8:47、1.6:0 (μM))、ATV と ERFX(ATV:ERFX 0:100、0.1:50、0.2:25、0.4:12、0.8:6、1.6:0 (μM))の両薬剤が添加された培養液作成した。各組合せを 2 段階希釈した培養液を用いて 144 時間培養を行い、血液塗抹標本にて parasitemia の計測を行った。その結果を基に fractional inhibitory concentration (FIC)を算出し、薬剤の相互作用を評価した。さらに薬剤を含まない培養液で培養を続け、定期的に血液塗抹標本を作製し再増殖の有無を評価した。M121I 保有率は抽出した gDNA を用いて real-time PCR 法により算出した。</p> <p>ATV と OFLX は相加効果を示し、ATV と ERFX は一部相乗効果を示したものの、大部分は相加効果を示した。両薬剤は ATV との併用が可能であること示唆された。各濃度の組み合わせの暴露後、薬剤を含まない培養液で培養を開始した。薬剤暴露後に完全に増殖抑制できていなかった組み合わせにおいて薬剤除去後 7 日では原虫が確認されなかった。しかし培養後 35 日までですべての組み合わせにおいて再増殖を認めた。再増殖時の M121I 保有率は 1%未満であり、ATV 単剤暴露後の再増殖時よりも低値であった。</p> <p>ATV とニューキノロン系薬剤の併用は原虫の再増殖を抑制できないものの、M121I 保有率は低値であったことから ATV 感受性低下を防ぐ効果的な併用療法であることが示唆された。また薬剤暴露中止後も増殖が抑制されたことから、ニューキノロン系薬剤は <i>B. gibsoni</i> に対し遅延死を引き起こす可能性が示唆された。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>本研究は第 161 回日本獣医学会学術集会にて口頭発表を行った。現在、英語論文の投稿準備中である。</p> <p>・第 161 回日本獣医学会学術集会 「<i>Babesia gibsoni</i> に対するニューキノロン系抗菌薬の有効性の評価」○益田美佐、井口愛子、内田直宏、小林沙織、佐藤れえ子、山崎真大</p>