

イオノフォアを応用した新規抗ピロプラズマ原虫薬の開発

山崎 真大 [北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座 / 准教授]

背景・目的

ピロプラズマ原虫は、哺乳動物の血液細胞に感染しピロプラズマ症を引き起こす。ピロプラズマ原虫は免疫機能を回避し、薬剤耐性を獲得するためにワクチンや抗ピロプラズマ原虫薬の開発は困難である。イオノフォアは細胞膜に作用し、細胞内外のイオン勾配を変化させる化合物の総称であり、ピロプラズマ原虫細胞膜に作用し、その細胞機能を障害し細胞死を引き起こすことが明らかになってきているが、原虫のみならず宿主哺乳動物の細胞にも作用することが予想される。このことから、本研究ではより原虫膜に対して特異性の高いイオノフォアの検索を試みた。

内容・方法

サリノマイシン、バリノマイシンおよびナスタチンのようなイオノフォアは赤血球内に寄生する原虫を24時間でほぼ死滅させるが、赤血球をも溶血させる。しかしおもしろいことに、ナスタチンは赤血球への作用が他のイオノフォアに比べて弱かった。この化合物は細胞膜に作用する際にステロールを必要とするが、哺乳動物の細胞膜に多いコレステロールより原虫や真菌に多いエルゴステロールに親和性の高いことが報告されている。しかしながらナスタチンの静脈内投与の是非は十分に検討されていない。一方化学構造の類似した抗生物質のアムホテリシンBは抗真菌薬として静脈内に投与可能であるため、抗原虫効果を有するならば赤血球内に寄生するピロプラズマ原虫に作用することが可能である。そこで本研究では、アムホテリシンBの抗原虫効果を培養原虫を用いて検討するとともに、アムホテリシンBおよびナスタチンの赤血球および白血球に対する細胞障害効果を検討した。

結果・成果

ピロプラズマ原虫の一種で犬に感染する *Babesia gibsoni* を用いてアムホテリシンBの抗原虫効果を観察した。培養 *B. gibsoni* の培養液中にさまざまな濃度のアムホテリシンBを添加し培養を行い、24時間後に培養原虫数を塗抹標本作製して計測した。その結果、アムホテリシンBは濃度依存的に培養原虫数を減少させ、特にアムホテリシンBの濃度が2.5 µg/mLから5 µg/mLの間で原虫数が大きく減少した。計算したアムホテリシンBの *B. gibsoni* に対するED₅₀は3.7 µg/mLであり、以前求めたナスタチンのED₅₀(31.96 µg/mL)と比較して、抗原虫効果はアムホテリシンBの方が強いことが明らかになった。しかしながら、原虫の感染したイヌ赤血球に対するアムホテリシンBの毒性を溶血を指標に観察したところ、アムホテリシンBの濃度依存的に培養上清中のヘモグロビン

濃度が増加し、このことから本化合物は感染イヌ赤血球に溶血を引き起こすことが明らかになった。ただしこのことは、感染赤血球が原虫の死滅とともに溶血を起こしたものであるかもしれないので、非感染赤血球を用いてアムホテリシンBの赤血球に対する毒性を再検討する必要があると考えられた。一方ナスタチンはほとんど赤血球を溶血させないことが明らかになっている。次に、イヌの白血球から好中球を慎重に分離し、ナスタチンならびにアムホテリシンBの好中球に対する毒性を、死亡する細胞数を指標に観察した。分離したイヌ好中球を様々な濃度のナスタチンあるいはアムホテリシンBを含む培養液中で培養を行い、24時間後にトリパンブルー染色を行って死亡した好中球数を計測した。その結果、両化合物を含まない培養液で培養した対照実験では、好中球の約97%が生存していたが、それぞれ最高濃度のナスタチン(100 µg/mL)存在下では95.5%、最高濃度のアムホテリシンB(10 µg/mL存在下)でも98%の好中球が24時間の培養後に生存していた。この結果から、ナスタチンおよびアムホテリシンBの両化合物は *B. gibsoni* に対して抗原虫効果を発揮する程度の濃度では宿主動物の好中球には強い障害を引き起こさないことが明らかになった。以上の研究より、1)ナスタチンは原虫を死滅させるためには高濃度で使用する必要があるものの、この濃度では宿主動物の赤血球および白血球には細胞障害を及ぼさないこと、2)アムホテリシンBは低濃度で原虫を死滅させることが可能であり、この濃度では宿主動物の白血球には細胞障害を引き起こさないが、赤血球を溶血させてしまう可能性があること、が明らかになった。

今後の展望

ナスタチンは、血液以外の臓器由来の細胞に対する毒性を培養細胞を用いてまず検討し、問題なければ動物の個体に対して本化合物を静脈内に投与可能であるかどうかを検討する。以上をクリアできれば、ナスタチンはピロプラズマ原虫に対する新規治療薬となることが期待できる。アムホテリシンBは、まず非感染赤血球に対する毒性を再検討する必要がある。これをクリア出来ればナスタチンと同様に培養細胞さらに個体に対する毒性の検討を進め、抗ピロプラズマ原虫薬としての可能性を検証する。本化合物は既に静脈内への投与が行われているので、新規治療薬として期待できる。