

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-35071

(P2018-35071A)

(43) 公開日 平成30年3月8日(2018.3.8)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 31/343 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/343	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 33/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 33/02	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2016-166525 (P2016-166525)	(71) 出願人	504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地
(22) 出願日	平成28年8月29日 (2016.8.29)	(74) 代理人	100113332 弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100160037 弁理士 金子 真紀
		(72) 発明者	加藤 健太郎 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立 大学法人帯広畜産大学内
		(72) 発明者	村田 優穂 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立 大学法人帯広畜産大学内

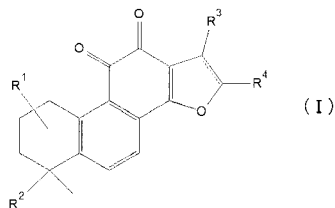
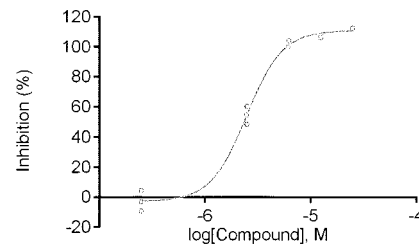
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗トキソプラズマ剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 プラディゾイトを含む宿主細胞内のトキソプラズマ原虫に対して作用する一方で宿主細胞への毒性が低く、且つタキゾイドをプラディゾイトに誘導しない薬剤を提供する。

【解決手段】 式(I)で表される化合物、その異性体、薬学的に許容されるそれらの塩又はこれらの混合物を有効成分とする抗トキソプラズマ剤。



(式中、R<sup>1</sup>はH又はOHを、R<sup>2</sup>はCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>OH、COOH又はCOOCH<sub>3</sub>を、R<sup>3</sup>はCH<sub>3</sub>又はCH<sub>2</sub>OHを、及びR<sup>4</sup>はH又はSO<sub>3</sub>Naをそれぞれ表し、破線を含む結合は単結合又は二重結合を表す。)

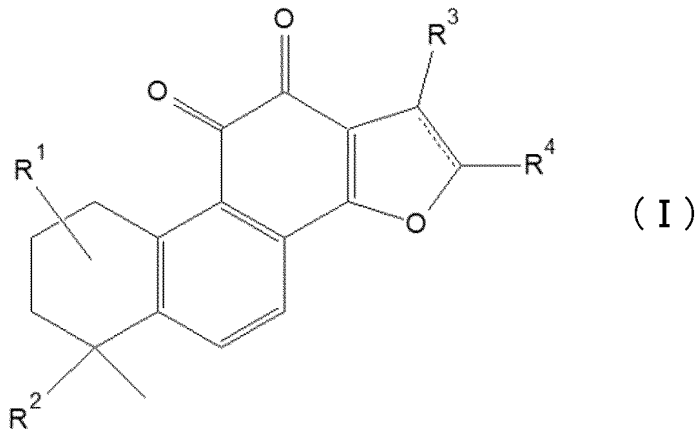
【選択図】 図1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式(1)で表される化合物、その異性体、薬学的に許容されるそれらの塩又はこれらの混合物を有効成分とする抗トキソプラズマ剤。

## 【化 1】



10

(式中、R<sub>1</sub>はH又はOHを、R<sub>2</sub>はCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>OH、COOH又はCOOCH<sub>3</sub>を、R<sub>3</sub>はCH<sub>3</sub>又はCH<sub>2</sub>OHを、及びR<sub>4</sub>はH又はSO<sub>3</sub>Naをそれぞれ表し、破線を含む結合は単結合又は二重結合を表す)

20

## 【請求項 2】

式(I)で表される化合物が、タンシノンIIA、ヒドロキシタンシノンII、3-ヒドロキシタンシノン、ジヒドロキシタンシノン、タンシノンIIAスルホン酸ナトリウム、クリプトタンシノン、1-ヒドロキシクリプトタンシノン、17-ヒドロキシクリプトタンシノン、3-ヒドロキシシプトタンシノン、タンシノンIIB、3-ヒドロキシタンシノンIIB、タンシノンIIBスルホン酸ナトリウム、タンシノン酸、タンシノン酸メチル、及びジヒドロノルタンシノン酸メチルよりなる群から選択される化合物である、請求項1に記載の抗トキソプラズマ剤。

## 【請求項 3】

トキソプラズマ原虫タキゾイトの増殖抑制剤である、請求項1又は2に記載の抗トキソプラズマ剤。

30

## 【請求項 4】

トキソプラズマ原虫ブラディゾイトの駆除剤である、請求項1又は2に記載の抗トキソプラズマ剤。

## 【請求項 5】

請求項1から4のいずれかに記載の抗トキソプラズマ剤を含む、トキソプラズマ症の治療及び/又は予防のための医薬。

## 【請求項 6】

急性感染期の、又は潜伏感染していたトキソプラズマ原虫の再活性化により再発したトキソプラズマ症の治療のための、請求項5に記載の医薬。

40

## 【請求項 7】

トキソプラズマ原虫の再活性化によるトキソプラズマ症の再発を予防するための、請求項5に記載の医薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、タンシノンを含む有効成分とする抗トキソプラズマ剤に関する。

## 【背景技術】

50

## 【0002】

トキソプラズマ症は、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) に感染した家畜の肉を加熱調理などが不十分な状態で食べる、又は終宿主であるネコの糞便に含まれるオーシストを経口摂取するなどにより引き起こされる人獣共通性の原虫感染症である。現在、全世界人口の約3割ほどが感染状態にあると推定されている。

## 【0003】

トキソプラズマの終宿主はネコ科動物であるが、ヒト、家畜を含む全ての恒温動物は中間宿主となる。トキソプラズマに感染した中間宿主は、免疫系が健全であるときは症状を示さない、又は軽度な急性感染症状を示すに留まるが、感染したトキソプラズマ原虫は組織シストと呼ばれる安定な壁に覆われた構造の中で緩やかに増殖し、宿主免疫系による排除を回避しつつ宿主に感染し続ける。この時期の原虫はブラディゾイト(緩増虫体)と呼ばれる。一方、HIV感染、臓器移植後その他の宿主免疫系の機能が低下した状態になるとトキソプラズマ原虫は再活性化し、視力障害、トキソプラズマ脳炎又は肺炎などを引き起こす。また、胎児が妊娠中の母体を通じて感染する先天性トキソプラズマ症は、流産、胎児の水頭症、失明、頭蓋内石灰化、神経系の発達障害などを引き起こす。

10

## 【0004】

現在用いられている抗トキソプラズマ薬は、ピリメサミン、葉酸代謝経路を標的とするサルファ剤とピリメサミンとの合剤、タンパク質合成系を標的とするスピラマイシンなどである。しかし、上記抗トキソプラズマ薬は、増殖期の原虫(タキゾイト)を排除し得るが、ブラディゾイトに対する効果は限定的であることに加え、薬物の投与がタキゾイトをブラディゾイトに誘導してしまうという問題を有する。

20

## 【0005】

このため、ブラディゾイトを含む宿主細胞内のトキソプラズマ原虫に対して作用する一方で宿主細胞への毒性が低く、かつタキゾイトをブラディゾイトに誘導しない、新しい薬剤が必要とされている。

## 【0006】

タンシノン(*tanshinones*)は、生薬の一種である丹参に含まれるフラン骨格を有する有機化合物の総称であり、クリプトタンシノン(*cryptotanshinone*)、タンシノンIIA(*tanshinone IIA*)、タンシノンI(*tanshinone I*)その他多数のフラン化合物が含まれる。タンシノンの多くは、がん細胞に対する増殖抑制作用、血管新生阻害作用などの生理活性を有することが知られている(例えば、非特許文献1など)。また、タンシノンが抗トリパノソマ活性及び抗マラリア活性を有することも報告されている(非特許文献2)。しかし、これまでのところ、トキソプラズマ原虫に対する薬理作用に関する報告はない。

30

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0007】

【非特許文献1】Qing, Lu et al., 2009, *Int. J. Mol. Med.*, 24, 773-780.

【非特許文献2】Slusarczyk, S., et al., *Planta Med.*, 2011, 77, 1594-1596.

40

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明は、ブラディゾイトを含む宿主細胞内のトキソプラズマ原虫に対して作用する一方で宿主細胞への毒性が低く、かつタキゾイトをブラディゾイトに誘導しない薬剤を提供することを目的とするものである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明者らは、タンシノンの幾つかが上記課題を解決し得ることを見出し、下記の各発

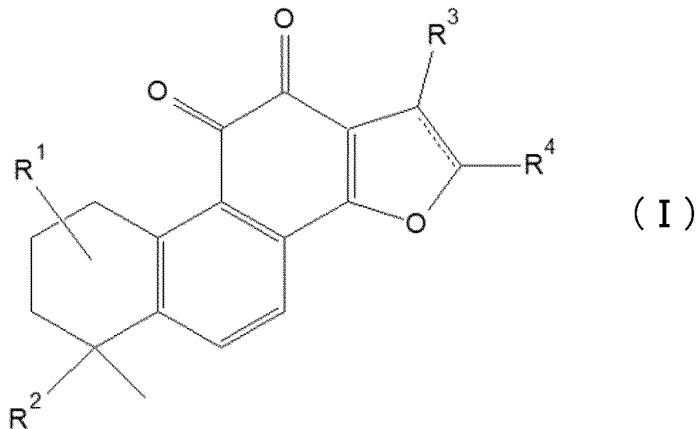
50

明を完成させた。

【0010】

(1) 式(I)で表される化合物、その異性体、薬学的に許容されるそれらの塩又はこれらの混合物を有効成分とする抗トキソプラズマ剤。

【化1】



10

(式中、 $R^1$ はH又はOHを、 $R^2$ は $CH_3$ 、 $CH_2OH$ 、 $COOH$ 又は $COOCH_3$ を、 $R^3$ は $CH_3$ 又は $CH_2OH$ を、及び $R^4$ はH又は $SO_3Na$ をそれぞれ表し、破線を含む結合は単結合又は二重結合を表す)

20

(2) 式(I)で表される化合物が、タンシノンIIA、ヒドロキシタンシノンII、3-ヒドロキシタンシノン、ジヒドロキシタンシノン、タンシノンIIAスルホン酸ナトリウム、クリプトタンシノン、1-ヒドロキシクリプトタンシノン、17-ヒドロキシクリプトタンシノン、3-ヒドロキシシプトタンシノン、タンシノンIIB、3-ヒドロキシタンシノンIIB、タンシノンIIBスルホン酸ナトリウム、タンシノン酸、タンシノン酸メチル、及びジヒドロノルタンシノン酸メチルよりなる群から選択される化合物である、(1)に記載の抗トキソプラズマ剤。

(3) トキソプラズマ原虫タキゾイトの増殖抑制剤である、(1)又は(2)に記載の抗トキソプラズマ剤。

(4) トキソプラズマ原虫ブラディゾイトの駆除剤である、(1)又は(2)に記載の抗トキソプラズマ剤。

30

(5) (1)から(4)のいずれかに記載の抗トキソプラズマ剤を含む、トキソプラズマ症の治療及び/又は予防のための医薬。

(6) 急性感染期の、又は潜伏感染していたトキソプラズマ原虫の再活性化により再発したトキソプラズマ症の治療のための、(5)に記載の医薬。

(7) トキソプラズマ原虫の再活性化によるトキソプラズマ症の再発を予防するための、(5)に記載の医薬。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、トキソプラズマ原虫のタキゾイトの増殖をブラディゾイトへの誘導を回避しながら抑制することができ、また宿主細胞内に潜伏感染したブラディゾイトを殺滅することができる。したがって、本発明の抗トキソプラズマ剤は、視力障害、トキソプラズマ脳炎などのトキソプラズマ症の予防及び/又は治療に利用することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】トキソプラズマ原虫のタキゾイトに対するタンシノンIIAの増殖阻害濃度曲線を示すグラフである。

【図2】宿主細胞への感染前にタンシノンIIA、デキストラン硫酸(DS10)、ピリメサミン(PYR)又はDMSOで処理したトキソプラズマ原虫タキゾイトの増殖を示すグラフである。

50

【図3】宿主細胞への感染後にタンシノンIIA、デキストラン硫酸(DS10)、ピリメサミン(PYR)又はDMSOで処理したトキソプラズマ原虫タキゾイトの増殖を示すグラフである。

【図4】タンシノンIIA、ピリメサミン(PYR)又はDMSO(Tachy)で処理したトキソプラズマ原虫の潜伏感染誘導を示すグラフである。

【図5】トキソプラズマ原虫のブラディゾイトに対するタンシノンIIA(Tan0.2~Tan25)、ピリメサミン(Pyro.04~Pyro5)又はDMSOの効果を示すグラフである。

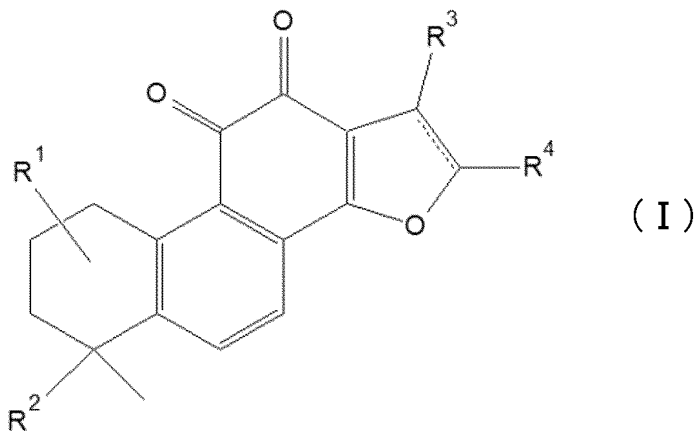
【発明を実施するための形態】

【0013】

10

本発明の第一の態様は、下記式(I)で表される化合物、その異性体、薬学的に許容されるそれらの塩又はこれらの混合物を有効成分とする抗トキソプラズマ剤に関する。

【化2】



20

(式中、 $R^1$ はH又はOHを、 $R^2$ は $CH_3$ 、 $CH_2OH$ 、 $COOH$ 又は $COOCH_3$ を、 $R^3$ は $CH_3$ 又は $CH_2OH$ を、及び $R^4$ はH又は $SO_3Na$ をそれぞれ表し、破線を含む結合は単結合又は二重結合を表す)

【0014】

30

式(I)で表される化合物の例としては、以下の化合物を挙げることができる。

・タンシノンIIA：1,6,6-トリメチル-6,7,8,9-テトラヒドロフェナントロ[1,2-b]フラン-10,11-ジオン

・ヒドロキシタンシノンII：6,7,8,9-テトラヒドロ-9-ヒドロキシ-1,6,6-トリメチルフェナントロ[1,2-b]フラン-10,11-ジオン

・3-ヒドロキシタンシノン：6,7,8,9-テトラヒドロ-7-ヒドロキシ-1,6,6-トリメチルフェナントロ[1,2-b]フラン-10,11-ジオン

・ジヒドロキシタンシノン：1-(ヒドロキシメチル)-6,6-ジメチル-7-ヒドロキシ-6,7,8,9-テトラヒドロフェナントロ[1,2-b]フラン-10,11-ジオン

・タンシノンIIAスルホン酸ナトリウム：1,6,6-トリメチル-10,11-ジオキソ-6,7,8,9,10,11-ヘキサヒドロフェナントロ[1,2-b]フラン-2-スルホン酸ナトリウム

40

・クリプトタンシノン：1,2,6,7,8,9-ヘキサヒドロ-1,6,6-トリメチルフェナントロ[1,2-b]フラン-10,11-ジオン

・1-ヒドロキシクリプトタンシノン：1-ヒドロキシ-15-メチル-17-オキサ-20-ノル-16,17-シクロカッサ-5(10),6,8,13-テトラエン-11,12-ジオン

・17-ヒドロキシクリプトタンシノン：1,2,6,7,8,9-ヘキサヒドロ-1-(ヒドロキシメチル)-6,6-ジメチルフェナントロ[1,2-b]フラン-10,11-ジオン

50

- ・ 3 - ヒドロキシシプトタンシノン : 3 - ヒドロキシ - 14 , 16 - エポキシ - 20 - ノルアピエタン - 5 ( 10 ) , 6 , 8 , 13 - テトラエン - 11 , 12 - ジオン
- ・ タンシノン I I B : 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 6 - ヒドロキシメチル - 1 , 6 - ジメチルフェナントロ [ 1 , 2 - b ] フラン - 10 , 11 - ジオン
- ・ 3 - ヒドロキシタンシノン I I B : 3 , 19 - ジヒドロキシ - 14 , 16 - エポキシ - 20 - ノルアピエタン - 5 ( 10 ) , 6 , 8 , 13 , 15 - ペンタエン - 11 , 12 - ジオン
- ・ タンシノン I I B スルホン酸ナトリウム : 1 , 6 - ジメチル - 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 6 - ( ヒドロキシメチル ) - 10 , 11 - ジオキソフェナントロ [ 1 , 2 - b ] フラン - 2 - スルホン酸ナトリウム
- ・ タンシノン酸 : 6 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11 - ヘキサヒドロ - 1 , 6 - ジメチル - 10 , 11 - ジオキソフェナントロ [ 1 , 2 - b ] フラン - 6 - カルボン酸
- ・ タンシノン酸メチル : 6 , 7 , 8 , 9 , 10 , 11 - ヘキサヒドロ - 1 , 6 - ジメチル - 10 , 11 - ジオキソフェナントロ [ 1 , 2 - b ] フラン - 6 - カルボン酸メチル
- ・ ジヒドロノルタンシノン酸メチル : 11 , 12 - ジオキソ - 14 , 16 - エポキシ - 20 - ノルアピエタン - 5 ( 10 ) , 6 , 8 , 13 - テトラエン - 19 - 酸メチル

【 0015 】

本発明において好ましい化合物は、タンシノン I I A、ヒドロキシタンシノン I I、3 - ヒドロキシタンシノン、ジヒドロキシタンシノン、タンシノン I I A スルホン酸ナトリウムであり、特にタンシノン I I A が好ましい。

【 0016 】

式 ( I ) で表される化合物は、シソ科植物の丹参 ( *Salviae miltiorrhizae* )、特に丹参の根から抽出することができるが、有機化学的手法により合成することもできる。

【 0017 】

「異性体」は、式 ( I ) で表される化合物において存在し得るエナンチオマ - 、ジアステレオマ - ( シス - トランス異性体を含む )、配座異性体、二重結合におけるシス - トランス異性体などを意味する。

【 0018 】

式 ( I ) で表される化合物の薬学的に許容される塩としては、ヒドロキシ基における塩、例えば、ナトリウム及びカリウムなどのアルカリ金属との塩；カルシウム及びマグネシウムなどのアルカリ土類金属塩との塩；アンモニウム塩；並びにトリメチルアミン、トリエチルアミン、トリブチルアミン、ピリジン、N, N - ジメチルアニリン、N - メチルピペリジン、N - メチルモルホリン、ジエチルアミン、ジシクロヘキシルアミン、プロカイン、ジベンジルアミン、N - ベンジル - フェネチルアミン、1 - エフェナミン及び N, N' - ジベンジリエチレンジアミンなどの含窒素有機塩基との塩などを挙げることができる。

【 0019 】

本発明との関連で抗トキソプラズマ剤とは、トキソプラズマ原虫の増殖抑制及び殺滅、宿主細胞への感染阻害、宿主組織からのトキソプラズマ原虫の駆除など、トキソプラズマ原虫の数及び/又はその活動の抑制、低減、停止などのために用いられる剤をいう。本発明の抗トキソプラズマ剤は、特にトキソプラズマ原虫タキゾイトの増殖抑制のために、及びトキソプラズマ原虫ブラディゾイトの駆除のために用いることができる。

【 0020 】

式 ( I ) で表される化合物は、そのまま抗トキソプラズマ剤として利用してもよく、さらに賦形剤、結合剤、崩壊剤、崩壊抑制剤、固結・付着防止剤、滑沢剤、吸収・吸着担体、溶剤、増量剤、等張化剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤、増粘剤、被覆剤、吸収促進剤、ゲル化・凝固促進剤、光安定化剤、保存剤、防湿剤、乳化・懸濁・分散安定化剤、着色防止剤、脱酸素・酸化防止剤、矯味・矯臭剤、着色剤、起泡剤、消泡剤、無痛化剤、帯電防止剤、緩衝・pH調節剤などの各種添加物を配合して抗トキソプラズマ剤又はこれを

10

20

30

40

50

含む医薬若しくは医薬組成物として利用してもよい。

【0021】

本発明の第二の態様は、第一の態様の抗トキソプラズマ剤を含む、トキソプラズマ症の治療及び/又は予防のための医薬に関する。

【0022】

本発明との関連でトキソプラズマ症とは、トキソプラズマ原虫の感染、又は感染により引き起こされるあらゆる症状若しくは状態をいう。本発明の医薬は、かかる感染又はこれに伴う症状若しくは状態の治療、寛解、改善、予防のために恒温動物に投与することで使用される。

【0023】

トキソプラズマ症の急性感染期には、タキゾイトが宿主細胞に侵入し、細胞内で増殖する。トキソプラズマ原虫はその後ブラディゾイトに変化して潜伏感染に移行するが、宿主免疫系の機能低下などにより再活性化され、再びタキゾイトに変化して細胞内での増殖を開始し、これがトキソプラズマ症の再発につながる。

【0024】

本発明の抗トキソプラズマ剤はタキゾイトに対する増殖抑制効果を有することから、かかる剤を含む医薬は急性感染期の、又は潜伏感染していたトキソプラズマ原虫の再活性化により再発したトキソプラズマ症の治療のために用いることができる。

【0025】

また、本発明の抗トキソプラズマ剤は組織内でシストを形成して潜伏感染しているブラディゾイトに対する駆除効果も有する。したがって、本発明の医薬は、トキソプラズマ原虫の再活性化によるトキソプラズマ症の再発を予防するために用いることもできる。

【0026】

本発明の医薬は、トキソプラズマ原虫に感染し得る全ての恒温動物を対象として適用することができる。そのような恒温動物の例としては、ニワトリ、シチメンチョウ、ウズラ、アヒルなどの鳥類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、ウサギ、サルその他の非ヒト哺乳動物及びヒトを挙げることができる。

【0027】

本発明の医薬の剤形としては、経口剤（錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、丸剤、懸濁剤、乳剤、液剤、シロップ剤など）、注射剤、坐剤、外用剤（軟膏剤、貼付剤など）、エアゾール剤などを挙げることができる。

【0028】

錠剤、散剤、顆粒剤などの経口用固形製剤は、例えば、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、無水第二リン酸カルシウム、部分アルファ化デンプン、コンスターチ及びアルギン酸などの賦形剤；単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、ポリビニルアルコール、ポリビニルエテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、エチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、水及びエタノールなどの結合剤；乾燥デンプン、アルギン酸、寒天末、デンプン、架橋ポリビニルピロリドン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム及びデンプングリコール酸ナトリウムなどの崩壊剤；ステアリルアルコール、ステアリン酸、カカオバター及び水素添加油などの崩壊抑制剤；ケイ酸アルミニウム、リン酸水素カルシウム、酸化マグネシウム、タルク、無水ケイ酸などの固結防止・付着防止剤；カルナバロウ、軽質無水ケイ酸、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム、硬化油、硬化植物油誘導体、胡麻油、サラシミツロウ、酸化チタン、乾燥水酸化アルミニウムゲル、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、リン酸水素カルシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びポリエチレングリコールなどの滑沢剤；第4級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウム、尿素及び酵素などの吸収促進剤；デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、無水ケイ酸、含水二酸化ケイ素、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム及びコロイ

10

20

30

40

50

ド状ケイ酸などの吸収・吸着担体といった固形製剤化医薬用添加物を用い、常法に従い調製すればよい。

【0029】

さらに錠剤は、必要に応じ、通常の剤皮を施した錠剤、例えば、糖衣錠、ゼラチン被包錠、胃溶性被覆錠、腸溶性被覆錠及び水溶性フィルムコ-ティング錠とすることができる。

【0030】

カプセル剤は、上記で例示した各種の医薬を、硬質ゼラチンカプセル及び軟質カプセルなどに充填して調製される。

【0031】

また、溶剤、増量剤、等張化剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤、増粘剤などの上記した各種の液体製剤化用添加物を用い、常法に従い調製して、水性又は油性の懸濁液、溶液、シロップ及びエリキシル剤とすることもできる。

【0032】

注射剤は、例えば、水、エチルアルコ-ル、マクロゴ-ル、プロピレングリコ-ル、クエン酸、酢酸、リン酸、乳酸、乳酸ナトリウム、硫酸及び水酸化ナトリウムなどの希釈剤；クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム及びリン酸ナトリウムなどのpH調整剤及び緩衝剤；ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸、チオグリコ-ル酸及びチオ乳酸などの安定化剤；食塩、ブドウ糖、マンニト-ル又はグリセリンなどの等張化剤；カルボキシメチルセルロ-スナトリウム、プロピレングリコ-ル、安息香酸ナトリウム、安息香酸ベンジル、ウレタン、エタノ-ルアミン、グリセリンなどの溶解補助剤；グルコン酸カルシウム、クロロブタノ-ル、ブドウ糖、ベンジルアルコ-ルなどの無痛化剤；及び局所麻酔剤などの液体製剤化用の医薬品添加物を用い、常法に従い調製すればよい

【0033】

本発明の医薬の投与方法は特に限定されないが、製剤の形態に応じて適宜決定される。例えば、非経口製剤である場合は、血管内投与（好ましくは静脈内投与）、腹腔内投与、腸管内投与、皮下投与などを挙げることができる。好ましい実施形態の一つにおいて、本発明の抗トキソプラズマ剤は、経口投与、静脈内投与により生体に投与される。

【0034】

本発明の医薬の投与量は、投与された対象において治療及び/又は予防効果を奏する量、すなわち有効量であればよい。有効量は対象となる動物の種類、症状の程度、ヒトにあっては患者の年齢、性別、疾患の形態その他の条件などに応じて適宜選択されるが、通常成人に対して体重1kgあたり10 $\mu$ g~2000 $\mu$ g、好ましくは50 $\mu$ g~1000 $\mu$ g、より好ましくは100 $\mu$ g~500 $\mu$ gであり、これを1日に1回若しくは複数回に分けて、又は間歇的に投与することができる。

【0035】

本発明の第三の態様は、第二の態様の医薬の有効量を対象に投与することを含む、トキソプラズマ症を治療及び/又は予防する方法に関する。

【0036】

以下、非限定的な実施例を示して、本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0037】

<実験材料>

(1)化合物

タンシノンIIAは東京化成工業株式会社から、ピリメサミン(pyrimethamine)は和光純薬工業株式会社から、それぞれ購入し、DMSOに溶解して以下の実験に使用した。

【0038】

(2)宿主細胞

アフリカミドリザル腎臓由来細胞(Verob細胞)は理研バイオソ-スセンターから、

10

20

30

40

50



ヒト包皮線維芽細胞（HFF細胞）はATCCから、それぞれ入手して使用した。Verob細胞は5%FBSを含むDMEM培地中で、HFF細胞は10%FBSを含むDMEM培地中で維持した。

【0039】

(3) トキソプラズマ原虫

潜伏感染型虫体に分化する能力が低く、バクテリア型 - ガラクトシダ - ゼを高発現する組換えトキソプラズマ原虫RH/2F株(ATCC50839)、並びに潜伏感染型虫体に分化する能力を有し、原虫で恒常的に発現するTUBA1プロモ - タ - の制御下にウミシタケルシフェラ - ゼ遺伝子を及び潜伏感染期特異的なBAG1プロモ - タ - の制御下にホタルルシフェラ - ゼ遺伝子をそれぞれ有する組換えトキソプラズマ原虫PLK/DLUC1C9株(特開2015-223105号公報)を、Sugira(Anal. Biochem., 2014, 464, 9-11)に記載の方法に従って維持し、それぞれのタキゾイトを調製した。

10

【0040】

<実施例1> トキソプラズマ原虫に対する増殖抑制効果及び宿主細胞への毒性の評価

(1) PLK/DLUC1C9株のタキゾイトをVerob細胞にM.O.I = 0.5で感染させ、2時間インキュベ - トした後、感染細胞をトリプシン処理して細胞懸濁液を調製した。感染細胞2500個を含む培地25μLを、被験物質であるタンシノンIIA(2mM DMSO溶液を125nL、終濃度10μM)を添加したハーフエリア96ウェルプレ - トのウェルに加えて48時間培養後、Renilla - Glo kit(Promega)を用いてウミシタケルシフェラ - ゼ活性を測定した。タンシノンIIAに代えて同量のDMSOのみを加えたものをネガティブコントロール(0%阻害)とし、またタンシノンIIAに代えてピリメサミン(終濃度10μM)を添加したものをポジティブコントロール(100%阻害)としたとき、タンシノンIIAはウミシタケルシフェラ - ゼ活性すなわち宿主細胞中のトキソプラズマ原虫の増殖を90%以上阻害することが確認された。

20

【0041】

(2) HFF細胞をコンフルエントになるまで培養したハーフエリア96ウェルプレートのウェルに、50μLの培地に懸濁した500個のRH/2F株タキゾイトを感染させた。感染細胞に被験物質としてタンシノンIIA(終濃度25μM又は2.5μM)を加えて、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で48時間培養後、Beta - Glo kit(Promega)を用いて - ガラクトシダ - ゼ活性を測定した。タンシノンIIAに代えて同量のDMSOのみを加えたものをネガティブコントロール(0%阻害)とし、またタンシノンIIAに代えてピリメサミン(終濃度10μM)を添加したものをポジティブコントロール(100%阻害)としたとき、 - ガラクトシダ - ゼ活性すなわち宿主細胞中のトキソプラズマ原虫の増殖は、25μMのタンシノンIIAによって112%、2.5μMのタンシノンIIAによって55%阻害されることが確認された。

30

【0042】

さらに、タンシノンIIAの添加量を変えて同様の実験を繰り返して行った結果を図1に示す。図1の阻害曲線からRH/2F株に対するタンシノンIIAのIC<sub>50</sub>を求めたところ、2.5μMであることが確認された。

40

【0043】

一方、トキソプラズマ原虫に感染していないHFF細胞を終濃度25μM又は2.5μMのタンシノンIIAの存在下で48時間培養したときの宿主細胞の生存率をCell - Titer Glo kit(Promega)を用いて測定した。宿主細胞生存率は、それぞれ75%(終濃度25μM)及び99%(終濃度2.5μM)であり、トキソプラズマ原虫へのタンシノンIIAの選択性指標(宿主細胞生存50%阻害濃度(>25μM)/原虫増殖50%阻害濃度)は10以上であることが確認された。

【0044】

<実施例2> トキソプラズマ原虫に対する宿主細胞侵入及び宿主細胞内増殖抑制効果の評

50

価

50  $\mu$ L の培地中で、500 個の RH / 2 F 株タキゾイトを、被験物質であるタンシノン I I A (終濃度 2.5  $\mu$ M)、宿主細胞へのトキソプラズマ原虫の侵入を阻害することが知られているデキストラン硫酸 (10 kDa、終濃度 10 mg / mL)、宿主細胞内の原虫の増殖を阻害することが知られているピリメサミン (終濃度 5  $\mu$ M) 又は同量の DMSO と混合した。混合物を、HFF 細胞をコンフルエントになるまで培養したハーフエリア 96 ウェルプレートのウェルに加え、室温で 10 分間インキュベ - トした。さらに 37

の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48 時間培養後、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を測定することで、宿主細胞感染前の被験物質処理がトキソプラズマ原虫の宿主細胞への侵入及び宿主細胞内増殖に及ぼす影響を評価した。また、RH / 2 F 株タキゾイトと HFF 細胞とを混合して 2 時間インキュベ - トした後、培地交換及び洗浄により未侵入の原虫を除去し、その後被験物質を加えて同様に試験を行うことで、宿主細胞感染後の被験物質処理の影響を評価した。

10

#### 【0045】

宿主細胞感染前に DMSO で処理した RH / 2 F 株の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を 100% としたときの各被験物質で処理した RH / 2 F 株の  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を、原虫の増殖率として図 2 及び図 3 に表す。タンシノン I I A 及びピリメサミンは、感染前処理、感染後処理のいずれの場合にも原虫の増殖を抑制した。一方、デキストラン硫酸は感染前処理の場合は原虫の増殖を抑制したが、感染後処理の場合は原虫の増殖に影響しなかった。このことから、タンシノン I I A は宿主細胞内の原虫の増殖を阻害することが確認

20

#### 【0046】

##### < 実施例 3 > 潜伏感染誘導能の確認

HFF 細胞を 12 ウェルプレ - トで培養し、各ウェルに 2.0  $\times$  10<sup>4</sup> 個の PLK / DLUC1C9 株を接種して 24 時間インキュベ - トした後、被験物質としてタンシノン I I A (終濃度 2.5  $\mu$ M)、潜伏感染を引き起こすことが知られているピリメサミン (終濃度 5  $\mu$ M) 又は同量の DMSO を添加して、さらに 48 時間インキュベ - トした。200  $\mu$ L の Passive Lysis Buffer を加えて細胞を溶解した後、DUAL - Glo kit (Promega) を用いて、潜伏感染期特異的な BAG1 プロモ - タ - の制御下にあるホタルルシフェラ - ゼ活性及び構成的 TUBA1 プロモ - タ - の制御下にあるウミシイタケルシフェラ - ゼ活性を測定し、ホタルルシフェラ - ゼ活性 / ウミシイタケルシフェラ - ゼ活性を BAG1 プロモーター活性として算出した。

30

#### 【0047】

ピリメサミンで処理した PLK / DLUC1C9 株の BAG1 プロモーター活性を 100% としたときの DMSO 又はタンシノン I I A で処理した PLK / DLUC1C9 株の BAG1 プロモーター活性を図 4 に表す。タンシノン I I A は、ピリメサミンと比較してブラディゾイトを誘導しない、すなわち潜伏感染を誘導しないことが確認された。

#### 【0048】

##### < 実施例 4 > ブラディゾイトに対する殺滅効果

実施例 3 と同様にして PLK / DLUC1C9 株を感染させた HFF 細胞を一般的に潜伏感染誘導に用いられる条件である pH 8.2 及び CO<sub>2</sub> 非存在下で 8 日間培養し、ブラディゾイトへの分化を誘導した。培養 9 日目に被験物質としてタンシノン I I A (終濃度 0.2  $\mu$ M、1  $\mu$ M、5  $\mu$ M 又は 25  $\mu$ M)、ピリメサミン (終濃度 0.04  $\mu$ M、0.2  $\mu$ M、1  $\mu$ M 又は 5  $\mu$ M)、又は同量の DMSO を添加して、さらに 48 時間インキュベ - トした後、細胞を溶解してウミシイタケルシフェラ - ゼの活性を測定した。なお各被験物質の濃度範囲は、タキゾイトに対して同等の効果を示すように設定されており、例えば終濃度 5  $\mu$ M のタンシノン I I A 及び 1  $\mu$ M のピリメサミンはタキゾイトに対しておよそ 90% の増殖阻害を示す。

40

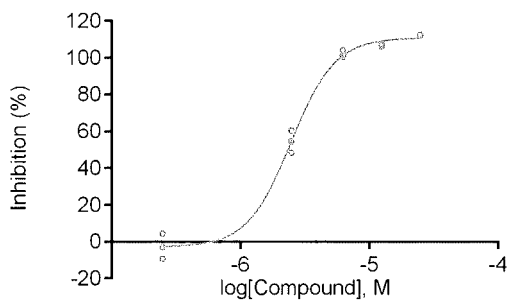
#### 【0049】

結果を図 5 に示す。ピリメサミン処理した PLK / DLUC1C9 株のルシフェラ - ゼ

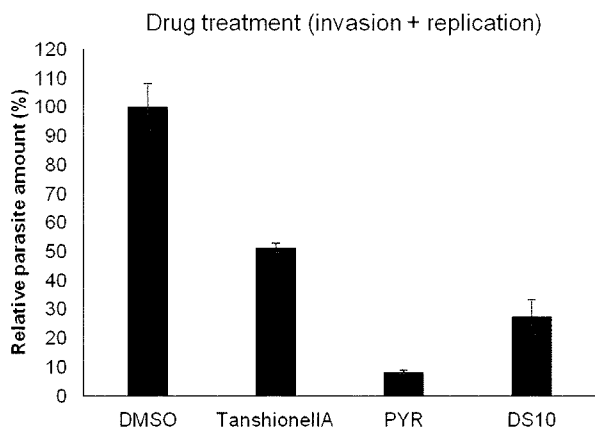
50

活性は大きく変動しなかった一方、タンシノン I I A 処理はルシフェラーゼ活性を濃度依存的に低下させた。このことから、タンシノン I I A はプラディソイトに対して殺滅効果を示すことが確認された。

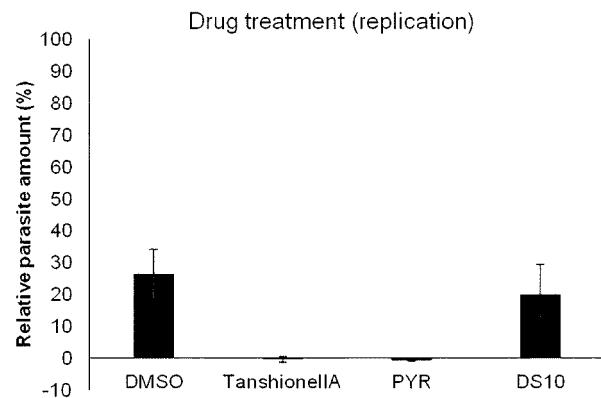
【 図 1 】



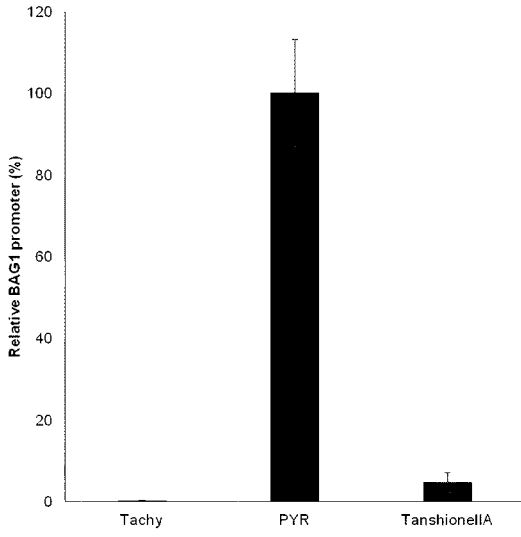
【 図 2 】



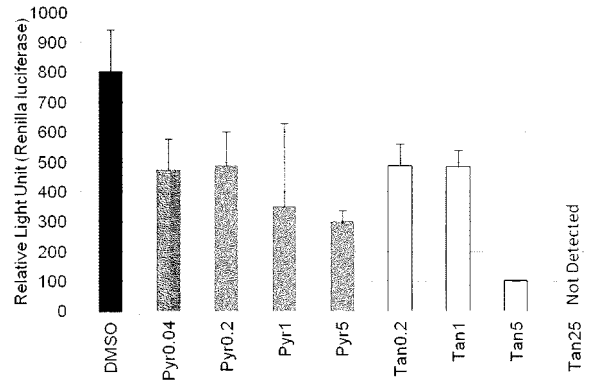
【 図 3 】



【 4 】



【 5 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 杉 達紀

北海道帯広市稲田町西2線1番地 国立大学法人帯広畜産大学内

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BA06 MA01 MA04 NA14 ZB38