

(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2018-35079

(P2018-35079A)

(43) 公開日 平成30年3月8日(2018.3.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/495 (2006.01)	A 6 1 K 31/495	4 C 0 8 6
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2016-167695 (P2016-167695)</p> <p>(22) 出願日 平成28年8月30日 (2016. 8. 30)</p>	<p>(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</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(72) 発明者 杉 達紀 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</p> <p>Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC50 MA01 MA04 NA14 ZB37</p>
--	--

(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、かつタキゾイドをプラディゾイトに誘導しない薬剤の提供。

【解決手段】 ヒドロキシジン、セチリジン、及びシクリジン等のピペラジン化合物、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、視力障害、トキソプラズマ脳炎等のトキソプラズマ症の予防及び/又は治療に有効な抗トキソプラズマ剤。

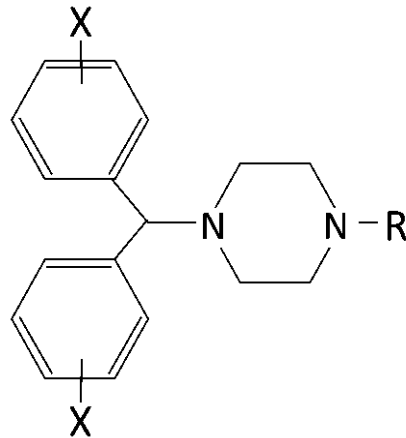
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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。

【化 1】



10

20

(I)

(式中、 X は水素原子又はハロゲン原子を示し、 R は水酸基もしくは酢酸基を有していてもよい炭素数 1 ~ 4 のアルキル基またはアルキルエーテル基、を示す)

【請求項 2】

一般式 (I) で表される化合物がヒドロキシジン、セチリジン、シクリジンおよびクロルシクリジン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。

【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。

【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、ジフェニルメチルピペラジンを基本骨格に持つ化合物を有効成分とする抗トキソプラズマ剤に関する。

【背景技術】

30

40

50

【0002】

トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) はアピコンプレックス門に属する寄生性の原虫である。食肉生産家畜やげっ歯類を中間宿主とし、猫科動物を終宿主とする。食肉中の潜伏感染状態の虫は食肉検査で検出することが非常に難しい。また、日本国で認可されている食肉生産家畜用のワクチンは存在しない。

【0003】

トキソプラズマ症は、トキソプラズマ原虫が潜伏感染した家畜を加熱調理などが不十分な状態で食べることや、終宿主である猫に感染した原虫が猫の糞便中に形成する虫卵（オーシスト）を経口摂取することで引き起こされる原虫感染症である。全世界人口の約3割が潜伏感染状態にあると推定されるが、健康な成人の場合には感染しても無徴候に留まるか、せいぜい数週間のあいだ軽い風邪のような症状が出る程度である。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。

10

【0004】

しかしながら妊婦が初めてトキソプラズマに感染すると、血液中に流入したトキソプラズマが胎盤を介して胎児に感染し、脳発育不全や失明リスクの高まることが問題となっている。また、感染した原虫は潜伏感染に至り、宿主免疫系から逃れることで終生患者に感染し続ける。そのため免疫不全状態にある臓器移植者やAIDS患者などでは、再活性化を引き起こすことでトキソプラズマ脳炎や肺炎が重篤化し、死亡原因の一つになっている。

20

【0005】

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。

【0006】

また、潜伏感染期では急性感染期と異なり、宿主細胞からの脱出および再侵入が頻繁に行われないことから、原虫の増殖を阻害し且つタキゾイトをブラディゾイトに誘導せず、しかも宿主細胞への毒性が低い、新しい薬剤が必要とされている。

30

【0007】

マラリアはマラリア原虫が引き起こす代表的な原虫症の一つであり、予防や治療が可能な病気ではあるが、近年薬剤耐性株の出現が大きな課題になっている。これらの耐性株における耐性発現のメカニズムは、A T P - 駆動性トランスポーターによる化学療法剤の細胞外への排出機構が大きく係わっていると言われている。特許文献1は薬剤耐性を解除するトランスポーター阻害剤としてジフェニルメチルピペラジン骨格を有する薬剤を開示している。これらの薬剤は抗マラリア剤として知られているクロロキンと併用することにより抗マラリア剤耐性株に対しても有効であるが、マラリアに対する単独での効果は認められていない。

【0008】

一方、ジフェニルメチルピペラジン骨格を有するヒドロキシジン、セチリジン、あるいはシクリジンはヒスタミンH1受容体と拮抗する抗ヒスタミン薬として知られている薬剤であるが、これらの薬剤に抗トキソプラズマ作用のあることは知られていない。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2006 232772号公法

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

50

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を駆除できるだけでなく、タキゾイドのブラディゾイトへの誘導を阻害し、かつ宿主細胞に対する毒性の低い薬剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、ジフェニルメチルピペラジン骨格を持つ幾つかの化合物が上記課題を解決し得ることを見出し、下記の各発明を完成させた。

【0012】

(1) 下記の式(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。

(2) 一般式(I)で表される化合物がヒドロキシジン、セチリジン、シクリジン、およびクロルシクリジン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。

(3) トキソプラズマ原虫タキゾイド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。

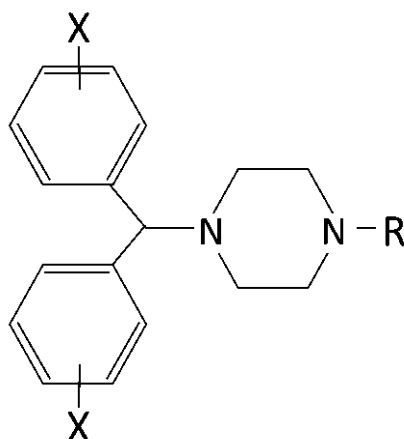
(4) トキソプラズマ原虫ブラディゾイトの駆除剤である、(1)又は(2)に記載の抗トキソプラズマ剤。

(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。

【化1】



(I)

(式中、Xは水素原子又はハロゲン原子を示し、Rは水酸基もしくは酢酸基を有していてもよい炭素数1～4のアルキル基またはアルキルエーテル基、を示す)

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、トキソプラズマ原虫のタキゾイド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排除できる。したがって本発明の抗トキソプラズマ剤は、高リスク患者(トキソプラズマ感染陽性免疫不全患者)における長期間に渡る薬剤治療が必要なくなるうえ、既存薬の問題点

である薬剤アレルギーや副作用を回避しうる。さらに視力障害、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。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】トキソプラズマ原虫のタキゾイトに対するヒドロキシジン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ヒドロキシジン、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3】宿主細胞への感染後にヒドロキシジン、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】ヒドロキシジン、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ヒドロキシジン(Hxz0.2~Hzx5)、ピリメサミン(Pyro.02~Pyr5)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】

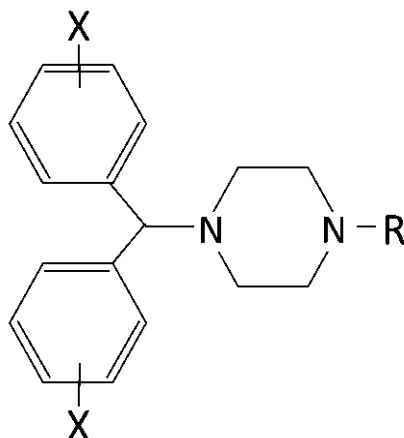
【0015】

以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。さらに、本発明に関連して使用される科学技術の用語およびフレーズは、当業者に一般に理解される意味を持つものとする。

【0016】

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】



(I)

(式中、Xは水素原子又はハロゲン原子を示し、Rは水酸基もしくは酢酸基を有していてもよい炭素数1~4のアルキル基またはアルキルエーテル基、を示す)

【0017】

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。

・ヒドロキシジン：2-[2-[4-[4-クロロフェニル(フェニル)メチル]ピペラジン-1-

10

20

30

40

50

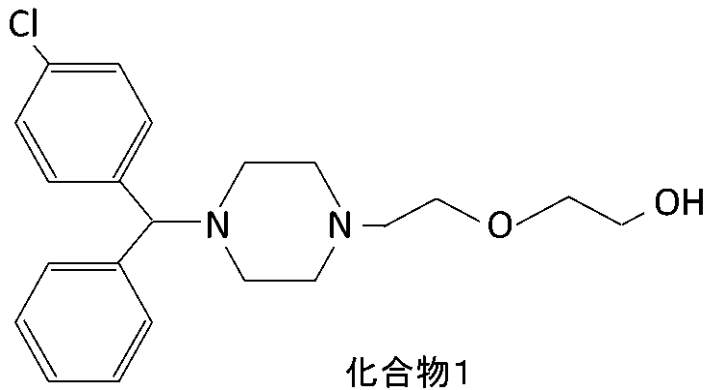
イル]エトキシ]エタノール (化合物 1)

・セチリジン : [2-[4-[(4-クロロフェニル)フェニルメチル]ピペラジン-1-イル]エトキシ]酢酸 (化合物 2)

・シクリジン : 1-ジフェニルメチル-4-メチルピペラジン (化合物 3)

・クロルシクリジン : 1-[(4-クロロフェニル)フェニルメチル]-4-メチルピペラジン (化合物 4)

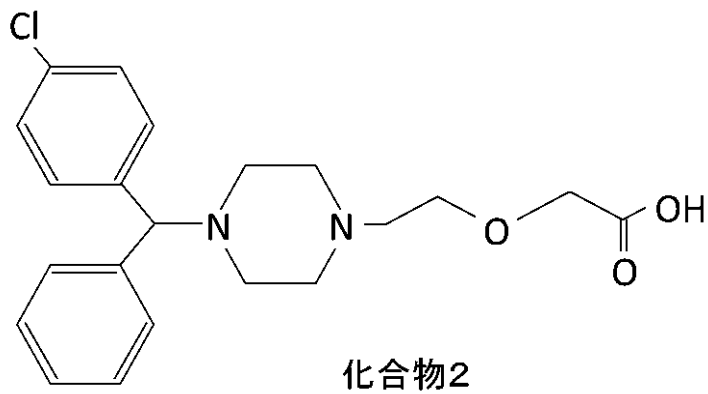
【化 3】



10

20

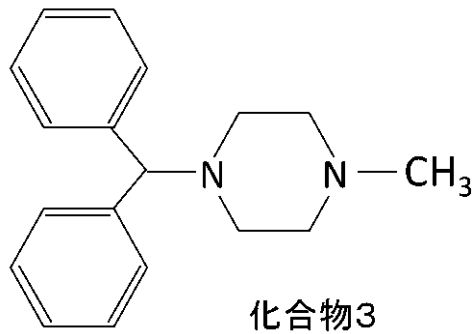
【化 4】



30

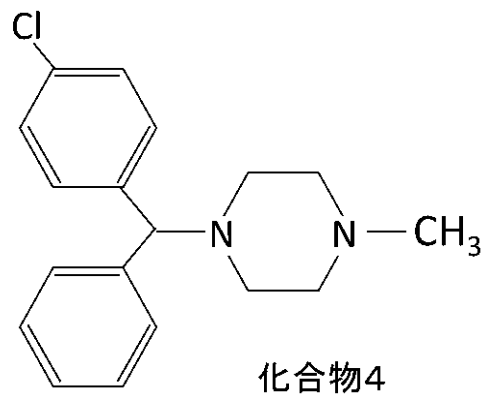
40

【化 5】



10

【化 6】



20

30

【0018】

本発明において好ましい化合物は、ヒドロキシジン（化合物1）である。

40

【0019】

式（I）で表される化合物は、一般的な有機化学的手法により合成することができる。

【0020】

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、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事ができる。

50

【0021】

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。

【0022】

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含む医薬若しくは医薬組成物として利用してもよい。

10

【0023】

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。

【0024】

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。

20

【0025】

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。

【0026】

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。

30

【0027】

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。

【0028】

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。

40

【0029】

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。

【0030】

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-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-

50

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、硬化植物油誘導體、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。

10

【0031】

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ーティング錠とすることができる。

20

【0032】

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。

【0033】

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。

【0034】

注射剤は、例えば、水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、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、チオグリコール酸及びチオ乳酸などの安定化剤；食塩、ブドウ糖、マンニトー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ースナトリウム、プロピレングリコール、安息香酸ナトリウム、安息香酸ベンジル、ウレタン、エタノールアミン、グリセリンなどの溶解補助剤；グルコン酸カルシウム、クロロブタノール、ブドウ糖、ベンジルアルコールなどの無痛化剤；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。

30

【0035】

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。

40

【0036】

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 μ g～2000 μ g、好ましくは50 μ g～1000 μ g、より好ましくは100 μ g～500 μ 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。

【0037】

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

50

ソプラズマ症を治療及び／又は予防する方法に関する。

【0038】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0039】

<実験材料>

(1)化合物

ヒドロキシジン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。

【0040】

2) 宿主細胞

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

【0041】

(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 (ATCC 50839)、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。

【0042】

<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Vero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、被験物質であるヒドロキシジン (2mM DMSO溶液を125nL、終濃度10µM) を添加したハーフエリア96ウェルプレート (Promega) 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。ヒドロキシジンに代えて同量の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、またヒドロキシジン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、ヒドロキシジン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。

【0043】

(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 (Promega) 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ヒドロキシジン (終濃度25µM又は2.5µM) を加えて、37°CのCO₂ 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。ヒドロキシジンに代えて同量の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、またヒドロキシジン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のヒドロキシジンによって107%、2.5µMのヒドロキシジンによって100% 阻害されることが確認された。

10

20

30

40

50

【0044】

さらに、ヒドロキシジン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株に対するヒドロキシジンのIC₅₀を求めたところ、1.0 μMであることが確認された。

【0045】

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25 μM又は2.5 μMのヒドロキシジンの存在下で48時間培養したときの宿主細胞の生存率をCell-Tracker Glo kit (Promega)を用いて測定した。宿主細胞生存率は、それぞれ100% (終濃度25 μM)及び102% (終濃度2.5 μM)であり、トキソプラズマ原虫へのヒドロキシジンの選択性指標 (宿主細胞生存50%阻害濃度 (>25 μM) / 原虫増殖50%阻害濃度)は25以上であることが確認された。

10

【0046】

<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価

50 μLの培地中で、500個のRH/2F株タキゾイトを、被験物質であるヒドロキシジン (終濃度2.5 μM)、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 μM)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CO₂インキュベーター内で48時間培養後、 α -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/2F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。

20

【0047】

宿主細胞感染前にDMSOで処理したRH/2F株の α -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/2F株の α -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。ヒドロキシジン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、ヒドロキシジンは宿主細胞内の原虫の増殖を阻害すること

30

【0048】

<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 × 10⁴個のPLK/DLUC1C9株を接種して24時間インキュベ-トした後、被験物質としてヒドロキシジン (終濃度1.0 μM)、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 μM)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 μL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ーゼ活性及び構成的TUBA1プロモ-タ-の制御下にあるウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し、ホタルルシフェラーゼ活性/ウミシイタケルシフェラーゼ活性をBAG1プロモ-ター活性として算出した。

40

【0049】

ピリメサミンで処理したPLK/DLUC1C9株のBAG1プロモ-ター活性を100%としたときのDMSO又はヒドロキシジンで処理したPLK/DLUC1C9株のBAG1プロモ-ター活性を図4に表す。ヒドロキシジンは、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。

【0050】

50

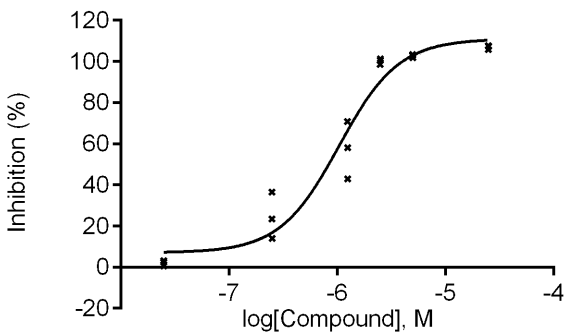
< 実施例 4 > プラディゾイトに対する殺滅効果

実施例 3 と同様にして P L K / D L U C _ 1 C 9 株を感染させた H F F 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 および C O 2 非存在下で 8 日間培養し、プ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ヒドロキシジン（終濃度 0 . 2 μ M、1 μ M、5 μ M 又は 2 5 μ M）、ピリメサミン（終濃度 0 . 0 4 μ M、0 . 2 μ M、1 μ M 又は 5 μ M）、又は同量の D M S O を添加して、さらに 4 8 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 μ M のヒドロキシジン及び 1 μ M のピリメサミンはタキゾイトに対しておよそ 9 0 % の増殖阻害を示す。

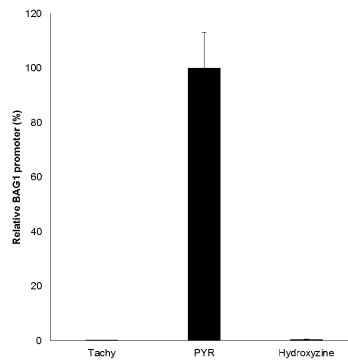
【 0 0 5 1 】

結果を図 5 に示す。ピリメサミン処理した P L K / D L U C 1 C 9 株のルシフェラーゼ活性は大きく変動しなかった一方、ヒドロキシジン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、ヒドロキシジンはプラディゾイトに対して殺滅効果を示すことが確認された。

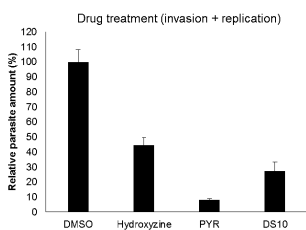
【 図 1 】



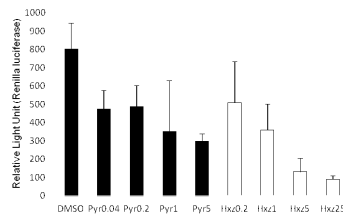
【 図 4 】



【 図 2 】



【 図 5 】



【 図 3 】

