

(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2018-177663

(P2018-177663A)

(43) 公開日 平成30年11月15日(2018.11.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	4 C 0 8 6
A 6 1 K 33/38 (2006.01)	A 6 1 K 33/38	
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	
A 6 1 P 33/10 (2006.01)	A 6 1 P 33/02 1 7 1	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-76436 (P2017-76436)
 (22) 出願日 平成29年4月7日(2017.4.7)

(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
 (74) 代理人 110002480
 特許業務法人IPアシスト特許事務所
 (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 アデエミ オルヨミ
 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
 Fターム(参考) 4C076 AA95 CC34 CC41 DD60 EE59
 4C086 AA01 AA02 BC14 HA01 MA01
 MA02 MA04 NA05 ZB38 ZB39
 ZC75

(54) 【発明の名称】 抗トキソプラズマ剤及びこれを含む医薬

(57) 【要約】

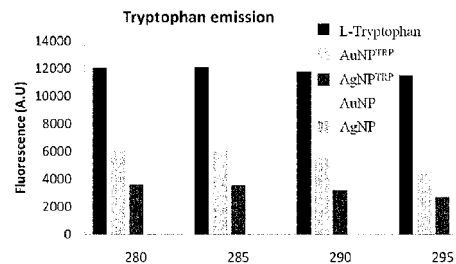
【課題】

本発明は、抗トキソプラズマ剤として利用可能な物質を提供することを目的とする。

【解決手段】

本発明は、トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートを有効成分とする抗トキソプラズマ剤に関する。本発明によれば、より優れた抗トキソプラズマ活性及び選択性を有し、宿主に対する安全性が高い抗トキソプラズマ剤を提供することができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートを有効成分とする抗トキソプラズマ剤。

【請求項 2】

金属ナノ粒子が金ナノ粒子又は銀ナノ粒子である、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予防及び / 又は治療のための医薬。

【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。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートを有効成分とする抗トキソプラズマ剤及びこれを含む医薬に関する。

【背景技術】

【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こと、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こと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。

【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

30

40

50

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。

【0005】

一方、金属ナノ粒子は、比表面積が極めて大きく、バルク金属とは異なる物性を有することから、エレクトロニクス分野における利用に加え、医療分野における利用も検討されている。例えば、金ナノ粒子又は銀ナノ粒子が、抗微生物活性（非特許文献1）、抗リーシュマニア活性（非特許文献2）、選択的酵素阻害活性（非特許文献3）などを示すことが知られている。また、金属ナノ粒子、特に銀ナノ粒子が抗トキソプラズマ剤として利用可能であることも報告されている（非特許文献4）。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Mubarak Ali D. et al., Colloids Surf B Biointerfaces. 2011, 85(2): 360-365

【非特許文献2】Allahverdiyev AM. et al., Int J Nanomedicine. 2011, 6: 2705-2714

【非特許文献3】Adeyemi OS. et al., Int J Biol Macromol. 2013, 62: 450-456

【非特許文献4】Adeyemi OS. et al., Int J Nanomedicine. 2017, 12: 1647-1661

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、抗トキソプラズマ剤として利用可能な物質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】

【0008】

本発明者らは、アミノ酸の一種であるトリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートが、金属ナノ粒子よりも高い抗トキソプラズマ活性及び選択性を有していることを見出し、以下の発明を完成させた。

【0009】

30

(1) トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートを有効成分とする抗トキソプラズマ剤。

(2) 金属ナノ粒子が金ナノ粒子又は銀ナノ粒子である、(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。

(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予防及び/又は治療のための医薬。

40

(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】

【0010】

本発明によれば、金属ナノ粒子と比較して、より優れた抗トキソプラズマ活性及び選択性を有し、宿主に対して安全性が高い抗トキソプラズマ剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

50

【図1】トリプトファン、トリプトファンと金ナノ粒子とのコンジュゲート ($AuNP^{TRP}$)、トリプトファンと銀ナノ粒子とのコンジュゲート ($AgNP^{TRP}$)、金ナノ粒子 ($AuNP$) 及び銀ナノ粒子 ($AgNP$) の波長 280、285、290 及び 295 nm における蛍光を示すグラフである。

【図2】 $AuNP^{TRP}$ 、 $AgNP^{TRP}$ 及びトリプトファンの FTIR スペクトルである。

【図3】トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートによるトキソプラズマ原虫の宿主細胞侵入阻害を示すグラフである。縦軸は、被験物質を加えないコントロールにおける原虫生存率を 100% としたときの、 $AuNP^{TRP}$ 又は $AgNP^{TRP}$ 添加時の原虫生存率である。

【図4】トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートによるトキソプラズマ原虫の宿主細胞内増殖阻害を示すグラフである。縦軸は、被験物質を加えないコントロールにおける原虫生存率を 100% としたときの、 $AuNP^{TRP}$ 又は $AgNP^{TRP}$ 添加時の原虫生存率である。

【図5】トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートによるトキソプラズマ原虫の宿主細胞内分裂阻止を示すグラフである。縦軸は、カウントした全寄生体胞数に対する所定数の虫体を含む寄生体胞数の割合である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の第1の態様は、トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートを有効成分とする抗トキソプラズマ剤に関する。

【0013】

本発明にいう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。本発明の第一の態様にかかる抗トキソプラズマ剤は、トキソプラズマ原虫タキゾイトの増殖抑制及び/又はトキソプラズマ原虫ブラディゾイトの駆除のために、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用いることができる。

【0014】

本発明における金属ナノ粒子は、金属、好ましくは金又は銀よりなる、平均粒子径がナノメートルレベルの金属粒子である。金属ナノ粒子の平均粒子径は 1 ~ 100 nm、好ましくは 1 ~ 50 nm である。以下、本発明において、金ナノ粒子を $AuNP$ 、銀ナノ粒子を $AgNP$ と表記する。なお、本発明における金属ナノ粒子には、一般的に微量の不純物として認識される程度の量の他の元素を含むものも包含される。

【0015】

本発明におけるトリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートとは、トリプトファンと金属ナノ粒子との結合体であって、金属ナノ粒子表面のほぼ全体にわたってトリプトファン分子が結合しているものをいう。結合は、水素結合、ファンデルワールス結合いずれであってもよい。かかるコンジュゲートは、トリプトファンが表面に付着した金属ナノ粒子、トリプトファンで被覆された金属ナノ粒子、又はトリプトファンで表面修飾された金属ナノ粒子などと表すこともできる。本発明におけるトリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートの好ましい形態は、トリプトファンで表面が被覆された金属ナノ粒子である。

【0016】

なお、本発明におけるトリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートには、金属ナノ粒子よりも高い抗トキソプラズマ活性を有するとの観点において、抗トキソプラズマ活性が実質的に変化しない微量のトリプトファン分子が金属ナノ粒子に結合したものや、ナノ粒子が有する特徴を失うような、例えばマイクロメートルレベルの厚さのトリプトファン被膜を有するものなどは包含されない。

【0017】

10

20

30

40

50

アミノ酸と金属ナノ粒子とのコンジュゲートの製造方法は、例えばDubeyら(Amino Acids, 2015, 47(12): 2551-60)、又はZareら(Journal of Experimental Nanoscience, 2013, 9(9): 957-965)によって報告されており、トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートもかかる方法に準じて製造することができる。具体的には、金属塩を還元して金属ナノ粒子を調製する際に、金属塩1モルに対して5~15モルのトリプトファンを共存させることで、本発明の第1の態様にかかるトリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートを製造することができる。

【0018】

後の実施例に示すように、本発明の第1の態様にかかるトリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートは、金属ナノ粒子と比較して高い抗トキソプラズマ活性、すなわちトキソプラズマ原虫の宿主細胞への侵入を抑制する活性及び/又は宿主細胞内での増殖を抑制する活性を有する。また本発明の第1の態様にかかるトリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートは、金属ナノ粒子と比較して、宿主細胞に対する毒性(IC₅₀)と抗トキソプラズマ活性(EC₅₀)との比で表される選択指数(Selective Index, SI、IC₅₀/EC₅₀)が高く、トキソプラズマに対して高い選択性を有する。

10

【0019】

本発明の第1の態様にかかる抗トキソプラズマ剤は、トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートを含む液体製剤、特に懸濁液製剤の形態にあることが好ましい。このような製剤は、トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートの懸濁状態を損なわない限り、希釈剤、乳化剤、分散安定化剤、保存剤、pH調節剤などの液体製剤化用の添加物を含む組成物であってもよい。

20

【0020】

本発明の第1の態様にかかる抗トキソプラズマ剤は、トキソプラズマ原虫に対して直接的に、又はトキソプラズマ原虫が感染した細胞に対して用いることができる。感染細胞に対して用いる場合、抗トキソプラズマ剤の濃度は、当該細胞に対する毒性を発揮しない程度に設定することが好ましい。

【0021】

本発明の第2の態様は、第1の態様にかかる抗トキソプラズマ剤を含む、トキソプラズマ症の予防及び/又は治療のための医薬に関する。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。

30

【0022】

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。

【0023】

本発明の第2の態様にかかる医薬はタキゾイトに対する増殖抑制効果を有することから、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。また、本発明の第2の態様にかかる医薬は、宿主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と期待される。したがって、本発明の第2の態様にかかる医薬は、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。

40

【0024】

本発明の第2の態様にかかる医薬は、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

50

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。

【0025】

本発明の第2の態様にかかる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、エアゾール剤などを挙げることができる。

【0026】

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2リン酸カルシウム、部分アルファ化デンプン、コー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、ポリビニルエーテル、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

20

【0027】

さらに錠剤は、必要に応じ、通常剤皮を施した錠剤、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。

30

【0028】

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。

【0029】

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。

【0030】

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。

40

【0031】

本発明の第2の態様にかかる医薬の好ましい例は、トリプトファンと金属ナノ粒子との

50

コンジュゲートを適当な溶媒、特に生理食塩水等のヒトを含む治療対象に投与可能な薬学的に許容される溶媒に懸濁した懸濁液製剤である。トリプトファンと金属ナノ粒子とのコンジュゲートの懸濁量は、溶媒 1 mL あたり 1 ~ 1000 μ g、好ましくは 1 ~ 100 μ g、より好ましくは 1 ~ 10 μ g とすればよい。

【0032】

本発明の第2の態様にかかる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、本発明の第2の態様にかかる医薬は、経口投与、静脈内投与又は腹腔内投与により生体に投与される。

10

【0033】

本発明の第2の態様にかかる医薬の投与量は、投与された対象において予防及び/又は治療効果を奏する量、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、ヒトにあつては患者の年齢、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 1 kg 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。

【0034】

本発明の第3の態様は、第2の態様にかかる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予防及び/又は治療する方法に関する。投与方法、投与形態及び投与量は、いずれも本発明の第2の態様にかかる医薬において説明したとおりである。

20

【0035】

以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【実施例】

【0036】

実験材料

・試薬

硝酸銀 (AgNO_3)、塩化銀酸 (HAuCl_4)、L-トリプトファン、L-チロシン、L-フェニルアラニン、L-アルギニンは、いずれも Sigma-Aldrich から購入した。

30

【0037】

・細胞

ヒト包皮線維芽細胞 (HFF細胞) は ATCC から入手し、GlutaMAX (登録商標) - I (Gibco)、10% (v/v) ウシ胎児血清 (Gibco)、100 U/ml ペニシリン及びストレプトマイシンを添加した DMEM を用いて、37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 雰囲気下でコンフルエントまで培養して使用した。

【0038】

・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) を使用した。RH-2F 株は、HFF細胞の単層培養中で継代培養を行うことで維持した。RH-2F 株が感染した HFF細胞を 27ゲージニードルに通して細胞を溶解した後、溶解液を 5 μ m のフィルターに通すことで、細胞残渣を含まないトキソプラズマ原虫タキゾイトの懸濁液を調製した。新たな培地で洗浄した後、原虫濃度を血球計を用いて測定した。また、懸濁液中のトキソプラズマ原虫タキゾイト数は、RH-2F 株が発現する - ガラクトシダーゼ (Gal) 活性を、Beta-Glo kit (Promega) を製造業者のプロトコルに従って用いて測定することにより決定した。

40

【0039】

データ解析

50

データは一元配置分散分析を用いて解析し (Graph Pad Software Inc.)、平均値 ± 標準誤差で表した。群間比較は一元配置分散分析及びその後の Dunnett 検定により決定した。p < 0.05 を有意差とした。

【0040】

実施例 1. アミノ酸と金属ナノ粒子とのコンジュゲートの調製

アミノ酸と金属ナノ粒子とのコンジュゲートは、既報の方法 (Zare D. et al., Journal of Experimental Nanoscience. 2013, 9(9): 957-965; Dubey K. et al., Amino Acids. 2015, 47(12): 2551-60) を少し改変して調製した。簡潔には、25 mM の L-トリプトファン、L-チロシン、L-フェニルアラニン又は L-アルギニンの溶液を、等量の 5 mM HAuCl₄ 又は AgNO₃ の溶液に温度 50~60 で攪拌しながら加えた。色の変化が安定するまで攪拌を続け、濃赤色のアミノ酸-金ナノ粒子コンジュゲート (AuNP^{TRP}、AuNP^{TYR}、AuNP^{PHI}、AuNP^{ARG})、又は淡黄色のアミノ酸-銀ナノ粒子コンジュゲート (AgNP^{TRP}、AgNP^{TYR}、AgNP^{ARG}) を得た。対照の金ナノ粒子 (AuNP) 及び銀ナノ粒子 (AgNP) は、アミノ酸溶液を加えずに上記反応を行うことにより調製した。

【0041】

5,000 × g で 15 分間の遠心分離及び孔径 0.45 μm のフィルターでのろ過により上記ナノ粒子を精製した後、UV/可視光吸光分析 (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific)、蛍光分光分析 (Microplate HT7700; Corona Electric)、誘導結合プラズマ原子発光分析 (島津製作所)、走査型電子顕微鏡観察 (JSM-7800F; 日本電子)、フーリエ変換型赤外線分光分析 (FTIR; 日立製作所) 及び透過型電子顕微鏡観察 (日立製作所) による分析を行った。いずれの分析結果も既報のアミノ酸-金属ナノ粒子コンジュゲート (Zare D. et al., Journal of Experimental Nanoscience. 2013, 9(9): 957-965; Dubey K. et al., Amino Acids. 2015, 47(12): 2551-60; Si S. et al., Chem Eur J. 2007, 13: 3160-3168; Rativa D. et al., J Fluoresc. 2008, 18(6): 1151-1155) と一致していた。以上から、アミノ酸-金属ナノ粒子コンジュゲートが成功裏に調製されたことが確認された。

【0042】

一例として AuNP^{TRP} 及び AgNP^{TRP} の分析結果を図 1 及び図 2 に示す。AuNP^{TRP} 及び AgNP^{TRP} では、波長 280~295 nm においてトリプトファン由来の蛍光が検出され (図 1)、また赤外吸収スペクトルによってもトリプトファンの存在が確認された (図 2)。また、透過型電子顕微鏡観察により、AuNP^{TRP} は直径 35~45 nm 程度、AgNP^{TRP} は直径 2~10 nm の球形であることが確認された。

【0043】

実施例 2. トリプトファン-金属ナノ粒子コンジュゲートの抗トキソプラズマ活性及び宿主細胞毒性の評価

(1) トキソプラズマ原虫の増殖阻害アッセイ

Adeyemiら (Adeyemi OS. et al., Int J Nanomedicine. 2017, 12: 1647-1661) の記載に従って行った。簡潔には、96 ウェルオプティカルボトムプレート (Nunc; Fisher Scientific) 中でコンフルエントになるまで培養した HFF 細胞の単層培養にタキゾイトの懸濁液を加え、1 時間、感染させた。培地を除去して洗浄した後、新たな培地に懸濁した AuNP、AgNP、各アミノ酸-金ナノ粒子コンジュゲート、各アミノ酸-銀ナノ粒子コンジュゲート又は対照薬剤 (スルファジアジン、ピリメタミン) をそれぞれ終濃度 0.01~1000 μg/ml になるように加えて 48 時間インキュベートした。被験物質の代わりに培地を加えた細胞のウェルをコントロールとし、培地のみのウェルをバックグラウ

10

20

30

40

50

ンドシグナルの補正のために用いた。インキュベート後、 β -gal 活性を測定することにより原虫の生存率を決定した。横軸に被験物質濃度を、縦軸に原虫生存率をプロットし、Prism 5 (Graphpad) を用いて、非線形回帰分析により曲線に当てはめることで EC_{50} を算出した。

【0044】

(2) 宿主細胞に対する細胞毒性アッセイ

コンフルエントになるまで培養したHFF細胞をトリプシン処理して回収し、96ウェルプレート(Nunc; Fisher Scientific)に 1×10^5 個/ウェルとなるように播種して37℃、5%CO₂雰囲気下で72時間インキュベートした。AuNP、AgNP、各アミノ酸-金ナノ粒子コンジュゲート、各アミノ酸-銀ナノ粒子コンジュゲート又は対照薬剤(スルファジアジン、ピリメタミン)をそれぞれ終濃度0.01~1000μg/mlになるように加えて、さらに72時間インキュベートした後、CellTiter-Aqueous One Solution proliferation assay kit (Promega)を用い、製造業者のプロトコルに従って、各ウェルの生存細胞数(490nm吸光度)を測定した。被験物質の代わりに培地を加えた細胞のウェルをコントロールとし、培地みのウェルをバックグラウンドシグナルの補正のために用いた。横軸に被験物質濃度を、縦軸に細胞生存率をプロットし、Prism 5 (Graphpad)を用いて、非線形回帰分析により曲線に当てはめることで IC_{50} を算出した。

【0045】

(3) 結果

結果を表1に示す。AuNP及びAgNPの EC_{50} はトリプトファンとのコンジュゲーションにより約1/20~1/30の値になり、トキソプラズマ原虫増殖阻害効果の増強が認められた。また、選択性の指標である IC_{50}/EC_{50} もトリプトファンとのコンジュゲーションにより大きい値となった。このような傾向は、他のアミノ酸とのコンジュゲーションでは認められなかった。

【表1】

処理群	EC_{50} (トキソプラズマ) μg/ml	IC_{50} (宿主細胞:HFF) μg/ml	IC_{50}/EC_{50}
AuNP	≤3	≥115	≥38
AgNP	≤0.96	≥29	≥30
AuNP ^{TRP}	≤0.1372	≥19	≥130
AuNP ^{TYR}	≤8.726	<1	≤1
AuNP ^{PHE}	≤0.211	<1	≤5
AuNP ^{ARG}	≤5	<1	≤1
AgNP ^{TRP}	≤0.03	≥6.211	≥200
AgNP ^{TYR}	≤0.1	<0.1	≤1
AgNP ^{ARG}	≤0.0001	<0.1	≥20
Sulfadiazine (抗トキソプラズマ薬)	≤100	<500	≤5
Pyrimethamine (抗トキソプラズマ薬)	≤1	≥10	≤20

【0046】

以上から、AuNP^{TRP}及びAgNP^{TRP}は、アミノ酸とコンジュゲートしていない金属ナノ粒子、トリプトファン以外のアミノ酸とコンジュゲートした金属ナノ粒子、及び既存の抗トキソプラズマ薬のいずれと比較しても、強力なトキソプラズマ原虫に対する増殖阻害効果を有すると同時に高い選択性を有することが示された。

【0047】

実施例3．トリプトファン-金属ナノ粒子コンジュゲートによるトキソプラズマ原虫の宿主細胞侵入阻害及び増殖阻害の評価

(1) 宿主細胞侵入アッセイ

侵入アッセイはAdeyemiら (Adeyemi OS, et al., Int J Nanomedicine. 2017, 12: 1647-1661) の記載に従って行った。簡潔には、カバーガラス上で増殖させたHFF細胞の単層培養に、トキソプラズマ原虫 (1×10^5 個) を、AuNP^{TRP} (終濃度 1000 ng/ml) を含む培地、AgNP^{TRP} (終濃度 600 ng/ml) を含む培地又はコントロールの培地と共に接種し、37 °C で1時間インキュベートして原虫を感染させた。氷冷PBSで細胞を3回洗浄した後、2% FCSを含有するPBS (2% FCS-PBS) 中で、ウサギ抗トキソプラズマ・ゴンディRH株ポリクローナル抗体 [1:1000] (Bio-Rad Laboratories) を使用して氷冷下で30分間、細胞外の原虫を染色した。2% FCS-PBS 中で細胞を3回洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド加PBS 中で固定し、氷冷メタノールで20分間透過処理を行った。細胞を2% FCS-PBS で3回洗浄した後、2% FCS-PBS 中でマウス抗SAG1モノクローナル抗体 [1:1000] (Hytest) を使用してさらに染色した。2次染色は、ALEXA 488ヤギ抗マウス抗体及びALEXA 594ヤギ抗ウサギ抗体を含有する抗体溶液 [1:1000] により、並びに核染色用のDAPIにより、2% FCS-PBS 中で行った。細胞を蛍光顕微鏡 (Nikon Eclipse E400) で可視化した。顕微鏡の視野をランダムに選び、細胞外の原虫をウサギ抗トキソプラズマ抗体を用いて、全原虫をマウス抗SAG1抗体で検出した。

10

20

【0048】

(2) 宿主細胞内増殖アッセイ

宿主細胞内増殖アッセイはAdeyemiら (Adeyemi OS, et al., Int J Nanomedicine. 2017, 12: 1647-1661) の記載に従って行った。簡潔には、カバーガラス上で増殖させたHFF細胞の単層培養にトキソプラズマ原虫 (1×10^5 個) を接種し、37 °C で1時間インキュベートして原虫を感染させた。温めた培地で細胞を3回洗浄して侵入していない原虫を除去した後、AuNP^{TRP} (終濃度 1000 ng/ml) 若しくはAgNP^{TRP} (終濃度 600 ng/ml) を含む培地、又は培地のみ (コントロール) を加えて24時間インキュベートした。細胞を4% パラホルムアルデヒド加PBS 中、室温で30分間固定し、室温で20分間氷冷メタノールでの透過処理を行い、PBS で3回洗浄した。細胞を2% BSA加ブロッキングバッファー (0.1% Tween 20-PBS) 中、室温で1時間ブロッキングした。1次抗体のマウス抗SAG1モノクローナル抗体 [1:1000] (Hytest) を加え、37 °C で30分間インキュベートした。細胞をブロッキングバッファーで3回洗浄した (各洗浄の間は5分間)。ブロッキングバッファー中にALEXA 546 ヤギ抗マウス抗体及び核染色用のDAPIを含有する2次抗体溶液を加え、37 °C で30分間インキュベートした。カバーガラスをPBS で3回洗浄し、蛍光顕微鏡 (Nikon Eclipse E400) 下、ランダムに選んだ視野内に存在する寄生体胞の数をカウントし、その中に含まれる虫体の数を算出した。

30

40

【0049】

(3) 結果

上記2つのアッセイにおいて細胞内で検出された原虫数の相対値をそれぞれ図3及び図4に示す。AuNP^{TRP} 及びAgNP^{TRP} はいずれも、トキソプラズマ原虫の宿主細胞

50

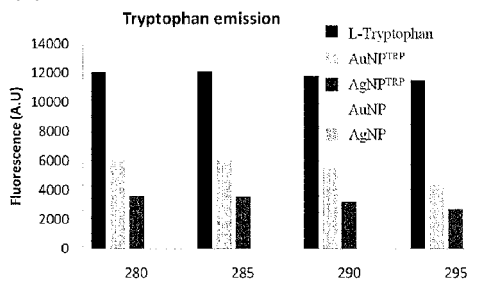
胞への侵入阻害、及び細胞内増殖阻害を有しており、特に AgNP^{TRP} は AuNP^{TRP} よりも低濃度でありながら強い阻害効果を発揮した。

【0050】

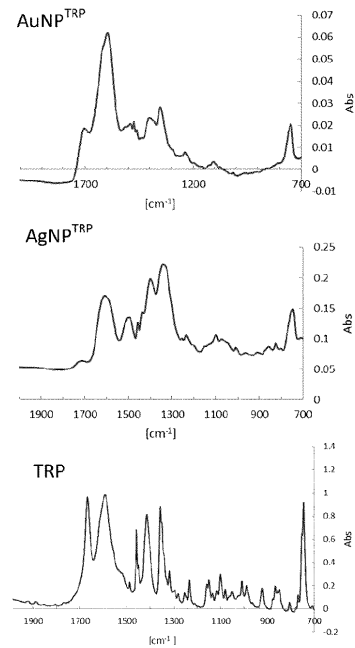
カウントした全寄生体胞数に対する所定数の虫体を含む寄生体胞数の割合を図5に示す。コントロールでは16個のタキゾイトを含む寄生体胞の割合が最も多かったのに対し、 AuNP^{TRP} では4個の、 AgNP^{TRP} では1個のタキゾイトを含む寄生体胞の割合が最も多かった。このことから、 AuNP^{TRP} 及び AgNP^{TRP} はいずれもトキソプラズマ原虫の宿主細胞内での分裂を阻止すること、特に AgNP^{TRP} は AuNP^{TRP} よりも低濃度でありながら強い分裂阻止効果を発揮することが示された。

10

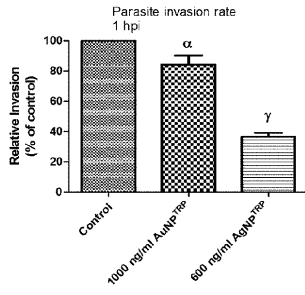
【図1】



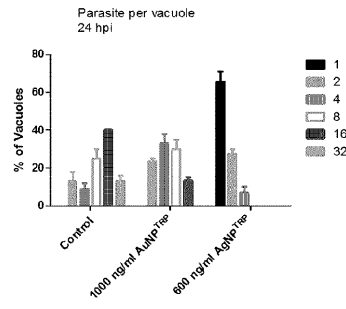
【図2】



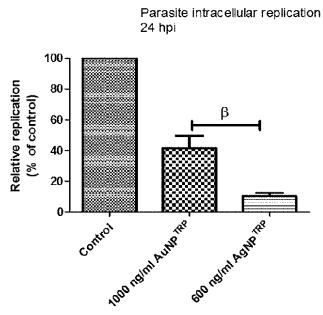
【 3 】



【 5 】



【 4 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 K	31/405	(2006.01)	A 6 1 P	33/10		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/405		
			A 6 1 P	43/00	1 2 1	