

(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2019-38749

(P2019-38749A)

(43) 公開日 平成31年3月14日(2019.3.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/473 (2006.01)	A 6 1 K 31/473	4 C 0 8 6
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 11 頁)

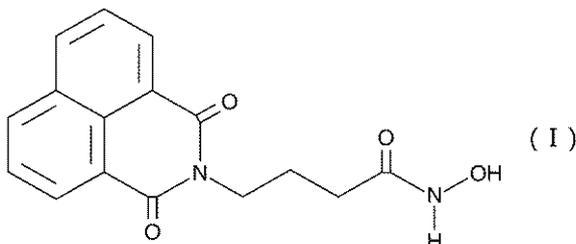
(21) 出願番号	特願2017-159087 (P2017-159087)	(71) 出願人	504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地
(22) 出願日	平成29年8月22日 (2017.8.22)	(72) 発明者	加藤 健太郎 北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立 大学法人帯広畜産大学内
		(72) 発明者	村越 ふみ 京都市上京区河原町通広小路梶井町465 京都府立大学法人京都府立医科大学内
		Fターム(参考)	4C086 AA01 AA02 BC27 MA01 MA04 NA14 ZB38

(54) 【発明の名称】 抗原虫作用を持つヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

(57) 【要約】 (修正有)

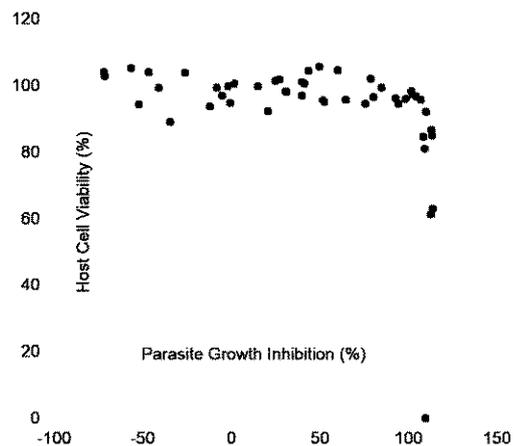
【課題】 アピコンプレクサ属原虫に対して作用する一方で宿主細胞への毒性が低い薬剤の提供。

【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アピコンプレクサ属原虫感染症の治療及び/又は予防のための薬剤。



【効果】 前記抗アピコンプレクサ属原虫剤はトキソプラズマ症、マラリア症、クリプトスポリジウム症の予防及び/又は治療に利用することができる。

【選択図】 図1

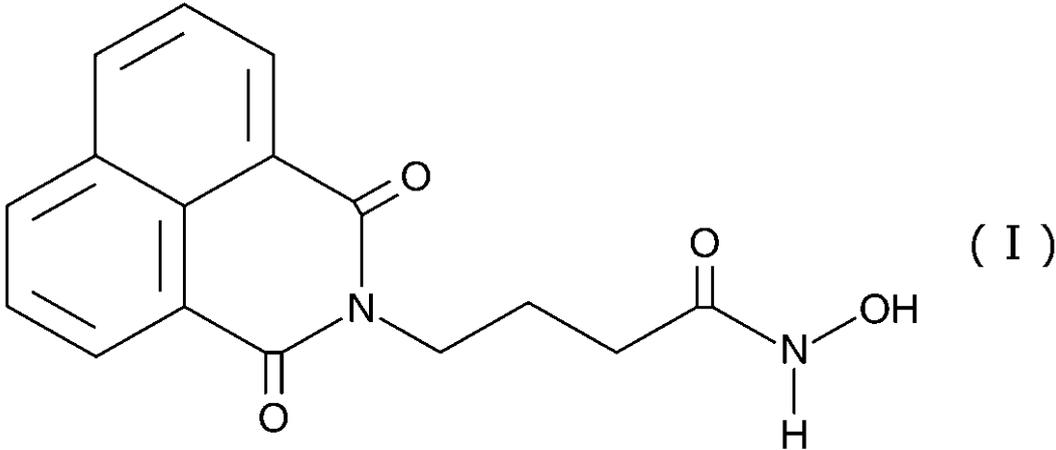


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式 (I) で表される化合物ヌルスクリプト、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アピコンプレクサ属原虫感染症の治療及び/又は予防のための薬剤。

【化 1】



【請求項 2】

アピコンプレクサ属原虫がクリプトスポリジウムである、請求項 1 記載の治療及び/又は予防のための薬剤。

20

【請求項 3】

アピコンプレクサ属原虫がマラリアである、請求項 1 に記載の治療及び/又は予防のための薬剤。

【請求項 4】

アピコンプレクサ属原虫がトキソプラズマ原虫である、請求項 1 に記載の治療及び/又は予防のための薬剤

【請求項 5】

請求項 2 に記載の抗クリプトスポリジウム剤を含む、クリプトスポリジウム症の治療及び/又は予防のための医薬。

30

【請求項 6】

請求項 3 に記載の抗マラリア剤を含む、マラリア症の治療及び/又は予防のための医薬。

【請求項 7】

請求項 4 に記載の抗トキソプラズマ剤を含む、トキソプラズマ原虫症の治療及び/又は予防のための医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるスクリプタイトのアナログ化合物として公知のヌルスクリプトを有効成分とする抗原虫剤に関する。

40

【背景技術】

【0002】

アピコンプレクサに属する、マラリア原虫、トキソプラズマ、クリプトスポリジウムは、世界に甚大な被害をもたらしている原虫である。

【0003】

世界三大感染症の一つである熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) では、従来から使用されてきた薬剤クロロキンに対する耐性株の出現が問題となっている。近年では東南アジアにおいて第一選択薬であるアルテミシニン耐性株の出現

50

が確認され、これらが流行地域に出現・拡散するとマラリアコントロールに大きく影響すると考えられ、新規の薬剤が求められている。

【0004】

トキソプラズマ症は、トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) が潜伏感染した家畜の肉を加熱調理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の経口摂取で引き起こされる原虫感染症である。全世界人口の約3割が潜伏感染状態と推定されているが、健常人の場合、その症状は軽微である。しかしながら免疫抑制状態にある患者では重症化して死に至る場合もあり、妊娠中に初めて感染した場合には胎児の脳発育不全や失明リスクが問題となる。

【0005】

クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) は、重篤な下痢症を引き起こす人獣共通の寄生原虫である。糞便から排出される大量のオーシストは塩素耐性を持つため、しばしば大規模な集団感染を引き起こす。しかし、日本国内で認可された薬剤は存在しない。また、米国で認可され抗原虫薬として使用されているサリチルアニリド誘導体であるニタゾキサニドは免疫不全マウスを用いたクリプトスポリジウム感染動物試験でニタゾキサニド100mg/kgの投与は効果がない(非特許文献1)。免疫不全患者へのニタゾキサニドの投与効果も立証されていないことから免疫不全の患者では致死性的となる。また、本原虫症に感染した仔牛は生産性の低下、斃死を引き起こす。以上のことから、本原虫症は畜産・公衆衛生上重大な問題となっている。

【0006】

アピコンプレクサ原虫は、複雑な生活環を持つため、そのステージ変換において、DNAの変化を伴わない遺伝子やヒストンの修飾が重要な働きをすることが知られている。従って、原虫のエピジェネティクスに着目した薬剤、例えばヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害剤が注目されているが、宿主にも毒性を示してしまうものが多いといわれている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Theodos C. et al., Antimicrob Agents Chemother. 1998, 42(8): 1959-1965

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、抗原虫剤として利用可能な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】

【0009】

本発明者らは、実験の結果、HDAC阻害剤、スクリプタイトの関連化合物であるヌルスクリプト(化1)が宿主への毒性が低く、かつ原虫に対する薬効を有していることを見出した。なおヌルスクリプトはスクリプタイトの不活性型アナログであり、スクリプタイトのネガティブコントロールとして用いられており、宿主のHDACを阻害しない。

【0010】

(1)式(I)で表される化合物ヌルスクリプト、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アピコンプレクサ属原虫感染症の治療及び/又は予防のための薬剤。

(2)アピコンプレクサ属原虫がクリプトスポリジウムである、(1)記載の治療及び/又は予防のための薬剤。

(3)アピコンプレクサ属原虫がマラリアである、(1)に記載の治療及び/又は予防のための薬剤。

(4)アピコンプレクサ属原虫がトキソプラズマ原虫である、(1)に記載の治療及び/又は予防のための薬剤

10

20

30

40

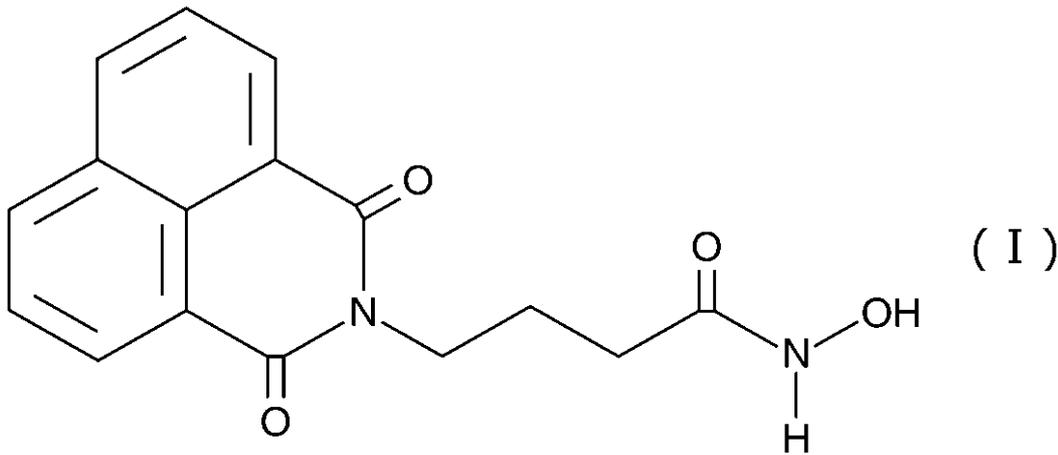
50

(5)(2)に記載の抗クリプトスポリジウム剤を含む、クリプトスポリジウム症の治療及び/又は予防のための医薬。

(6)(3)に記載の抗マラリア剤を含む、マラリア症の治療及び/又は予防のための医薬。

(7)(4)に記載の抗トキソプラズマ剤を含む、トキソプラズマ原虫症の治療及び/又は予防のための医薬。

【化1】



【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、宿主に対して安全性が高い抗クリプトスポリジウム剤、抗トキソプラズマ剤、抗マラリア剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】Epigenetics Library 43化合物の抗トキソプラズマ活性と宿主細胞への毒性評価を示す。

【図2】ヌルスクリプト存在、非存在下でのトキソプラズマの宿主細胞への侵入率を示す。

【図3】ヌルスクリプト存在、非存在下でのトキソプラズマ感染24時間後の宿主細胞内の原虫分裂数を示す。

【図4】ヌルスクリプト存在、非存在下でのトキソプラズマ感染24時間後、1つのトキソプラズマの虫体内での娘虫体の分裂個数を示す。

【図5】5週齢の免疫不全(SCID)マウスに、クリプトスポリジウムを経口投与により感染させた上で、ヌルスクリプトを経口投与し、糞便中に排泄されるクリプトスポリジウムのオーシストの個数を測定した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

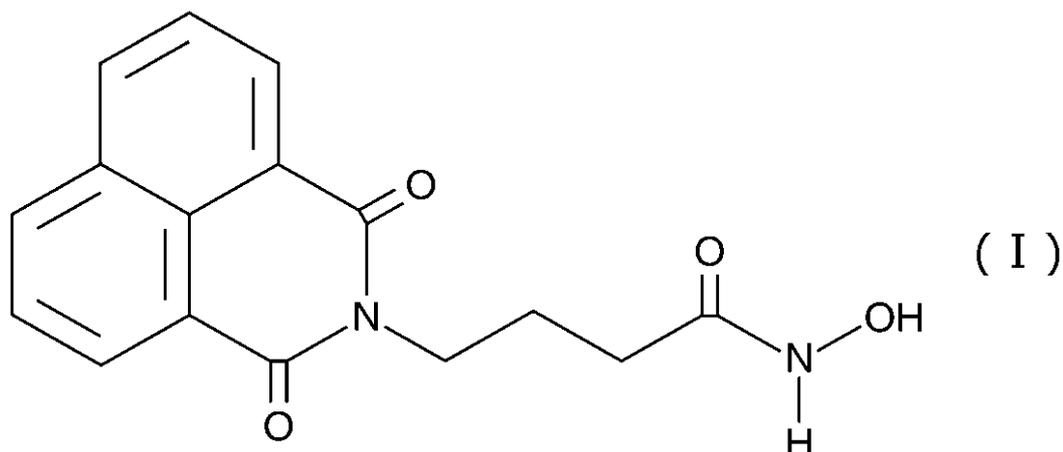
【0013】

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。

【0014】

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クリプトスポリジウム剤、抗マラリア剤、抗トキソプラズマ剤に関する。

【化 2】



【 0 0 1 5 】

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。

【 0 0 1 6 】

「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ー、ジアステレオマー（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。

20

【 0 0 1 7 】

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' - ジベンジル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。

【 0 0 1 8 】

本発明との関連で抗クリプトスポリジウム剤、抗マラリア剤、抗トキソプラズマ剤とは、クリプトスポリジウム、マラリア原虫、トキソプラズマの増殖抑制及び殺滅、宿主細胞への感染阻害、宿主組織からの各原虫の駆除など、各原虫の数及び/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。

30

【 0 0 1 9 】

式 (I) で表される化合物は、そのまま抗クリプトスポリジウム剤、抗マラリア剤、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クリプトスポリジウム剤、抗マラリア剤、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。

40

【 0 0 2 0 】

本発明の第二の態様は、第一の態様の抗クリプトスポリジウム剤、抗マラリア剤、抗トキソプラズマ剤を含む、クリプトスポリジウム症、マラリア症、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。

【 0 0 2 1 】

本発明との関連でクリプトスポリジウム症とは、クリプトスポリジウムの感染、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

50

ことで使用される。

【0022】

本発明との関連でマラリア症とは、マラリア原虫の感染、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癒、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】

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癒、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。

【0024】

本発明の医薬は、クリプトスポリジウム、マラリア原虫、トキソプラズマ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。

【0025】

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。

【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。

【0027】

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。

【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

10

20

30

40

50

、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

10

【0031】

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、本発明の抗クリプトスポリジウム剤、抗マラリア剤、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。

【0032】

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。

20

【0033】

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、クリプトスポリジウム症、マラリア症、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。

【0034】

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。

30

【実施例】

【0035】

<実験材料>

(1)化合物

Epigenetics Library（ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤43化合物）は金沢大学がん進展制御研究所から、ニタゾキサニド（Nitazoxanide）は東京化成工業株式会社から、それぞれ提供、購入しDMSOに溶解して以下の実験に使用した。

【0036】

40

(2)宿主細胞

ヒト包皮線維芽細胞（HFF細胞）及びヒト大腸がん由来細胞（HCT-8）はATCCから、それぞれ入手して使用した。HFF細胞及びHCT-8細胞は10%FBSを含むDMEMおよびRPMI1640培地中で維持した。

【0037】

(3)トキソプラズマ

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RH/2F株（ATCC50839）を抗トキソプラズマ活性スクリーニング、IC₅₀確認、宿主細胞への侵入および分裂阻害確認に用い、Sugira（Anal. Biochem., 2014, 464, 9-11）に記載の方法に従って維持し、タキゾイ

50

トを調製した。

【0038】

(4) マラリア原虫

熱帯熱マラリア原虫3D7株を増殖効果抑制試験等に用いた。

【0039】

(5) クリプトスポリジウム

クリプトスポリジウムHNJ-1株を増殖効果抑制試験、及びマウスを用いた投与実験に用いた。

【0040】

<実施例1> 抗原虫活性のスクリーニング評価

10

(1) 抗トキソプラズマ活性の評価

HFF細胞を96wellプレートにコンフルエントになるよう播種する。培地を吸引除去し、2.5 μ Mの終濃度となるように被験物質およびDMSOを溶かした培地を入れる。その後、1 \times 10³の3乗個のタキゾイトを接種し、48時間、37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーターで培養した。培養後、Beta-Glo Assay System (Promega)を用いて溶媒対照であるDMSO群と比較した際の β -ガラクトシダーゼ活性の減少をルミノメーターを用いて測定した。

【0041】

(2) 抗クリプトスポリジウム活性の評価

HCT-8細胞を96wellプレートにコンフルエントになるよう播種する。細胞の培地を吸引除去し、10 μ Mの終濃度となるように被験物質およびDMSOを溶かした培地を入れる。その後、1 \times 10⁴の4乗個のクリプトスポリジウムのスポロゾイトを接種し、48時間、37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーターで培養した。培養後、sporo-glo (クリプトスポリジウムに対するポリクローナル抗体)を用いて、細胞中の原虫数をカウントした。

20

【0042】

(3) 宿主細胞に対する毒性の評価

HFF細胞またはHCT-8細胞を96wellプレートにコンフルエントになるよう播種する。細胞の培地を吸引除去し、<100 μ Mの範囲の濃度の被験物質およびDMSOを溶かした培地を入れて48時間、37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーターで培養した。その後、Cell Titer-Glo Kit (Promega)を用いて、内在性のATPを定量し、生存する細胞数を測定した。

30

【0043】

抗原虫活性の評価した結果、43化合物のうちスクリプタイドのアナログであるヌルスクリプトが原虫増殖を抑制し、かつ宿主細胞への毒性が低いことを確認した。

【0044】

<実施例2> ヌルスクリプトの各原虫に対するIC₅₀の測定

(1) トキソプラズマに対するIC₅₀の測定

HFF細胞を96wellプレートにコンフルエントになるよう播種する。細胞の培地を吸引除去し、希釈系列を作成したヌルスクリプトおよびDMSOを溶かした培地を入れる。その後、1 \times 10³の3乗個のタキゾイトを接種し、48時間、37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーターで培養した。培養後、Beta-Glo Assay System (Promega)を用いて溶媒対照であるDMSO群と比較した際の β -ガラクトシダーゼ活性の減少をルミノメーターを用いて測定し、IC₅₀の測定を行った。

40

【0045】

(2) マラリア原虫に対するIC₅₀の測定

マラリア原虫を感染させた赤血球をを薬剤と共に96時間培養し、溶媒対照であるDMSO群と比較した際の原虫数の減少を、ギムザ染色を用いた計数によって測定した。

【0046】

(3) クリプトスポリジウムに対するIC₅₀の測定

50

HCT-8細胞を8wellチャンパープレートにコンフルエントになるよう播種する。細胞の培地を吸引除去し、1~10 μ Mの濃度で薬剤およびDMSOを溶かした培地を入れる。その後、1 \times 10⁵の5乗個のクリプトスポリジウムのスポロゾイトを接種し、48時間、37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーターで培養した。培養後、sporoglo(クリプトスポリジウムに対するポリクローナル抗体)を用いて、細胞中の原虫数をカウントした。

【0047】

ヌルスクリプトの原虫および宿主に対する50%阻害濃度を表1にまとめた。ヌルスクリプトは3種の原虫に抗原虫活性を持っていたが、特にトキソプラズマ、クリプトスポリジウムの増殖を低濃度で抑えた。クリプトスポリジウムに対しては、現在用いられているニタゾキサニドと比べて、宿主細胞に対する毒性が低いことが確認された。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるスクリプタイドは、宿主に対する毒性が強すぎるため、原虫の50%阻害濃度を求めることができなかった。

10

【表1】

薬剤	原虫種	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)(宿主細胞)
Nullscript	<i>Plasmodium</i>	31	-
	<i>Toxoplasma</i>	1.1	> 50 (HFF)
	<i>Cryptosporidium</i>	7	> 100(HCT-8)
Nitazoxianide	<i>Cryptosporidium</i>	4	8 (HCT-8)
Scriptaid	<i>Cryptosporidium</i>	-	4.1 (HCT-8)

【0048】

<実施例3>ヌルスクリプトのトキソプラズマ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

30

(1) 侵入抑制効果

HFF細胞をglass coverslipにコンフルエントになるよう培養する。その後、トキソプラズマをMOI5となるようヌルスクリプト(2 μ M)またはDMSO(対照群)に懸濁して宿主細胞に接種し、同時に1時間培養後、IMC7抗体を用いたカウントによって原虫の相対的な侵入率を測定し、侵入阻害の効果を確認した。

【0049】

(2) 宿主細胞内増殖抑制効果

HFF細胞をglass coverslipにコンフルエントになるよう培養する。ヌルスクリプト2 μ M存在下、非存在下(DMSO)で、トキソプラズマをMOI5となるよう感染させ、感染24時間後の1つの虫体内での娘虫体の分裂個数(parasite number / PV)を測定した。

40

【0050】

その結果、ヌルスクリプト2 μ Mの存在下では非存在下と比較して、トキソプラズマの宿主細胞への侵入率の低下が確認された(図2)。また感染24時間後の原虫の分裂数は著しく低下しており、(図3)、1つのトキソプラズマの虫体内での娘虫体の分裂個数は低下していた(図4)。従って、ヌルスクリプトはトキソプラズマの侵入阻止に効果を示すだけでなく、主に宿主細胞内の原虫の分裂阻止にも働くことが明らかとなった。

【0051】

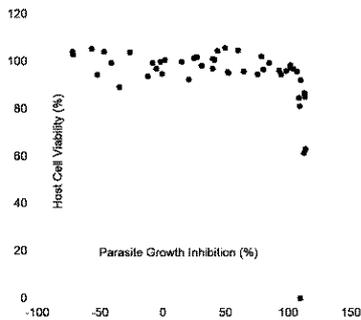
<実施例4>SCIDマウスを用いた投与試験

5週齢の免疫不全(SCID)マウス(雌)に、クリプトスポリジウムを1 \times 10⁵の5

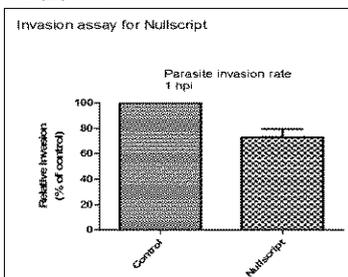
50

乗個および、ヌルスクリプト 10 mg / kg 経口投与した。比較対照としてクリプトスポリジウムを 1×10^5 の乗個および DMSO を経口投与した。マウスは各群 6 匹、計 12 匹を実験に用いた。原虫投与後は、ヌルスクリプトを 10 mg / kg / 日、比較対象群においては DMSO を経口投与した。原虫接種後 9 日目まで毎日糞便回収を行い、ショ糖浮遊法を用いてオーシスト排出数の測定を行った。その結果、ヌルスクリプト投与区は、比較対照である DMSO 投与区と比較し、オーシストの排出が一日遅延し、オーシストの排出量が有意に減少した (図 5)。

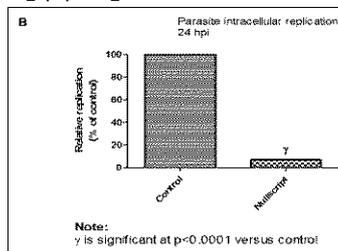
【図 1】



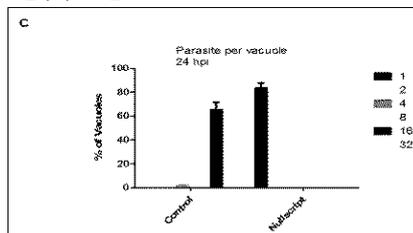
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【 図 5 】

