

(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2019-77633

(P2019-77633A)

(43) 公開日 令和1年5月23日(2019.5.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/122 (2006.01)	A 6 1 K 31/122	4 C 0 8 6
A 6 1 P 33/02 (2006.01)	A 6 1 P 33/02	4 C 2 0 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 31/196 (2006.01)	A 6 1 K 31/196	
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2017-205211 (P2017-205211)	(71) 出願人	504300088 国立大学法人帯広畜産大学
(22) 出願日	平成29年10月24日 (2017.10.24)	(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)	4C086 AA01 AA02 EA11 MA03 MA04 NA14 ZB38 ZC75 4C206 AA01 AA02 CB29 DA17 MA03 MA04 NA14 ZB38 ZC75

(54) 【発明の名称】 抗トキソプラズマ原虫剤

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、トキソプラズマ原虫の宿主細胞への侵入と宿主細胞内で増殖を阻害する一方で、宿主細胞への毒性が低い薬剤を提供することを目的とするものである。

【解決手段】 本発明は、トラニラスト、エモジン、マリチメイン、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ものである。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。

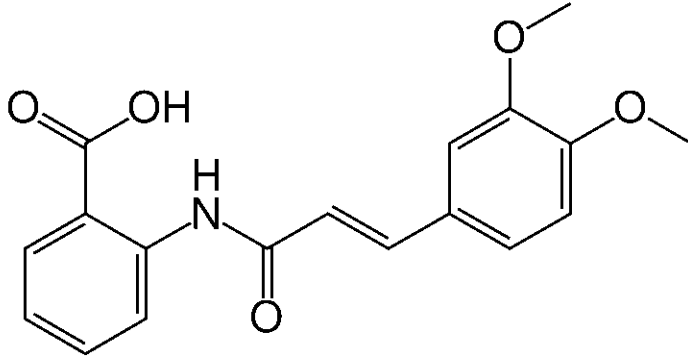
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

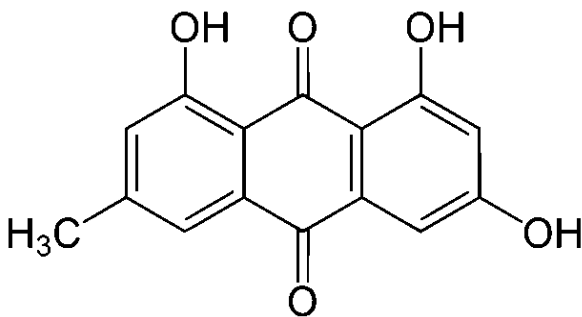
式(I)～(III)で表される、トラニラスト(化1)、エモジン(化2)、マリチメイン(化3)、その異性体、薬学的に許容されるそれらの塩又はこれらの混合物を有効成分とする抗トキソプラズマ剤。

【化1】



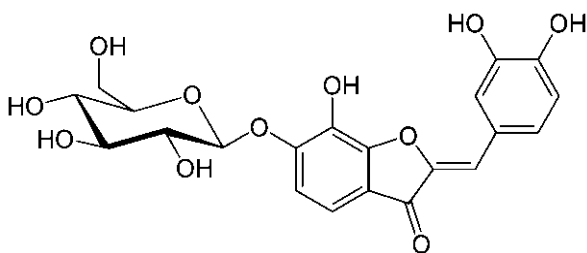
(I)

【化2】



(II)

【化3】



(III)

【請求項 2】

トキソプラズマ原虫の急性感染虫体の増殖阻止剤である、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の宿主細胞内での潜伏感染への誘導阻害剤である、請求項1に記載の抗トキソプラズマ剤。

【請求項 4】

請求項1から請求項3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。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は抗トキソプラズマ原虫活性を有する化合物に関する。

【背景技術】

【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。ヒト、家畜を含む全ての恒温動物は中間宿主となり、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虫卵（オーシスト）を経口摂取すること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割が感染状態にあると推定されている。

【0004】

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。

【0005】

現在用いられている抗トキソプラズマ薬としては、第一選択薬であるピリメサミン、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が知られている。しかしながら、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（非特許文献1～3）。

【0006】

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、新しい薬剤の開発が望まれている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Louis M. Weiss et al., *Toxoplasma gondii: The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods*, 2nd Edition, Academic Press

【非特許文献2】矢野明彦、他、「日本におけるトキソプラズマ症」九州大学出版会

【非特許文献3】厚生労働科学研究費補助金・医療技術実用化総合研究事業 熱帯病治療薬研究班「寄生虫症薬物治療の手引き 改訂第9.0版」

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、トキソプラズマ原虫の急性感染虫体（タキゾイト）の増殖および潜伏感染への誘導を阻害し、かつ宿主細胞に対する毒性の低い抗トキソプラズマ剤を提供することを目的とするものである。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、国立大学法人金沢大学のがん進展制御研究所が所有するFDA認可薬ライブラリー（640種）と天然物ライブラリー（503種）からトキソプラズマ原虫の急性感染虫体の増殖阻害と潜伏感染への移行を阻害する物質を見出したことにより、下記の各発明を完成させた。

【0010】

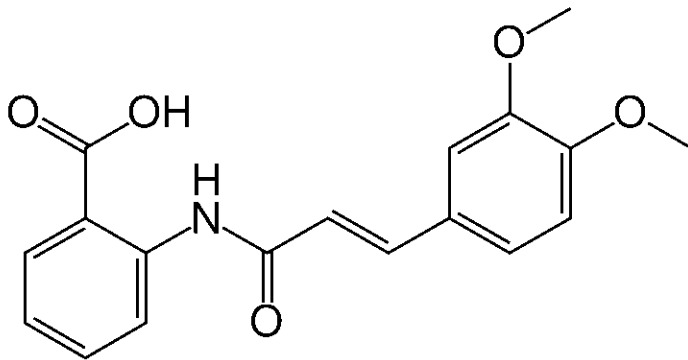
(1) トラニラスト（式I）、エモジン（式II）、マリチメイン（式III）、その異性体、薬学的に許容されるそれらの塩又はこれらの混合物を有効成分とする抗トキソプラズマ剤。

(2) トキソプラズマ原虫の急性感染虫体の増殖阻止剤である、(1)に記載の抗トキソプラズマ剤。

(3) トキソプラズマ原虫の宿主細胞内での潜伏感染への誘導阻害剤である、(1)に記載の抗トキソプラズマ剤。

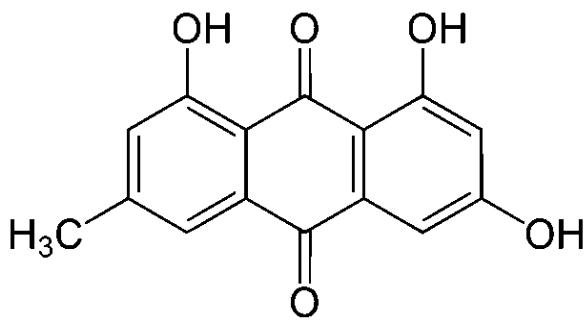
(4) (1)から(3)のいずれかに記載の抗トキソプラズマ剤を含む、トキソプラズマ症の治療及び/又は予防のための医薬。

【化1】



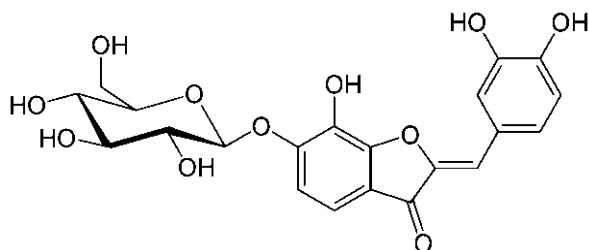
(I)

【化2】



(II)

【化 3】



(Ⅲ)

【0011】

なおトラニラスト(化1)はナンテン配糖体の研究から開発されたアレルギー性疾患や肥厚性瘢痕に有効としてFDAで承認された治療薬である。エモジン(化2)はダイオウやエビスグサに含まれるアントラキノン系の色素である。マルチメイン(化3)は脂質過酸化の抑制に優れた効果を示し、動脈効果、虚血性疾患、糖尿病、白内障などの疾患の予防及び/又は治療剤として、医薬あるいは食品添加剤として有用である。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、トキソプラズマ原虫の宿主細胞内での増殖および潜伏感染への移行が阻害できる。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/又は治療に利用できる。

20

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】FDA認可薬640種類の急性感染虫体の増殖阻止についてのスクリーニング結果。

【図2】天然物503種類の急性感染虫体の増殖阻止についてのスクリーニング結果。

【図3】選択した18種類のFDA認可薬の宿主細胞に対する毒性評価のスクリーニング結果。

【図4】選択した53種類の天然物の宿主細胞に対する毒性評価のスクリーニング結果。

【図5】ヒット化合物を用いたトキソプラズマ原虫の潜伏感染移行試験。

30

【発明を実施するための形態】

【0014】

A. 急性感染虫体の増殖阻害効果を示す薬剤のスクリーニング

バクテリア型 ガラクトシダーゼを発現したトキソプラズマ原虫株であるRH_2F株(ATCC:50839)を感染させたヒト初代繊維芽細胞であるHFF細胞を用い、ガラクトシダーゼ活性を指標としてライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、FDA認可薬640種類のうち、原虫数を反映するガラクトシダーゼ活性を70%以上低下させたものは18種類であった(図1)。また、天然物503種類の中で同様に70%以上低下させたものは53種類であった(図2)。

【0015】

B. 宿主細胞に対する毒性の評価

ヒト初代繊維芽細胞であるHFF細胞に対する同濃度での生存率で毒性を評価した。80%以上の宿主細胞生存率を示したものは、上記FDA認可薬18種類のうち8種類(図3)、上記天然物53種類のうち24種類であった(図4)

【0016】

C. ヒット化合物に対するトキソプラズマと宿主細胞の感受性の評価

既存の第一選択薬であるピリメサミンを対照薬とし、ヒット化合物の存在下でトキソプラズマRH-2Fのタキゾイドに対するEC₅₀を測定した。また、ヒット化合物と対照薬ピリメサミンの存在下で宿主細胞(HFF)に対するIC₅₀を測定した。さらに、感受性の指標として、両者の比IC₅₀/EC₅₀を求めた。FDA認可薬を表1に、天然

40

50

物由来化合物を表 2 に示す。

【表 1】

化合物	EC ₅₀ (トキソプラズマ) μg/ml	IC ₅₀ (宿主細胞- HFF) μg/ml	EC ₅₀ /IC ₅₀
★Tranilast	≤0.3	ND	ND
Nedaplatin	≤1	ND	ND
Ricobendazole	≤1.5	ND	ND
Fenbufen	≤1.4	≥22	≥15
Flurbiprofen	≤1	≥50	≥40
Nabumetone	≤3	ND	ND
Terazosin	≤0.5	ND	ND
Pyrimethamine	≤5	≥40	≤8

★：本願化合物、ND：not determined

【表 2】

化合物	EC ₅₀ (トキソプラズマ) μg/ml	IC ₅₀ (宿主細胞- HFF) μg/ml	EC ₅₀ /IC ₅₀
Daidzein	≤0.6	ND	ND
Genistein	≤1.9	≥41	≥20
Kavain	≤0.6	≥30	≥50
Apigenin	≤0.75	ND	ND
Chrysin	≤0.70	ND	ND
★Emodin	≤0.04	≥32.25	≥800
Luteolin	≤2.0	ND	ND
7-Hydroxyflavone	≤1.4	ND	ND
Isosakuranetin	≤0.2	≥46	≥230
Luteolin-3,7-diglucoside	≤2.5	ND	ND
★Maritimein	≤0.03	≥9	≥300
5-Methoxyflavone	≤0.6	ND	ND
Pratol	≤0.6	ND	ND
Acacetine	≤0.2	ND	ND
Biochanin A	≤2	≥80	≥40
Methysticin	≤0.2	ND	ND
Diosmetine	≤1	ND	ND
Formononetin	≤1.6	≥46	<30
Rutaecarpine	≤0.2	ND	ND
Yangonin	≤2	≥91	≥45
Flavanomarein	≤6	ND	ND
Verruculogen	≤8	ND	ND
Pyrimethamine	≤5	≥40	≤8

★：本願化合物、ND：not determined

【0017】

その結果、原虫への選択的感受性が高く、急性感染虫体の増殖を阻止し、潜伏感染を誘

導しにくい抗トキソプラズマ剤として、トラニラスト(化1)、エモジン(化2)、マリチメイン(化3)を選択した。

【0018】

D. 潜伏感染移行の阻害効果

トキソプラズマ原虫であるPLK/DLUC_1C9株が感染した宿主細胞を、ヒット化合物もしくは、対照薬であるピリメサミンで処理し、潜伏感染誘導効果を潜伏感染期特異的プロモーターの制御下で発現するホタルルシフェラーゼの活性として測定した。

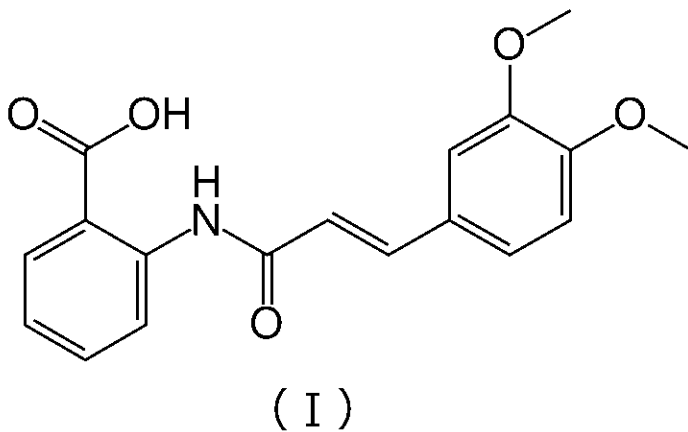
薬剤で原虫の増殖が阻害された際に原虫が潜伏感染に回避してしまうかどうかを評価したところ、潜伏感染への誘導が知られている既存薬ピリメサミンと比較して、FDA認可薬ライブラリーおよび天然物ライブラリーから選択した化合物は潜伏感染を全く誘導せず、原虫の潜伏感染への回避を伴わないことが明らかになった(図5)。

10

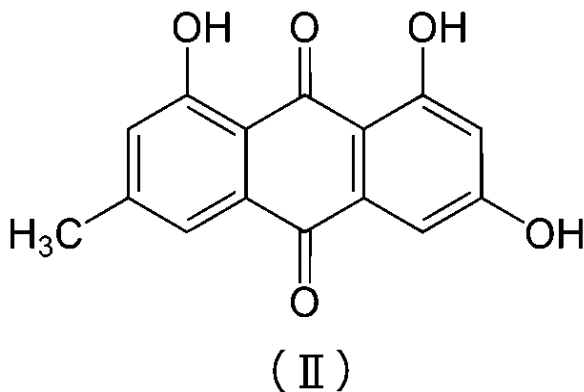
【0019】

本発明の第一の態様は、下記式(I)~(III)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。

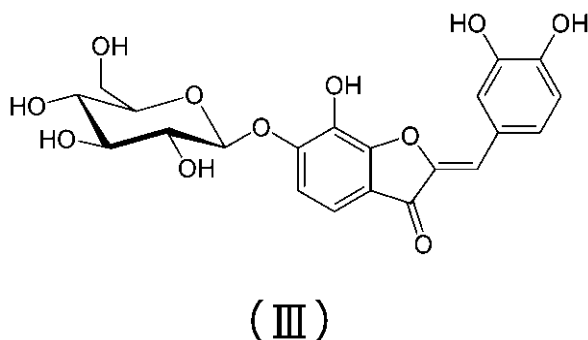
【化1】



【化2】



【化3】



【0020】

「異性体」は、式(I)～(III)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。

【0021】

式(I)～(III)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。

10

【0022】

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。

【0023】

式(I)～(III)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。

20

【0024】

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。

【0025】

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

【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。

40

【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

50

ンブ、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-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-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

【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。

20

【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、エチルアルコール、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ースナトリウム、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

【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10µg~2000µg、好ましくは50µg~1000µg、より好ましくは100µg~500µg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。

40

【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】

50

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

ピリメサミン (pyrimethamine) は和光純薬工業株式会社から購入し、DMSOに溶解して以下の実験に使用した。スクリーニングに用いたFDA認可薬ライブラリー (640種) と天然物ライブラリー (503種) は国立大学法人金沢大学のがん進展制御研究所より提供されたものである。

【0038】

(2)宿主細胞

ヒト包皮線維芽細胞 (HFF細胞) はATCCから入手して使用した。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 - ガラクトシダー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プロモータの制御下にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を及び潜伏感染期特異的なBAG1プロモータの制御下にホタルルシフェラー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。

【0040】

<実施例1> 急性感染虫体の増殖阻害効果を示す薬剤のスクリーニング

バクテリア型 ガラクトシダーゼを発現する原虫株であるRH_2F株 (ATCC: 50839) をヒト初代繊維芽細胞であるHFF細胞に感染させ、5 µg/mlのFDA認可薬あるいは天然物の存在下で72時間培養し、溶媒対照であるDMSO、陽性対照である200 µg/ml ピリメサミンと比較した際の ガラクトシダーゼ活性の減少を、薬剤による原虫増殖阻害効果として測定した。

【0041】

スクリーニングしたFDA認可薬のうち ガラクトシダーゼ活性を70%以上低下させたものは18種類であった。また、天然物503種類の中で同様に70%以上低下させたものは53種類であった。化合物を活性順に並べたものをそれぞれ図1および図2に示す。

【0042】

<実施例2> 宿主細胞に対する毒性の評価

実施例1で70%以上の原虫に増殖阻害効果のあった薬剤について、トキソプラズマ原虫に感染していないHFF細胞を実施例1と同じ濃度で同様に72時間培養したときの宿主細胞の生存率をCell Titer - Aqueous One Solution proliferation assay kit (Promega) を用いて測定した。

【0043】

これらのうち、同濃度で宿主細胞に対して80%以上の宿主細胞生存率を示したものは、FDA認可薬8種類 (図3)、天然物24種類であった (図4)。

【0044】

<実施例3> ヒット化合物に対するトキソプラズマと宿主細胞の感受性の評価

実施例2で選択した化合物と対照薬ピリメサミンの存在下 (4段階希釈) でトキソプラズマRH-2F株のタキゾイドに対するEC₅₀を測定した。また、ヒット化合物と対照薬ピリメサミンの存在下で宿主細胞 (HFF細胞) に対するIC₅₀を測定した。培養条件は実施例1と同様である。さらに、感受性の指標として、両者の比IC₅₀/EC₅₀

10

20

30

40

50

を求めた。FDA認可剤の結果を表1に、天然物の結果を表2に示す。

【0045】

最終的にトランラスト(化1)、エモジン(化2)、マリチメイン(化3)は原虫への選択的感受性が高く、急性感染虫体の増殖を阻止し、潜伏感染を誘導しにくい抗トキソプラズマ薬のシーズとして選択した。

【0046】

<実施例4> 潜伏感染移行の阻害効果

HFF細胞を96ウェルプレートで培養し、各ウェルに 1.0×10^4 個のPLK/DLUC1C9株を接種して24時間インキュベ-トした後、被験物質としてヒット化合物、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 μ 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 μ 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-ター活性として算出した。

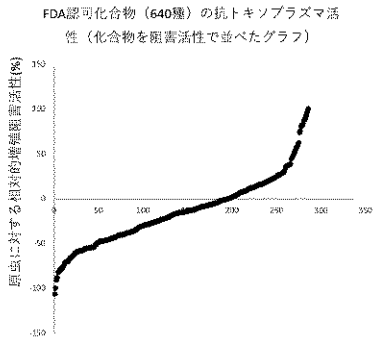
【0047】

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又はトランラスト、エモジン、マリチメインを含む抗トキソプラズマ薬のシーズで処理したPLK/DLUC1C9株のBAG1プロモ-ター活性を図5に表す。薬剤で原虫の増殖が阻害された際に原虫が潜伏感染に回避してしまうかどうかを評価したところ、潜伏感染への誘導が知られているピリメサミンと比較して、FDA認可薬ライブラリーおよび天然物ライブラリーからのヒット化合物は潜伏感染を誘導せず、原虫の潜伏感染への回避を伴わないことが明らかになった。

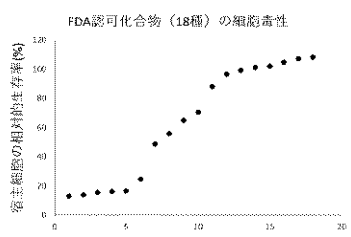
10

20

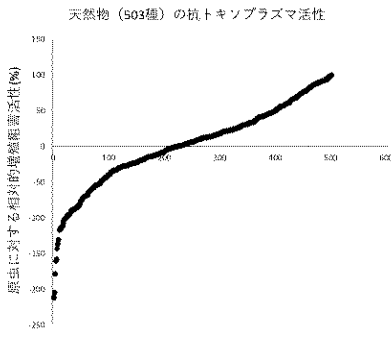
【図1】



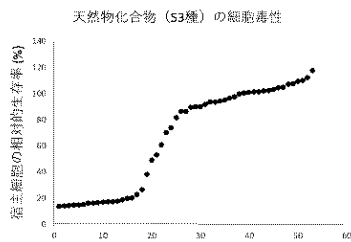
【図3】



【図2】



【図4】



【 図 5 】

