

(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2019-108307

(P2019-108307A)

(43) 公開日 **令和1年7月4日(2019.7.4)**

(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	
A 6 1 P 33/12 (2006.01)	A 6 1 P 33/02 1 7 1	
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/02 1 7 3	
A 6 1 P 15/06 (2006.01)	A 6 1 P 33/12	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-243872 (P2017-243872)	(71) 出願人	000173913 公益財団法人微生物化学研究会 東京都品川区上大崎3丁目14番23号
(22) 出願日	平成29年12月20日 (2017.12.20)	(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	100107515 弁理士 廣田 浩一
		(74) 代理人	100107733 弁理士 流 良広
		(74) 代理人	100115347 弁理士 松田 奈緒子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗アピコンプレクサ類原虫剤、アピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物、及び流産又は死産防止剤

(57) 【要約】

【課題】アピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染を抑制することができる抗アピコンプレクサ類原虫剤、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物、流産又は死産防止剤、並びにアピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染の抑制方法、アピコンプレクサ類原虫感染症の予防又は治療方法、及び流産又は死産の防止方法を提供する。

【解決手段】構造式(1)で表される化合物又はその塩を含む抗アピコンプレクサ類原虫剤、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物、及び前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を含む流産又は死産防止剤である。

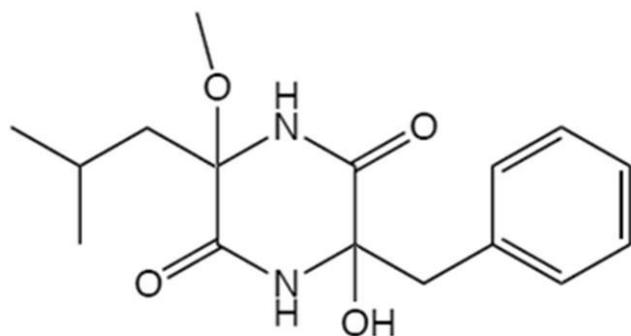
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記構造式(1)で表される化合物又はその塩を含むことを特徴とする抗アピコンプレクサ類原虫剤。

【化 1】



構造式(1)

【請求項 2】

前記アピコンプレクサ類原虫が、グレガリナ類、コクシジウム類、住血胞子虫類、及びピロプラズマ類からなる群から選択されるいずれかである請求項 1 に記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤。

【請求項 3】

前記アピコンプレクサ類原虫が、コクシジウム類及び住血胞子虫類のいずれかである請求項 1 から 2 のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤。

【請求項 4】

前記アピコンプレクサ類原虫が、トキソプラズマ、マラリア原虫、及びネオスポラからなる群から選択されるいずれかである請求項 1 から 3 のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤。

【請求項 5】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むことを特徴とするアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物。

【請求項 6】

前記アピコンプレクサ類原虫感染症が、グレガリナ類、コクシジウム類、住血胞子虫類、及びピロプラズマ類からなる群から選択されるいずれかの原虫が感染することにより生じる感染症である請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記アピコンプレクサ類原虫感染症が、コクシジウム類及び住血胞子虫類のいずれかが感染することにより生じる感染症である請求項 5 から 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記アピコンプレクサ類原虫感染症が、トキソプラズマ症、マラリア、及びネオスポラ症からなる群から選択されるいずれかである請求項 5 から 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むことを特徴とする流産又は死産防止剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染を抑制することができる抗アピコンプレクサ類原虫剤、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物、及び前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を含む流産又は死産防止剤に関する。

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

原虫感染症は、人類の健康に甚大な被害を与えたり、家畜の生産性を著しく低下させ、経済的被害を与えたりすることが知られている。

例えば、マラリアの病原体であるマラリア原虫には、年間3億人～5億人が感染し、200万人が死亡している。また、トキソプラズマ症の病原体であるトキソプラズマには、世界人口の30%～60%が感染している。

また、原虫感染症による世界の経済損失は、15兆円以上と言われている。家畜に感染するアピコンプレクサ類原虫としては、例えば、ネオスポラ、バベシア、トキソプラズマなどが知られている。

そのため、アピコンプレクサ類を含む原虫感染症に対する薬剤の開発が鋭意行われている。

【0003】

これまでに、例えば、トキソプラズマ症治療薬としてスルファジアジン、マラリア治療薬としてクロロキンなどが開発されている。

【0004】

また、トキソプラズマ由来のProfilinを含むトキソプラズマ症に対するワクチン製剤（例えば、特許文献1参照）、マラリア原虫由来の抗原タンパク質CSP又はMSP1を含むマラリアに対するワクチン製剤（例えば、特許文献2参照）、ネオスポラ由来の可溶性タンパク質GRA7又はAMA1を含むネオスポラ症に対するワクチン製剤（例えば、特許文献3参照）などが提案されている。

【0005】

しかしながら、原虫の生活環が複雑であるため、感染経路の遮断が困難であったり、病態の慢性化により、臨床学的診断が困難であったり、原虫と動物細胞との類似性により、薬剤の開発が困難であったり、原虫の巧妙な免疫回避機構により、既成ワクチン戦略の限界があったりすることなどにより、原虫病は、未だ制圧できていない。

また、これまでに開発された治療薬に耐性を有する薬剤耐性原虫が出現したり、前記治療薬による副作用が生じたりする問題も懸念されている。

【0006】

したがって、原虫感染症に対する新たな治療薬及び治療方法の速やかな提供が強く求められているのが現状である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2014/034046号

【特許文献2】特開2016-145154号公報

【特許文献3】国際公開第2010/032408号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、従来における前記諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、アピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染を抑制することができる抗アピコンプレクサ類原虫剤、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物、流産又は死産防止剤、並びにアピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染の抑制方法、アピコンプレクサ類原虫感染症の予防又は治療方法、及び流産又は死産の防止方法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】

前記課題を解決するため、本発明者らは鋭意検討した結果、下記構造式(1)で表される化合物が、アピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染を抑制する抗アピコンプレクサ類原

10

20

30

40

50

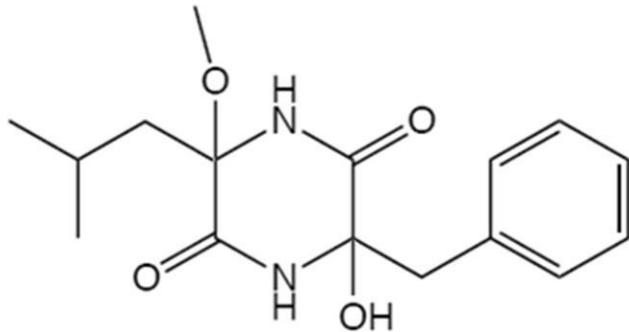
虫作用を有すること及び流産又は死産を防止できることを知見し、本発明の完成に至った。

【0010】

本発明は、本発明者らによる前記知見に基づくものであり、前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

< 1 > 下記構造式(1)で表される化合物又はその塩を含むことを特徴とする抗アピコンプレクサ類原虫剤である。

【化1】



構造式(1)

< 2 > 前記< 1 >に記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むことを特徴とするアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物である。

< 3 > 個体に、前記< 1 >に記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を投与することを特徴とするアピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染の抑制方法である。

< 4 > 個体に、前記< 2 >に記載のアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物を投与することを特徴とするアピコンプレクサ類原虫感染症の予防又は治療方法である。

< 5 > 前記< 1 >に記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むことを特徴とする流産又は死産防止剤である。

< 6 > 個体に、前記< 1 >に記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を投与することを特徴とする流産又は死産の防止方法である。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、アピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染を抑制することができる抗アピコンプレクサ類原虫剤、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物、流産又は死産防止剤、並びにアピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染の抑制方法、アピコンプレクサ類原虫感染症の予防又は治療方法、及び流産又は死産の防止方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】図1Aは、構造式(1)で表される化合物の赤外部吸収スペクトル(KBr錠中)を示す図である(横軸:波数(cm^{-1})、縦軸:透過率(%))。

【図1B】図1Bは、構造式(1)で表される化合物のプロトン核磁気共鳴スペクトル(重メタノール中)を示す図である(横軸:ppm)。

【図2A】図2Aは、試験例1-1において、構造式(1)で表される化合物を添加した場合のトキソプラズマ増殖の阻害率を示す図である。

【図2B】図2Bは、試験例1-1において、スルファジアジンを添加した場合のトキソプラズマ増殖の阻害率を示す図である。

【図2C】図2Cは、試験例1-2において、構造式(1)で表される化合物を添加した場合のトキソプラズマ感染の阻害率を示す図である。

【図3】図3は、試験例2において、構造式(1)で表される化合物を添加した場合のヒ

20

30

40

50

ト包皮線維芽細胞（HFF細胞）の増殖阻害率を示す図である。

【図4】図4は、試験例3におけるマウス生存率を示す図である。

【図5】図5は、試験例4におけるマウス生存率を示す図である。

【図6A】図6Aは、試験例5において、3D7株感染ヒト赤血球に対し、構造式(1)で表される化合物を添加した場合の3D7株の増殖阻害率を示す図である。

【図6B】図6Bは、試験例5において、3D7株感染ヒト赤血球に対し、クロロキンを添加した場合の3D7株の増殖阻害率を示す図である。

【図6C】図6Cは、試験例5において、K-1株感染ヒト赤血球に対し、構造式(1)で表される化合物を添加した場合のK-1株の増殖阻害率を示す図である。

【図6D】図6Dは、試験例5において、K-1株感染ヒト赤血球に対し、クロロキンを添加した場合のK-1株の増殖阻害率を示す図である。

【図6E】図6Eは、試験例5において、3D7株感染ヒト赤血球に対し、構造式(1)で表される化合物を10 μ g/mL添加した場合の血液塗抹標本をギムザ染色した結果を示す図である。

【図6F】図6Fは、試験例5において、3D7株感染ヒト赤血球に対し、構造式(1)で表される化合物を添加しなかった場合の血液塗抹標本をギムザ染色した結果を示す図である。

【図7】図7は、試験例6において、構造式(1)で表される化合物を添加した場合のネオスポラ増殖の阻害率を示す図である。

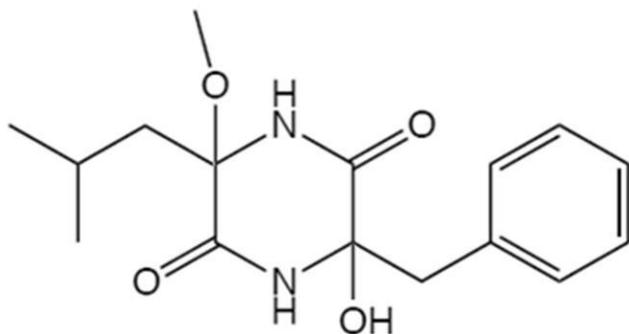
【発明を実施するための形態】

【0013】

(抗アピコンプレクサ類原虫剤)

本発明の抗アピコンプレクサ類原虫剤は、下記構造式(1)で表される化合物又はその塩を少なくとも含み、必要に応じて更にその他の成分を含む。

【化2】



構造式(1)

【0014】

< 構造式(1)で表される化合物又はその塩 >

前記構造式(1)で表される化合物の理化学的性状は、下記の表1に示される通りである。

【0015】

【表 1】

形 状	無色プリズム状結晶
分子量	306 (FABマスペクトルによる)
分子式	$C_{16}H_{22}N_2O_4$
元素分析	
理論値	C 62.73 %, H 7.24%, N 9.14%
測定値	C 62.35 %, H 7.22%, N 8.90%
融 点	201 ~ 202 °C (褐変)
比旋光度	$[\alpha]_D^{27} +5.1^\circ$ (c 0.63, メタノール)
溶解性	メタノールに可溶、 水、クロロホルムに難溶
Rf 値*	
(i) 展開溶媒	
クロロホルム-メタノール	0.36
(10 : 1)	
(ii) 展開溶媒	
ヘキサン-酢酸エチル	0.58
(3 : 7)	

* Rf 値はシリカゲル (Art. 5721, メルク社製) の薄層クロマトグラフィーでニンヒドリン試薬又はライドンスミス試薬でスポットの呈色反応を行って測定された。

【0016】

前記構造式(1)で表される化合物の臭化カリウム錠による赤外部吸収スペクトルは図 1 A に示すとおりである。

前記構造式(1)で表される化合物の重メタノール中のプロトン核磁気共鳴スペクトル(内部基準:テトラメチルシラン)は図 1 B に示すとおりである。また、前記構造式(1)で表される化合物の ^{13}C 核磁気共鳴スペクトルは下記の表 2 に示すとおりである。

【0017】

【表 2】

メタサイトフィリンの¹³C-NMR (重メタノール中)

169.7 ppm	s
168.5 ppm	s
136.0 ppm	s
132.2 ppm	d, d
129.4 ppm	d, d
128.3 ppm	d
88.4 ppm	s
84.3 ppm	s
49.9 ppm	q
49.5 ppm	t
46.1 ppm	t
24.6 ppm	q
24.3 ppm	q
24.2 ppm	d

【0018】

化合物が、前記構造式(1)で表される構造を有するか否かは、適宜選択した各種の分析方法により確認することができる。なお、前記各種分析方法による測定値には、多少の誤差が生じることがあるが、当業者であれば、化合物が前記構造式(1)で表される構造を有することは容易に同定することが可能である。

30

【0019】

前記構造式(1)で表される化合物は立体異性体が存在するが、前記構造式(1)で表される化合物の立体構造としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記構造式(1)で表される化合物は、塩の態様であってもよい。

前記構造式(1)で表される化合物の塩としては、特に制限はなく、薬理的に許容され得る塩であれば、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、塩酸、硫酸等の無機酸、又は酢酸等の有機酸との酸付加塩などが挙げられる。

40

【0020】

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤における構造式(1)で表される化合物又はその塩の含有量としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。前記抗アピコンプレクサ類原虫剤は、前記構造式(1)で表される化合物又はその塩そのものであってもよい。

【0021】

前記構造式(1)で表される化合物又はその塩の製造方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、微生物を用いて製造する方法などが挙げられる。

50

【0022】

前記微生物を用いて製造する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記構造式(1)で表される化合物又はその塩を生産する微生物を培養し、その培養物から前記構造式(1)で表される化合物又はその塩を採取する方法などが挙げられる。

【0023】

前記微生物としては、前記構造式(1)で表される化合物又はその塩を生産する能力を有する限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、メタリジウム(Metarrhizium)属に属する微生物(以下、「生産菌」と称することがある)などが挙げられる。

前記微生物は、常法によって、自然界より分離することが可能である。なお、前記微生物は、放射線照射やその他の変異処理に供することにより前記構造式(1)で表される化合物又はその塩を生産する生産能を高めてもよいし、遺伝子工学的手法により前記構造式(1)で表される化合物又はその塩を生産する生産能を高めてもよい。

【0024】

前記微生物の具体例としては、例えば、TA2759菌株などが挙げられる。前記TA2759菌株は、山梨県塩山市の放牧地で1988年10月23日に採取した土壌からISP培地4を用いて分離された菌株であり、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室)に寄託申請し、NITE P-02576として受託された(受託日:2017年11月15日)ものであり、その形態学的性質等は、以下の通りである。

【0025】

前記TA2759菌株は、ツアペック(Czapek)寒天培地及びポテト-ブドウ糖寒天培地で15~35で生育し、22~28に生育適温を有する。

寒天培養基上の生育は孢子が着生すると黄緑色から暗緑色になり、ときに孢子着生の少ない白色の長い気中菌糸を生ずる。寒天培養基中には幅1.5~3.0ミクロンの菌糸が伸長し分枝する。培養基上にも気中菌糸が70~150ミクロン伸長し分枝する。分枝した菌糸の末端からフィア口型の分生孢子が形成され連鎖をなす。分生孢子は幅1.5~3.0×長さ5~7.5ミクロンの桿状~長楕円状で着色した連鎖をなす。孢子連鎖は50~70ミクロンにおよび集合体を示す。

前記TA2759菌株は麦芽汁培地で培養すると、ツアペック寒天培地の場合と同様の生育性状を示す。

以上の形態性状から、前記TA2759菌株は不完全菌カビのメタリジウム(Metarrhizium)属の菌株であることが判明した〔参考文献: Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. "Metarrhizium Sorok. 1883 In "Compendium of Soil Fungi"」第1巻, 413~415頁(Academic Press, London(1980))及びTulloch, M. "The genus Metarrhizium. Trans. Br. Mycol. Soc.", 66巻407~411頁(1976). 参照〕。

前記TA2759菌株は、rRNA配列解析に基づき、Metarrhizium sp.であることが確認された。

【0026】

前記培養の方法及び条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記採取の方法及び条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【0027】

例えば、前記生産菌を、栄養源含有培地に接種して好氣的に発育させることによって、前記構造式(1)で表される化合物又はその塩を含む培養物を得ることができる。

前記栄養源としては、特に制限はなく、不完全菌カビの栄養源として使用しうる既知の

10

20

30

40

50

炭素源及び窒素源を適宜選択することができ、例えば、市販されているペプトン、肉エキス、コーン・スティープ・リカー、綿実粉、落花生粉、大豆粉、酵母エキス、N Z - アミン、カゼインの水解物、硝酸ソーダ、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウムなどの窒素源；市販されているグリセリン、しょ糖、でん粉、グルコース、ガラクトース、マンノース、糖みつ等の炭水化物あるいは脂肪などの炭素源などが挙げられる。

また、食塩、リン酸塩、炭素カルシウム、硫酸マグネシウムなどの無機塩を添加してもよい。その他必要に応じて微量の金属塩、消泡剤としての動植・鉱物油等を加用できる。

これらのものは、生産菌が利用し、前記構造式(1)で表される化合物又はその塩の生産に役立つものであればよく、公知の不完全菌カビの培養材料はすべて使用できる。

【0028】

前記前記構造式(1)で表される化合物又はその塩の生産に用いる培地としては、液体培地が好ましい。

培養温度としては、生産菌が発育し、前記構造式(1)で表される化合物又はその塩を生産する温度であれば特に制限はなく、適宜選択することができ、通常27 ~ 32 である。

培養は、生産菌の性質に応じて適宜選択して行うことができる。

前記構造式(1)で表される化合物又はその塩は、培養液に存在する。

【0029】

前記生産菌の培養の好ましい態様としては、寒天斜面培地で培養した生産菌を、可溶性デンプン2%、グルコース1%、酵母エキス0.5%、トリプチケースペプトン0.5%、炭酸カルシウム0.4%から成る水溶液に学術研究用人工海水・ジャマリンSを25% (v/v) 加えた液体培地(pH7.2) 100mLに接種し、27 度で3日間振とう培養し、得られた培養物を種培養液として用い、この種培養液2mLを上述の液体培地100mLに接種し、27 度で4日間振とう培養することによって、構造式(1)で表される化合物又はその塩の生産を行なう態様などが挙げられる。

【0030】

前記構造式(1)で表される化合物又はその塩は、得られた培養液の濾液より、酢酸ブチル、ブタノール等の有機溶剤で抽出できる。前記抽出液を減圧濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィー、遠心液々分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を適宜組み合わせることによって構造式(1)で表される化合物又はその塩を純粋に採取することができる。

【0031】

<その他の成分>

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤におけるその他の成分としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、添加剤、補助剤、水等の薬理的に許容され得る担体などが挙げられる。

【0032】

前記添加剤又は前記補助剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、殺菌剤、保存剤、粘結剤、増粘剤、固着剤、結合剤、着色剤、安定化剤、pH調整剤、緩衝剤、等張化剤、溶剤、酸化防止剤、紫外線防止剤、結晶析出防止剤、消泡剤、物性向上剤、防腐剤などが挙げられる。

【0033】

前記殺菌剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム等のカチオン性界面活性剤などが挙げられる。

【0034】

前記保存剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、クレゾールなどが挙げられる。

【0035】

前記粘結剤、増粘剤、固着剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択するこ

10

20

30

40

50

とができ、例えば、デンプン、デキストリン、セルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルデンプン、プルラン、アルギン酸ナトリウム、アルギン酸アンモニウム、アルギン酸プロピレングリコールエステル、グアーガム、ローカストビーンガム、アラビアゴム、キサンタンガム、ゼラチン、カゼイン、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキサイド、ポリエチレングリコール、エチレン・プロピレンブロックポリマー、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

【0036】

前記結合剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン液、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、エチルセルロース、シェラック、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

10

【0037】

前記着色剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、酸化チタン、酸化鉄などが挙げられる。

【0038】

前記安定化剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、トラガント、アラビアゴム、ゼラチン、ピロ亜硫酸ナトリウム、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、チオグリコール酸、チオ乳酸などが挙げられる。

20

【0039】

前記pH調整剤又は前記緩衝剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

【0040】

前記等張化剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖などが挙げられる。

【0041】

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤における前記その他の成分の含有量としては、本発明の効果損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

30

【0042】

<アピコンプレクサ類原虫>

前記アピコンプレクサ類原虫は、生活環のどこかでアピカルコンプレックスという構造を持つという点で特徴付けられる原生生物のグループである。前記アピコンプレクサ類原虫としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

アピコンプレックス門の下位分類としては、例えば、グレガリナ(簇虫)類、コクシジウム(球虫)類、住血胞子虫(血虫)類、ピロプラズマ類などがある。

【0043】

前記コクシジウム類としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、トキソプラズマ(Toxoplasma gondii)、ネオスポラ(Neospora caninum)、肉胞子虫(Sarcocystis)、クリプトスポリジウム(Cryptosporidium)などが挙げられる。なお、クリプトスポリジウムは、グレガリナ類とする説もあるが、本発明では、コクシジウム類とする。

40

【0044】

前記住血胞子虫としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、マラリア原虫(Plasmodium)、ロイコチトゾーン(Leucocytozoon)などが挙げられる。

【0045】

前記ピロプラズマ類としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ

50

、例えば、バベシア (B a b e s i a)、タイレリア (T h e i l e r i a)などが挙げられる。

【0046】

本発明の抗アピコンプレクサ原虫剤は、コクシジウム類、住血胞子虫類に対して好適に用いることができ、特に、トキソプラズマ、マラリア原虫、及びネオスポラからなる群から選択されるいずれかにより好適に用いることができる。

【0047】

- トキソプラズマ -

トキソプラズマ (T o x o p l a s m a g o n d i i) は、ネコ科動物を終宿主とし、哺乳類、鳥類を中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。

10

【0048】

- マラリア原虫 -

マラリア原虫は、マラリアの病原体で、ハマダラカによって媒介される。マラリア原虫としては、熱帯熱マラリア原虫 (P l a s m o d i u m f a l c i p a r u m)、三日熱マラリア原虫 (P l a s m o d i u m v i v a x)、四日熱マラリア原虫 (P l a s m o d i u m m a l a r i a e)、卵形マラリア原虫 (P l a s m o d i u m o v a l e) の4種のほか、サルマラリア原虫 (P l a s m o d i u m k n o w l e s i) などが知られている。

【0049】

- ネオスポラ -

ネオスポラ (N e o s p o r a c a n i n u m) は、犬科動物を終宿主とし、牛、羊、山羊、鹿などを中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。

20

【0050】

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤は、1種単独で使用してもよいし、他の成分を有効成分とする医薬と併せて使用してもよい。また、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤は、他の成分を有効成分とする医薬中に、配合された状態で使用してもよい。

【0051】

< 剤形 >

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤の剤形としては、特に制限はなく、所望の投与方法に応じて適宜選択することができ、例えば、固形剤、半固形剤、液剤などが挙げられる。これらの剤形の前記抗アピコンプレクサ類原虫剤は、常法に従い製造することができる。

30

【0052】

- 固形剤 -

前記固形剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、内用剤として用いられる場合、例えば、錠剤、チュアブル錠、発泡錠、口腔内崩壊錠、トローチ剤、ドロップ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、ドライシロップ剤、浸剤などが挙げられる。

前記固形剤が、外用剤として用いられる場合、例えば、坐剤、パップ剤、プラスター剤などが挙げられる。

【0053】

- 半固形剤 -

前記半固形剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、内用剤として用いられる場合、例えば、舐剤、チューインガム剤、ホイップ剤、ゼリー剤などが挙げられる。

40

前記半固形剤が、外用剤として用いられる場合、例えば、軟膏剤、クリーム剤、ムース剤、インヘラー剤、ナザールジェル剤などが挙げられる。

【0054】

- 液剤 -

前記液剤としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、内用剤として用いられる場合、例えば、シロップ剤、ドリンク剤、懸濁剤、酒精剤などが挙げ

50

られる。

前記液剤が、外用剤として用いられる場合、例えば、液剤、点眼剤、エアゾール剤、噴霧剤などが挙げられる。

【 0 0 5 5 】

< 投与 >

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤の投与方法、投与量、投与時期、及び投与対象としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

前記投与方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択ことができ、例えば、局所投与方法、経腸投与方法、静脈内投与方法、腹腔内投与方法などの非経口投与方法や経口投与方法などが挙げられる。

10

前記投与量としては、特に制限はなく、投与対象個体の年齢、体重、体質、症状、他の成分を有効成分とする医薬の投与の有無など、様々な要因を考慮して適宜選択することができる。

前記投与対象となる動物種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択ことができ、例えば、ヒト、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、トリなどが挙げられる。

【 0 0 5 6 】

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤は、アピコンプレクサ類原虫に対して優れた増殖又は感染抑制活性を示すことから、本発明のアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物に好適に利用することができる。また、本発明は、個体に、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を投与するアピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染の抑制方法にも関する。

20

【 0 0 5 7 】

本発明において、アピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染の抑制とは、アピコンプレクサ類原虫の殺虫、発育妨害、宿主細胞への侵入阻害などをいう。

【 0 0 5 8 】

(アピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物)

本発明のアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物(以下、「医薬組成物」と称することがある)は、本発明の抗アピコンプレクサ類原虫剤を少なくとも含み、必要に応じて更にその他の成分を含む。

30

【 0 0 5 9 】

< 抗アピコンプレクサ類原虫剤 >

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤は、上記した本発明の抗アピコンプレクサ類原虫剤である。

前記医薬組成物における抗アピコンプレクサ類原虫剤の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。また、前記医薬組成物は、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤そのものであってもよい。

【 0 0 6 0 】

< その他の成分 >

前記医薬組成物におけるその他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択ことができ、例えば、上記した抗アピコンプレクサ類原虫剤のその他の成分の項目に記載したものと同様のものなどが挙げられる。

40

前記医薬組成物における前記その他の成分の含有量としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 6 1 】

< アピコンプレクサ類原虫感染症 >

前記アピコンプレクサ類原虫感染症は、前記アピコンプレクサ類原虫が感染することによる生じる感染症である。

前記アピコンプレクサ類原虫感染症としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択ことができ、例えば、グレガリナ類、コクシジウム類、住血胞子虫類、及びピロプラ

50

ズマ類からなる群から選択されるいずれかの原虫が感染することにより生じる感染症などが挙げられ、より具体的には、トキソプラズマが感染することにより生じるトキソプラズマ症、マラリア原虫が感染することにより生じるマラリア、ネオスポラが感染することにより生じるネオスポラ症、バベシアが感染することにより生じるバベシア症、クリプトスポリジウムが感染することにより生じるクリプトスポリジウム症などが挙げられる。

これらの中でも、本発明の医薬組成物は、コクシジウム類及び住血胞子虫類のいずれかが感染することにより生じる感染症に対して好適に用いることができ、トキソプラズマ症、マラリア、及びネオスポラ症からなる群から選択されるいずれかの感染症により好適に用いることができる。

【0062】

- トキソプラズマ症 -

トキソプラズマ症は、宿主の免疫能が正常な状態では不顕性感染として経過するが、ヒトではエイズや臓器移植、妊娠などにより宿主が免疫抑制状態に陥ると発症する日和見感染症である。動物においては、豚や羊などで感染による流産、死産が問題となっている。

【0063】

- マラリア -

マラリアは、熱帯から亜熱帯に広く分布する原虫感染症である。症状としては、高熱や頭痛、吐き気などを呈する。悪性の場合には、脳マラリアによる意識障害や腎不全などを起こし、死亡する。

【0064】

- ネオスポラ症 -

ネオスポラ症は、牛では流産、死産或いは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高率に引き起こし、イヌでは多発性筋炎、上行性麻痺を引き起こす。

【0065】

前記医薬組成物は、1種単独で使用してもよいし、他の成分を有効成分とする医薬と併せて使用してもよい。また、前記医薬組成物は、他の成分を有効成分とする医薬中に、配合された状態で使用してもよい。

【0066】

< 剤形 >

前記医薬組成物の剤形としては、特に制限はなく、所望の投与方法に応じて適宜選択することができる。例えば、上記した抗アピコンプレクサ類原虫剤の剤形の項目に記載したものと同様のものなどが挙げられる。また、前記医薬組成物は、常法に従い製造することができる。

【0067】

< 投与 >

前記医薬組成物の投与方法、投与量、投与時期、及び投与対象としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。例えば、上記した抗アピコンプレクサ類原虫剤の投与の項目に記載したものと同様のものなどが挙げられる。

【0068】

前記医薬組成物は、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むことから、アピコンプレクサ類原虫に対して優れた増殖又は感染抑制活性を示し、アピコンプレクサ類原虫感染症を予防又は治療することができる。したがって、本発明は、個体に、前記医薬組成物を投与するアピコンプレクサ類原虫感染症の予防又は治療方法にも関する。

【0069】

本発明において、アピコンプレクサ類原虫感染症の予防とは、アピコンプレクサ類原虫の感染の抑制、生体内におけるアピコンプレクサ類原虫の増殖の抑制、アピコンプレクサ類原虫に感染した後の症状の発生の抑制、治療後の再発の抑制などをいう。

また、本発明において、アピコンプレクサ類原虫感染症の治療とは、アピコンプレクサ類原虫の感染と関連する1つ以上の症状の緩和若しくは悪化の阻止、生体内におけるアピコンプレクサ類原虫の増殖の抑制などをいう。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

(流産又は死産防止剤)

本発明の流産又は死産防止剤は、本発明の抗アピコンプレクサ類原虫剤を少なくとも含み、必要に応じて更にその他の成分を含む。

【 0 0 7 1 】

< 抗アピコンプレクサ類原虫剤 >

前記抗アピコンプレクサ類原虫剤は、上記した本発明の抗アピコンプレクサ類原虫剤である。

前記流産又は死産防止剤における抗アピコンプレクサ類原虫剤の含有量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。また、前記流産又は死産防止剤は、前記抗アピコンプレクサ類原虫剤そのものであってもよい。

10

【 0 0 7 2 】

< その他の成分 >

前記流産又は死産防止剤におけるその他の成分としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、上記した抗アピコンプレクサ類原虫剤のその他の成分の項目に記載したものと同様のものなどが挙げられる。

前記流産又は死産防止剤における前記その他の成分の含有量としては、本発明の効果を損なわない限り、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

【 0 0 7 3 】

前記流産又は死産防止剤は、1種単独で使用してもよいし、他の成分を有効成分とする医薬と併せて使用してもよい。また、前記流産又は死産防止剤は、他の成分を有効成分とする医薬中に、配合された状態で使用してもよい。

20

【 0 0 7 4 】

< 剤形 >

前記流産又は死産防止剤の剤形としては、特に制限はなく、所望の投与方法に応じて適宜選択することができ、例えば、上記した抗アピコンプレクサ類原虫剤の剤形の項目に記載したものと同様のものなどが挙げられる。また、前記流産又は死産防止剤は、常法に従い製造することができる。

【 0 0 7 5 】

< 投与 >

前記流産又は死産防止剤の投与方法、投与量、投与時期、及び投与対象としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、上記した抗アピコンプレクサ類原虫剤の投与の項目に記載したものと同様のものなどが挙げられる。

30

【 0 0 7 6 】

本発明の流産又は死産防止剤によれば、アピコンプレクサ類原虫の感染に起因する流産又は死産を防止することができる。したがって、本発明は、個体に、前記流産又は死産防止剤を投与する流産又は死産の防止方法にも関する。

【 実施例 】

【 0 0 7 7 】

以下に、製造例、試験例などを挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの製造例、試験例などに何ら限定されるものではない。

40

【 0 0 7 8 】

寒天斜面培地で培養したメタリジウム属に属する構造式(1)で表される化合物を生産する生産菌、TA2759菌株(NITE P-02576)を、可溶性デンプン(小宗化学薬品株式会社製)2%、グルコース(第一製薬株式会社製)1%、酵母エキス(ディフコ社製)0.5%、トリプチケースペプトン(BBL社製)0.5%、炭酸カルシウム0.4%からなる水溶液に学術研究用人工海水・ジャマリンS(ジャマリンラボラトリー社製)を25%(v/v)加えた液体培地(pH7.2)100mLずつを分注したワッフル付三角フラスコ2本に一白金耳ずつ接種し、27℃で3日間振とう培養した。

得られた培養液を種培養液として、この種培養液2mLを上述の組成の液体培地を10

50

0 mL ずつ分注したワッフル付三角フラスコ 100 本に 2 mL ずつ接種し、27 °C で 4 日間振とう培養した。

【0079】

培養液から濾過により菌体を除去し、その培養濾液から酢酸ブチルで 2 回抽出し、抽出液を減圧濃縮し、0.6 g の粗物質を得た。

この粗物質を 50 mL のシリカゲルカラムを用い、クロマトグラフィーを行った。この際、まずクロロホルム 500 mL、次いでクロロホルム - メタノール (20 : 1) の 500 mL で溶出し、ニンヒドリン呈色及び紫外吸収を指標に分画し、減圧濃縮して 0.2 g の粗物質を得た。

この粗物質を高速液体クロマトグラフィー (日立製、センシューパック ODS 530 IN、20 × 300 mm) により、30% メタノールを移動相として 4 mL / 分間の流速で溶出、分画し、80 ~ 90 分間で溶出される分画を集め、減圧濃縮後、メタノールによって結晶化し、無色プリズム状物質 (構造式 (1) で表される化合物) を 40 mg 得た。

10

【0080】

得られた物質は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (メルク社製、Art. 5721、展開溶媒: クロロホルム - メタノール (10 : 1)) で単スポット (Rf 0.36) を与え、また高速液体クロマトグラフィー (日立製、資生堂カプセルパック C18 SG 1204.6 mm × 250 mm) で 30% メタノールを移動相として 1 mL / 分間の流速において、単一のピーク (滞留時間 15.6 分) を与えた。

また、得られた物質の理化学的性状、赤外部吸収スペクトル、プロトン核磁気共鳴スペクトル、¹³C 核磁気共鳴スペクトルの結果は、それぞれ、前記表 1、図 1 A、図 1 B、前記表 2 のとおりであり、前記構造式 (1) で表される構造を有する化合物であることが確認された。

20

【0081】

(試験例 1 : *in vitro* におけるトキソプラズマ増殖抑制効果)

< 試験例 1 - 1 : 細胞内原虫 >

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*、RH 株) 感染ヒト包皮線維芽細胞 (HFF 細胞) に対し、感染 4 時間後に前記構造式 (1) で表される化合物又はトキソプラズマ標準治療薬であるスルファジアジンを所定量添加し、感染 72 時間後に原虫増殖を以下のように測定し、細胞内原虫に対する IC₅₀ を求めた。結果を図 2 A 及び図 2 B に示す。

30

- 原虫増殖の測定方法 -

HFF 細胞 (1 × 10⁴ 細胞 / ウェル、96 ウェル培養プレート) を 37 °C で一晩培養し、精製した緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現トキソプラズマ RH 株を加えた (5 × 10⁴ 原虫 / ウェル)。4 時間後に細胞を洗浄し、前記構造式 (1) で表される化合物又はトキソプラズマ標準治療薬であるスルファジアジンを所定量添加し、感染 72 時間後に蛍光プレートリーダーにて GFP の蛍光レベルを測定した。

トキソプラズマ増殖の阻害率は、下記式により算出した。

トキソプラズマ増殖の阻害率 = [(化合物未処置サンプルの GFP 蛍光強度) - (化合物処理サンプルの GFP 蛍光強度) / (化合物未処置サンプルの GFP 蛍光強度)] × 100

40

なお、前記 GFP 発現トキソプラズマ RH 株は、Nishikawa, Y., Xuan, X., Makala, L., Vielemeyer, O., Joiner, K.A., and Nagasawa, H.: Characterization of *Toxoplasma gondii* engineered to express mouse interferon-gamma. *Int J Parasitol.* 2003 Nov; 33 (13): 1525 - 35. PMID: 14572515 に記載の方法と同様の方法で作製した。

【0082】

図 2 A は前記構造式 (1) で表される化合物を添加した場合のトキソプラズマ増殖の阻

50

害率を示し、図 2 B はスルファジアジンを添加した場合のトキソプラズマ増殖の阻害率を示す。

図 2 A 及び図 2 B より、細胞内原虫に対する IC_{50} は、前記構造式 (1) で表される化合物では $1.19 \mu M$ であり、スルファジアジンでは $397 \mu M$ となった。したがって、前記構造式 (1) で表される化合物は、スルファジアジンの 334 倍の抗原虫効果が認められた。

【0083】

< 試験例 1 - 2 : 細胞外原虫 >

細胞外トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*, RH 株) に対し所定量の前記構造式 (1) で表される化合物を 1 時間作用させ、その後アフリカミドリザル腎臓上皮細胞 (Vero 細胞) に添加した。2 時間後に細胞を洗浄し、原虫添加後 24 時間での感染率を以下のように測定し、細胞外原虫に対する IC_{50} を求めた。結果を図 2 C に示す。

10

- 感染率の測定方法 -

Vero 細胞 (1×10^5 細胞 / ウェル、カバースリット入り 12 ウェル培養プレート) を $37^\circ C$ で一晩培養し、前記構造式 (1) で表される化合物を 1 時間作用させた緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現トキソプラズマ RH 株を加えた (2×10^5 原虫 / ウェル)。2 時間後に細胞を洗浄し、その後 22 時間 $37^\circ C$ で培養した。

PBS で洗浄後、3% パラフォルムアルデヒド (PBS 緩衝液) で室温 15 分間固定し、0.3% Triton X-100 (PBS 緩衝液) で室温 5 分間透過処理を行った。その後、Vero 細胞を計測するため Hoechst 33342 (1:10, 000 希釈) で核染色を行った。

20

トキソプラズマの感染は、GFP シグナルを蛍光顕微鏡で観察し、感染率は、下記式により算出した。

感染率 = [(GFP 陽性の Vero 細胞数) / (ランダムに測定した Vero 細胞 100 個)] $\times 100$

トキソプラズマ感染の阻害率は、下記式により算出した。

トキソプラズマ感染の阻害率 = [(化合物未処置サンプルの感染率) - (化合物処理サンプルの感染率) / (化合物未処置サンプルの感染率)] $\times 100$

【0084】

30

図 2 C は前記構造式 (1) で表される化合物を添加した場合のトキソプラズマ感染の阻害率を示す。

図 2 C より、細胞外原虫に対する前記構造式 (1) で表される化合物の IC_{50} は、 $2.42 \mu M$ であった。したがって、前記構造式 (1) で表される化合物は、細胞外虫体にも作用し、原虫の感染を阻害する効果を示した。

【0085】

(試験例 2 : 構造式 (1) で表される化合物の細胞毒性)

前記構造式 (1) で表される化合物の HFF 細胞に対する細胞毒性を以下のように測定し、 IC_{50} を求めた。結果を図 3 に示す。

- 細胞毒性の測定方法 -

40

HFF 細胞 (1×10^4 細胞 / ウェル、96 ウェル培養プレート) を $37^\circ C$ で一晩培養し、前記構造式 (1) で表される化合物を所定量添加し、 $37^\circ C$ で 24 時間培養した。

細胞の生存は、cell counting kit - 8 (CCK-8, Dojindo Molecular Technologies, Inc. Japan) を用い、試薬添加後 4 時間における培地の 450 nm の吸光度で判定した。

宿主細胞の増殖率は、下記式により算出した。

増殖率 = [(化合物処理サンプルの 450 nm の吸光度 / (化合物未処置サンプルの 450 nm の吸光度)) $\times 100$]

宿主細胞の増殖阻害率は、下記式により算出した。

宿主細胞の増殖阻害率 = [(化合物未処置サンプルの宿主細胞増殖率) - (化合物処理

50

サンプルの宿主細胞増殖率) / (化合物未処置サンプルの宿主細胞増殖率)] × 100
【0086】

図3は、前記構造式(1)で表される化合物を添加した場合のHFF細胞の増殖率を示す。

図3より、HFF細胞に対する前記構造式(1)で表される化合物のIC₅₀は、167.8 μMであった。したがって、前記構造式(1)で表される化合物の選択毒性比は、細胞内原虫で141、細胞外原虫で69となった。

【0087】

(試験例3：マウス感染モデルにおける腹腔内投与の治療効果)

BALB/cマウスにトキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*、PLK株)を腹腔内感染させ(1匹あたり5 × 10³原虫)、感染後24時間から前記構造式(1)で表される化合物(以下、「MCF」と称することがある)を1日1回7日間腹腔内投与した。MCF投与群は、30 mg/kg/回(6匹)、10 mg/kg/回(12匹)、3 mg/kg/回(6匹)の3群を設定した。

対照群として、感染後24時間からリン酸緩衝液(以下、「PBS」と称することがある)を1日1回7日間腹腔内投与した群(12匹)、及びスルファジアジン溶液(400 mg/L)を7日間自由飲水させた群(6匹)を設定した。

結果を図4に示す。

【0088】

図4中、「 」はMCFを30 mg/kg/回で投与した群、「 」はMCFを10 mg/kg/回で投与した群、「 」はMCFを3 mg/kg/回で投与した群、「 」はスルファジアジン溶液を自由飲水させた群、「 」はPBSを投与した群の結果を示す。

図4より、PBS投与群と比較して、MCF投与群のマウス生存率の有意な上昇が認められた。また、スルファジアジン溶液を自由飲水させた群と同様に、MCFを30 mg/kg/回で投与した群は、100%のマウス生存率を示した。図4中、「****」はP < 0.0001、「***」はP < 0.0002を表す(ログランク検定)。

【0089】

(試験例4：マウス感染モデルにおける経口投与の治療効果)

BALB/cマウスにトキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*、PLK株)を腹腔内感染させ(1匹あたり5 × 10³原虫)、感染後24時間から前記構造式(1)で表される化合物(以下、「MCF」と称することがある)を1日1回7日間経口投与した。MCF投与群は、30 mg/kg/回(6匹)、10 mg/kg/回(6匹)の2群を設定した。

対照群として、感染後24時間からリン酸緩衝液(以下、「PBS」と称することがある)を1日1回7日間経口投与した群(6匹)を設定した。

結果を図5に示す。

【0090】

図5中、「 」はMCFを30 mg/kg/回で投与した群、「 」はMCFを10 mg/kg/回で投与した群、「 」はPBSを投与した群の結果を示す。

図5より、PBS投与群は感染により全て死亡したのに対し、MCF投与群の生存率は、どちらの投与量においても100%であった。図5中、「**」はP < 0.001(ログランク検定)。

【0091】

(試験例5：in vitroにおける熱帯熱マラリア原虫増殖抑制効果)

熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*、クロロキン感受性原虫株(3D7)又はクロロキン抵抗性原虫株(K-1))感染ヒト赤血球(寄生率0.5%)に対し、前記構造式(1)で表される化合物又はマラリア標準治療薬であるクロロキンを所定量添加し、添加48時間後に原虫増殖を以下のように測定し、各細胞株に対するIC₅₀を求めた。結果を図6Aから図6Dに示す。

- 原虫増殖の測定方法 -

10

20

30

40

50

マラリア原虫感染ヒト赤血球（寄生率 0.5%、ヘマトクリット値 2%、100 μ L / ウェル、96 ウェル培養プレート）に対し、0.02% SYBR I を含む細胞溶解緩衝液（Tris（20 mM；pH 7.5）、EDTA（5 mM）、サポニン（0.008%；W/V）、Triton X-100（0.8%；V/V））を 100 μ L / ウェル 加えた。

暗室において、室温で 1 時間反応後、蛍光プレートリーダーにて、蛍光を測定した（励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm）。

マラリア原虫増殖の阻害率は、下記式により算出した。

マラリア原虫増殖の阻害率 = [（化合物未処置サンプルの測定値） - （化合物処理サンプルの測定値） / （化合物未処置サンプルの測定値）] \times 100

10

【0092】

図 6 A は前記 3 D 7 株感染ヒト赤血球に対し、前記構造式（1）で表される化合物を添加した場合の前記 3 D 7 株増殖の阻害率を示し、図 6 B は前記 3 D 7 株感染ヒト赤血球に対し、クロロキンを添加した場合の前記 3 D 7 株増殖の阻害率を示し、図 6 C は前記 K - 1 株感染ヒト赤血球に対し、前記構造式（1）で表される化合物を添加した場合の前記 K - 1 株増殖の阻害率を示し、図 6 D は前記 K - 1 株感染ヒト赤血球に対し、クロロキンを添加した場合の前記 K - 1 株増殖の阻害率を示す。

図 6 A から図 6 D より、クロロキン感受性原虫株（3 D 7）に対する IC₅₀ は、前記構造式（1）で表される化合物で 665.7 nM（選択毒性比：252）、クロロキンで 39.14 nM となった。クロロキン抵抗性原虫株（K - 1）に対する IC₅₀ は、前記構造式（1）で表される化合物で 604.8 nM（選択毒性比：277）、クロロキンで 1,616 nM となった。

20

【0093】

また、前記構造式（1）で表される化合物を添加した熱帯熱マラリア原虫感染ヒト赤血球の血液塗抹標本を作成しギムザ染色を行ったところ、前記構造式（1）で表される化合物添加による原虫の死滅が観察された。

一例として、図 6 E に 3 D 7 株感染ヒト赤血球（寄生率 0.5%）に対し、前記構造式（1）で表される化合物を 10 μ g / mL 添加した場合の血液塗抹標本をギムザ染色した結果を示す。また、コントロールとして、前記構造式（1）で表される化合物を添加しなかった場合の血液塗抹標本をギムザ染色した結果を図 6 F 示す。

30

【0094】

以上の結果から、前記構造式（1）で表される化合物の抗マラリア原虫効果が認められ、クロロキン抵抗性原虫株にも効果を持つことが明らかとなった。

【0095】

（試験例 6：in vitro におけるネオスポラ増殖抑制効果）

ネオスポラ（*Neospora caninum*、Nc 1 株）感染ヒト包皮線維芽細胞（HFF 細胞）に対し、感染 24 時間後に前記構造式（1）で表される化合物を所定量添加し、感染 72 時間後に原虫増殖を以下のように測定し、細胞内原虫に対する IC₅₀ を求めた。結果を図 7 に示す。

- 原虫増殖の測定方法 -

40

HFF 細胞（1 \times 10⁴ 細胞 / ウェル、96 ウェル培養プレート）を 37 $^{\circ}$ C で一晩培養し、精製した緑色蛍光タンパク質（GFP）発現ネオスポラ Nc 1 株を加えた（5 \times 10⁴ 原虫 / ウェル）。4 時間後に細胞を洗浄し、前記構造式（1）で表される化合物を所定量添加し、感染 72 時間後に蛍光プレートリーダーにて GFP の蛍光レベルを測定した。

ネオスポラ増殖の阻害率は、下記式により算出した。

ネオスポラ増殖の阻害率 = [（化合物未処置サンプルの GFP 蛍光強度） - （化合物処理サンプルの GFP 蛍光強度） / （化合物未処置サンプルの GFP 蛍光強度）] \times 100

なお、GFP 発現ネオスポラ Nc 1 株は、Abe C, Tanaka S, Nishimura M, Ihara F, Xuan X, Nishikawa Y. Role of the chemokine receptor CCR5 - depe

50

ndent host defense system in Neospora caninum infections. Parasit Vectors. 2015 Jan 6; 8(1):5. [Epub ahead of print] PMID: 25558986に記載の方法と同様の方法で作製した。

【0096】

図7より、細胞内原虫に対するIC₅₀は、967nM(選択毒性比:174)であった。したがって、前記構造式(1)で表される化合物の抗ネオスポラ効果が認められた。

【0097】

(試験例7:妊娠マウス感染モデルにおける経口投与の治療効果)

<トキソプラズマ感染群>

BALB/cマウスを妊娠させ、妊娠3日目にトキソプラズマ(Toxoplasma gondii、PLK株)を腹腔内感染させ(1匹あたり 1×10^3 原虫)、感染後24時間から前記構造式(1)で表される化合物(以下、「MCF」と称することがある)を1日1回7日間経口投与した。MCF投与群は、10mg/kg/回(6匹)を設定した。対照群として、感染後24時間からリン酸緩衝液(以下、「PBS」と称することがある)を1日1回7日間経口投与した群(6匹)を設定した。

<非感染群>

BALB/cマウスを妊娠させ、妊娠4日目からMCFを1日1回7日間経口投与した。MCF投与群は、10mg/kg/回(6匹)を設定した。対照群として、妊娠4日目からPBSを1日1回7日間経口投与した群(6匹)を設定した。

なお、妊娠の開始の有無は、膈線プラグの形成の有無を確認することにより判断した。結果を表3に示す。

【0098】

【表3】

実験群	処置	使用 マウス 数	妊娠期間の 母マウスの 生存数	妊娠期間の 母マウスの 生存率(%)	出産した 母マウス数	出産率 (%)	一腹あたりの 出生数
非感染	PBS投与	6	6	100	4	66.7	8, 9, 4, 3
	MCF投与	6	6	100	5	83.3	10, 7, 7, 6, 2
トキソプラズマ 感染	PBS投与	6	3	50	0	0	
	MCF投与	6	6	100	4	66.7	8, 8, 1, 6

【0099】

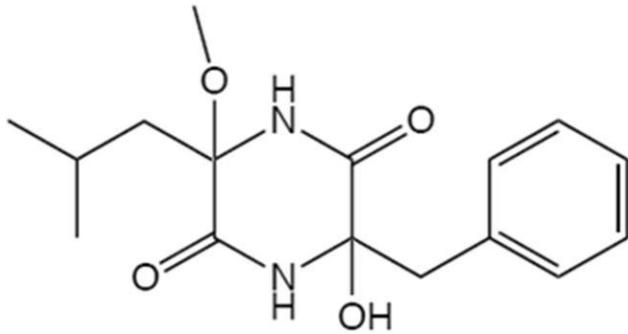
表3に示したように、トキソプラズマ感染群では、PBSを投与した場合には出産率が0%であったのに対し、MCFを投与した場合には出産率が66.7%であった。

【0100】

本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

<1> 下記構造式(1)で表される化合物又はその塩を含むことを特徴とする抗アピコンプレクサ類原虫剤である。

【化3】



構造式(1)

< 2 > 前記アピコンプレクサ類原虫が、グレガリナ類、コクシジウム類、住血胞子虫類、及びピロプラズマ類からなる群から選択されるいずれかである前記< 1 >に記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤である。

< 3 > 前記アピコンプレクサ類原虫が、コクシジウム類及び住血胞子虫類のいずれかである前記< 1 >から< 2 >のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤である。

< 4 > 前記アピコンプレクサ類原虫が、トキソプラズマ、マラリア原虫、及びネオスポラからなる群から選択されるいずれかである前記< 1 >から< 3 >のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤である。

< 5 > 前記< 1 >から< 4 >のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むことを特徴とするアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物である。

20

< 6 > 前記アピコンプレクサ類原虫感染症が、グレガリナ類、コクシジウム類、住血胞子虫類、及びピロプラズマ類からなる群から選択されるいずれかの原虫が感染することにより生じる感染症である前記< 5 >に記載の医薬組成物である。

< 7 > 前記アピコンプレクサ類原虫感染症が、コクシジウム類及び住血胞子虫類のいずれかが感染することにより生じる感染症である前記< 5 >から< 6 >のいずれかに記載の医薬組成物である。

< 8 > 前記アピコンプレクサ類原虫感染症が、トキソプラズマ症、マラリア、及びネオスポラ症からなる群から選択されるいずれかである前記< 5 >から< 7 >のいずれかに記載の医薬組成物である。

30

< 9 > 個体に、前記< 1 >から< 4 >のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を投与することを特徴とするアピコンプレクサ類原虫の増殖又は感染の抑制方法である。

< 10 > 個体に、前記< 5 >から< 8 >のいずれかに記載のアピコンプレクサ類原虫感染症に対する予防又は治療用医薬組成物を投与することを特徴とするアピコンプレクサ類原虫感染症の予防又は治療方法である。

< 11 > 前記< 1 >から< 4 >のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を含むことを特徴とする流産又は死産防止剤である。

< 12 > 個体に、前記< 1 >から< 4 >のいずれかに記載の抗アピコンプレクサ類原虫剤を投与することを特徴とする流産又は死産の防止方法である。

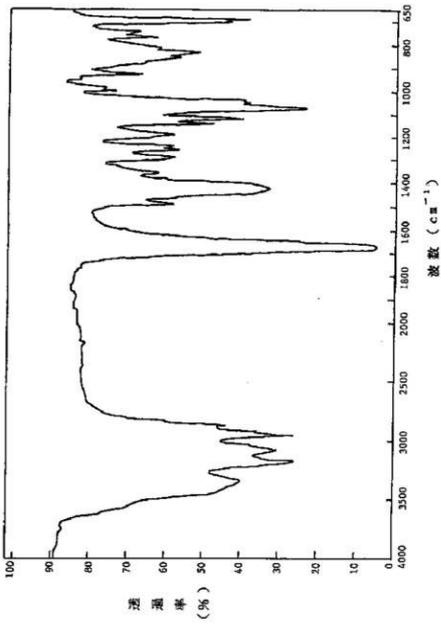
40

【受託番号】

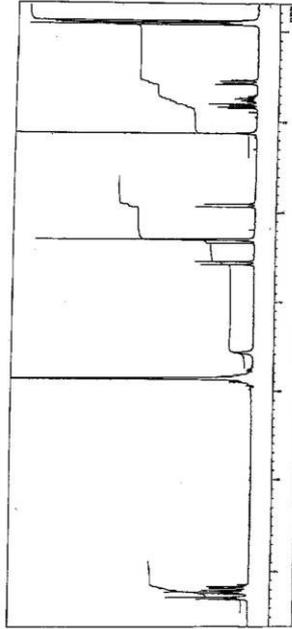
【0101】

N I T E P - 0 2 5 7 6

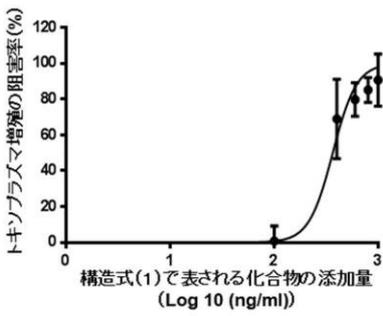
【図 1 A】



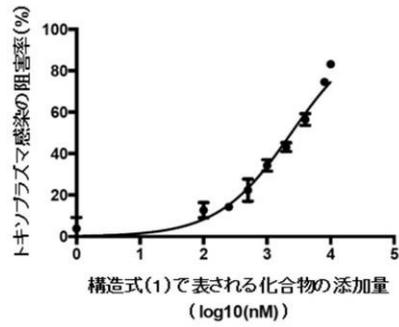
【図 1 B】



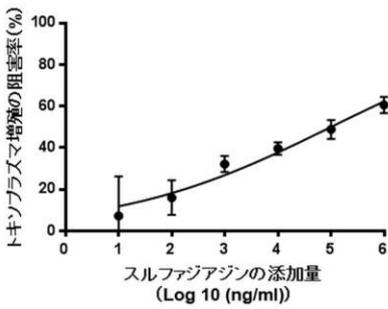
【図 2 A】



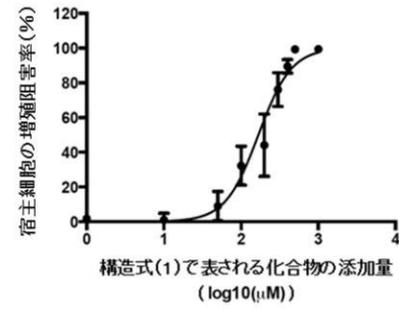
【図 2 C】



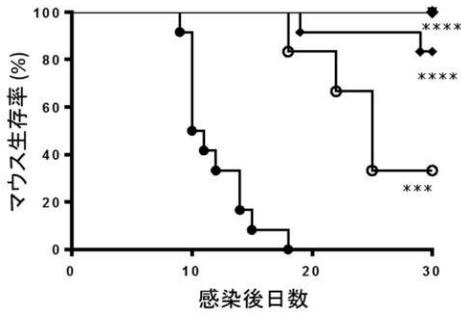
【図 2 B】



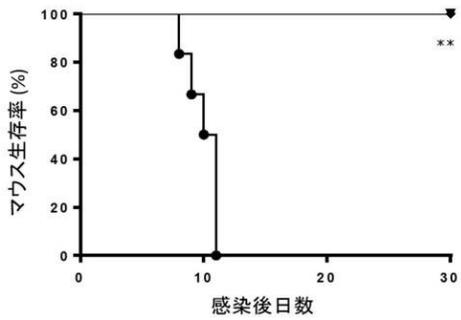
【図 3】



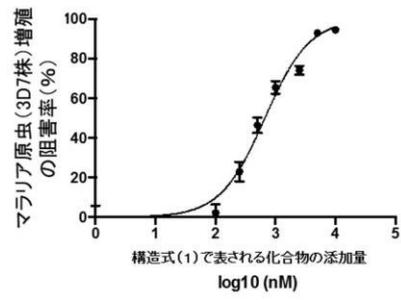
【 図 4 】



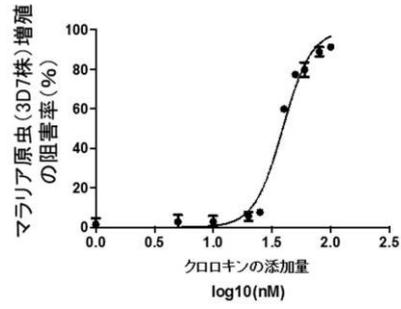
【 図 5 】



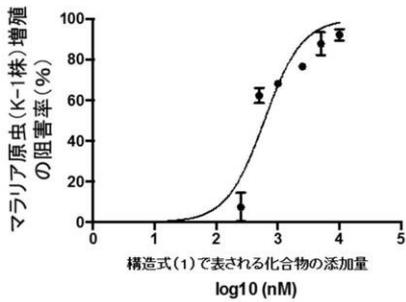
【 図 6 A 】



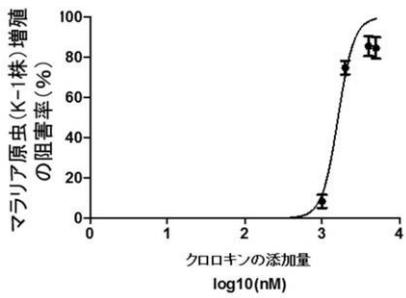
【 図 6 B 】



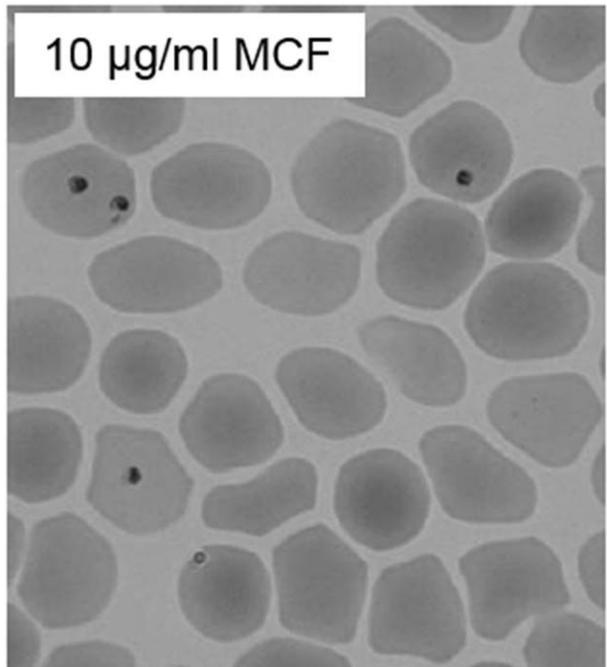
【 図 6 C 】



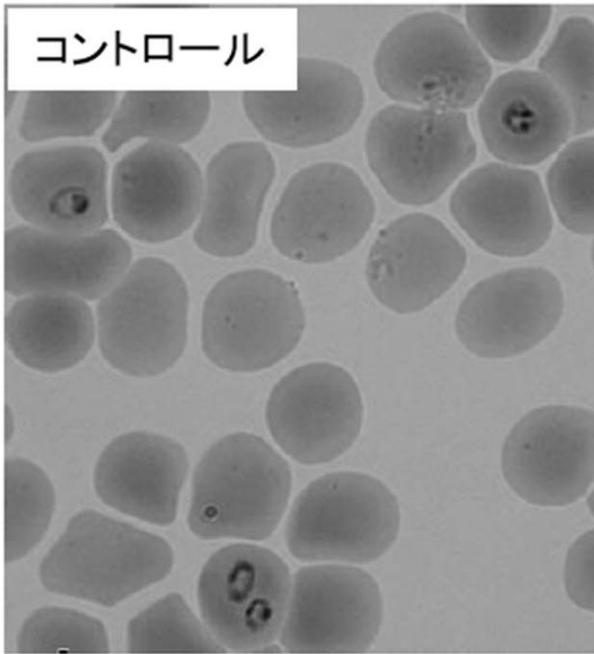
【 図 6 D 】



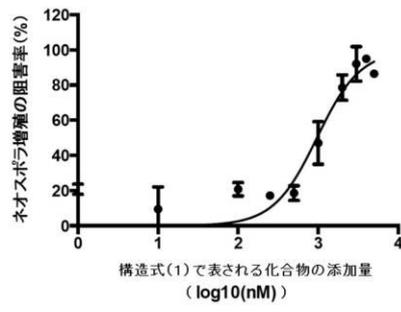
【 図 6 E 】



【図 6 F】



【図 7】



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 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/06	
	A 6 1 P 15/06	
	A 6 1 P 31/00	
	A 6 1 P 31/00	1 7 1

(72)発明者 西川 義文
北海道帯広市稲田町西2線13番地 国立大学法人帯広畜産大学 原虫病研究センター内

(72)発明者 二瓶 浩一
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 飯島 正富
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 一色 邦夫
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 大庭 俊一
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 土井 宏育
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 木村 智之
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 波多野 和樹
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 村松 秀行
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 五十嵐 雅之
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

(72)発明者 山崎 勝久
東京都品川区上大崎3丁目14番23号 公益財団法人微生物化学研究会内

Fターム(参考) 4C086 AA01 AA02 BC50 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZB31 ZB38 ZB39
ZC61 ZC64