

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2012年5月3日(03.05.2012)

PCT



(10) 国際公開番号

WO 2012/057294 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 31/4045 (2006.01) *A61P 33/06* (2006.01)
A61K 31/69 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2011/074876

(22) 国際出願日: 2011年10月27日(27.10.2011)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
61/407,679 2010年10月28日(28.10.2010) US

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). 国立大学法人帯広畜産大学(OBIHIRO UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND VETERINARY MEDICINE) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稻田町西2線11番地 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 御子柴 克彦(MIKOSHIBA, Katsuhiko) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 榎本 匡宏(ENOMOTO,

Masahiro) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 河津 信一郎(KAWAZU, Shin-ichiro) [JP/JP]; 〒0808555 北海道帯広市稻田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学 原虫病研究センター内 Hokkaido (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人原謙三(RIKEN PATENT & TRADEMARK) [JP]; 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

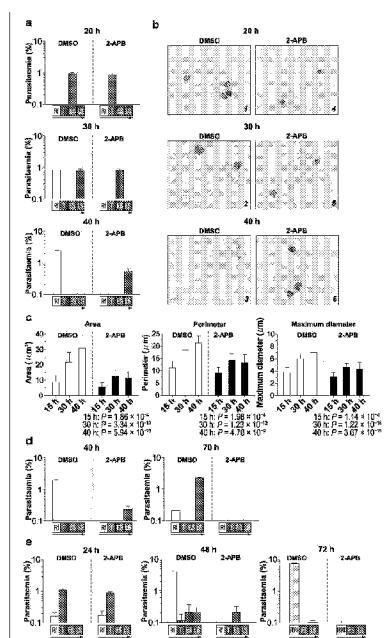
(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR TREATING MALARIA, METHOD FOR KILLING MALARIA PARASITE, AND USE OF THE METHODS

(54) 発明の名称: マラリアの治療方法、マラリア原虫の殺虫方法、及びその利用

[図4]



(57) Abstract: This method for treating malaria comprises a step of administering an therapeutically effective amount of a medicinal agent to a human body or an animal, wherein the medicinal agent can inhibit the export of calcium ions from a subcellular organelle to the outside of the organelle in a malarial parasite and/or can inhibit the transport of calcium ions from the outside of a cell into the cell in a malarial parasite.

(57) 要約: 本発明のマラリアの治療方法は、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を、ヒト又は動物に対して、治療有効量投与する工程を含む方法である。

ツバ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称 :

マラリアの治療方法、マラリア原虫の殺虫方法、及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、マラリアの新規な治療方法、マラリア原虫の新規な殺虫方法、及びその利用に関する。

背景技術

[0002] マラリアは、熱帯性の蚊であるハマダラカが媒介する原虫病の一つである。ハマダラカの体内に棲息するマラリア原虫は、ハマダラカの吸血行動の際にその口吻を介して、ヒト又は動物の体内に侵入する。

[0003] ヒト又は動物は、マラリア原虫にとっての中間宿主である。ヒト又は動物の体内に侵入したマラリア原虫は、はじめに肝臓細胞に集積して増殖する。次いで、増殖したマラリア原虫は、血管内に侵入した後に、赤血球内に侵入してさらなる増殖を繰返す。

[0004] マラリアの治療法は幾つか確立されたものが存在する。例えば、元々は天然由来成分であるキニーネはマラリアの特効薬として知られており、現在では化学合成により生産が可能である。或いは、キニーネからの派生物であるクロロキン、メフロキン等もマラリアの治療薬として知られている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Flavio H. Beraldo, Katsuhiko Mikoshiba and Celia R.S. Garcia; J. Pineal Res. 2007, 43: p360-364

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかし、キニーネの全合成の収率は、これまでの工程改良の努力にも関わらず一桁台に留まっており、収率が不十分という問題が解消されていない。さらに、キニーネは非常に副作用が強いという問題を有し、さらに薬剤耐性

の問題も生じ始めている。また、キニーネからの派生物であるクロロキンは、キニーネと比較して副作用は低減されているが、キニーネと同様に薬剤耐性の問題が生じ始めている。現在最も広汎に用いられている抗マラリア薬はアルテミシニン誘導体であり、耐性獲得を遅らせるためにWHOの推奨に従い、他の抗マラリア薬との合剤として使用されている。今後、アルテミシン誘導体に耐性を持つマラリア原虫が蔓延した場合、それに代わる特効薬が存在しないことが現在最も問題となっている。上記の問題に鑑み、新たなメカニズムに基づくマラリアの治療法及び治療薬の開発が切望されているという状況にある。

[0007] なお、マラリアの治療法及び治療薬の開発に結びつくか否かとは無関係に、ヒト又は動物の体内に侵入したマラリア原虫の生態を、メラトニンとの関係において解明する研究上のアプローチは様々行われている。例えば、非特許文献1には、ヒトのメラトニンが、ホスホリパーゼCの活性化を通じてマラリア原虫の概日周期を調整すること、及び、メラトニンを介したシグナル伝達系が、マラリア原虫の侵入、成熟、及び増殖に深く関与していることが記載されている。より具体的には、非特許文献1には、InsP₃ (IP₃) 受容体の調整物質であるジフェニルボリン酸2-アミノエチル (2-APB) をマラリア原虫に投与すると、メラトニンよりもたらされる細胞質内のカルシウムイオン濃度の増大が抑えられることが記載されている。加えて、非特許文献1の362頁右欄最終行～363頁左欄2行目等には、2-APB自身は、マラリア原虫におけるカルシウム放出の促進には何らの効果もないことが記載されている。

[0008] しかし、非特許文献1はマラリア原虫の生態の一端を解明するアプローチに過ぎず、マラリア原虫が死滅した等の結果も得られていないため、当該文献はマラリアの治療法及び治療薬の開発に示唆を与えるものではないのが現状である。

[0009] 本願発明は、上記の課題を解決するためになされたものであり、従来とは異なるメカニズムを利用したマラリアの治療方法、マラリア原虫の殺虫方法

、及びその利用を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

- [0010] 上記の課題を解決するために、本願発明者らは鋭意検討を行なった。その結果、マラリア原虫細胞質におけるカルシウムイオンの搬出（放出）及び／又は搬入（流入）を制御するという作用機序により、マラリア原虫の殺虫、及びマラリアの治療に極めて優れた効果があることを新たに見出し、本願発明を想到するに至った。
- [0011] すなわち、本発明にかかるマラリアの治療方法は、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を、ヒト又は動物に対して、治療有効量投与する工程を含む方法である。
- [0012] 本発明にかかるマラリア原虫の殺虫方法は、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を、マラリア原虫に対して、有効量供給する工程を含む方法である。
- [0013] 本発明にかかるマラリアの治療薬は、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を含んでいるものである。
- [0014] 本発明にかかるマラリアの治療薬候補のスクリーニング方法は、イン・ビトロでマラリア原虫を同調培養し、当該マラリア原虫の生育ステージが輪状体の段階から初期のシゾント段階の間において、スクリーニング対象となる薬剤を添加する第一工程と、次いで、上記薬剤の添加により、上記マラリア原虫の生育が抑制された、又はマラリア原虫が死滅した場合に、当該薬剤をマラリアの治療薬候補として選択する第二工程と、を含んでいる方法である。なお、スクリーニング対象となる薬剤を添加するタイミングは、より好ましくは輪状体の段階からトロホゾイトの段階の間であり、さらに好ましくは初期の輪状体又はトロホゾイトの段階であり、特に好ましくはトロホゾイト

の段階である。

- [0015] 本発明にかかるマラリアの治療薬候補のスクリーニング方法は、イン・ビトロで培養しているマラリア原虫に対して、スクリーニング対象となる薬剤を添加する第一工程と、次いで、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出量、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入量を測定する第二工程と、次いで、上記薬剤の添加により、カルシウムイオンの上記搬出量、及び／又は、搬入量が減少した場合に、当該薬剤をマラリアの治療薬候補として選択する第三工程と、を含んでいる方法である。
- [0016] 本発明にかかるマラリアへの二次感染の防止法は、マラリア原虫が感染した血液又は感染の虞がある血液であって、ヒト又は動物の体外に存在するものに対して、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を供給する工程を含む方法である。

発明の効果

- [0017] 本発明は、従来とは異なるメカニズムを利用したマラリアの治療方法、マラリア原虫の殺虫方法、及びその利用を提供することが出来るという効果を奏する。

図面の簡単な説明

- [0018] [図1]図1中の(a)は熱帯熱マラリア原虫の生活環を赤血球寄生ステージを中心に図示したものである。(b)～(k)は、初期の輪状体からシゾントの各段階における、熱帯熱マラリア原虫細胞内の蛍光Ca²⁺イメージングの結果を示す図である。図中の画像写真は蛍光Ca²⁺指示薬を導入した各段階の原虫の赤血球中の像を示す。(l)は、マラリア原虫の後期の輪状体、シゾント及びメロゾイトにおけるCa²⁺の周期的な変動の振幅の大きさに2-A-P-Bが与える影響を分析した結果を示す。

[図2]図2中の(a)及び(b)は、U73122で処理した初期の輪状体及びトロホゾイトの段階の熱帯熱マラリア原虫細胞内の蛍光Ca²⁺イメージン

グの結果を示す図であり、(c)及び(d)は、タブシガルギンで処理した初期の輪状体及びトロホゾイトの段階の熱帯熱マラリア原虫細胞内の蛍光C_a²⁺イメージングの結果を示す図であり、(e)及び(f)は、コンカナマイシンAで処理した初期の輪状体及びトロホゾイトの段階の熱帯熱マラリア原虫細胞内の蛍光C_a²⁺イメージングの結果を示す図である。

[図3]図3中の(a)・(b)はそれぞれ、灌流試験による、タブシガルギン、コンカナマイシンAで処理した初期の輪状体及びトロホゾイトの段階の熱帯熱マラリア原虫細胞内のC_a²⁺のイメージングの結果を示す図である。

[図4]図4は、2-APBによる、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育阻害の実験結果を示す図である。(a)は40時間にわたり同調培養を行った結果を示し、(b)は40時間にわたり同調培養を行った熱帯熱マラリア原虫の形態を示し、(c)はマラリア原虫細胞の占める面積、周囲長、及び最大直径の分析結果を示し、(d)は70時間にわたり同調培養を行った結果を示し、(e)は熱帯熱マラリア原虫のクロロキン耐性株へ2-APBを処置した結果を示す。

[図5]図5中の(a)・(b)はそれぞれ、2-APBで事前に処理した赤血球を用いた、熱帯熱マラリア原虫の同調培養開始後20時間、40時間の結果を示す図である。

[図6]図6は、異なる生育段階にある熱帯熱マラリア原虫の培養に対する、2-APBの効果を実験した結果を示す図である。(a)は培養開始時に2-APBを添加し、10時間後に2-APBを含まない培地に交換し、(b)は培養開始時に2-APBを添加し、21時間後に2-APBを含まない培地に交換し、(c)は培養開始後21時間のタイミングで2-APBを添加し、(e)は培養開始後28時間のタイミングで2-APBを添加し、(a)～(c)は培養開始後40時間、(e)は培養開始後45時間の結果を示す図である。(f)は、100μMの2-APBが、マラリア原虫細胞の占める面積、周囲長、及び最大直径に及ぼす影響を分析した結果を示す。

[図7]図7は、ルジンドール(LZ)による、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内

での生育阻害の実験結果を示す図である。（a）は20時間、（b）は40時間、（c）は70時間にわたり同調培養を行った結果を示す。

[図8]図8は、コントロール、及び2-APBで処置された熱帯熱マラリア原虫を電子顕微鏡で観察した様子を示す図であり、（a）はDMSOを投与後、30時間培養したものであり（コントロール群：オリジナル倍率×30,000）、（b）は100μMの2-APBを投与後、30時間培養したもの（オリジナル倍率×30,000）、（c）は100μMの2-APBを投与後、30時間培養したもの（オリジナル倍率×30,000）、（d）は100μMの2-APBを投与後、30時間培養したものであって、矢印で示す網目状小胞体構造が観察されるもの（オリジナル倍率×50,000）、（e）は100μMの2-APBを投与後、40時間培養したものであって、矢印で示す核膜(NE)がリボゾームの顆粒(Ri)に取り囲まれた構造が観察されるもの（オリジナル倍率×50,000）、（f）は100μMの2-APBを投与後、40時間培養したものであって、かん小体(Rh)及び他の微小オルガネラが観察されるもの（オリジナル倍率×50,000）、Nは核を、MPはマラリアピグメントを、MCはマウレル裂を示す。

[図9]図9は、2-APBが小胞体の構造に与える影響を示す図であり、DMSOの投与下（上側のパネル）、又は2-APBの投与下（下側のパネル）で30時間培養した熱帯熱マラリア原虫の核及び小胞体がHoechst 33342（青色）及びER-Tracker（赤）で同時に染色されたものを示し、右側にはHoechst 33342（青色）及びER-Tracker（赤）による染色結果の両方を併合した図（Merge）を示す。

[図10]図10は、赤血球内に寄生したマラリア原虫のクロロキン耐性株に関し、24時間にわたり同調培養を行い、100μMのDMSOを添加した群と、100μMの2-APBを添加した群との間で、マラリア原虫細胞の面積、周囲長、及び最大直径を観察した結果を示す。エラーバーは平均+ S.D. (n = 50)を示し、各パネルにP値を示す(two-tailed unpaired t検定)。

[図11]図11は、DMSOコントロール培養中におけるマラリア原虫を電子顕微鏡で観察した様子を示す図であり、(a)はアッセイ開始後30時間のものを(オリジナル倍率, ×30,000)、(b)は、(a)中でアステリスクで示した部位をより高倍率で示すものを(オリジナル倍率, ×80,000)、(c)は、アッセイ開始後30時間のものを(オリジナル倍率, ×20,000)、(d)は、(c)中でアステリスクで示した部位をより高倍率で示すものを(オリジナル倍率, ×80,000)示し、Nは核を示し、NEは核膜(nuclear envelope)を示し、Riはリボソームを示し、Rhはかん小体(rhoptry)を示す。

[図12]図12は、各シゾント中のメロゾイト数に対する2-APBの影響を示す図であり、(a)は、DMSO(白いボックス)または2-APB(塗りつぶしボックス)の共存下で熱帯熱マラリア原虫を40時間培養をした場合の、各シゾント(S)中に形成されたメロゾイト(M)の数をボックスプロットで示すものである。真ん中に位置する長方形は第一クォンタイル(quantile)から第三クォンタイルまでの範囲に相当し、長方形内のセグメントは中央値(median)を示し、各ボックスの上下のひげは最小値と最大値とを示す。(b)は(a)のデータをヒストグラムで表した図である。

発明を実施するための形態

[0019] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[0020] [1. マラリアの治療方法]

(治療方法の概要)

本発明にかかるマラリアの治療方法は、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤（以下「Ca輸送抑制剤」と総称する）を、ヒト又は動物に対して、治療有効量投与する工程を含む方法である。

[0021] 本発明の治療方法は、従来のマラリア治療薬とは全く異なるメカニズムを利用した新規な治療方法である。そのため、キニーネ又はクロロキン等、従

来のマラリア治療薬では薬剤耐性が生じたマラリア原虫による感染の治療にも有効である。また、有効成分として用いられるCa輸送抑制剤は、合成が容易な化合物からも選択可能であり、その場合は、安価かつ大量な供給也可能である。さらに、当該Ca輸送抑制剤は、治療対象となるヒト又は動物に対する副作用が比較的弱いものからも適宜選択可能であるという利点を有する。

[0022] マラリア原虫において、上記カルシウムイオンの能動的な搬出又は搬入は、主に、カルシウムイオンチャネル型受容体と総称される受容体群により行われると推定される。本発明者らは、後述する実施例に示すように、ヒトメラトニン受容体の阻害剤、ヒトイノシトール三リン酸受容体の阻害剤、及び、イノシトール三リン酸（イノシトール1,4,5-三リン酸）と特異的な結合活性を有する化合物、を夫々別々にマラリア原虫に投与することによって、何れの場合もマラリア原虫が死滅したという事実に基づき本発明をなすに至っている。これら三種類の阻害剤等は、ヒトにおいて、イノシトール三リン酸受容体を介した一連のシグナル伝達系を阻害し、細胞におけるカルシウムイオンの放出又は流入を制御する。また、上記薬剤においては、マラリア原虫の輪状体及び／又はトロホゾイトにおける、細胞内小器官内から細胞内外小器官へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入を特に阻害するものであることが好ましいことを見出した。よって、マラリア原虫も、ヒトと同様のシグナル伝達系を備えることが示唆される。

[0023] とりわけ、ヒトイノシトール三リン酸受容体の阻害剤等又はイノシトール三リン酸と特異的な結合活性を有するペプチド等の化合物を用いて、マラリア原虫をイノシトール三リン酸が欠乏した状態において、マラリア原虫が死滅したという事実は、マラリア原虫においてイノシトール三リン酸の受容体が存在するという事実を示唆する。なお、マラリア原虫のゲノム配列中には、ヒトイノシトール三リン酸受容体と相同性を示す配列はこれまで知られていない。

[0024] なお、ヒトにおいて、イノシトールミリン酸受容体は、細胞小器官である小胞体のみならず、核及び細胞膜にも存在して、細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの能動的な搬入、或いは、細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの能動的な搬出に寄与することが知られている。この中で、とりわけ本発明にとって重要性の高い機能は、細胞内小器官である小胞体内から小胞体外（細胞質）へのカルシウムイオンの搬出であり、また、マラリア原虫の輪状体及び／又はトロホゾイトにおける、細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出を特に阻害するものであることが好ましい。

[0025] (マラリアの治療とは)

本発明において治療の対象となるマラリアは、*Plasmodium*属マラリア原虫がヒト又は動物に感染している状態を広く指し、ヒト又は動物において、マラリアに特有の症状が顕在化している状態はもちろん、当該症状が顕在化する以前の状態も含む概念である。なお、マラリアに特有の症状とは、特に限定されないが、頭痛、倦怠感、貧血、脾腫、ならびに、亜寒期、灼熱期及び発汗期を伴う発熱発作等の症状が挙げられる。

[0026] 本発明において治療とは、何らの措置をしない場合と比較して、ヒト又は動物内におけるマラリア原虫の活動を抑制することを指し、好ましくはマラリア原虫を死滅させることを指す。治療の一つの側面には、マラリアに関連する少なくとも1つの症状を軽減又は緩和すること、例えば、頭痛、倦怠感、貧血、脾腫、ならびに亜寒期、灼熱期及び発汗期を伴う発熱発作の軽減又は緩和することが含まれる。

[0027] (治療対象となるヒト又は動物)

治療対象は、マラリア原虫の宿主となっているヒト又は動物であり、より具体的には、マラリア原虫が寄生可能なことが知られた爬虫類、鳥類、及びヒトを含む哺乳類からなる群より選択される何れかである。中でも、哺乳類に対して特に好適に本発明の治療方法が適用される。治療対象となる哺乳類の種類は特に限定されないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ヒト

を除く霊長類等の実験動物；イヌ、ネコ等の愛玩動物（ペット）；ウシ、ウマ等の家畜；ヒト；が挙げられ、特に好ましくはヒトである。

[0028] ヒト又は動物に対する、マラリア原虫の感染ルートは特に限定されず、例えば、ハマダラカ属の蚊に刺された伝染、マラリア原虫を含む血液（感染血）を輸血、胎盤経由の母子感染、及び注射針を介した感染、等が挙げられる。

[0029] （マラリア原虫の種類、生育段階）

治療及び殺虫の対象となるマラリア原虫の種類は、上記ヒト又は動物に寄生可能なマラリア原虫であれば特に限定されない。ヒトに感染可能なマラリア原虫として、例えば、熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、卵型マラリア原虫 (*P. ovale*)、及び *P. knowlesi* の5種が代表的なものとして挙げられる。また、*P. cynomolgi*など、サルマラリア原虫として知られるマラリア原虫についても、将来的にヒトへの感染が報告される可能性が高いものとして重要なである。

[0030] 治療及び殺虫の対象となるマラリア原虫の成育段階は特に限定されるものではない。しかし、治療及び殺虫効果を最大化するためには、生育ステージが輪状体から初期のシゾントの間である、赤血球内にいるマラリア原虫を対象として、治療及び殺虫を行うことが好ましい場合がある。また、生育ステージが輪状体からトロホゾイトの間である、赤血球内にいるマラリア原虫を対象として、治療及び殺虫を行うことがより好ましい場合があり、生育ステージが初期の輪状体又はトロホゾイトであるマラリア原虫を対象とすることが特に好ましい場合があり、生育ステージがトロホゾイトであるマラリア原虫を対象とすることが最も好ましい場合がある。

[0031] （有効成分としてのC a 輸送抑制剤）

本発明にかかるマラリアの治療方法では、C a 輸送抑制剤を、マラリア治療の有効成分として使用する。ここで、C a 輸送抑制剤は、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又

は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する機能を有する化合物であれば特に限定されずに使用可能である。Ca輸送抑制剤は、好ましくは、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの能動的な搬出を抑制する機能を有する化合物から選択され、さらに好ましくは、上記抑制剤は、マラリア原虫の輪状体及び／又はトロホゾイトにおける、細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出を特に阻害するものである。ここで、細胞内小器官とは、例えば、マラリア原虫の小胞体が意図される。

[0032] マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの能動的な搬出を抑制する機能を有する化合物としては、例えば、(1)メラトニンに対する阻害剤、マラリア原虫におけるメラトニンのホモログに対する阻害剤、メラトニン受容体に対する阻害剤、又は、マラリア原虫におけるメラトニン受容体のホモログに対する阻害剤、(2)イノシトール三リン酸受容体に対する阻害剤、又はマラリア原虫におけるイノシトール三リン酸受容体のホモログに対する阻害剤、或いは、(3)イノシトール三リン酸と特異的な結合活性を有する化合物、ペプチド、又は当該ペプチドをコードする核酸が挙げられる。これら、(1)～(3)に挙げる阻害剤等は何れも、イノシトール三リン酸誘導型のカルシウム搬出（放出）を抑制する作用を有する。

[0033] ここで、イノシトール三リン酸誘導型のカルシウム搬出とは、生体において、メラトニン又はそのホモログがイノシトール三リン酸の産生を誘導し、次いで、イノシトール三リン酸がトリガーとなりカルシウムイオン（2価）の搬出が誘導されるという生理的な現象を指す。イノシトール三リン酸は、一般的には、カルシウムイオンチャネル型受容体として機能するイノシトール三リン酸受容体又はそのホモログに結合することで、カルシウムイオンの搬出を誘導する。

[0034] 上記メラトニンに対する阻害剤、マラリア原虫におけるメラトニンのホモログに対する阻害剤、メラトニン受容体に対する阻害剤、又は、マラリア原

虫におけるメラトニン受容体のホモログに対する阻害剤は、何れも、メラトニン又はそのホモログが、対応する受容体（メラトニン受容体又はメラトニン受容体のホモログ）に結合することを妨げて、下流側へのシグナル伝達を遮断又は抑制するものであれば特に限定されない。

- [0035] メラトニン受容体に対する阻害剤、又はマラリア原虫におけるメラトニン受容体のホモログに対する阻害剤の具体例は特に限定されないが、例えば、ヒトメラトニン受容体のモジュレーター又はアンタゴニスト等、或いは、メラトニンと構造が類似した生理活性物質であるセロトニンアゴニスト、セロトニンアンタゴニスト等が挙げられ、中でも、ルジンドール、4P-ADOT、4P-P DOT、等が好適なものとして挙げられる。
- [0036] メラトニンに対する阻害剤、又はマラリア原虫におけるメラトニンのホモログに対する阻害剤の具体例は特に限定されないが、例えば、メラトニン又はそのホモログと特異的な結合活性を有する化合物、ペプチド、又は当該ペプチドをコードする核酸等が挙げられる。ここで、メラトニン又はそのホモログと特異的な結合活性を有するペプチドの一例は、メラトニン受容体又はそのホモログが有する、メラトニン（又はそのホモログ）結合ドメインを構成するペプチドである。
- [0037] なお、ここで、単にメラトニン又はメラトニン受容体と称する場合、由来する動物種（ヒトを含む）は、マラリア原虫を除く全ての動物種が意図され、特に治療対象となるヒト又は動物が意図される。また、ここで、メラトニンのホモログ、又はメラトニン受容体のホモログとは、マラリア原虫由來のものが意図される。
- [0038] 上記イノシトールミリン酸受容体に対する阻害剤、又はマラリア原虫におけるイノシトールミリン酸受容体のホモログに対する阻害剤の具体例は特に限定されないが、参照として組み込まれる日本国公開特許公報：特開2007-169272に記載の化合物群（ヒトイノシトールミリン酸受容体のモジュレーター、アンタゴニスト）が挙げられる。中でも、ジフェニルボリニ酸2-アミノエチル（2-APB）、ヘパリン（heparin）、ゼストスポンジ

ンC (Xestospongin C) 等がより好ましい。これらの阻害剤は、何れも、イノシトール三リン酸が、対応する受容体（イノシトール三リン酸受容体又はそのホモログ）に結合することを妨げて、下流側へのシグナル伝達を遮断又は抑制するものである。

[0039] イノシトール三リン酸と特異的な結合活性を有する化合物、ペプチド、及び当該ペプチドをコードする核酸の具体例は特に限定されないが、参照として組み込まれる米国特許 6 4 6 5 2 1 1 及び 7 0 4 1 4 4 0 (対応日本特許出願：特開 2000-135095 参照) に記載のイノシトール三リン酸高親和性ポリペプチド、及び当該ペプチドをコードする核酸が挙げられる。中でも、配列番号 1 で示すアミノ酸配列からなるペプチド、及び当該ペプチドをコードする配列番号 2 で示す塩基配列をもつ核酸を含むものがより好ましい。また、当該ペプチドは、イノシトール三リン酸と特異的な結合活性を有するという機能が損われない限り、配列番号 1 で示すアミノ酸配列からなるペプチドに対して 80% 以上、好ましくは 90% 以上、特に好ましくは 95% 以上の配列相同性を有するペプチドであっても良い。また、当業者であれば、上記ペプチドをコードする塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列によりコードされるペプチドを適宜使用することもできる。なお、ストリンジエントな条件下とは、例えば 60°C、1 × SSC、0.1% SDS、好ましくは 0.1 × SSC、0.1% SDS、に相当する塩濃度で、1 回好ましくは 2 ~ 3 回洗浄する条件を挙げることができる。これらの化合物又はペプチドは、何れも、イノシトール三リン酸が、対応する受容体（イノシトール三リン酸受容体又はそのホモログ）に結合することを妨げて、下流側へのシグナル伝達を遮断又は抑制するものである。

[0040] なお、上記ペプチドは、例えば、N 末端側に GST tag を付与して哺乳類細胞内での発現をより安定化することもできる。配列番号 3 で示すアミノ酸配列からなるペプチドは、配列番号 1 で示すアミノ酸配列からなるペプチドの N 末端側にリンカ一配列と GST tag とを付与した配列に相当する。また、配列番

号4で示す塩基配列をもつ核酸は、配列番号3で示すアミノ酸配列からなるペプチドをコードするものである。

[0041] なお、ここで、単にイノシトール三リン酸受容体と称する場合、由来する動物種（ヒトを含む）は、マラリア原虫を除く全ての動物種が意図され、特に治療対象となるヒト又は動物が意図される。また、ここで、イノシトール三リン酸受容体のホモログとは、マラリア原虫由来のものが意図される。

[0042] なお、より直接的かつ効果的な治療効果を得るという観点では、メラトニン及びイノシトール三リン酸が関わるシグナル伝達系のより下流側において、シグナル伝達を遮断又は抑制することが好ましい場合がある。すなわち、イノシトール三リン酸受容体に対する阻害剤、又はマラリア原虫におけるイノシトール三リン酸受容体のホモログに対する阻害剤がより好ましい場合がある。

[0043] また、治療対象となるヒト又は動物へ実質的に影響を及ぼさないという観点では、Ca輸送抑制剤は、マラリア原虫におけるメラトニンのホモログに特異的に作用する阻害剤、マラリア原虫におけるメラトニン受容体のホモログに特異的に作用する阻害剤、又は、マラリア原虫におけるイノシトール三リン酸受容体のホモログに特異的に作用する阻害剤、から選択されることが好ましい場合がある。ただし、メラトニン及びイノシトール三リン酸が関わるシグナル伝達系を一時的に遮断又は抑制しても、ヒト又は動物に致命的な影響を与えることはない。

[0044] (投与方法・用量)

本発明にかかるマラリアの治療方法は、上記Ca輸送抑制剤の少なくとも一種を、マラリア原虫が感染しているヒト又は動物に対して、治療有効量投与する工程を含む。ここで、Ca輸送抑制剤は、当該剤のみを単独で投与してもよく、又は、投与の目的に適した薬学的組成物の一構成成分として投与してもよい。

[0045] 上記Ca輸送抑制剤の投与方法は特に限定されず、経口投与、静脈内又は動脈内への血管内投与、腸内投与といった手法により全身投与されてもよく

、経皮投与、舌下投与といった手法により局所投与されてもよい。好ましい一つの投与態様では、血管系（赤血球内）に棲息するマラリア原虫に作用を及ぼすために、C a 輸送抑制剤は、静脈内投与又は動脈内投与によって全身投与される。好ましい他の投与態様では、投与の容易さ等の観点で優れるため、経口投与される。

- [0046] 上記C a 輸送抑制剤の投与量（治療有効量）は、投与対象となる上記ヒト又は動物の年齢、性別、症状、投与経路、投与回数等に応じて適宜設定すればよい。また、必要であれば、C a 輸送抑制剤を用いたインビボアッセイを事前に行い、過度の実験を要することなく上記投与量を決定することができる。
- [0047] 例えば、上記C a 輸送抑制剤がいわゆる低分子化合物である場合、上記投与量の好ましい一例は、ヒト又は動物のキログラム体重あたり、0. 5 m g 以上で20 m g 以下の範囲内であり、0. 5 m g 以上で10 m g 以下の範囲内であり、1 m g 以上で5 m g 以下の範囲内である。
- [0048] 上記C a 輸送抑制剤の投与回数も治療効果が得られる限り特に限定されず、例えば、C a 輸送抑制剤の種類、上記投与量、投与経路、症状、ヒト又は動物の年齢や性別に応じて適宜設定すればよい。
- [0049] 上記C a 輸送抑制剤の投与タイミングも、治療効果が得られる限り特に限定されないが、治療効果を最大化するために、マラリア原虫の生育ステージに応じて決定することが好ましい場合がある。より具体的には、上記マラリア原虫がヒト又は動物の赤血球内に存在し、かつその生育ステージが輪状体から初期のシゾントの間に、C a 輸送抑制剤の血中濃度が治療有効量となるように、上記薬剤の投与タイミングが決定されることがより好ましい場合がある。さらに好ましくは、マラリア原虫の生育ステージが輪状体からトロホゾイトの間に、C a 輸送抑制剤の血中濃度が治療有効量となるタイミングで投与され、特に好ましくは、マラリア原虫の生育ステージが初期の輪状体又はトロホゾイトの間に、C a 輸送抑制剤の血中濃度が治療有効量となるタイミングで投与され、最も好ましくは生育ステージがトロホゾイトの間にC a

輸送抑制剤の血中濃度が治療有効量となるタイミングで投与される。

- [0050] なお、ヒト又は動物に対して、マラリア原虫の感染前のタイミングで C a 輸送抑制剤が投与される、いわゆる予防投与のような投与形態も、本発明の治療方法の範疇に含まれる。すなわち、ヒト又は動物にマラリア原虫が感染する前に、C a 輸送抑制剤の血中濃度が治療有効量以上に保たれた状態にし、マラリア原虫が感染した際に治療効果を奏するという態様である。
- [0051] また、薬剤の投与と同時に、又は先立って、ヒト又は動物の体内に寄生したマラリア原虫の生育ステージを同調させてもよい。生育ステージの同調は、例えば、ヒト又は動物の体内にメラトニンを投与する等の方法で行いうる。
- [0052] なお、ヒト又は動物におけるマラリア原虫の生育ステージは、当業者であれば容易に把握することができる。当該生育ステージを把握する方法の一例は、赤血球の薄層塗抹を調製して、ギムザ染色法等の方法で染色した後に、マラリア原虫を顕微鏡観察する方法が挙げられる。マラリア原虫の生育に周期性が見られる場合には、一度、生育ステージを確認しておけば、所定時間経過後の生育ステージも予見可能となる。
- [0053] また、必要に応じてインビボアッセイ等を行うことにより、ヒト又は動物における C a 輸送抑制剤の血中濃度、より具体的には、C a 輸送抑制剤の投与量、投与タイミング及びその血中濃度の関係も、当業者であれば容易に把握することができる。

[0054] (併用療法)

本発明に係るマラリアの治療方法は、キニーネ、クロロキン、メフロキン、アルテミシニン誘導体等の、本発明に係る以外のマラリア治療方法と組合せてもよい(併用療法)。本発明に係るマラリアの治療方法は、従来のマラリア治療薬とは異なるメカニズムを利用した新規な治療方法である。それゆえ、本併用療法を採用すれば、従来治療法との間で相乗的な治療効果を示し、治療成績が飛躍的に向上することが期待される。また、アルテミシニン誘導体と組合せることにより、マラリア原虫の耐性獲得を遅らせることができ

るという効果も期待される。

[0055] [2. マラリアの殺虫方法]

本発明に係るマラリア原虫の殺虫方法は、上記C a 輸送抑制剤を、マラリア原虫に対して、「有効量」供給する工程を含む方法である。

[0056] ここで、「有効量」とは、マラリア原虫を死滅させることが出来る量を意図しており、上記薬剤が投与されるマラリア原虫の棲息環境等の条件に応じて、当業者により適宜設定される。

[0057] マラリア原虫の殺虫方法の応用例としては、マラリア原虫の感染が判明した又は感染の虞がある血液に対して上記C a 輸送抑制剤を供給することで、マラリアへの二次感染リスクを抑制することが挙げられる。例えば、上記の血液とは、特に限定されないが、献血活動において回収した血液、輸血用血液、野外活動（交通事故等を含む）における流血、医療現場における流血等、ヒト又は動物の体外に取り出された血液も意図した概念である。

[0058] なお、マラリア原虫の殺虫効果を確認する方法の一例は、赤血球の薄層塗抹を調製して、ギムザ染色法等の方法で染色した後に、マラリア原虫を顕微鏡観察する方法が挙げられる。

[0059] その他、本殺虫方法が適用される、マラリア原虫の種類、生育段階等については、上記した〔1. マラリアの治療方法〕の欄の記載を、そのまま参照可能である。

[0060] [3. マラリアの治療薬]

本発明に係るマラリアの治療薬は、上記C a 輸送抑制剤を含むものである。

[0061] マラリアの治療薬は、上記C a 輸送抑制剤のみから構成されるものでもよく、又は、上記C a 輸送抑制剤を一構成成分として含む薬学的組成物として構成されるものであってもよい。

[0062] 上記薬学的組成物を構成するC a 輸送抑制剤以外の成分は特に限定されず、例えば、薬学的に許容される担体、潤滑剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧調整用の塩類、緩衝剤、着色剤、香味料、甘味料、抗酸化剤、

粘度調整剤、等と混合することができる。また、必要に応じて、キニーネ、クロロキン、メフロキン、アルテミシニン誘導体等のマラリア治療薬を、上記薬学的組成物の一構成として加えて複合剤を構成してもよい。

- [0063] 上記薬学的に許容される担体は、特に限定されないが、担体であって、C_a輸送抑制剤と同時投与された場合にC_a輸送抑制剤の機能（マラリアの治療）を阻害せず、かつ、治療薬の投与対象となるヒト又は動物に対して実質的な悪影響を及ぼさないという性質を備えることが好ましい。
- [0064] 上記担体としては、この分野で従来公知のものを広く使用でき、具体的には、例えば、水、各種塩溶液、アルコール、植物油、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、パラフィン、脂肪酸モノグリセリド、脂肪酸ジグリセリド、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等が挙げられるが、特にこれらに限定されない。担体の種類は、薬学的組成物の剤型、薬学的組成物の投与方法、等に応じて、適宜選択すればよい。
- [0065] 上記薬学的組成物の剤型も特に限定されず、例えば、錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤等が挙げられ、好ましくは注射剤、又は経口投与用の剤型である。例えば、携帯性及び投与の容易さ等の観点では、錠剤等の経口投与の剤型が好ましく、所定のタイミングでC_a輸送抑制剤の血中濃度を所定の範囲内に制御することがより容易という観点では注射剤が好ましい。
- [0066] また、本発明におけるマラリアの治療薬は、遺伝子治療剤でありえる。より具体的には、例えば、1) イノシトール三リン酸と特異的な結合活性を有するペプチドをコードする核酸、又は、2) メラトニン又はそのホモログと特異的な結合活性を有するペプチドをコードする核酸、の少なくとも一方を治療有効成分として含むものが挙げられる。
- [0067] 上記遺伝子治療剤は、上記治療有効成分たる核酸を、注射によりヒト又は動物に直接投与する形態のものであってもよく、或いは、上記治療有効成分たる核酸が組み込まれたベクターを、注射によりヒト又は動物に直接投与す

る形態のものであってもよい。また、上記ベクターは、特に限定されないが、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター等、遺伝子治療に適用可能なベクターが挙げられる。なお、上記遺伝子治療剤はリポソーム製剤であってもよい。

[0068] 上記遺伝子治療剤を構成する上記ベクターには、上記ペプチドをコードする核酸をマラリア原虫に特異的に発現させる発現調節配列が組み込まれていることが好ましい。ここで、発現調節配列とは、例えば、プロモータ又はエンハンサであり、より具体的には、マラリア由来のカルモジュリンのプロモータ配列、及びヒートショックタンパク質86（HSP86）のプロモータ配列、等が挙げられる。

[0069] なお、「核酸をマラリア原虫に特異的に発現させる」とは、治療対象となるヒト又は動物では当該核酸が実質的に発現せず、マラリア原虫内でのみ当該核酸が発現する状態を指し、これによりマラリア原虫に選択的に遺伝子治療剤の効果を及ぼすことができる。

[0070] その他、本発明の治療剤に関しては、上記した〔1. マラリアの治疗方法〕の欄の記載を、そのまま参考可能である。

[0071] [4. マラリアの治療薬候補のスクリーニング方法]

本発明に係るマラリアの治療薬候補のスクリーニング方法（1）は、イン・ビトロでマラリア原虫を同調培養し、当該マラリア原虫の生育ステージが輪状体の段階から初期のシゾント段階の間において、スクリーニング対象となる薬剤を添加する第一工程と、次いで、上記薬剤の添加により、上記マラリア原虫の生育が抑制された、又はマラリア原虫が死滅した場合に、当該薬剤をマラリアの治療薬候補として選択する第二工程と、を含む方法である。

[0072] なお、スクリーニング対象となる薬剤を添加する第一工程は、マラリア原虫の生育ステージが輪状体の段階からトロホゾイトの段階の間に行なうことが好ましく、初期の輪状体の段階又はトロホゾイトの段階に行なうことがより好ましく、トロホゾイトの段階に行なうことが特に好ましい。

- [0073] 上記方法（1）は、「マラリア原虫が、輪状体の段階から初期のシゾント段階にある場合に、メラトニン及びイノシトールミリン酸の双方が関与するカルシウム振動を抑制可能な剤を投与すれば、マラリア原虫が死滅する」との知見に基づく方法であり、従来とは異なる作用機序を示す治療薬候補のスクリーニングを可能とする。
- [0074] なお、上記第一工程における同調培養の方法、及びマラリア原虫の生育ステージを確認する方法は特に限定されず、例えば、後述する実施例に記載の方法を採用すればよい。
- [0075] また、本発明に係るマラリアの治療薬候補のスクリーニング方法（2）は、イン・ビトロで培養しているマラリア原虫に対して、スクリーニング対象となる薬剤を添加する第一工程と、次いで、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出量、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入量を測定する第二工程と、次いで、上記薬剤の添加により、カルシウムイオンの上記搬出量、及び／又は、搬入量が減少した場合に、当該薬剤をマラリアの治療薬候補として選択する第三工程と、を含む方法である。
- [0076] 上記方法（2）は、「メラトニン及びイノシトールミリン酸の双方が関与するカルシウム振動を抑制可能な剤を投与すれば、マラリア原虫が死滅する」との知見に基づく方法であり、従来とは異なる作用機序を示す治療薬候補のスクリーニングを可能とする。
- [0077] なお、上記第二工程におけるカルシウムイオンの搬出量及び搬入量の測定の方法は特に限定されず、例えば、後述する実施例に記載の方法を採用すればよい。
- [0078] 上記スクリーニング方法（1）及び（2）は、マラリアの殺虫剤候補のスクリーニング方法と捉えることもできる。
- [0079] [5. 本発明に係る治療方法に関する諸態様]
本発明に係る治療方法において、上記薬剤は、上記細胞内小器官としての小胞体内から小胞体外へのカルシウムイオンの搬出を抑制するものであるこ

とが好ましい。

- [0080] 本発明に係る治療法において、上記薬剤は、マラリア原虫の輪状体及び／又はトロホゾイトにおける、細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入を阻害するものであることが好ましい。
- [0081] 本発明に係る治疗方法において、上記薬剤が、メラトニンに対する阻害剤、マラリア原虫におけるメラトニンのホモログに対する阻害剤、メラトニン受容体に対する阻害剤、又は、マラリア原虫におけるメラトニン受容体のホモログに対する阻害剤を含んでいることが好ましい。
- [0082] 本発明に係る治疗方法において、上記薬剤が、イノシトールミリン酸受容体に対する阻害剤、又はマラリア原虫におけるイノシトールミリン酸受容体のホモログに対する阻害剤を含んでいることが好ましい。
- [0083] 本発明に係る治疗方法において、上記薬剤が、イノシトールミリン酸と特異的な結合活性を有する化合物、ペプチド、又は当該ペプチドをコードする核酸を含んでいることが好ましい。また、上記薬剤が、配列番号1に示すペプチドを上記ペプチドとして含んでいることがより好ましい。また、上記薬剤は、イノシトールミリン酸と特異的な結合活性を有するという機能が損われない限り配列番号1に示すペプチドに対して80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の配列相同性を有するペプチドを含むものであっても良い。また、当業者であれば、上記薬剤に含まれるペプチドとして、上記ペプチドをコードする塩基配列に相補的な配列、又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列にコードされるペプチドを適宜使用することもできる。なお、ストリンジェントな条件下とは、例えば60°C、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは0.1×SSC、0.1% SDS、に相当する塩濃度で、1回好ましくは2～3回洗浄する条件を挙げることができる。また、上記薬剤が、上記ペプチドをコードする核酸と、当該核酸に連結され当該核酸をマラリア原虫に特異的に発現させる発現調節配列と、を含むベクターからなることがさらに好ましい。

[0084] 本発明に係る治療方法において、上記薬剤の投与タイミングが、上記ヒト又は動物におけるマラリア原虫の生育ステージに応じて決定されることが好ましい。また、上記ヒト又は動物におけるマラリア原虫の生育ステージが輪状体の段階から初期のシゾント段階の間に、当該薬剤の血中濃度が治療有効量となるように、上記薬剤の投与タイミングが決定されることがより好ましく、さらに好ましくは輪状体の段階からトロホゾイトの段階の間に、特に好ましくは初期の輪状体の段階又はトロホゾイトの段階に、最も好ましくはトロホゾイトの段階に、上記薬剤の血中濃度が治療有効量となるように投与タイミングが決定される。

実施例

[0085] 本発明について、以下の実施例等に基づいてより具体的に説明するが、本発明はこれに限定されない。

[0086] [材料及び方法]

初めに、実施例に共通する材料及び方法について、以下に説明する。

[0087] (1) 热帯热マラリア原虫 (*P. falciparum*) の培養

Plasmodium falciparum (*P. falciparum*) の F C R – 3 株 (参照文献 : Hat abu T, Takada T, Taguchi N, Suzuki M, Sato K, Kano S. (2005) Antimicrob Agents Chemother. 2005 Feb;49(2):493-6.) を、Trager and Jensen の方法 (参照文献 : Trager, W. & Jensen, J. B. (1976) Science 193, 673-675.) に従い、RPMI 培地 (Invitrogen社/GIBCO社) 中で培養した。F C R - 3 株は、媒虫体 (メロゾイト) の赤血球侵入から、輪状体 (リング型) の形成、栄養体 (トロホゾイト) の形成、分裂体 (シゾント) の形成、成熟メロゾイトの放出と当該成熟メロゾイトの赤血球侵入までの発育・増殖の 1 サイクルが約 40 時間の株である。なお、培養に際して、RPMI 培地には、0.5 重量% の AlubumaxI (Invitrogen社)、25 mM の HEPES、24 mM の炭酸水素ナトリウム、0.5 g/L の L-グルタミン、50 mg/L のヒポキサンチン、25 μg/mL のゲンタマイシン (Sigma社)、及び 5% ヘマトクリットのヒト赤血球 (健常な日本人ボランティアより提供) を添加した。また、5 重量% の d - ソ

ルビトールを用いて*P. falciparum*の生育を同調させる同調培養を行った（参考文献：Lambros, C. & Vanderberg, J. P. (1979) *J. Parasitol.* 65, 418-420.）。

[0088] (2) *P. falciparum*の生育阻害アッセイ

初期の赤血球の原虫寄生率（parasitemia）が約1%でかつ輪状体の段階にある熱帯熱マラリア原虫の培養（カルチャー）を対象とし、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育に対する2-APB (2-aminoethyl diphenylborinate : ジフェニルボリン酸2-アミノエチル) 及びLZ (luzindole : ルジンドール) の影響を調べた。

[0089] まず、組織培養プレート(24ウェル平底プレート, Corning社)の各ウェル内に、500μlの上記培養（カルチャー）を注入した。2-APB及びLZをそれぞれ10mM及び100mM濃度となるように、ジメチルスルホキシド(DMSO, HYBRI-MAX (登録商標), Sigma社)に溶解して、これら化合物のストック溶液を調製した。このストック溶液はRPMI培地で希釈し、所定の最終濃度となるように組織培養プレートの各ウェルに加えた。また、DMSOをPPMI培地で希釈し、所定の最終濃度となるように組織培養プレートのウェルに加え、コントロールとして使用した。そして、各ウェルで、所定の期間、培養を行った。

[0090] 次いで、所定の期間経過後、上記組織培養プレートの各ウェル内に存在する赤血球を含む培養を一滴、スライドガラス上に展開し、ギムザ染色を行った。2000個の赤血球のうち、熱帯熱マラリア原虫が感染した赤血球の数を計数し、原虫寄生率を決定した。

[0091] (3) 赤血球内に存在するステージでの*P. falciparum*細胞内の蛍光Ca²⁺イメージング、及びデータ解析（実施例1に対応）

感染した赤血球の培養物(赤血球5×10⁸個/mL)を0.5mL採り、当該培養物をCa²⁺イメージング用のBSA(-)培地(フェノールレッド(Invitrogen/GIBCO)を含まないRPMI1640培地であって、25mMのHEPES、24mMの炭酸水素ナトリウム、0.5g/LのL-グルタミン、50mg/L

Lのヒポキサンチンを添加したもの)で10倍希釈した。次いで、当該希釈後の赤血球の培養物1mLを遠心分離(室温下、1,000g、5分間)にかけて回収し、上記と同成分のBSA(−)培地350μL中に再懸濁した(赤血球再懸濁液(1)と称する)。

- [0092] Ca²⁺蛍光指示薬(fluo4-AM)の導入とHoechst 33342による核染色を行うために、ロード用溶液>Loading Solution)を調製し、fluo4-AM(BSA(−)培地中に、0.1mg/mLのHoechst 33342(Dojindo社)、100μMのfluo4-AM(Invitrogen社/Molecular Probes社)、及び100倍希釈したPowerLoad(Invitrogen社)を含むもの)をロードした。上記赤血球再懸濁液(1)350μLを、このロード用溶液150μLと混合して、37℃で30分～60分間、200rpmで振とうした。
- [0093] 次いで、赤血球を一度、10mLのBSA(−)培地で洗浄し(室温、1,000gで5分間)、600μLのBSA(+)培地(上記BAS(−)培地に、0.5重量%のAlubumaxI、及び25μg/mLのゲンタマイシン(Sigma社)を添加したもの)に再懸濁した(赤血球再懸濁液(2)と称する)。次いで、100μLの赤血球再懸濁液(2)を、0.1mg/mLのpoly-L-リジンでコートした35mm径のガラス底ディッシュ(MatTek Corp.)に接種した。O₂、CO₂インキュベータ中で30分間インキュベーションを行った後、懸濁した赤血球は、緩和な条件下、BSA(+)培地で洗浄をした後に、回収した。
- [0094] 次いで、上記ガラス底ディッシュを、O₂濃度、CO₂濃度、温度、及び湿度の各条件が、通常、マラリア原虫のイン・ビトロ培養を行う場合と同じ条件(O₂濃度5%、CO₂濃度5%、温度37℃)に保たれた培養チャンバー中にセットした。
- [0095] ライカ社製の共焦点電子顕微鏡システム(Leica TCS SP5 II, Leica Microsystems社)を用いて、Hoechst 33342、fluo4-AMの連続的なタイムラプスイメージング、及び透過像(transparent image)の取得を実施した。イメージングに用いた対物レンズは、倍率63x(N.A. 1.42)のオイル浸潤対物レンズ(

oil immersion objective lens) であり、Hoechst 33342は励起波長410 nm (ダイオードレーザ使用) で、fluo4-AMは励起波長488 nm (アルゴンレーザ使用) でそれぞれ励起した。透過像の取得、及び励起により生じた発光の取得は、Leica Microsystems社が開発したthe true spectral detection methodを用いて行った。イメージングは、5秒～15秒間隔で、300秒～600秒間にわたり実施した。fluo4-AMの蛍光強度は、バックグラウンドの蛍光を差し引き (F) 、イメージング期間における蛍光強度の最小値(F_{min})により標準化 (normalized) した。

[0096] (4) 統計学的分析の手法

アッセイ間の差異は、Student's t-testを用いて評価した。テストで得られたp値が0.05未満 ($p < 0.05$) を満たせば統計学的に有意であるとみなした。

[0097] (5) マラリア原虫のサイズ測定、及び電子顕微鏡による観察

ギムザ染色した塗抹(smear)を、Nikon Eclipse 80i 顕微鏡(Nikon社製)で観察し、Nikon DXM 1200F カメラ (Nikon社製)を用いて写真撮影をし、デジタル写真マネージャーソフトウェア(ACT-1; Nikon社製)を用いてパーソナルコンピュータにアップロードした。熱帯熱マラリア原虫のサイズを測定するため、任意に50個の熱帯熱マラリア原虫を選択し、スクリーン上にこれら熱帯熱マラリア原虫を含む領域をマニュアルで線引きした。熱帯熱マラリア原虫細胞の占める面積、周囲長、及び最大直径の解析は、WinROOF software package Ver. 5.8.1 (Mitani, Japan)を用いて行った。

[0098] (6) 透過型電子顕微鏡による観察

既報 (参考文献 : Kawai, S., Kano, S., Chang, C. & Suzuki, M. The effects of pyronaridine on the morphology of Plasmodium falciparum in Aotus trivirgatus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55, 223–229 (1996)) に従い、透過型電子顕微鏡による観察を行った。電子顕微鏡観察の対象となる試料は、0.1Mリン酸バッファー (pH 7.4, 4°C) でバッファーされた2.5% (V/V) グルタルアルデヒド中で約2時間固定した。次いで、1% (w/

V) の四酸化オスミウム (osmium tetroxide) で 1 時間、当該試料を後固定した。固定された試料は、エタノール濃度の上昇系を用いて脱水を行い、次いで、プロピレンオキシドで 15 分間処理をし、Epon 812樹脂に包埋した。得られたEpon 812樹脂のブロックから、ダイヤモンドナイフ(Diatome)を備えたウルトラミクロトーム(Porter-Blim MT-2; Ivan Sorvall)を用いて切片を切り出した。得られた切片は、200-メッシュの銅グリッド上にマウントし、酢酸ウラニル (uranyl acetate) 及びクエン酸鉛 (lead citrate) で染色し、JEOL JEM-1011透過型電子顕微鏡で観察した。

[0099] (7) 核及び小胞体の染色

熱帯熱マラリア原虫の核及び小胞体は、Hoechst 33342及びER-Tracker Red (Invitrogen)で染色した。Hoechst 33342を用いた染色は、蛍光 Ca^{2+} イメージングの目的で、上記した通りに行われた。ER-Tracker Redは、最終濃度が 0.5 μM となるように赤血球の懸濁液に添加され、37°C、200 rpmの条件で 30 分間振とうした。

[0100] [実施例 1]

(1) 热帯熱マラリア原虫の内生的な Ca^{2+} 振動と、2-APBによる Ca^{2+} 振動の阻害

上記 Ca^{2+} 振動の観察結果、及び Ca^{2+} 振動の阻害実験の結果を図 1 及び図 2 にまとめて示す。

[0101] 図 1 中の (b) 及び (f) はそれぞれ、コントロールとして 100 μM の DMSO を初期の輪状体 (ER) の段階、及びトロホゾイト (T) の段階で添加して熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) の培養を行い、その細胞質での Ca^{2+} の動態を、蛍光 Ca^{2+} イメージングにより観察した結果を示すグラフである。

[0102] また、図 1 中の (c) 及び (g) はそれぞれ、100 μM の 2-APB を初期の輪状体 (ER) の段階、及びトロホゾイト (T) の段階で添加して熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) の培養を行い、その細胞質での Ca^{2+} の動態を、蛍光 Ca^{2+} イメージングにより観察した結果を示すグラフである。

ここで、2-APB（ジフェニルボリン酸2-アミノエチル）は、本願発明者らにより開発され、イノシトール1,4,5-三リン酸受容体型のCa²⁺チャネルの阻害剤として確立されたものである。

- [0103] また、図1中の(d)、(h)、(j)はそれぞれ、コントロールとして100μMのDMSOを後期の輪状体(LR)の段階、シゾント(S)の段階、及びメロゾイト(M)の段階で添加して熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)の培養を行い、その細胞質でのCa²⁺の動態を、蛍光Ca²⁺イメージングにより観察した結果を示すグラフである。
- [0104] また、図1中の(e)、(i)、(k)はそれぞれ、100μMの2-APBを後期の輪状体(LR)の段階、シゾント(S)の段階、及びメロゾイト(M)の段階で添加して熱帯熱マラリア原虫(*P. falciparum*)の培養を行い、その細胞質でのCa²⁺の動態を、蛍光Ca²⁺イメージングにより観察した結果を示すグラフである。
- [0105] なお、図1中の(b)～(k)で、異なる態様で標記されたドットは、別々のマラリア原虫での結果を示す。また、図1中の(b)、(d)、(f)、(h)、(j)において、矢頭は、赤血球中のER(初期の輪状体)、LR(後期の輪状体)、T(トロホゾイト)、S(シゾント)、及びM(メロゾイト)のイメージング時の像をそれぞれ示し、スケールバーは5μmである。
- [0106] 図1中の(b)及び(f)に示すように、初期の輪状体の段階、及びトロホゾイトの段階にあるコントロールは何れも、内生的なCa²⁺の振動を示した。また、Ca²⁺の振動周期は、初期の輪状体の方が、トロホゾイトと比較してより高周期であった。なお、初期の輪状体とは、細胞サイズがトロホゾイトより小さく、かつヘモゾイン(hemozoin)が細胞質に形成された単核の状態にあるマラリア原虫を指し、トロホゾイトとは単核のマラリア原虫を指す。
- [0107] 対照的に、図1中の(c)及び(g)に示すように、100μMの2-APBでマラリア原虫を処理することにより、コントロールで見られた上記C

Ca^{2+} の振動がほぼ完全に阻害された。

[0108] 一方、図1中の(d)、(h)、(j)に示すように、熱帯熱マラリア原虫が、後期の輪状体の段階(LR)、シゾントの段階(S)、メロゾイトの段階(M)にある場合は、観察される Ca^{2+} の振動は相対的に非常に小さく、 $100\mu\text{M}$ の2-APBで処理しても特段の効果は生じなかった(図1中の(e)、(i)、(k)参照)。なお、後期の輪状体とは、細胞サイズが初期の輪状体とトロホゾイトとの間の大きさであり、かつヘモゾイン(hemogloine)を有しないものを指す。

[0109] 次に、観察される Ca^{2+} の振動が非常に小さかった、後期の輪状体の段階(LR)、シゾントの段階(S)、及びメロゾイトの段階(M)における Ca^{2+} の周期的な変動の振幅の大きさに2-APBが与える影響に関し、量的な解析を行った。 F/F_{\min} の最大値の平均値から、 F/F_{\min} の最小値の平均値を差し引くことで、平均振幅を計算した。その結果、メロゾイトの段階のみで、統計学的に有意な2-APBの効果が観察された(図1中の(i)参照)。

[0110] (2) U73122、Tg、及びCMAを用いた確認実験

図1に結果を示すように、初期の輪状体及びトロホゾイトにおいて、2-APBの添加により、内生的な Ca^{2+} の振動が阻害された。この事実は、当該 Ca^{2+} の振動が、イノシトール三リン酸の結合により活性化される、イノシトール三リン酸受容体型の Ca^{2+} チャネルにより制御されていることを示唆している。

[0111] そこで、上記の示唆を確認するために、まず、ホスホリパーゼCの阻害剤として汎用されるU73122を用いた確認実験を行った。なお、マラリア原虫では、ホスホリパーゼCのシグナル伝達経路が、マラリア原虫内の Ca^{2+} 貯蔵体からの Ca^{2+} の放出に関与していることが示唆されている(参考文献:Hotta, C.T., Markus, R.P. & Garcia, C.R. Braz J Med Biol Res 36, 15 83-1587 (2003).)。

[0112] 図2中の(a)及び(b)はそれぞれ、初期の輪状体(ER)及びトロホ

ゾイト（T）の段階にある熱帯熱マラリア原虫を、 $10\text{ }\mu\text{M}$ のU73122で、5分間、前処理した後に、当該マラリア原虫の蛍光Ca²⁺イメージングを行った結果を示すグラフである。同図に示すように、当該前処理を行った結果、初期の輪状体（ER）及びトロホゾイト（T）の双方で、Ca²⁺の振動がほぼ完全に消失した。

- [0113] さらに、Ca²⁺の振動に関わるCa²⁺の供給源を特定するため、蛍光Ca²⁺イメージングを行う前に、タブシガルギン(Tg)又はコンカナマイシンA(CMA)を用いてCa²⁺を人為的に放出させる前処理を行った。具体的には、以下の通りである。
- [0114] アピコンプレクサ群の寄生虫において、細胞内のCa²⁺貯蔵体としての小胞体及びアシドカルシソーム(acidocalcisome)が、Ca²⁺の放出に関与していることが知られている。そこで、小胞体及びアシドカルシソームからの何れか一方からCa²⁺を選択的に放出させるため、筋小胞体／小胞体Ca²⁺-ATPaseの特異的阻害剤であるタブシガルギン(Tg)、及び液胞型H⁺-ATPaseの特異的阻害剤であるコンカナマイシンA(CMA)を夫々用いて、熱帯熱マラリア原虫を前処理した。
- [0115] Ca²⁺のリークの増大にこれら化合物が及ぼす効果は、図3中の(a)及び(b)に結果を示すように、灌流試験により、輪状体(○)及びトロホゾイト(黒塗り四角)の双方でCa²⁺のイメージングを行うことにより確かめた。また、図2中の(c)及び(d)に示すように、 $2\text{ }\mu\text{M}$ のTgで30分間の前処理を行い、予め小胞体のCa²⁺を放出させることで、初期の輪状体(ER)、及びトロホゾイト(T)においてCa²⁺の振動が消失した。対照的に、図3中の(e)及び(f)に示すように、 100 nM のCMAで30分間の前処理を行い、予めアシドカルシソーム中のCa²⁺を放出させた場合には、初期の輪状体(ER)、及びトロホゾイト(T)においてCa²⁺の振動に何らの影響も現れなかった。
- [0116] これらの結果は、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育段階における初期の輪状体及びトロホゾイトで、内生的な、小胞体からのイノシトール三リ

ン酸誘導型のCa²⁺の放出（ICR）が生じたことを示す。

[0117] [実施例2：2-APBによる、熱帯熱マラリア原虫の生育阻害・死滅]

(1) 2-APBによる、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育阻害
上記生育阻害の実験結果を、図4の(a)～(d)にまとめて示す。なお
、図4の(d)は特に後述の項目(2)に関する。

[0118] 図4中の(a)は、同調培養を開始後40時間にわたり、24ウェル組織
培養プレート内で、熱帯熱マラリア原虫FCR-3株を培養した結果を示す
。培養は、各実験群当たり3ウェルを用い、それぞれ、20時間、30時間、
及び40時間培養してアッセイに供した。また、熱帯熱マラリア原虫の計数
のため、赤血球の薄層塗抹(erythrocytes thin-smears)を調製した。なお
、図4中の(a)及び(d)における、輪状体(R)、トロホゾイト(T)
、初期のシゾント(ES)、及び後期のシゾント(LS)の原虫寄生率(%)
は、各実験群3カウントの平均+SDである。原虫寄生率が、0.1%未
満の段階は図示していない。

[0119] また、図4中の(b)は、図4中の(a)に示す各培養における、赤血球
内での熱帯熱マラリア原虫の形態を示す図である。

[0120] 図4中の(a)及び(b)に示す通り、100μMの2-APBの存在下
では、DMSOを用いたコントロールと比較して、熱帯熱マラリア原虫の赤血球
内での生育が明らかに遅くなった。また、コントロールでは熱帯熱マラリア
原虫の形態は培養期間を通じて正常であった一方で、2-APBの存在下で
培養した場合、熱帯熱マラリア原虫は何れも形態的異常を伴っていた。

[0121] すなわち、コントロールの培養中における熱帯熱マラリア原虫は、同調培
養開始後20時間の時点において、初期のシゾント(early schizonts:核数
が8個未満の熱帯熱マラリア原虫)に生育していた。このシゾントは、同調
培養開始後30時間の時点において健全な後期のシゾント(late schizonts
:核数が8個を超える熱帯熱マラリア原虫)に生育し、その後、成熟メロゾイ
トが放出され、同調培養開始後40時間の時点において次のサイクルの感染

が成立し、形成された輪状体（ring forms）が観察された。

[0122] 一方、2-A P Bが存在する条件で培養された熱帯熱マラリア原虫は、同調培養開始後20時間の時点において、トロホゾイト（trophozoites：単一核を有する熱帯熱マラリア原虫）の状態に留まり、かつ形態的な異常が観察された。このトロホゾイトは、同調培養開始後30時間の時点で初期のシゾントに、次いで同調培養開始後40時間の時点で後期のシゾントに生育可能であったが、何れも形態的な異常を伴った（図4中の（b）も参照）。

[0123] さらに、赤血球内での熱帯熱マラリア原虫の生育に対する2-A P Bの効果を量的に評価するために、同調培養開始後15時間、30時間、40時間における熱帯熱マラリア原虫細胞の占める面積、周囲長、及び最大直径（3つのパラメータと総称する）を分析した。なお、同調培養開始後40時間の場合は、シゾントのみを解析した。同調培養開始後15時間、30時間、及び40時間の何れの条件においても、100μMの2-A P Bの存在下で培養された熱帯熱マラリア原虫は、DMSOの存在下で培養された熱帯熱マラリア原虫と比較して、3つのパラメータが著しく減少した。このことは、2-A P Bが熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育を遅らせることを示唆している（図4中の（c）参照）。さらに、熱帯熱マラリア原虫のサイズの解析によって、これら3つのパラメータの増加は、2-A P Bで処置してから30時間後に終わることが分かり、2-A P Bの効果の臨界時間は約30時間であることが示唆された。

[0124] なお、図4中の（c）において、カラム及びエラーバーは平均+S.D.を指す。各時点において50個の熱帯熱マラリア原虫を対象に上記3つのパラメータを測定した。DMSOを用いたコントロールとの比較に関するP値は各図の下に記載した（Welch's補正を行ったcorrection two-tailed unpaired t検定）。

[0125] （2）2-A P Bの処置による、熱帯熱マラリア原虫の死滅
2-A P Bが存在する条件で培養して得られた、形態異常を伴うシゾントの命運を確認するために、同調培養をさらに30時間継続した。図4中の（

d) はすなわち、同調培養開始後 40 時間（図 4 中の（a）の最終段階と同じ）、及び 70 時間で培養を終了し、熱帯熱マラリア原虫の計数を行った結果を示す。なお、DMSO 又は 2-APB を含む培養用の培地は、同調培養開始後 40 時間の時点で、これらを含まない培養用の培地に置換した。同図に示すデータは、各実験群当たり 3 ウエルの試験を行ったうちの代表値を示す。

- [0126] コントロール (DMSO) の培養中における熱帯熱マラリア原虫は、70 時間の培養終了時に、輪状体を一部に含む後期のシゾントに生育した。一方、2-APB が存在する条件下での培養では、70 時間の培養終了時に、形態的な異常を伴う後期のシゾント又は輪状体が見られた（赤血球 5000 個～8000 個当たり 1 個程度の頻度）。また、2-APB が存在する条件での培養中における熱帯熱マラリア原虫は、その赤血球の原虫寄生率が時間の経過とともに次第に減少し、同調培養開始後 70 時間が経過した時点では原虫寄生率が実質的にゼロとなり死滅した。
- [0127] 図 5 に示すように、熱帯熱マラリア原虫は、2-APB で事前にのみ処理した赤血球を用いた培養では、DMSO で事前に処理した赤血球を用いた培養の場合と同様に、同調培養開始後 20 時間後（図中の（a））、40 時間後（図中の（b））ともに正常に生育することができた。このことから、2-APB を用いた効果は、赤血球の生理学的性質を阻害した結果生じたものではないことが示唆された。これらの結果から、2-APB は、熱帯熱マラリア原虫の正常な細胞周期の進行を阻害することによって、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内における生育を阻害し、最終的には死滅に至らしめることが示唆された。

- [0128] (3) 2-APB の処置が、熱帯熱マラリア原虫のクロロキン耐性株へ与える影響

初期の原虫寄生率を約 2% にセットして、輪状体の段階にあるマラリア原虫を同調培養する手法を用いて、熱帯熱マラリア (*P. falciparum*) のクロロキン耐性株である K-1 株の赤血球内での生育に対して 2-APB が及ぼす影響を調べた。培養は、同調培養を開始後 24 時間、48 時間、及び 72 時

間の時点で終了し、熱帯熱マラリア原虫をカウントするため赤血球の薄層塗抹を調製した。100 μMのDMSO 又は100 μMの2-APBが添加された培養培地は、24時間及び48時間経過した段階で交換した。典型的な結果が得られた3回の独立した試験の結果を図4中の(e)に示す。輪状体(Rf)、トロホゾイト(T)、初期のシゾント(ES)及び後期のシゾント(LS)夫々の原虫寄生率は、3つのウェルの平均+ S.D.として示す。原虫寄生率が0.1%未満の段階は示していない。

100 μMの2-APBを添加して培養した系では、アッセイ開始後24時間において、トロホゾイトの段階にある熱帯熱マラリア原虫が減少する傾向が再現性をもって観察された(図4中の(e)参照)。2-APBが示すこの阻害効果は、アッセイ開始後24時間において、熱帯熱マラリア原虫細胞の占める面積、周囲長、及び最大直径を測定することで確認した(図10参照)。アッセイ開始後48時間において、2-APBの存在下ではDMSOの存在下と比較して赤血球内でのマラリア原虫の成育が遅れる傾向にあった。この傾向は、FCR3株での観察と同様であった。アッセイをさらに24時間行った結果(アッセイ開始後72時間)、熱帯熱マラリア原虫に感染した赤血球(非常の高レベルの原虫寄生率を示す)の数は、2-APBの存在下ではDMSOの存在下と比較してずっと少ないと判明した。

[0129] なお、アッセイ開始後24時間における、K-1株に対する2-APBの効果は比較的弱いが(図4中の(e)も参照)、これには、大部分の熱帯熱マラリア原虫K-1株は、2-APBがFCR-3株に致死的な影響を与えた段階(トロホゾイトから初期のシゾントの段階:実施例3及び図6も参照)に達していないという事実が寄与していると考えられる。

[0130] [実施例3]

(1) 2-APBは、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育を初期段階で阻害する

次に、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育阻害が生じる段階を調査するため、2-APBを異なるタイミングで培養中に添加した。図6は、異な

る生育段階にある熱帯熱マラリア原虫の培養に対する、2-A P Bの効果を実験した結果を示す図である。独立に2回の試験（E x - 1 及び E x - 2）を代表的な結果として示した。この実験では、24ウェル組織培養プレートを用いて、熱帯熱マラリア原虫の F C R - 3 株を同調培養した。同調培養開始後40時間で培養を終了し、熱帯熱マラリア原虫の計数を行った（各実験群当たり3ウェル。原虫寄生率が、0. 1 %未満の段階は図示していない。）。

[0131] なお、図6中の(a)及び(b)はそれぞれ、同調培養開始時に2-A P Bを添加し、熱帯熱マラリア原虫が輪状体の段階にある10時間後、及びトロホゾイト／初期のシゾントの遷移段階に生育した、21時間後のタイミングで2-A P Bを含まない培地に交換した培養の結果を示す図である。図6中の(c)は、培養開始後21時間のタイミングで2-A P Bを添加した培養の結果を示す図である。図6中の(d)は、熱帯熱マラリア原虫が後期のシゾントに成育した、培養開始後28時間のタイミングで2-A P Bを添加した培養の結果を示す図である。トータルの培養時間は45時間である。なお、図6中の(a)～(c)、(e)における、輪状体(R)、トロホゾイト(T)、初期のシゾント(E S)、及び後期のシゾント(L S)の原虫寄生率(%)は、各実験群を構成する3ウェルの平均+SDである。原虫寄生率が、0. 1 %未満の段階は図示していない。

[0132] 2-A P Bをアッセイ開始時に添加し、輪状体の段階で除いた場合も、トロホゾイトから初期のシゾント段階の間で除いた場合も、アッセイ開始40時間後の輪状体の原虫寄生率に有意な差が見られたが、トロホゾイトから初期のシゾント段階まで2-A P Bを加えていた場合の方が、その効果は大きかった。

[0133] また、2-A P Bをトロホゾイトから初期のシゾント段階の間で添加した場合は、輪状体の段階あるいはトロホゾイトから初期のシゾント段階に2-A P Bを除いた場合と比べて、アッセイ開始40時間後の輪状体の原虫寄生率により大きな効果が見られた。なお、トロホゾイトから初期のシゾント段

階の間に 2 - A P B を添加した 2 回の試験の結果において、アッセイ開始 40 時間後の輪状体の原虫寄生率に顕著な差が見られたが、これは 2 - A P B 添加時のトロホゾイトとシゾントの存在率と関係があることが、図 6 中の (d) により推察される。 (a) ~ (c) の結果を総合すると、トロホゾイトの段階で 2 - A P B に暴露されることが、アッセイ開始 40 時間後の輪状体の原虫寄生率（次の発育サイクルに入る際の原虫寄生率）に重篤な影響を及ぼすことが強く示唆された。

- [0134] 一方、 2 - A P B がより遅いタイミング、例えば後期のシゾント段階で添加された場合、コントロールの培養での観察と同様に、熱帯熱マラリア原虫は輪状体を形成した。しかし、 2 - A P B の添加により、アッセイ開始後 45 時間が経過した段階での、輪状体の原虫寄生率は、有意に減少した（図 6 中の (e) : *p < 0.05）。
- [0135] この結果は、後期のシゾントの成熟、メロゾイトの赤血球外への放出、及び／又は、メロゾイトの赤血球への侵入を 2 - A P B が阻害することを示唆する。
- [0136] Ca²⁺イメージングの実験結果とあわせて、トロホゾイトの段階での、イノシトール三リン酸誘導型の内生的な Ca²⁺の振動が、赤血球内の熱帯熱マラリア原虫の生育に極めて重要であることを初めて証明した。あわせて、メロゾイトの段階での、イノシトール三リン酸誘導型の内生的な Ca²⁺の周期変動が、熱帯熱マラリア原虫の赤血球への侵入に重要な役割を果たしていると結論付けた。
- [0137] また、輪状体の段階における 2 - A P B の効果を調べるために、同調培養中の熱帯熱マラリア原虫に対して 100 μM の 2 - A P B を添加して培養を継続した後、10 時間後及び 20 時間後に熱帯熱マラリア原虫のサイズを測定した。なお、一部のアッセイ（図 6 中の (f) における removed at 10h）では、100 μM の 2 - A P B を添加して培養を継続した後、10 時間後に 2 - A P B を取り除いて引き続き培養を行い、20 時間後に熱帯熱マラリア原虫のサイズを測定した（図 6 中の (f) を参照）。また、同様の実験を、

コントロールとしての $100 \mu M$ の DMSO の存在下で培養した熱帯熱マラリア原虫に対しても行った。なお、各実験群では、50個の熱帯熱マラリア原虫を測定の対象とし、コントロール (DMSO の存在下) と比較した P 値は図中の各パネルに記載した (Welch's 補正を行った two-tailed unpaired t 検定)。

- [0138] コントロールである $100 \mu M$ の DMSO の存在下で培養した熱帯熱マラリア原虫では、アッセイ開始後 20 時間における熱帯熱マラリア原虫細胞の占める面積、周囲長、及び最大直径の増加は、アッセイ開始後 10 時間ににおけるこれらの増加よりも大きかった。同様の結果は、アッセイ開始後 10 時間で DMSO を取り除いた系でも得られた。対照的に、 $100 \mu M$ の 2-A-PB の存在下で、アッセイ開始後 10 時間及び 20 時間培養した場合には、DMSO の存在下で培養した系と比較してこれら 3 つのパラメータは顕著に小さくなった。しかし、アッセイ開始後 10 時間の時点で 2-A-PB を取り除いた場合には、DMSO を添加して培養した場合と比較して 3 つのパラメーターは全て僅かに小さくなるに過ぎず、統計的に有意な差が見られない程度にまで回復した。
- [0139] 初期の輪状体の段階における 2-A-PB の可逆的効果 (図 6 中の (f) を参照) を考慮すれば、2-A-PB が熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育を致死的に阻害する効果は、主にトロホゾイトの段階において Ca^{2+} の振動をブロックしたことによる起因すると推定される。

[0140] [実施例 4]

(1) LZ による、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育阻害 $250 \mu M$ の LZ の存在下での、上記生育阻害の実験結果を、図 7 の (a) から (c) にまとめて示す。なお、LZ の濃度は、熱帯熱マラリア原虫に関する既報 (参照文献 : Beraldo F. H., Mikoshiba K. & Garcia C. R. (2007) J. Pineal. Res. 43, 360-364.) に基づき決定した。また、DMSO の存在下での培養実験をコントロールとして使用した。同図には、同調培養を開始後 70 時間にわたり、24 ウェル組織培養プレート内で、熱帯熱マラリア原虫

F C R – 3 株を培養した結果を示す。培養は、各実験群当たり 3 ウェルを用い、それぞれ、20 時間（図中の（a））、40 時間（図中の（b））及び 70 時間（図中の（c））培養してアッセイに供した。また、熱帯熱マラリア原虫の計数のため、赤血球の薄層塗抹を調製した。なお、図 7 における、輪状体（R）、トロホゾイト（T）、初期のシゾント（E S）、及び後期のシゾント（L S）の原虫寄生率（%）は、各実験群を構成する 3 ウェルの平均 + S D である。原虫寄生率が、0.1% 未満の段階は図示していない。

- [0141] 図 7 に示すように、 $250 \mu M$ の L Z の存在下では、熱帯熱マラリア原虫の赤血球内での生育は明らかに阻害された。
- [0142] すなわち、コントロールの培養中における熱帯熱マラリア原虫は、アッセイ開始後 20 時間の時点において、後期トロホゾイト及び初期のシゾントに生育した。これら熱帯熱マラリア原虫は、アッセイ開始後 40 時間の時点において、健全な初期・後期のシゾント及び次の生育サイクル中に位置づけられる輪状体／初期トロホゾイトの遷移段階に生育した。さらに、アッセイ開始後 70 時間ににおいて、健全なトロホゾイト及び初期・後期シゾントに、そして次の生育サイクル中に位置づけられる輪状体に生育した。
- [0143] 一方、L Z の存在下での培養中における熱帯熱マラリア原虫は、アッセイ開始後 20 時間の時点において、輪状体／初期トロホゾイトの遷移段階に留まっていた。一部の輪状体／初期トロホゾイトは、初期のシゾントまで生育可能であった。しかし、大部分の熱帯熱マラリア原虫は、アッセイ開始後 40 時間の時点においても、輪状体／初期トロホゾイトの遷移段階に留まつたままであった。さらにアッセイ開始後 70 時間ににおいても、熱帯熱マラリア原虫は輪状体／初期トロホゾイトの遷移段階に留まつたままであり、アッセイ開始後 40 時間に観察された初期シゾントは生育を停止し死滅したと予想された。
- [0144] 上記の結果は、L Z は、正常な細胞周期の進行を阻害することで、熱帯熱マラリア原虫の赤血球での生育を阻害することを示唆した。なお、L Z は、メラトニン受容体の遮断薬（アンタゴニスト）である。

[0145] [実施例5：2-A P Bにより引き起こされるマラリア原虫の重篤な変性]
]

透過型電子顕微鏡を用いて、2-A P Bにより引き起こされた超微細構造の変性を観察した。図8中の(a)に示すように、D M S Oの存在下で培養された熱帯熱マラリア原虫は、アッセイ開始後30時間において、通常の構造を維持していた。対照的に、100μMの2-A P B存在下で培養された熱帯熱マラリア原虫は、アッセイ開始後30時間において、核中に非常に濃密なクロマチンの塊、及び非常に濃密なその変性物が観察された(図8中の(b)及び(c)参照)。食胞中にマウレル裂(Maurer's cleft)及びマラリアピグメント(malaria pigment)が形成されているという事実は、2-A P Bにより引き起こされる変性は、ある程度、赤血球内でのマラリア原虫の生育が進んでから引き起こされることを示唆する(図8中の(b))。

[0146] Plasmodium属の種においては、核膜(nuclear envelope)は、主要な小胞体(ER)コンパートメントと考えられている。図9で示すように、D M S Oの存在下で熱帯熱マラリア原虫を培養した場合に、Hoechst 33342により青色に染色された小胞体トラッカーシグナル(ER-Tracker signals)が熱帯熱マラリア原虫の核を取り囲んで現れる一方で、2-A P Bの存在下で熱帯熱マラリア原虫を培養した場合には、小胞体トラッカーシグナルはよりブロードになり、細胞質にも広がることが確認された。同様に、電子顕微鏡での観察において、2-A P Bの存在下で培養された熱帯熱マラリア原虫では、核膜(nuclear envelope)及び小胞体が膨張しており(図8中の(b)及び(c)参照)、膨張した核膜(nuclear envelopes)と膨張した小胞体とが結合して、網目状小胞体(reticular ER)構造を形成していた(図8中の(d)及び図9参照)。電子顕微鏡を用いたマラリア原虫の観察に関する既報(参考文献: Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S. & Mitchell, G.H. Ultrastructure of rhoptry development in Plasmodium falciparum erythrocytic schizonts. Parasitology 121 (Pt 3), 273-287 (2000).)では、後期のシゾントの段階において、粗面小胞体により取り囲まれた

核は、沢山のリボゾームの顆粒を保持した核膜 (nuclear envelope) を備えていると報告されている。そして、同様の電子顕微鏡写真が、DMSO の存在下で培養した熱帯熱マラリア原虫でも得られた（図 11 を参照）。また、2-APB の存在下で培養した熱帯熱マラリア原虫でも、膨張した核膜 (nuclear envelope) に沿ったラインそれぞれの間で、しばしばリボゾームの顆粒数が増加することが見られた（図 8 中の (e) を参照）。

[0147] 2-APB の存在下で培養された大部分の熱帯熱マラリア原虫が、重篤な変性を示すが（図 8 中の (b) 及び (c) 参照）、正常なマイクロオルガネラを持つメロゾイトが形成されたシゾントもまた存在する（図 8 中の (f) 参照）。アッセイ開始後 40 時間経過した段階において、2-APB の存在下で培養された、熱帯熱マラリア原虫の各シゾント中に形成されたメロゾイトの数は、DMSO の存在下で培養されたものと比較して著しく少なくなる（図 12 中の (a) 及び (b) を参照。Welch's 補正をした two-tailed unpaired t 検定を行っており、(b) は (a) で示した頻度分布の生データである。）が、このことは、正常にメロゾイトが形成された熱帯熱マラリア原虫においても、その生育が 2-APB により阻害されることを示唆する。

[0148] 本発明は上述した各実施形態及び実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

産業上の利用可能性

[0149] 本発明は、従来とは異なるメカニズムを利用したマラリアの治療方法、マラリア原虫の殺虫方法、及びその利用を提供することが出来る。

請求の範囲

- [請求項1] マラリアの治療方法であって、
マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を、ヒト又は動物に対して治療有効量投与する工程を含む、マラリアの治療方法。
- [請求項2] 上記薬剤は、上記細胞内小器官としての小胞体内から小胞体外へのカルシウムイオンの搬出を抑制するものである、請求項1に記載の治療方法。
- [請求項3] 上記薬剤が、マラリア原虫の輪状体及び／又はトロホゾイトにおけるカルシウムイオンの搬出を抑制する薬剤である請求項1に記載の治療方法。
- [請求項4] 上記薬剤が、メラトニンに対する阻害剤、マラリア原虫におけるメラトニンのホモログに対する阻害剤、メラトニン受容体に対する阻害剤、又は、マラリア原虫におけるメラトニン受容体のホモログに対する阻害剤を含んでいる請求項1に記載の治療方法。
- [請求項5] 上記薬剤が、イノシトールミリン酸受容体に対する阻害剤、又はマラリア原虫におけるイノシトールミリン酸受容体のホモログに対する阻害剤を含んでいる請求項1に記載の治療方法。
- [請求項6] 上記薬剤が、イノシトールミリン酸と特異的な結合活性を有する化合物、ペプチド、又は当該ペプチドをコードする核酸を含んでいる請求項1に記載の治療方法。
- [請求項7] 上記薬剤が、配列番号1に示すペプチドを上記ペプチドとして含んでいる請求項6に記載の治療方法。
- [請求項8] 上記薬剤が、上記ペプチドをコードする核酸と、当該核酸に連結され当該核酸をマラリア原虫に特異的に発現させる発現調節配列と、を含むベクターからなる請求項6に記載の治療方法。
- [請求項9] ヒト又は動物に対して、マラリア原虫の感染前のタイミングで予防

的に投与される請求項 1～8 の何れか一項に記載の治療方法。

- [請求項10] 上記薬剤の投与タイミングが、上記ヒト又は動物におけるマラリア原虫の生育ステージに応じて決定される請求項 1～8 の何れか一項に記載の治療方法。
- [請求項11] 上記ヒト又は動物におけるマラリア原虫の生育ステージが輪状体の段階から初期のシゾント段階の間に、当該薬剤の血中濃度が治療有効量となるように、上記薬剤の投与タイミングが決定される請求項 10 に記載の治療方法。
- [請求項12] マラリア原虫の殺虫方法であって、
マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を、マラリア原虫に対して、有効量供給する工程を含む、マラリア原虫の殺虫方法。
- [請求項13] マラリアの治療薬であって、
マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を含んでいるマラリアの治療薬。
- [請求項14] マラリアの治療薬候補のスクリーニング方法であって、
イン・ビトロでマラリア原虫を同調培養し、当該マラリア原虫の生育ステージが輪状体の段階から初期のシゾント段階の間において、スクリーニング対象となる薬剤を添加する第一工程と、次いで、
上記薬剤の添加により、上記マラリア原虫の生育が抑制された、又はマラリア原虫が死滅した場合に、当該薬剤をマラリアの治療薬候補として選択する第二工程と、
を含んでいるマラリアの治療薬候補のスクリーニング方法。
- [請求項15] マラリアの治療薬候補のスクリーニング方法であって、
イン・ビトロで培養しているマラリア原虫に対して、スクリーニン

グ対象となる薬剤を添加する第一工程と、次いで、

マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出量、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入量を測定する第二工程と、次いで、

上記薬剤の添加により、カルシウムイオンの上記搬出量、及び／又は、搬入量が減少した場合に、当該薬剤をマラリアの治療薬候補として選択する第三工程と、

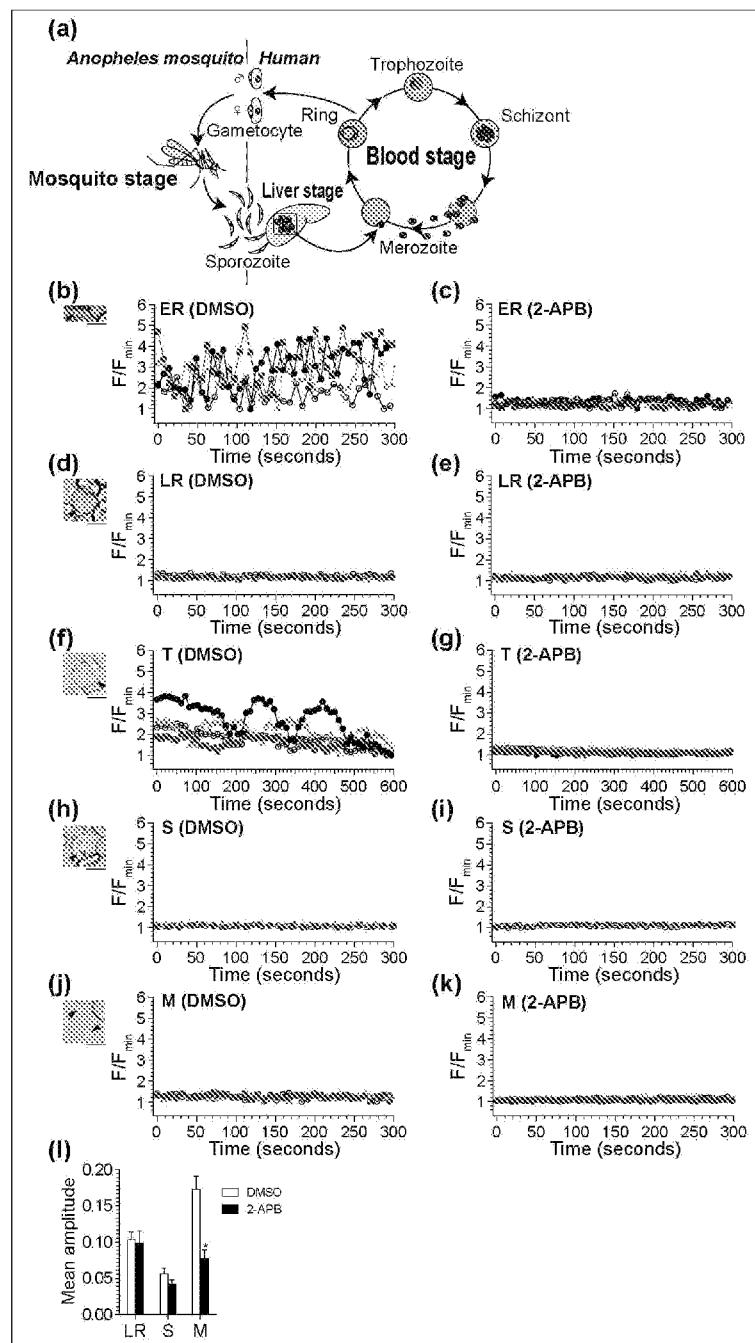
を含んでいるマラリアの治療薬候補のスクリーニング方法。

[請求項16]

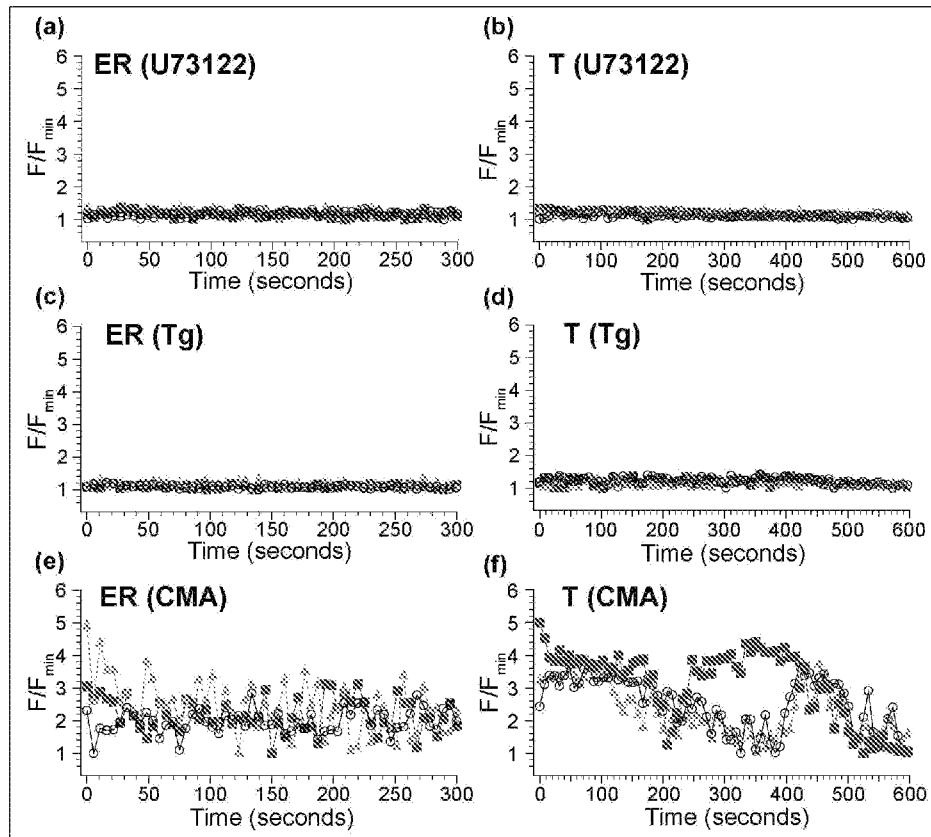
マラリアへの二次感染の防止方法であって、

マラリア原虫が感染した血液又は感染の虞がある血液であって、ヒト又は動物の体外に存在するものに対して、マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出、及び／又は、マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入、を抑制する薬剤を供給する工程を含む、マラリアへの二次感染の防止方法。

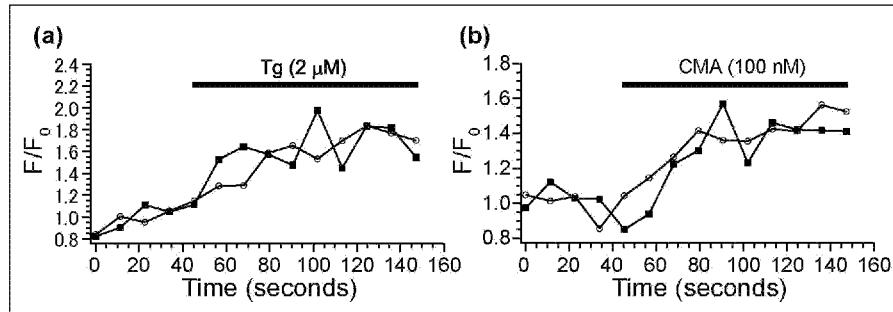
[図1]



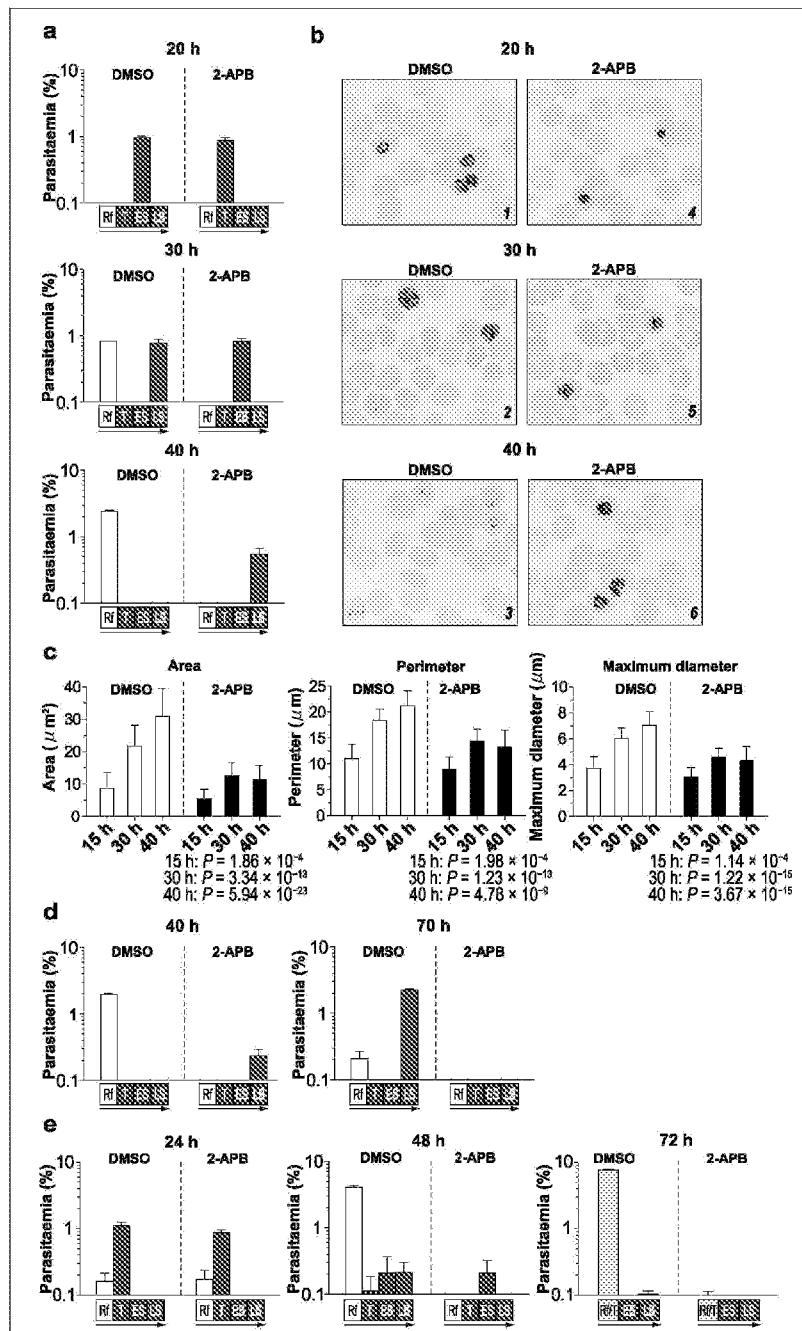
[図2]



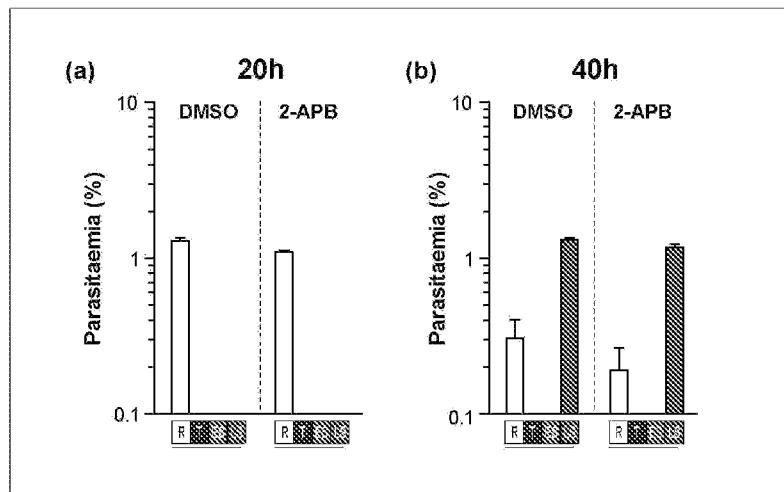
[図3]



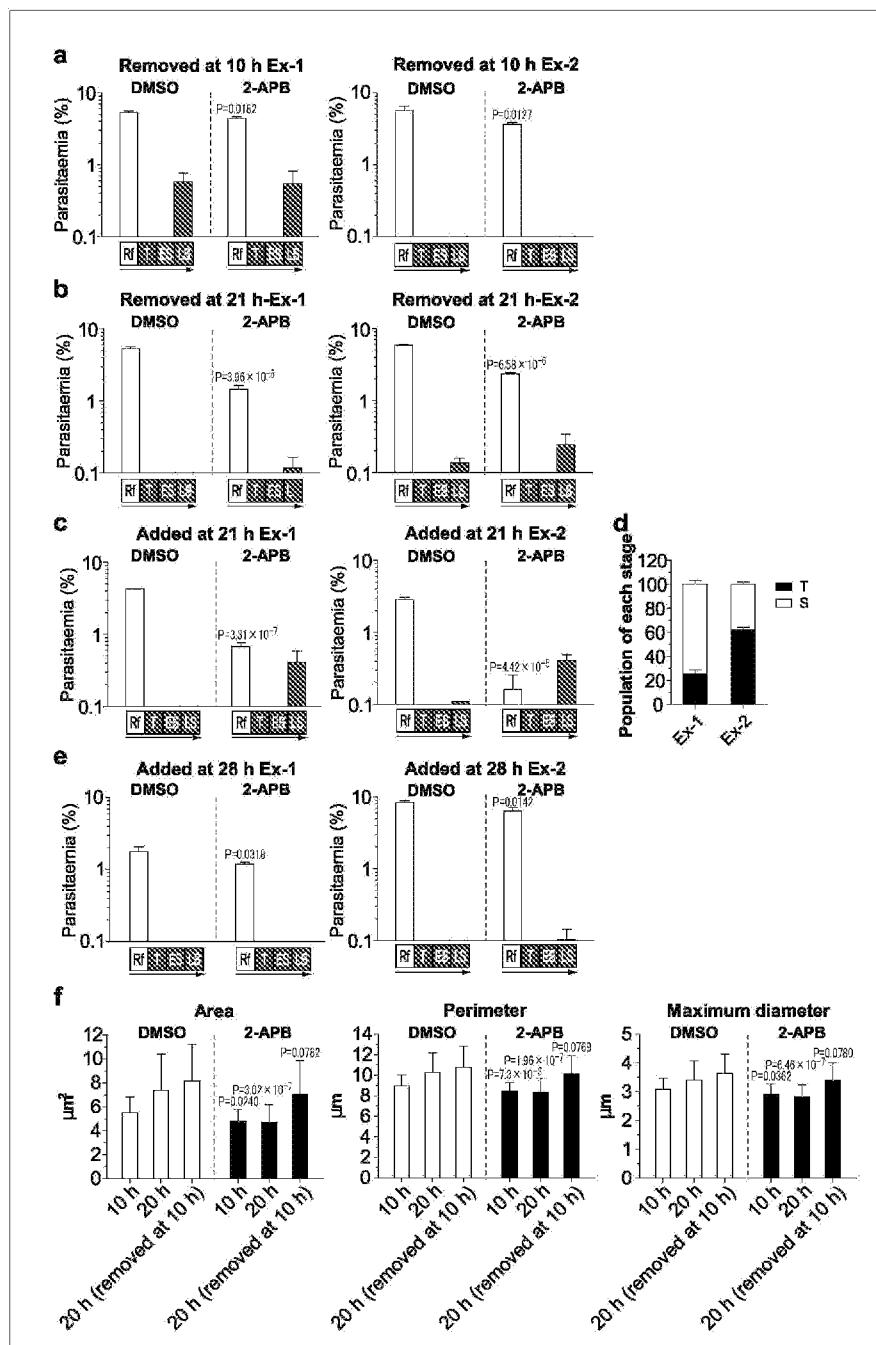
[図4]



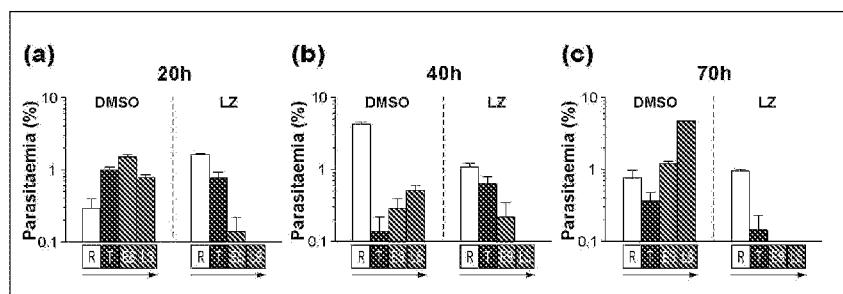
[図5]



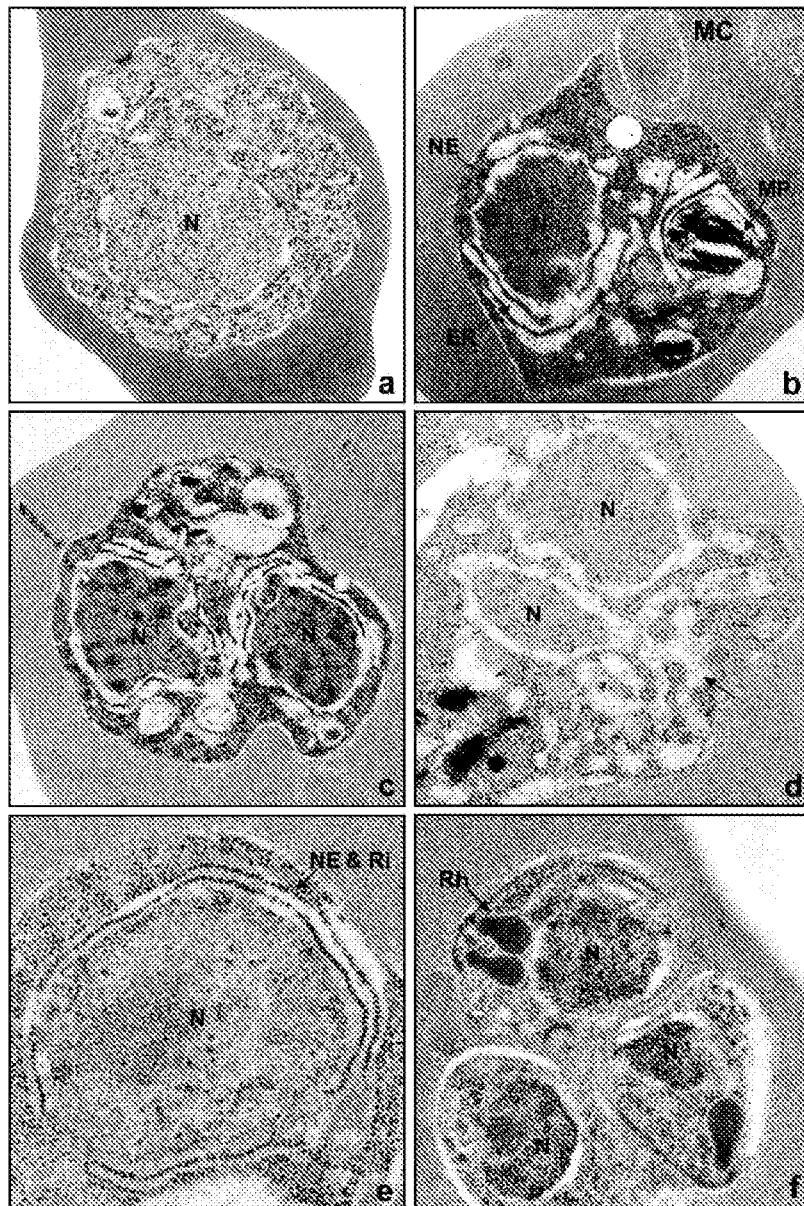
[図6]



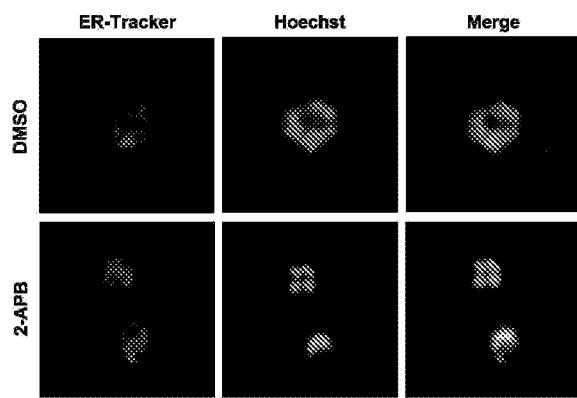
[図7]



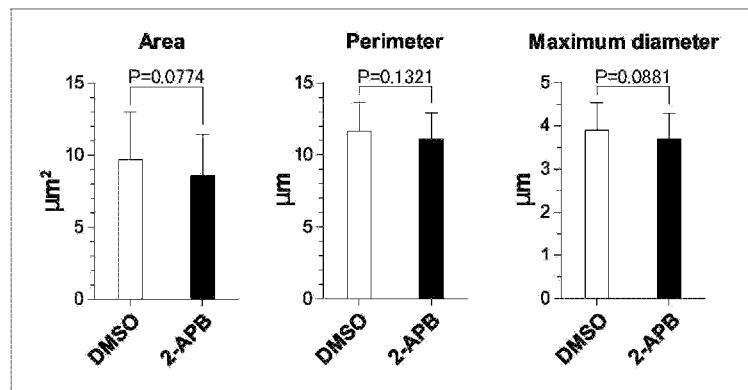
[図8]



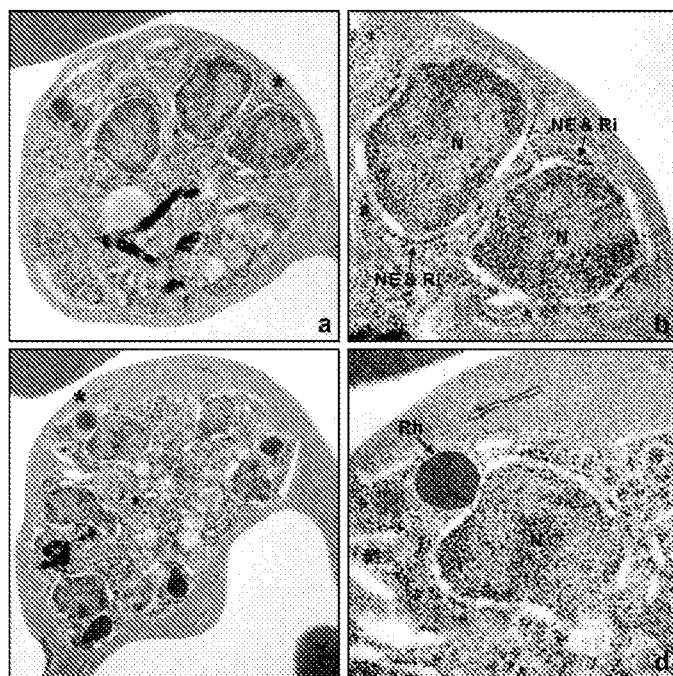
[図9]



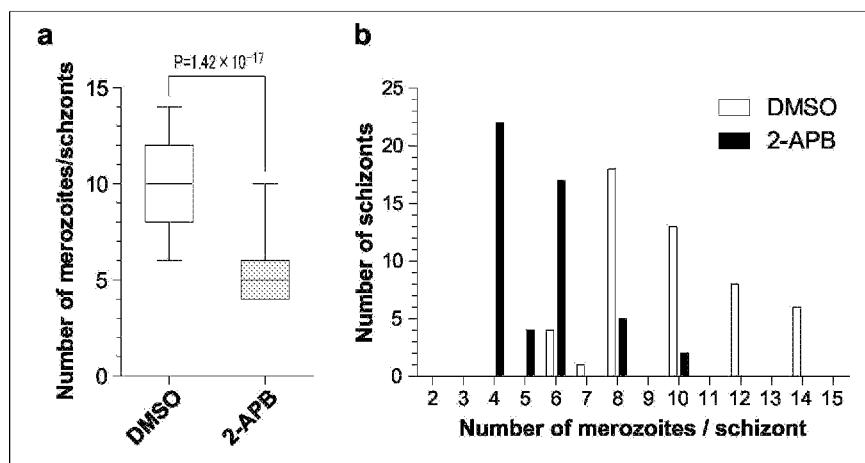
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/074876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, *A61K31/4045*(2006.01)i, *A61K31/69*(2006.01)i,
A61K38/00(2006.01)i, *A61K48/00*(2006.01)i, *A61P33/06*(2006.01)i, *G01N33/15*
(2006.01)i, *G01N33/50*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00, *A61K31/4045*, *A61K31/69*, *A61K38/00*, *A61K48/00*, *A61P33/06*,
G01N33/15, *G01N33/50*

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	1922-1996	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	1996-2012
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	1971-2012	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), *JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)*

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Scheibel LW, et al., "Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (<i>Plasmodium falciparum</i>): implications for drug design", <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> , 1987.10, Vol. 84, No. 20, p. 7310-7314	13, 16 15 14
X Y A	Bagnaresi P, et al., "Desynchronizing Plasmodium Cell Cycle Increases Chloroquine Protection at Suboptimal Doses", <i>The Open Parasitology Journal</i> , 2008, Vol. 2, p. 55-58	13, 16 15 14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 January, 2012 (11.01.12)

Date of mailing of the international search report
24 January, 2012 (24.01.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/074876

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	Matveeva NB, et al., "Suppression of the autooscillatory contractile activity of <i>Physarum polycephalum</i> plasmodium by the inhibitor of the IP3-Induced Ca ²⁺ release, 2-aminoethoxydiphenyl borate", <i>Biochemistry (Moscow) Supplemental Series A: Membrane and Cell Biology</i> , 2010.03, Vol. 4, No. 1, p. 70-76	13,15,16 14
Y A	Beraldo FH, et al., "Human malarial parasite, <i>Plasmodium falciparum</i> , displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the <i>P. falciparum</i> cell cycle", <i>Journal of Pineal Research</i> , 2007.11, Vol. 43, No. 4, p. 360-364	13,15,16 14
P,X	Masahiro ENOMOTO et al., "Sekinaiki Nettainetsu Malaria Genchu no Jihatsuteki Calcium Shindo wa Seijo na Saibo Hatsuiku ni Hissu de aru", <i>The Japanese Society of Parasitology Taikai Program Shorokushu</i> , 2011.02, vol.80th, page 51 (BPA-04)	13-16
X A	Naik RS, et al., "Developmental stage-specific biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in intraerythrocytic Plasmodium falciparum and its inhibition in a novel manner by mannosamine", <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 2000.08.11, Vol. 275, No. 32, p. 24506-24511	14 13,15,16
X A	Slater AF, et al., "Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites", <i>Nature</i> , 1992.01.09, Vol. 355, No. 6356, p. 167-169	14 13,15,16
A	Srinivasan V, et al., "Malaria: therapeutic implications of melatonin", <i>Journal of Pineal Research</i> , 2010.01, Vol. 48, No. 1, p. 1-8	13-16
A	Beraldo FH, et al., "Products of tryptophan catabolism induce Ca ²⁺ release and modulate the cell cycle of <i>Plasmodium falciparum</i> malaria parasites", <i>Journal of Pineal Research</i> , 2005.10, Vol. 39, No. 3, p. 224-230	13-16
A	Hiroshi OTOMO, "Chemotherapy for malaria", <i>Kosei Busshitsu kara Kagaku Ryoho no Ryoiki</i> , 1986.03, vol.2, no.3, pages 328 to 333	13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/JP2011/074876**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 12 involve "methods for treatment of the human body or animal body by therapy" and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/074876

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The invention described in claim 13 relates to a therapeutic agent for malaria, and the invention described in claim 14 relates to a method for screening for a candidate for a therapeutic agent for malaria. There is no technical relationship between the treatment of a disease and the screening for a candidate for a therapeutic agent. Therefore, these inventions are common only in a matter that these inventions relate to a therapeutic agent for malaria. However, the technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the contents disclosed in document 1 or 2 shown below. Therefore, the technical feature cannot be regarded as a special technical feature. Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Document 1: Scheibel LW, et al., "Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*): implications for drug design", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987.10, Vol. 84, No. 20, p. 7310-7314

Document 2: Bagnaresi P, et al., "Desynchronizing Plasmodium Cell Cycle Increases Chloroquine Protection at Suboptimal Doses", The Open Parasitology Journal, 2008, Vol. 2, p. 55-58

Claims include the following two (groups of) inventions.

(Invention 1) The inventions described in claims 13, 15 and 16.

In these inventions, a medicinal agent capable of inhibiting "the export of calcium ions from an organelle to the outside of the organelle in a malarial parasite" or "the transport of calcium ions from the outside of a cell into the cell in a malarial parasite" is applied for the treatment of malaria or the prevention of secondary infection of malaria.

(Invention 2) The invention described in claim 14.

The invention relates to "a method for screening for a candidate for a therapeutic agent for malaria, which comprises: a first step of carrying out the *in vitro* synchronous culture of a malarial parasite and adding a medicinal agent of interest to the resulting culture at any growth stage of the malarial parasite which lies between the state in which the malarial parasite has a ring form and the initial schizont state; and a second step of selecting the medicinal agent as a candidate for a therapeutic agent for malaria when the growth of the malarial parasite is inhibited or the malarial parasite is killed by the addition of the medicinal agent".

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/4045(2006.01)i, A61K31/69(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P33/06(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/4045, A61K31/69, A61K38/00, A61K48/00, A61P33/06, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Scheibel LW, et al., "Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (<i>Plasmodium falciparum</i>): implications for drug design", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987.10, Vol. 84, No. 20, p. 7310-7314	13, 16
Y		15
A		14
X	Bagnaresi P, et al., "Desynchronizing Plasmodium Cell Cycle Increases Chloroquine Protection at Suboptimal Doses", The Open Parasitology Journal, 2008, Vol. 2, p. 55-58	13, 16
Y		15
A		14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 11. 01. 2012	国際調査報告の発送日 24. 01. 2012
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 小松 邦光 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	Matveeva NB, et al., "Suppression of the autooscillatory contractile activity of <i>Physarum polycephalum</i> plasmodium by the inhibitor of the IP3-Induced Ca ²⁺ release, 2-aminoethoxydiphenyl borate", <i>Biochemistry (Moscow)</i> Supplemental Series A: Membrane and Cell Biology, 2010.03, Vol. 4, No. 1, p. 70-76	13, 15, 16 14
Y A	Beraldo FH, et al., "Human malarial parasite, <i>Plasmodium falciparum</i> , displays capacitative calcium entry: 2-aminoethyl diphenylborinate blocks the signal transduction pathway of melatonin action on the <i>P. falciparum</i> cell cycle", <i>Journal of Pineal Research</i> , 2007.11, Vol. 43, No. 4, p. 360-364	13, 15, 16 14
P, X	榎本匡宏, et al., "赤内期熱帯熱マラリア原虫の自発的カルシウム振動は正常な細胞発育に必須である", 日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集, 2011.02, Vol. 80th, p. 51 (BPA-04)	13-16
X A	Naik RS, et al., "Developmental stage-specific biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in intraerythrocytic <i>Plasmodium falciparum</i> and its inhibition in a novel manner by mannosamine", <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 2000.08.11, Vol. 275, No. 32, p. 24506-24511	14 13, 15, 16
X A	Slater AF, et al., "Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites", <i>Nature</i> , 1992.01.09, Vol. 355, No. 6356, p. 167-169	14 13, 15, 16
A	Srinivasan V, et al., "Malaria: therapeutic implications of melatonin", <i>Journal of Pineal Research</i> , 2010.01, Vol. 48, No. 1, p. 1-8	13-16
A	Beraldo FH, et al., "Products of tryptophan catabolism induce Ca ²⁺ release and modulate the cell cycle of <i>Plasmodium falciparum</i> malaria parasites", <i>Journal of Pineal Research</i> , 2005.10, Vol. 39, No. 3, p. 224-230	13-16
A	大友弘士, "マラリアの化学療法", 抗生物質から化学療法の領域, 1986.03, Vol. 2, No. 3, p. 328-333	13-16

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 1 - 1 2 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求項1-12は「治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることが要しない対象に係るものである。

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページを参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

<第III欄について>

請求項13に記載の発明はマラリアの治療薬に係る発明であり、請求項14に記載の発明はマラリアの治療薬候補のスクリーニング方法に係る発明であるところ、疾患の治療と治療薬候補のスクリーニングとは技術的には関連のない事項であるから、これらの発明は、マラリアの治療薬に係るものという点でのみ共通している。しかしながら、この技術的特徴は、下記文献1又は2などの開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、ほかに同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

文献1 : Scheibel LW, et al., "Calcium and calmodulin antagonists inhibit human malaria parasites (*Plasmodium falciparum*) : implications for drug design", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987.10, Vol. 84, No. 20, p. 7310-7314

文献2 : Bagnaresi P, et al., "Desynchronizing Plasmodium Cell Cycle Increases Chloroquine Protection at Suboptimal Doses", The Open Parasitology Journal, 2008, Vol. 2, p. 55-58

そして、請求の範囲には以下に示す2の発明（群）が含まれる。

(発明1) 請求項13、15、16に係る発明

「マラリア原虫の細胞内小器官内から細胞内小器官外へのカルシウムイオンの搬出」又は「マラリア原虫の細胞外から細胞内へのカルシウムイオンの搬入」を抑制する薬剤を、マラリアの治療又はマラリアへの二次感染の防止のために適用するもの。

(発明2) 請求項14に係る発明

「マラリアの治療薬候補のスクリーニング方法であって、イン・ビトロでマラリア原虫を同調培養し、当該マラリア原虫の生育ステージが輪状体の段階から初期のシゾント段階の間において、スクリーニング対象となる薬剤を添加する第一工程と、次いで、上記薬剤の添加により、上記マラリア原虫の生育が抑制された、又はマラリア原虫が死滅した場合に、当該薬剤をマラリアの治療薬候補として選択する第二工程と、を含んでいるマラリアの治療薬候補のスクリーニング方法」に係るもの。