

厚生科学研究研究費補助金  
エイズ対策研究事業

# 日和見感染寄生原虫の治療薬の開発研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 仙道富士郎

平成13 (2001) 年 3月

## 目次

I. 総括研究報告書	
日和見感染寄生原虫の治療薬の開発研究	1
仙道富士郎	
II. 分担研究報告	
1. トキソプラズマ症の新規薬剤開発に関する基礎研究	5
仙道富士郎	
2. クリプトスポリジウム症の治療薬開発に関する基礎研究	8
井関基弘	
3. 原虫感染症の治療法の調査研究	12
増田剛太	
4. トキソプラズマ特異酵素 (NTPase) を標的にした原虫増殖阻害剤の開発研究	15
浅井隆志	

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

（総括）研究報告書

日和見感染寄生原虫の治療薬の開発研究

主任研究者 仙道富士郎 山形大学医学部 教授

**研究要旨** エイズ患者に多発する日和見感染症のうちクリプトスポリジウム症とトキソプラズマ症は、難治性の原虫感染症である。現在両感染症の治療に使われている薬剤は、治療効果が低いうえに副作用も強い。本研究は、より治療効果が高く副作用のない新しい治療薬の開発を目的とし、その目的遂行のため、1) トキソプラズマ原虫特異的代謝経路の検索および関連酵素遺伝子のクローニング（仙道、浅井）、2) トキソプラズマ原虫特異的酵素に対する阻害剤の検索（浅井）、3) クリプトスポリジウムの *in vitro* 培養系の確立および定量法の検討（井関）、4) 両原虫症の全体像の把握、治療実態の現状に関する検討（増田）、を行った。その結果、本年度は、トキソプラズマ原虫に関する研究では、1) 解糖系代謝経路に関与するトキソプラズマヘキソキナーゼ遺伝子のクローニング・組み換え酵素の作製に成功したほか、2) トキソプラズマ原虫に特異的な NTPase の活性を阻害する 2 種類の化合物を選出し、それらが虫体の増殖を強く阻害することを明らかにした。3) クリプトスポリジウムに関する研究でも、これまで困難とされていた *in vitro* 培養系の確立に成功するなど、非常に意義のある成果が得られた。

分担研究者 井関基弘 金沢大学医学部、増田剛太 東京都立駒込病院、浅井隆志 慶応義塾大学医学部

#### A. 研究目的

エイズ患者に合併症としてみられるクリプトスポリジウム症の治療にはパロモマイシン等の抗生剤、トキソプラズマ症の治療には各種のサルファ剤やアセチルスピラマイシン等の抗生剤が現在使用されているが、治療効果は低く治療は困難である。またこれらの薬剤は副作用も強くこのような症例においては使用に厳重な注意を必要とする。したがって、より治療効果が高く副作用のない新しい治療薬の開発が望まれている。本研究では新規の治療薬を捜すべく治療薬の標的となる原虫に特異的な代

謝経路の検索にその重点をおく。特異的な代謝経路を標的にした治療薬はクリプトスポリジウム症と急性トキソプラズマ症の特効薬となることが期待される。しかし周知のとうり薬剤の開発には多大な経費と時間を要するため、原虫症の希用薬は民間の商業ベースでの開発には期待できない。実際に患者がいるがそれを治療する適切な薬剤がないという現在の状況をそのまま放置するわけにはいかないと考える。またこの問題の解決は行政およびこれら原虫症を研究する研究者の責務であると考え。今後予想されるエイズ患者の増加を考えれば、クリプトスポリジウム症とトキソプラズマ症の特異的治療薬を開発する意義は極めて大きいといえる。

## B. 研究方法

### 1. トキソプラズマ原虫特異的代謝経路の検索

解糖系の初段の反応を触媒するトキソプラズマヘキソキナーゼ(TgHK1) : a)ヘキソキナーゼの cDNA をクローニングし、TgHK1 のアミノ酸配列を解析するとともに組み換えヘキソキナーゼを作製した。b)この組み換えヘキソキナーゼについて酵素学的検討を行った。

### 2. トキソプラズマ原虫特異的酵素に対する阻害剤の検索

i) トキソプラズマ原虫特異的な酵素である NTPase の活性を阻害する薬剤について検索した。96 穴マイクロプレートに ATP、被検用化合物と NTPase 等を加え、一定時間後にその活性を測定することにより、NTPase 阻害剤の検索を行った。さらに、ii) NTPase 阻害効果が認められた化合物について、トキソプラズマ虫体の増殖を実際に阻害するか検討した。

### 3. クリプトスポリジウムの in vitro 培養系の確立および定量法

i) クリプトスポリジウムの in vitro 培養系の確立 : ヒトの大腸癌由来上皮細胞(HCT-8)の培養系にクリプトスポリジウムを感染さ、虫体の増殖が認められるか検討した。

ii) クリプトスポリジウムの定量法の開発 : a) in vitro 培養系で感染に用いたオオシストをあらかじめ Texas Red 標識抗クリプトスポリジウム抗体で染色した。一方、培養後に産生されたオオシストを抗クリプトスポリジウムウサギ血清と FITC 標識抗ウサギ抗体で染色し、両者を識別して計数することにより、虫体の増殖を定量した。b)市販の DNA 抽出用キットを用いてオオシストから抽出した DNA サンプルを 10 倍階段希釈し、PCR による定量化が可能か検討した。

4. 両原虫症の全体像の把握、治療実態の現状  
東京都立駒込病院で 1985~1999 年の 15 年間に診療した HIV 感染者について、AIDS 発症時の指標疾患としてのトキソプラズマ症および

クリプトスポリジウム症併発例について検討した。

(倫理面への配慮)

三年計画の本研究期間ではヒトへの臨床試験までには到達しない。したがって、人権擁護上の倫理面の配慮は本研究では該当しない。また実験に用いる原虫類は基本的に in vitro 培養するので実験動物は使用せず、動物愛護上の倫理面の配慮も本研究では該当しない。

## C. 研究結果

### 1. トキソプラズマ原虫特異的代謝経路の検索

解糖系の初段の反応を触媒するトキソプラズマヘキソキナーゼ(TgHK1) : a)遺伝子の全長をクローニングし、TgHK1 のアミノ酸配列を解析した結果、熱帯熱マラリア原虫の HK と高い同一性(43%)を示した。またトキソプラズマとマラリア原虫にのみ特異的に見られる挿入および欠損部位の存在が明らかになった。b)組み換えヘキソキナーゼを作製し、基質特異性について検討した結果、グルコースだけでなく、フルクトース、マンノース、ガラクトースをも基質にすることが明らかになった。

### 2. トキソプラズマ原虫特異的酵素に対する阻害剤の検索

i) トキソプラズマ原虫特異的な酵素である NTPase の活性を阻害する薬剤について、現在まで約 10 万種類の化合物をスクリーニングし 35 種類の候補化合物を選択してきた。今年度は、この 35 種類の中から 8 種類の化合物(コード No: L-092060, -092180, -572081, -657833, -669590, -670637, -685117, -729962)について、NTPase 活性の阻害効果について検討した。その結果、L-657833 と L-729962 以外の 6 種化合物が、低濃度で NTPase の活性を阻害した。

ii) NTPase 阻害効果が認められた上記 6 種類の化合物について、トキソプラズマ虫体の増殖を実際に阻害するか検討した。その結果、L-669590 と L-685117 がトキソプラズマ虫体の

増殖を強力に阻害することが明らかになった。虫体の増殖を 50% 阻害する濃度(IC50)は、それぞれ 7.0 と 13.5  $\mu\text{M}$  であった。

### 3. クリプトスポリジウムの *in vitro* 培養系の確立および定量法

i) クリプトスポリジウムの *in vitro* 培養系の確立: クリプトスポリジウムのオオシストをヒト大腸癌由来上皮細胞(HCT-8)の培養系にを感染させると効率よく増殖し、感染 48 時間後には約 160 個の、同 72 時間後には約 260 個のオオシストが新たに産出された。この 72 時間後の培養系を用いることにより、増殖抑制効果を判定しうることが明らかになった。

ii) クリプトスポリジウムの定量法の開発: a) 感染に用いた添加オオシストが赤 (Texas Red) と緑 (FITC) に、培養後に産生されたオオシストが緑 (FITC) に染色されることから、両者を識別することが *in vitro* の培養系で可能になった。b) 6 社 10 種の DNA 抽出キットについて検討した。その結果、2 社 3 種のキットで、オオシスト 1~10 個由来のゲノム DNA を検出できることが明らかになった。

### 4. 両原虫症の全体像の把握、治療実態の現状

東京都立駒込病院で 1985~1999 年の 15 年間に診療した HIV 感染者数は 858 人で、そのうち AIDS 発症者数は 265 人であった。ii) AIDS 発症時、7 例にトキソプラズマ脳炎、2 例にクリプトスポリジウム腸炎の併発が認められた。iii) トキソプラズマ脳炎発症時の  $\text{CD4}^+$  T リンパ球数の平均値は  $44.3/\mu\text{l}$  と減少していた。iv) クリプトスポリジウム症を併発した AIDS 発症例は現在まで 4 例報告されている。その  $\text{CD4}^+$  T リンパ球数は  $7-48/\mu\text{l}$  と著明に減少していた。3 症例ではパロモマイシン等が試みられたが、全例死亡した。

### D. 考察

トキソプラズマ原虫の解糖系の初段の反応を触媒する TgHK1 が広い基質特異性を有する

こと、およびアミノ酸配列の特異的挿入部位と欠損部位が存在することを明かにした。この知見は、TgHK1 阻害剤のデザインおよび検索をする際に重要な情報になると考えられる。

トキソプラズマ原虫特異的酵素である NTPase に対して活性阻害効果が認められた L-669590 (IC50: 7.0  $\mu\text{M}$ ) と L-685117 (IC50: 13.5  $\mu\text{M}$ ) によるトキソプラズマ虫体増殖阻害作用と NTPase 活性阻害効果との直接の関係は現在のところ不明である。しかしながら、これら 2 種類の化合物は生物毒性の低い物質であることから、NTPase を介した増殖阻害である可能性が高い。また宿主細胞への毒性が低いなど、治療薬としての可能性が期待される。

ヒト大腸癌由来上皮細胞 (HCT-8) を用いたクリプトスポリジウムの *in vitro* 培養系を確立するとともに、産出されたオオシストを PCR により定量化する可能性が示唆されたことから、従来、困難とされてきた増殖阻害剤のスクリーニングが飛躍的に進展することが期待される。

### E. 結論

1. トキソプラズマヘキソキナーゼが、アミノ酸配列や基質特異性からトキソプラズマ原虫に特徴的な酵素であり、治療薬開発の対象として有望であることが推察された。
2. トキソプラズマ原虫に特異的な NTPase 阻害剤である 2 種類の化合物 (L-669590 および L-685117) が、虫体の増殖を強く阻害することを明かにした。両化合物は細胞毒性が低いことから、副作用のない治療薬としての可能性が期待される。
3. クリプトスポリジウムの *in vitro* 培養系の確立により、増殖阻害効果のある薬剤のスクリーニングが飛躍的に進展することが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. L. Chen, T. Watanabe, H. Watanabe, and F. Sendo: Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. *Eur. J. Immunol.* 31, 265-275, 2001.
2. J. Sanuki, K. Nakano, M. Tokoro, T. Nozaki, E. Okuzawa, S. Kobayashi, and T. Asai: Purification and identification of major soluble 40-kDa antigenic protein from *Entamoeba histolytica*: its application for serodiagnostic of asymptomatic amebiasis. *Parasitol. Int.*, 2001 (in press).
3. Wu, Z., Nagano, L., Iseki, M., et. al.: Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. *Molec. Cell Probes* (2000), 14, 33-39, 2000.
4. Y. Kanjo, I. Kimata, M. Iseki, S. Miyanaga, H. Okada, C. Banno, M. Matsumoto, and Y. Shimada: Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in vitro excystation and animal infectivity. *Water Sci. Technol.* 41: 119-125, 2000.
5. C. Lin, Z. Zhang, and F. Sendo: Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 120, 125-133, 2000.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当せず。

### 2. 実用新案登録

該当せず。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
（分担）研究報告書

トキソプラズマ症の新規薬剤開発に関する基礎研究

主任研究者 仙道富士郎 山形大学医学部 教授

**研究要旨** トキソプラズマ症に対する新規薬剤を開発することを目的としてトキソプラズマのエネルギー代謝の中心である解糖系についての基礎的解析を開始した。初年度は解糖系の初段の反応を触媒するヘキソキナーゼの遺伝子をクローニングし、酵素学的解析を行った。トキソプラズマヘキソキナーゼは蛋白一次配列からも特異的な挿入・欠損部位を有するばかりでなく、基質特異性・親和性など生化学的にもほ乳類のヘキソキナーゼと異なった特徴を有していた。これらの結果はトキソプラズマの解糖系酵素が創薬のための標的となりうることを示唆している。

研究協力者： 野崎 智義  
国立感染症研究所

ヘキソキナーゼ(HK)の遺伝子をクローニングし、酵素学的解析を行うことを目的とした。

#### A. 研究目的

トキソプラズマ症に対しては現在各種のサルファ剤及びアセチルスピラマイシン等の抗生剤が通常用いられているが、治療効果は低く、治療は困難である。そこで新規のトキソプラズマ症製剤を開発するための基礎的な特異的代謝経路及び標的分子の探索が不可欠である。我々はトキソプラズマのエネルギー代謝の中心である解糖系を新規薬剤開発の標的として考慮するために基礎的な解析を開始した。トキソプラズマの解糖系はトキソプラズマの発育ステージ特異的な調節を受けるなどトキソプラズマの生物学にとって中心的な役割をはたしていることが知られている。こうした例はブラディゾイト特異的に発現しているエノラーゼ、或いは、ステージ特異的な乳酸脱水素酵素のアイソザイムなどに端的に表れている。初年度は解糖系の初段の反応を触媒する

#### B. 研究方法

##### 1. トキソプラズマ ヘキソキナーゼ cDNA のクローニング

*T. gondii* の EST のデータベースに登録された他種のヘキソキナーゼ(HK)に相同性を示すエントリー(tgzy27e07.r1)の配列をもとに PCR プライマーを作成し、PCR によって cDNA 断片を獲得した。この断片でタキゾイトの mRNA から作成された cDNA ライブラリーをハイブリダイゼーションによりスクリーニングし全長の cDNA を獲得した。

##### 2. 組換えヘキソキナーゼの作成

適当なプライマーを用いて TgHK1 の蛋白コード領域を増幅し、pGEX5X-1 にクローニングし、発現プラスミドを作成した。更にこのプラスミド用いて大腸菌株 DH5a を形質転換し、1 mM isopropyl b-D-thiogalactoside の存在下で 37°C で

Xaで消化した後、分離精製し組換え TgHK1 蛋白(rTgHK1)を得た。

### 3. ヘキソキナーゼアッセイ

HKの活性の測定はHKの反応によって生じたADPをカップリング法により NADHの消費でモニターして測定した。

(倫理面への配慮) 該当せず。

## C. 研究結果

### 1. トキソプラズマ ヘキソキナーゼ遺伝子のクローニングと解析

トキソプラズマのヘキソキナーゼ(TgHK1) cDNAは全長2952bpであった。このcDNAは155及び1370ntの5'及び3'非翻訳領域と1407ntの蛋白コード領域をもっていた。蛋白コード領域から推定されたアミノ酸配列は468アミノ酸、推定分子量51.5kDa、pI 5.8であった。TgHK1蛋白は他種のHkと30-43%の同一性を示した。特に熱帯熱マラリア原虫のHKと最も高い同一性(43%)を示した。マラリア原虫、マンソン住血吸虫、酵母、シロイネナズナ、ヒトのHKと蛋白配列の多重比較を行ったところ、リン酸及び塩基の結合部位・糖の側鎖の結合部位などに重要であることがX線解析法で明らかとなっているアミノ酸は完全に保存していた。しかしながら、トキソプラズマ及びマラリア原虫にだけ特異的に見られる挿入及び欠損部位が存在した。

### 2. 組換えトキソプラズマ ヘキソキナーゼの酵素学的解析

得られたrTgHK1はSDS-PAGE上で約50kDaの移動度を持ち、95%以上の精製度を示した。至適pHは7であった。グルコース・ATPに対してはそれぞれ約6mM、0.2mMのKmを示した。比活性は2-4mmol/min/mg proteinであった。定性的な基質特異性解析の準備実験の結果によると、rTgHK1はグルコース・フルクトース・マンノース・ガラクトースを基質にすることが明らかとなった。更に、グルコース-6-リン酸

による阻害は見られなかった。

## D. 考察

トキソプラズマにおける糖代謝は生活環のステージにより微妙な調節を受けている。更に、トキソプラズマ原虫の解糖系酵素群がほ乳類のそれらと量的・質的に大きく異なるため、薬剤開発のための有用な標的となる可能性がある。本年度、我々はトキソプラズマの解糖系を解析する足がかりとして初段酵素であるHK遺伝子を獲得し、生化学的解析を加えた。HKには一般に50kDaのものと100kDaのものと知られているが、ATPへの生理的な親和性及びグルコース-6-リン酸による阻害の欠如はTgHK1が比較的進化度の低いHK型であることを示唆している。しかしながら、rTgHK1はグルコースに対して低い親和性(Km 6mM)を示した。更に、糖の基質特異性が広くがグルコースだけでなく、フルクトース・マンノース・ガラクトースを基質としうることはTgHK1がトキソプラズマ特異的な酵素学的特徴を持つことを示唆している。更にアミノ酸一時配列からもまた、TgHK1に特異的挿入・欠損部位が存在し、これらは阻害剤及びワクチンをデザインする際に有益な情報であると考えられる。

## E. 結論

以上の結果はトキソプラズマヘキソキナーゼは蛋白一次配列からも、酵素学的にもほ乳類のヘキソキナーゼと異なった特徴を有していることを示しており、トキソプラズマの解糖系酵素が創薬のための標的となりうることを示唆している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. L. Chen, T. Watanabe, H. Watanabe, and F. Sendo: Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but

protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. Eur. J. Immunol. 31, 265-275, 2001.

2. Z. Zhang, L. Chen, S. Saito, O. Kanagawa, and F. Sendo: Possible modulation by male sex hormone of Th1/Th2 function in protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection in mice. Exp. Parasitol. 96, 121-129, 2000.

3. L. Chen, Z. Zhang, and F. Sendo: Neutrophils play a critical role in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. Clin. Exp. Immunol. 120, 125-133, 2000,

4. Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Tokoro, M., and Takeuchi, T. (2000) Characterization of a gene encoding cystathione  $\gamma$ -synthase involved in methionine biosynthesis from *Entamoeba*. Arch. Med. Res. S69-70.

5. Nozaki, T., Tokoro, M., Imada, M., Saito, Y., Abe, Y., Shigete, Y., and Takeuchi, T. (2000) Cloning and biochemical characterization of genes encoding two isozymes of cysteine synthase from *Entamoeba dispar*. Mol. Biochem. Parasitol. 107, 129-133.

6. Nakamura-Sato, Y., K. Sasaki, H. Watanabe, Y. Araki, and F. Sendo: Clustering on the forward surfaces of migrating neutrophils of a novel glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein that may regulate neutrophil adherence and migration. J. Leukoc. Biol. 68: 650-654, 2000.

## G 知的所有権の取得状況

### 1. 取得状況

該当せず。

### 2. 実用新案特許

該当せず。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
（分担）研究報告書

クリプトスポリジウム症の治療薬開発に関する基礎研究

分担研究者： 井関基弘 金沢大学大学院医学研究科 教授

**研究要旨** クリプトスポリジウム症の治療に有効な薬剤を *in vitro* でスクリーニングする方法を確立することを目的に研究を開始した。ヒトの大腸癌由来上皮細胞である HCT-8 細胞培養系で原虫が良好に増殖することを確認し、オーシスト添加 72 時間後の材料が判定に適していることを示した。増殖原虫の定量には、顕微鏡的な計数も可能ではあるが、効率のよい DNA 抽出法とプライマーを選択すれば、オーシスト 1-10 個を検出できることが判明したので、PCR 法で定量する方がより効率のよい方法であることが示唆された。今後はリアルタイム PCR 法などを導入して、効率のよい *in vitro* スクリーニング法を確立することを目指したい。

研究協力者： 木俣 勲 大阪市立大学  
大学院医学研究科  
吉川尚男 奈良女子大学  
理学部

#### A. 研究目的

クリプトスポリジウム症はエイズや先天性免疫不全症患者では致死感染を起こすが、有効な治療薬はまだ見つかっていない。新薬の開発が焦点の課題であるが、候補となる薬剤の有効性を評価するには、スクリーニングのための迅速で正確なアッセイ系の確立が欠かせない。これまでは感染マウスの系を用いて各種薬剤の有効性を評価してきたが、高価な免疫不全マウスの使用が必須であること、判定までに数週間を要すること、糞便中に排出されるオーシスト数の顕微鏡的定量には多大の労力を要することなどから、多種類の薬剤を短期間にスクリーニングすることは困難であった。初年度は、*in vitro* でのアッセイ系を

確立することを目的とした。

#### B. 研究方法

ヒトの大腸癌由来上皮細胞（HCT-8）培養系にクリプトスポリジウムを感染させ、原虫の増殖を経時的に定量する方法として、1) 蛍光抗体染色による原虫数の顕微鏡的計数法、2) 原虫の DNA 抽出法と定量法、の 2 項目について検討した。両実験に使用したオーシストは *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株である。

実験 1) では、添加オーシストを Texas Red 標識抗クリプトスポリジウム抗体であらかじめ染色し、培養後の虫体の検出と計数には抗クリプトスポリジウム・ウサギ血清と FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体による間接蛍光抗体法を用いた。添加したオーシストと新しく発育したオーシストとを判別するためである。オーシスト添加後の虫体の増殖は蛍光顕微鏡下で 24、48、72 時間後に計数・定量した。また、虫体の確認と発育ステージ

の分類には、DAPI 染色による核の形態と、微分干渉顕微鏡 (DIC) による形態観察を併用した。

実験 2) では、予備実験として、現在市販されている 10 種の DNA 抽出キットを使用し、オーシストから DNA を抽出するための各キットの有効性と感度について評価した。有効性と感度はクリプトスポリジウムに特異的なプライマーを用いた PCR 増幅の有無と程度で比較検討した。用いたキットは、(1) DNAzol Reagent (Gibco BRL), (2) DNAzol BD Reagent (Gibco BRL), (3) Plant DNAzol Reagent (Gibco BRL), (4) Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), (5) MagExtractor-Genome- (Toyobo), (6) MagExtractor-Plant Genome- (Toyobo), (7) Dneasy Tissue Kit (QIAGEN), (8) PUREGENE Cell and Tissue Kit (Gentra System), (9) PUREGENE Blood Kit (Gentra System), (10) microLYSIS (Microzone Limited) である。感染マウスの糞便から精製して凍結保存した同一ロットのオーシスト ( $1 \times 10^6$  個 / 10 ml) を各 DNA 抽出キットで抽出し、最終的に得られた DNA 試料は 100 ml に懸濁した。ただし、(10) microLYSIS は、その抽出方法が他社と全く異なっており、 $10^5$  個 / 1 ml のオーシストを用いて説明書通りの処理を行い、その 1/20 量を用いて PCR 増幅を行った。

PCR 増幅には、*Cryptosporidium parvum* に特異的と報告されている 18S rRNA gene を増幅するプライマー 18S-SF (Morgan et al. 1998) を用いた。増幅の条件は、94°C 30 秒、57°C 30 秒、72°C 1 分で 30 サイクル行った。PCR 反応液には、抽出したゲノム DNA を原液から 10 段階希釈で 10,000 倍希釈まで作製し、その 1 ml を用いて PCR 増幅を行った。その後、反応液 7 ml をアガロース電気泳動を行い、増幅の有無とバンドの濃淡で各キットの有効性と感度を評価した。

(倫理面への配慮) 該当せず。

### C. 研究結果

HCT-8 細胞培養系でクリプトスポリジウムは効率よく増殖した。顕微鏡的観察では、オーシストを添加してから 24 時間後、48 時間後、72 時間後と、虫体は経時的に増殖し、72 時間後にはメロゾイトやガumont、新しく形成されたオーシストなど、各発育ステージの虫体が多数検出された。96 時間後では HCT-8 細胞自身が増殖しすぎて虫体の観察・計数が困難になった。添加オーシストを Texas Red で前染色する手法は新生オーシストを判別する上で非常に有用であった。また、HCT-8 細胞は Caco-2 細胞よりも維持しやすく、原虫の発育という面でも優れていた。

一方、市販のキットによるオーシストからの DNA 回収効率は製品により異なり、DNAzol BD Reagent (Gibco BRL)、MagExtractor-Genome- (Toyobo)、および MagExtractor-Plant Genome- (Toyobo) が他の製品よりも優れていた。これらで抽出したゲノムは 1,000 倍希釈でも明瞭なバンドを示した。最終的に回収したゲノムを 100 ml に懸濁し、それを 1,000 倍希釈したゲノム 1 ml を用いて PCR 増幅してバンドが確認されたことから、10 個のオーシスト由来のゲノムで PCR 増幅されたことになる。とくに、MagExtractor-Plant Genome- (Toyobo) の場合は、10,000 倍希釈材料からの PCR 増幅でもわずかにバンドが観察されたことから、オーシスト 1 個から抽出されたゲノムから増幅されたことになる。

### D. 考察

HCT-8 細胞培養系でクリプトスポリジウムが効率よく増殖したことから、*in vitro* での薬剤の有効性のスクリーニングに適用できることが示唆され、効果判定にはオーシスト添加の 72 時間

後が適当と考えられた。したがって、感染マウスの系を用いる場合に比べて、スクリーニングに要する時間を大幅に短縮することが可能である。しかし、今回試みた顕微鏡的虫体計数法には難点もある。1 培養ウエル中での虫体の増殖は均一ではなく、局所的に集塊をなして点在する傾向があり、多数の視野を鏡検することが必要で、かなりの時間と労力を要することである。

一方、種々のゲノム抽出キットによるオーシストからのゲノム抽出効率を PCR 増幅の有無により比較検討した結果、2、3 の製品ではオーシスト 1-10 個を検出できることが判明した。これまで、個々の研究者により様々な DNA 抽出方法がクリプトスポリジウムに応用されているが、種々の抽出方法を同時に比較検討した報告例は見当たらない。本研究では、クリプトスポリジウムの検出方法の一つに用いられている PCR 増幅法において、その時に用いたゲノム抽出方法によって、回収されるゲノムの量が著しく異なってくることを示し、PCR 法を応用したクリプトスポリジウム研究において、ゲノム抽出方法が重要である事を明らかにした。in vitro 培養系におけるクリプトスポリジウムの増殖の定量方法が困難な現在、PCR 法を応用した評価方法を確立するには、クリプトスポリジウム虫体から効率良くゲノムを抽出する必要がある。今後、今回判明した最良のゲノム抽出方法を応用し、クリプトスポリジウムの in vitro 系における増殖評価方法としての PCR 法を応用した系を確立することが可能と思われる。特に今回、クリプトスポリジウムの 18S rRNA gene の特異的な領域を増幅するプライマーを用いた理由は、すでに報告されている種々のプライマーを用いた PCR 増幅予備実験で、18S rRNA gene を増幅するプライマーが最も感度が優れていたからである。オーシストにおいても 18S rRNA gene のコピー数が他のプライマーが

増幅する遺伝子より多かったためと思われる。今後、培養系材料に応用する場合、虫体はオーシストよりも栄養型、シゾン、メロゾイトの方が多いと想定されることから、細胞の増殖と関係する 18S rRNA gene を標的にした PCR 増幅の系が有効と思われる。今後はリアルタイム PCR 法などを導入して、効率のよい in vitro スクリーニング法を確立することを目指したい。

## E 結論

HCT-8 細胞培養系でクリプトスポリジウムが効率よく増殖することから、薬剤のスクリーニングには in vitro アッセイが有用であることが示された。増殖虫体の定量には顕微鏡的計数も可能ではあるが、効率のよい DNA 抽出法とプライマーを選択することにより、PCR 法で原虫数を定量する方がより効率のよい方法であることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yamamoto, N., Urabe, K., Takaoka, M., Nakazawa, K., Gotoh, A., Haga, M., Fuchigami, H., Kimata, I., Iseki, M., : Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. J. J. A. Inf. D., 76: 518~525, 2000.

2) Wu, Z., Nagano, I., Matsuo, A., Uga, S., Kimata, I., Iseki, M., Takahashi, Y. : Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. Molecul. & Cell Probes (2000) 14: 33-39, 2000.

3) Kanjo, Y., Kimata, I., Iseki, M., Miyanaga, S., Okada, H., Banno, C., Matsumoto, M., Shimada, Y. : Inactivation of *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone and ultraviolet irradiation evaluated by in

vitro excystation and animal infectivity. *Water Sci. & Technol.*, 41: 119-125, 2000.

4) 井関基弘, 木俣 勲: 感染症治療ガイド, クリプトスポリジウム症. 治療 82 (増刊号) : 943-945, 2000

5) 井関基弘, 木俣 勲: クリプトスポリジウム症. 小児科 41 : 1099-1105, 2000

6) 井関基弘, 木俣 勲: クリプトスポリジウム症—免疫不全小児における難治性慢性下痢. 小児科診療 63 : 1055-1058, 2000

7) 井関基弘, 木俣 勲: 病気のはなし, クリプトスポリジウム症. 検査と技術 28 : 108-114, 2000

8) 平田哲生, 座覇 修, 金城福則, 斎藤 篤, 當真 弘, 佐藤良也, 中村 広, 井関基弘: 最近経験したサイクロスポーラ症の1例. 病原微生物検出情報 21 : 194-195, 2000

9) 井関基弘, 木俣 勲: 感染性食中毒 10. 原虫. 治療学 34 : 759-761, 2000

## 2. 学会発表

1) Kimata, I., Iseki, M., Urakami, I. : Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ultraviolet irradiation. 12th German-Japan Symposium on Protozoal Diseases. (July, 2000, Bonn).

2) Kanjo, Y., Kimata, I., Iseki, M., et al. : Effect of co-existing substances on the inactivation *Cryptosporidium* spp. oocysts with ozone. 4th International Conference of Water Quality Control. (July, 2000, Poland).

3) Hermida F. M., 木俣 勲, 井関 基弘: 培養細胞 (HCT-8) 系を用いたクリプトスポリジウムの培養と原虫増殖の定量法の検討. 第33回日本原生動物学会 (2000年11月)

4) 木俣 勲, 井関基弘, 児玉義勝: 抗クリプトスポリジウム卵黄抗体の作成と *Cryptosporidium* 感染 SCID マウスにおけるそ

の免疫治療効果. 第56回日本寄生虫学会西日本支部大会 (2000年10月)

5) 増田剛太, 今村顕史, 味沢 篤, 根岸昌功, 井関基弘, 遠藤卓郎: 旅行者下痢症症例からのクリプトスポリジウムの検出. 第10回臨床寄生虫学会 (2000年6月)

6) 八木田健司, 泉山信司, 橘 祐司, 増田剛太, 井関基弘, 古谷宏二, 遠藤卓郎: クリプトスポリジウムの PCR-RFLP 解析による Genotyping. 第55回日本寄生虫学会東日本支部大会 (2000年10月)

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
該当せず。
2. 実用新案登録  
該当せず。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
（分担）研究報告書

原虫感染症の治療法の調査研究

分担研究者 増田剛太 東京都立駒込病院感染症科 部長

**研究要旨** AIDSに合併するトキソプラズマ脳炎とクリプトスポリジウム腸炎を東京都立駒込病院の症例から抽出した。これら2原虫性疾患はとくに宿主の免疫不全状態が高度である場合に発症するため、的確・迅速な診断方法の確立と特効的治療薬の開発が望まれる。現時点で言えることはトキソプラズマ脳炎では確実な診断方法が確立されていないこと、また、クリプトスポリジウム腸炎では診断法は確立しているが医療機関への診断技術の普及が十分でないことと原虫治療薬が開発されていないことが挙げられる。

研究協力者 今村顕史、味澤 篤、  
根岸昌功 東京都立駒込病院

#### A. 研究目的

原虫感染症は今日のわが国で疫学・診断・治療などのすべての分野で大きな問題を提起している。すなわち、国内の衛生環境が整備された最近30-40年間の日本にあって寄生虫・原虫疾患の多くは臨床現場から姿を消してしまっただが、国際間旅行者数の増加、血液疾患、担癌生体、さまざまな臓器不全や免疫抑制剤の使用などにより生じた易感染宿主の増加、さらにHIV感染症に伴う免疫不全宿主の増加等により、寄生虫・原虫感染症が新興・再興感染症として今日再び注目を集めるようになった。これに対する現在の原虫治療薬の開発・供給体制は本来あるべき形態から程遠く、供給が必要に的確に応じられない場面が多い。HIV感染者や正常宿主での原虫感染症の全体像およびその治療の実態の把握が現時点で重要と考え、原虫症としてトキソプラズマとクリプトスポリジウムによる感染症を取りあげた。

#### B. 研究方法

##### 1. トキソプラズマ症とクリプトスポリジウム症の臨床集計

東京都立駒込病院感染症科で1985年から1999年までの15年間に診療したHIV陽性症例を診療録に基づき集計した。これら症例の中からトキソプラズマ症とクリプトスポリジウム症症例を抽出し臨床的立場から検討を加えた。

##### 2. 下痢症症例間でのクリプトスポリジウムの検出

東京都立駒込病院で下痢症の病原体究明のために臨床検査科へ提出された糞便から主として蔗糖浮遊法を用いてクリプトスポリジウムの検出を試みた。

（倫理面への配慮：患者の個人名が特定されないように留意した）

#### C. 研究成果

東京都立駒込病院で1985-1999年に診療したHIV感染者数は858（男733、女125）であり、AIDS発症者数は265

5であった。AIDS発症時の指標疾患として多かったのはPCP（91例）、CMV感染症（52例）、カポシ肉腫（18例）などであるが、今回のテーマ疾患であるトキソプラズマ脳炎（7例）やクリプトスポリジウム腸炎（2例）も記録された。

1. トキソプラズマ脳炎発症時のCD4<sup>+</sup>T-リンパ球数の平均数値は44.3/μlと減少しており、臨床症状としては片麻痺、頭痛、意識障害などが記録された。診断方法としてはCT・MRIなどによる画像診断に加え、エンピリック・セラピー（サルファジアジン・ピリメサミン・クリンダマイシン等）での治療効果による臨床診断が主流を占めた。

2. クリプトスポリジウムは正常宿主に一過性の急性下痢症を、免疫不全宿主に難治性、再発性、致死性下痢症を発症させ、ときに胆道・呼吸器系疾患を合併する。AIDS発症例では総計4症例記録され、そのCD4<sup>+</sup>細胞数は7～48/μlと著明に減少しており、パロモマイシン等が試みられたが3症例は死亡している。HAARTを導入した2000年症例は*Enterocytozoon bieneusi*との混合感染症例であったが、本症例は2001年2月現在社会復帰を果たしている。HIV感染者の下痢便の検討では4/140検体（2.9%）がクリプトスポリジウム陽性であった。

#### D. 考察

AIDSに合併するトキソプラズマ症は多くの場合脳炎として発症する。トキソプラズマ脳炎の発生頻度は低いが、とくに高度の免疫不全宿主に発症するため、早期診断と迅速で的確な治療が開始されないとその予後は不良である。診断方法としては生検による脳組織や髄液を用いたPCR法などによる病原診断と抗体系による間接的証明方法が挙げられるが、脳組織の生検は危険を伴いわが国では殆ど行なわれていないし、また髄液での陽性率は極めて低

い。抗体系による診断方法も確実ではない。臨床現場で実際に行なわれているのはCT、MRIなどの画像上に多発性で輪状造影される浮腫を伴った脳内病変が証明された場合にトキソプラズマ脳炎としてエンピリック・セラピーを行ない、治療2週後の画像で改善が証明されれば本症として治療を続行し、改善がなければ悪性リンパ腫などである可能性を考える、すなわち治療的診断法である。病変が悪性新生物である場合には数週間その治療が遅延することになるため、トキソプラズマ症の迅速で的確な診断方法の開発が渴望される。一方、クリプトスポリジウム腸炎の診断方法は糞便からの原虫証明が直接的診断法であり、蔗糖浮遊法を初めとする集オースト法と顕微鏡下での明視野での証明、特異抗体を用いた蛍光抗体法などがあり、診断方法はほぼ完成していると理解する。わが国における現時点での問題点はこの原虫の証明方法が医療機関の検査室にまで普及していないことである。治療にあっては原虫であるクリプトスポリジウムの特効的治療薬が開発されていないことが問題である。AIDSでは抗HIV薬の投与が宿主の免疫機能を改善することによりクリプトスポリジウム症が改善することが分かっているが、免疫機能が改善しない症例もあり、この原虫症に対する治療薬の開発が望まれる。

#### E. 結論

AIDSのトキソプラズマ脳炎の診断にあってはPCR等を含めた病原診断の確立が急務であり、クリプトスポリジウム症では医療技術者の診断技術の向上に加え、治療薬の開発がポイントになる。

#### F. 研究発表

論文発表

1. 増田剛太、ほか：旅行者下痢症症例からのクリプトスポリジウムの検出。

Clinical Parasitology 11 : 109 - 111,  
2001

学会発表

1. 増田剛太、ほか：旅行者下痢症症例からのクリプトスポリジウムの検出.

第11回日本臨床寄生虫学会、2000. 6月、東京

2. 八木田健司、ほか：クリプトスポリジウムのPCR-RFLP解析による genotyping.

第60回日本寄生虫学会東日本大会、2000. 10月、東京

3. 八木田健司、ほか：PCR-RFLPによるクリプトスポリジウム分離株の genotyping.

第41回日本熱帯医学会大会、2000. 11月、東京

G. 知的所有権の出願・取得状況

該当せず。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
（分担）研究報告書

トキソプラズマ特異酵素（NTPase）を標的にした原虫増殖阻害剤の開発研究

分担研究者 浅井隆志 慶應義塾大学医学部 講師

**研究要旨** 我々はトキソプラズマ虫体に特異的にしかも大量に存在する酵素（ジチオスレイトールにより活性化されるヌクレオシド三リン酸加水分解酵素；NTPase）の存在を見出し、その遺伝子のヌクレオチド配列を明らかにした。この酵素は我々ヒトの ATPase 類とは性質がかなり異なることから、特異な阻害剤は選択的な抗トキソプラズマ剤になると考えた。そこで精製した酵素の活性を阻害する化合物の検索を開始した。現在まで約 10 万種類の化合物をスクリーニングし、その中から 35 種類の候補化合物を選択した。これらの化合物がトキソプラズマ虫体の増殖を阻害するかどうか調べたところ、そのうちの 2 種類の化合物がトキソプラズマの増殖を強力に阻害し、抗トキソプラズマ剤の候補として得られた。これらの研究をさらに効率的に行うために、酵素の大腸菌における大量発現の実験系および大腸菌のベータガラクトシダーゼの遺伝子を導入したトキソプラズマ虫体を用いる実験系を構築した。

**A. 研究目的**

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) は細胞内寄生性の原生動物で、全ての哺乳類及び鳥類に感染する。一度感染すると一生慢性的に感染していると考えられている。世界人口の約 50% の人々が感染していると推定され、ヒトへの感染率は非常に高い。例えば東京での感染率は約 20% であり、フランスの首都パリの感染率は 70% 以上である。重篤な症状を起こすのは胎児の先天感染及び免疫不全患者で、その他は健常人で稀にリンパ節炎や脈絡網膜炎を起こすこともあるが、感染率が高いわりには有症状患者は少ない。しかし欧米ではトキソプラズマ症は大きな問題となっている。それはエイズの蔓延と臓器移植手術施行例の増加に起因している。我が国でもエイズ患者及び臓器移植患者の増加に伴いトキソプラズマ症が顕在化してくると思われ、事実我が国のエイズ患

者の間にもかなりの頻度でこの原虫による脳炎が現れ始めている。

免疫不全患者や臓器移植時にみられる急性トキソプラズマ症の治療には各種のサルファ剤やスピラマイシン等の抗生剤が現在使用されているが、治癒効果は低く治療は困難であることが最近明らかになりつつある。またこれらの薬剤は副作用も強くこのような症例においては使用には嚴重な注意を必要とする。これは治療薬でのコントロールが成功しているカリニ肺炎とは好対照である。したがって、より治癒効果の高い副作用のない新しい治療薬の開発が望まれている。

我々は従来の研究によって、他の生物には見られないトキソプラズマと新種の原虫である *Neospora caninum* に特異的に存在する酵素を発見し、その性質から NTPase と命名している。最近我々はこの NTPase には二種類のアイソザイム

(I型及びII型)が存在することに気づき、コードする遺伝子の全核酸塩基配列を明らかにした。多数のトキソプラズマ分離株におけるアイソザイムをコードする遺伝子の存在を調べた結果、II型のアイソザイムは全株に共通して存在するがI型のアイソザイムは強毒株にのみ存在することが判明した。このNTPaseは海外の研究者に注目されており現在まで米国ワシントン州立大学、スタンフォード大学、私立ワシントン大学、豪州フリント大学と共同研究を行ってきた。

今回我々は今までの共同研究の経験を踏まえ、このNTPaseアイソザイムを標的にした新しいトキソプラズマ症の治療薬の開発プロジェクトを企画し、酵素の阻害剤の検索を開始した。本研究の目的はNTPaseアイソザイムの活性阻害物質の検索を行い、新しい抗トキソプラズマ剤を開発することである。

## B. 研究方法

### 1. NTPase 阻害化合物のスクリーニング

#### a. 酵素の精製と遺伝子組み換え酵素の作製

トキソプラズマの急増虫体よりNTPaseのふたつのアイソザイムを精製した。より多くの化合物を効率よくスクリーニングするために、我々は以下の方法で大量の遺伝子組み換え酵素を作製し精製した。しかしこの方法はふたつのアイソザイムのうちI型(NTPase-I)のみで成功している。II型のアイソザイム(NTPase-II)については組み換え体の発現には成功しているが活性のある酵素は現在のところ得られていない。方法としてまずNTPaseの蛋白コード部分をPCRで増幅し、発現ベクターpET22(b)<sup>\*</sup>に組み込んだ。この際、蛋白質のN-末端側はNde-I、C-末端側はXho-Iの制限酵素サイトになるようにプライマーを設計した。プライマーの配列はセンス側が 5'-TACCAT ATGACAGACTCATCGTCACTCCG-3' アンチセンス側が 5'-TCGCTCGAGTCACAGA

TTGTGAGAATATCC-3'である。遺伝子を組み込んだ発現ベクターpET22(b)<sup>\*</sup>は大腸菌BL-21に導入し、IPTGでNTPase-Iを発現させた。大腸菌に発現させたNTPase-Iはインクルージョンボディで形成されているので一度6Mグアニジン塩酸で溶解した後、リフォールドして活性のある酵素を得た。

#### b. 酵素活性の阻害実験

96穴のマイクロタイタープレートとの1穴あたり最終0.1mlになるように反応液を以下のように調整し酵素反応を行った。反応液には50mM HEPES-KOH, pH 7.5, 0.2mM (NTPase-I用)あるいは0.5mM (NTPase-II用) ATP, ATP濃度の5mM過剰の酢酸マグネシウム、5mMジチオスレイトール(DTT)、酵素(NTPase-IあるいはNTPase-II)および各種濃度の被検化合物が含まれる。DTTを含まない反応液を10分間37度で保温した後、DTTを加えて酵素を活性化することで反応を開始した。これらの操作は全自動のロボット(Merk社)を用いて行った。

### 2. トキソプラズマ虫体の増殖阻害実験

大腸菌のベータガラクトシダーゼ遺伝子を含むプラスミドを構築し、トキソプラズマの急増虫体に電気的に導入した。遺伝子が導入されたトキソプラズマ虫体をクローニングした後、安定的にベータガラクトシダーゼを発現する株をさらに選択した。選択された株はベータガラクトシダーゼの活性と細胞数が非常に良く相関する。ヒトの繊維芽細胞(HFF)を敷き詰めた96穴のマイクロタイタープレートとの1穴あたり最終0.1mlになるようにトキソプラズマの培養液を調整した。この培養液の組成は、10%の胎児血清を含むMEMをベースに、各種濃度の被検化合物と一千個体のトキソプラズマ急増虫体である。培養後48および72時間後にベータガラクトシダーゼの活性を測定し、増殖したトキソプラズマ虫体数を標準曲線を用いて測定した。

(倫理面への配慮) 該当せず。

## C. 研究結果

### 1. トキソプラズマ特異酵素 (NTPase) の阻害剤の検索

NTPase-I を大腸菌に発現させて酵素活性を持つ蛋白構造にリフォールドした後精製した。この遺伝子組み換え体酵素およびトキソプラズマ虫体から精製した二種類のアイソザイム NTPase の阻害剤の検索を行った。現在まで約 10 万種類の化合物をスクリーニングし、その中から 35 種類の候補化合物を選択した。さらにその中から虫体の阻害実験を 8 種類の化合物 (コード No : L-092060 ; 092180 ; 572081 ; 657833 ; 669590 ; 670637 ; 685117 ; 729962) についてはさらに検討を加えた。ロボットを使わずこれらの化合物の酵素に対する阻害活性を調べたところ、L-657833 と L-729962 は NTPase-I と NTPase-II の両酵素の活性をあまり阻害せず、化合物が酵素活性を 50% 阻害する濃度 (IC50) 値も 15  $\mu\text{M}$  以上であった。その他の化合物は低濃度で両酵素の活性を阻害した。

### 2. 遺伝子導入トキソプラズマ株の作製

多数の化合物の中から選択された薬剤の抗トキソプラズマ増殖活性を効率良く調べるために、虫体数を簡便に測定できる系を確立した。そのためにトキソプラズマに大腸菌のガラクトシダーゼ遺伝子を導入した。その後ガラクトシダーゼを安定的に発現しているトキソプラズマ株を選択し、ガラクトシダーゼ活性と虫体数の相関を調べた。その結果、この遺伝子導入トキソプラズマ株は阻害剤のスクリーニングに非常に有効であることがわかった。

### 3. トキソプラズマ虫体の増殖阻害化合物の検索

NTPase 活性を阻害する化合物がトキソプラズ

マ虫体の増殖を阻害するかどうか調べたところ、そのうち 2 種類の化合物 (L-669590, L-685117) がトキソプラズマの増殖を強力に阻害した。虫体の増殖を 50% 阻害する濃度 (IC50) がそれぞれ 7 と 13.5  $\mu\text{M}$  であった。しかしその他の化合物は酵素活性を強力に阻害するが、虫体の増殖はあまり阻害しなかった。IC50 値は 50  $\mu\text{M}$  以上であった。虫体の NTPase の活性阻害とトキソプラズマの増殖阻害の直接の関係は現在のところ不明である。しかし、これら 2 種類の化合物は生物毒性の低い物質であるので、NTPase を介した増殖阻害である可能性が高い。

## D. 考察

大腸菌に発現させ、活性をリフォールドした後精製した NTPase-I は、虫体から精製されたネイティブな酵素の諸性質と全く同一であった。このことからさらに大量の化合物を安価にスクリーニングすることが可能になった。しかし現在のところ大腸菌に発現させた NTPase-II の活性のリフォールドには成功していない。NTPase-I とのアミノ酸配列の違いが活性のリフォールドに関係すると思われるが、検討した限りにおいて技術的には NTPase-II の活性をリフォールドすることが非常に困難な状況にある。しかしながら NTPase-I 活性を阻害する化合物は NTPase-II も共通に阻害することから、片方の酵素活性の阻害スクリーニングで当初の目的は達成可能である。ただし NTPase-II はどの株にもにも共通して存在するが、NTPase-II は強毒にのみ存在する。したがって化合物の酵素活性に対する阻害効果が大きく異なる化合物が存在した場合、片方だけのスクリーニングは NTPase-II の阻害剤を見落とす可能性がある。

両アイソザイムの基本的性質の違いで際立つことはヌクレオチド二リン酸 (NDP) に対する反応性の違いである。NTPase-I は NDP をほとんど

分解しない(ヌクレオチド三リン酸 ;NTP の 1% 以下)が、NTPase-II は NTP も NDP もほぼ同じように分解する。両アイソザイムとも 603 個のアミノ酸で構成されているが、その配列の 97% は相同でわずか 15 のアミノ酸が違うだけである。現在までのデータから NTPase-I によるスクリーニングにより NTPase-II の阻害剤もそのほとんどが捕らえられると考えられる。やはり酵素分子を構築するアミノ酸配列の高度な類似性の結果であろう。

虫体の増殖を 50%そがいする化合物の IC50 が  $\sim 10 \mu\text{M}$  という値であることが、その化合物が治療薬となり得る一般的な目安といわれている。L-669590 と L-685117 がトキソプラズマの増殖を阻害する IC50 がそれぞれ 7 と  $13.5 \mu\text{M}$  であったことから、抗トキソプラズマ薬の候補として、次の動物実験に進むことができると思われる。両化合物とも高濃度での完全な増殖抑制効果はないが、低濃度で増殖抑制効果が顕著である。高濃度での完全な増殖抑制効果が見られない原因として、化合物の細胞内への低い取り込み率が最も重要であろう。今後は細胞に取り込まれやすい関連の化合物を検討する必要があるであろう。

NTPase の阻害剤の検索において現在さらに多くのプリンアナログを検討中である。酵素活性を阻害するの化合物を前回よりさらに 35 種類同定した。またふたつある NTPase アイソザイムのうち NTPase-II を特異的に阻害する化合物を同定した。現在判明した NTPase の活性阻害物質の主なものはプリンアナログであるが、虫体の増殖も抑制する物質はプリン体にイオウ原子を介してベンゼンやナフタレンが結合した構造をベースにしている。今後はこれらのベースを修飾し、宿主細胞に対して毒性が低く、虫体の増殖抑制が高い物質を検索する予定である。NTPase-II の特異的阻害剤として脂肪酸にペンタクロロベンゼンが結合したものや Ursolic acid など多岐にわたって

いるが、これらの化合物を修飾した化合物を検討したい。これらの化合物が In Vitro で虫体の増殖を阻害するか検討する予定である。

今後はトキソプラズマの増殖に必要な栄養素(アミノ酸、核酸前駆体等)の虫体内への取り込みの変化を阻害剤の存否の条件下で調べる予定である。また結晶化酵素を用いた阻害剤の検索には今後更なる研究が必要と思われる。

## E. 結論

エイズ患者に高率に発症するトキソプラズマ症の新規治療薬の開発を目的に、トキソプラズマの特異酵素(NTPase)の阻害剤を検索し、約 10 万種類の化合物より 35 種類の化合物を新規治療剤候補として選び出した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし(本年度は投稿中および投稿準備中)

本研究分野以外の論文を以下に示す。

Sanuki J, Nakano K, Tokoro M, Nozaki T, Okuzawa E, Kobayashi S, Asai T: Purification and identification of major soluble 40-kDa antigenic protein from *Entamoeba histolytica* : its application for serodiagnosis of asymptomatic amebiasis  
Parasitol Int 2001 (in press)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当せず。

### 2. 実用新案登録

該当せず。