

マウスの実験的急性トキソプラズマ症に対する Acetyl-spiramycin の治療効果について

青 木 豊 治

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(1969年1月31日 受領)

トキソプラズマ症(以下 Tp 症と略記す)の治療は、ここ20余年来多くの研究者により、各種 Sulfa 剤, Pyrimethamine, Chlortetracycline, Spiramycin 等の薬剤を使用して広く試みられてきたが、急性症に対してある程度の治療効果が認められたにすぎず、慢性症を含む Tp 症に対する決定的な治療法は、まだ確立されていない現況である。Acetyl-spiramycin (以下 Asp と略記す)は、1965年 Spiramycin (以下 Sp と略記す)の構造の一部の hydroxyl 基を acetyl 化して得られた誘導体で、macrolides 系の新抗生物質である。従来 Sp より耐酸性がすぐれ、熱に安定、血中濃度および臓器親和性が非常に高く、治療投与量も半減し、毒性が少なく、Sp のマウス経口投与の LD₅₀ は、3.55g/kg であるが、Asp は、4.0g/kg 以上とされている。今回は、Asp の急性 Tp 症に対する治療効果の検討を目的としてマウスにトキソプラズマ(以下 Tp と略記す)を感染せしめると同時に Asp の経口投与を開始、その延命、生残、Tp 根絶等の治療効果を検討した。また Asp と Sulfa 剤との併用効果についても比較検討したので報告する。

実験材料および方法

本実験に使用したマウスは市販マウス、体重18g 前後のものを用い、使用 Tp 株は当教室で継代保持された RH 株と Beverley 株を用いた。RH 株虫体は、虫体接種後3日目のマウス腹水より採取、滅菌生食水にて稀釈調製し、虫体数3,000 \times 0.3ml を、被検健康マウス腹腔内に接種した。Beverley 株虫体は、同株慢性感染マウスの脳を摘出、これに滅菌生食水5ml を加え、グラスホモジナイザーを使用し乳濁液として、その0.5ml を健康マウス腹腔内に接種し、腹腔内栄養型虫体の増殖を目的として、当日、3日目および6日目の3回 Cortisone-acetate 0.125mg (0.1ml) ずつ皮下注射し、その後の腹水より得た栄養型虫体を、RH 株と同様に調製し、

0.3ml 中3,000虫体数を、マウス腹腔内に接種した。

薬剤は、N/10 H₂SO₄ を24%添加蒸留水100ml に、粉末 Asp, Sp および粒状 Daimeton をそれぞれ1,600mg 加え、乳鉢にて乳化して調製した。使用前よく攪拌して、毎日その0.5ml (8 mg) を、虫体接種日より、4週間に亘つて投与を継続した。投与の方法は、先を切断した注射針注射筒に、ビニール管を連結したもにて、直接胃内に注入した。これらマウスの延命、生残を、Tp 接種非投薬の対照群と比較検討した。4週以内に死亡したマウスは、その腹水における虫体の存否を顕微鏡にて検した。虫体が検出できなかったマウスでは、脳を摘出、グラスホモジナイザーで乳濁化した後、その1ml 宛を健康マウスに腹腔内接種し、脳内における残存虫体の有無を検討した。4週以上の生残マウスについては、エーテル麻酔後、脳を摘出し、脳塗抹圧平標本を作製、顕微鏡にて脳内シストの有無を検した。またこれらの脳を前記同様、脳乳剤とし、1ml 宛2匹の健康マウスの腹腔に接種し、4週以上生残するかどうかを検して、Tp 根絶の有無を見た。なお Beverley 株虫体数3,000接種、Asp 1日8mg 宛継続投与例で、4週以上生残せるものの脳を健康マウスに接種し、そのマウスが1カ月以上生残した場合には、毛細管ピペットで、そのマウスの眼窩静脈洞より採血し、花木・信藤法(1964)による赤血球凝集反応により抗体価を検した。また前記同様の方法にて、脳内シストの存否についても検索した。

実験成績

1) Acetyl-spiramycin の効果

RH 株および Beverley 株とも接種虫体数3,000とし、Asp 1日投与量8mg を接種日より経口投与し、4週間継続観察を行った。(第1表)

RH 株接種例では、被検マウス111匹のうち、1週間で2匹死亡、2週間までに18匹死亡、3週間までに50匹

第1表 Acetyl-spiramycin 4週継続投与した場合、マウスの延命及びTp根絶効果

株名	被検マウス数	接種虫数	1日の投与量	生存マウス数				生存マウス中Tp根絶例数	
				1週	2	3	4		
RH	実験群	111	3,000	8mg	109	83	51	32 (28.8)	27 (24.7)
	対照群	25	〃	0	16	0	—	—	—
Bev	実験群	38	3,000	8mg	37	37	35	33 (86.5)	29 (76.3)
	対照群	5	〃	0	5	3	3	3 (60.0)	0 (0)
対照群	15	0	8mg	15	15	15	15	—	

括弧内の数字は%を示す

死亡、4週後では69匹死亡、32匹が生残し、生残率は28.8%であった。対照のRH 3,000虫体数接種非投薬のマウス25匹は、7ないし10日間で凡て死亡した。対照群に比して明らかな延命効果が認められた。この生残マウス32匹の脳内シストの存否を検したが、凡て検出されず、脳の生食懸濁液1mlを健康マウス2匹宛腹腔内に接種したところ、32匹中5匹からの再接種をうけたマウスは、凡て7~10日間で死亡し腹腔内には多数のTp栄養型虫体を検した。これら5匹を除く27匹からの再接種マウスは、元気に4週後も生残し、この間腹腔内から栄養型虫体の検出を試みたが、凡て陰性であった。よつてこれらマウスはAsp 4週間継続投与にて、RH株虫体の根絶が立証されたものである。すなわち111匹中27匹の根絶例数を得、根絶率は24.7%であった。また4週間の投薬中に死亡したマウスは、死亡直後腹腔内より栄養型虫体の検出を試み、不検出例については、その脳を健康マウスに再接種したところ、それらは凡て7日前後で死亡し、栄養型虫体を多数腹腔内に検出した。すなわち、前述したRHだけを接種した対照例とあわせ考えて投薬中の死亡はすべてRH株虫体による死亡と考えた。Beverley株でも、栄養型虫体数3,000を接種し、Asp 8mg 4週継続投与して、Aspの効果を検した。被検マウス38匹中2週までに1匹死亡し、3週間に2匹死亡し、4週間までに計5匹死亡、33匹が生残、生残率86.5%であった。死亡した5匹は、脳の再接種により、7~24日間に、いずれも腹腔内に少数の栄養型虫体、または脳にシストを検した。4週以上生残した33匹の凡ての脳にシ

トは検出されず、健康マウスに再接種したところ、2匹は7~10日で死亡腹腔内に虫体を検出、他の2匹は20~26日で死亡腹腔内および脳には虫体検出されなかつたが、再接種をうけたマウスはいずれも死亡した。29匹は4週間元気に生残し、そのマウスの眼窩靜脈洞より採血し、花木・信藤法による赤血球凝集反応にて抗体価を検したが、凡て陰性であった。なおこれらマウスの脳からシストは検出されなかつた。33匹中29匹が根絶され根絶率76.3%であった。Beverley株虫体数3,000 Asp非投与の対照5匹は、2匹が7~13日で死亡腹腔内に栄養型虫体を検し、3匹が4週生残(60.0%)したが、脳内にはシストが3匹とも検出され根絶率は0%であった。Asp 8mgのみ投与Tp非接種の対照15匹は、いずれも4週以上生残しAspの副作用は、特に認められなかつた。

2) Spiramycin の効果

RH株虫体数3,000接種Sp 1日投与量8mg 4週継続投与した(第2表)。被検マウス29匹中4週生残したマウスは、5匹で生残率17.2%であった。1週間では死亡マウスはなく2週間に11匹死亡、3週間までに18匹死亡いずれも腹腔内に虫体を検した。生残した5匹のマウスの脳には、シスト検出されず、再接種にても凡て4週以上生存し、生残・根絶率共に17.2%を示した。対照の10匹は、8日間で凡て死亡した。

3) Asp と Daimeton の併用効果

Daimetonはsulfamonomethoxineでマウス経口投与のLD₅₀は4.7g/kgである。RH株虫体数3000接種、

第2表 Spiramycin 4週継続投与した場合、マウスの延命及びTp根絶効果

株名	被検マウス数	接種虫数	1日の投与量	生存マウス数				生存マウス中Tp根絶例数	
				1週	2	3	4		
RH	実験群	29	3,000	8mg	29	18	11	5 (17.2)	5 (17.2)
	対照群	10	〃	0	8	0	—	—	—

括弧内の数字は%を示す

第3表 Acetyl-spiramycin と Daimeton を併用し、4週継続投与した場合、マウスの延命及び Tp 根絶効果

株名	被検マウス数	接種虫数	1日の投与量	生存マウス数				生存マウス中 Tp 根絶例数
				1週	2	3	4	
RH 実験群	42	3,000	8mg	42	41	41	41 (97.6)	40 (95.2)
	5	//	0	0	—	—	—	—
対照群	5	0	8mg	5	5	5	4	—

括弧内の数字は%を示す

第4表 Daimeton 4週継続投与した場合、マウスの延命及び Tp 根絶効果

株名	被検マウス数	接種虫数	1日の投与量	生存マウス数				生存マウス中 Tp 根絶例数
				1週	2	3	4	
RH 実験群	23	3,000	8mg	23	21	21	17 (73.9)	3 (13.0)
	10	//	0	3	0	—	—	—

括弧内の数字は%を示す

Asp と Daimeton 各 8 mg 4 週経口投与した (第 3 表). 被検マウス 42 匹中 10 日目に 1 匹死亡したのみで他は凡て 4 週以上元気に生残し生残率 97.6% であつた. 生残せる 41 匹のマウスの脳内にシストは検出されず健康マウスへの再接種によつても 1 匹のみが 7 日目に死亡腹腔内に Tp 虫体を検出したが, 他の 40 匹は凡て 4 週以上生残し Tp 根絶率 95.2% という良好な成績を得られた. Tp 接種非投薬の対照 5 匹は 1 週で凡て死亡した. 薬剤各 8 mg のみ投与の対照 5 匹中 4 匹は 4 週間以上生残した.

そこで上記の非常に良好な成績が Daimeton によるものかどうかを検討した (第 4 表). RH 株虫体接種数は, 同様に 3,000 虫数とし, Daimeton 8 mg/day 4 週経口投与した. 被検マウス 32 匹中 17 匹が 4 週生残, 途中死亡した 6 匹は, 腹腔内に虫体を検出した. 生残した 17 匹の脳内にはシストは検出できなかつたが, 健康マウスへの再接種により 14 匹が 7 ~ 12 日で死亡, 腹腔内に多数の栄養型虫体を検出し, 根絶率 13% という低い値を示し, この点 Asp と Daimeton 併用に比較して著しく劣るものである. RH 株接種・非投薬の対照は, 10 匹いずれも 10 日以内に死亡した.

考 察

Tp 症に対する化学療法は, sulfonamide, sulfone, に属する数種の薬剤, pyrimethamine およびある種の抗生物質が使用されている.

Sulfonamide としては, Sabin & Warren (1942) が, マウスの Tp 症に有効であるが, 治療後再発して死亡したと最初に報告して以来多数の発表がなされている.

Sabin (1953), Eyles (1953) は, 急性 Tp 症に sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadiazine の sulfapyrimidine 系物質が, 30% 前後の治癒率を示すことを発表した. Tsunoda *et al.* (1965) は, sulfamonomethoxine が, マウスにおけるよりも豚における急性 Tp 症に有効であり, pyrimethamine 併用では差がなかつたと報告している. pyrimethamine は抗マラリア剤として有効であるが, 一種の血液毒であるために, 副作用が強い欠点をもっている. しかしながら Eyles & Coleman (1952), Summers (1953) が独自に pyrimethamine の Tp 症に対して有効なことを発表, Eyles (1953), Jacobs *et al.* (1964) はそれと Sulfa 剤の併用が相乗効果を示すことを発表している.

Sulfone としては, Jacobs *et al.* (1964) が, D. D. S. (4-4'-diaminodiphenylsulfone) は Tp 症に有効で, これは sulfadiazine に劣らぬものであると報告した. さらに D. D. S. から開発された S. D. D. S. (2-sulfanyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone) は sulfadiazine より効力が強いと大島ら (1967, 1968) が報告, さらに S. D. D. S. と pyrimethamine が相乗効果のあることを示した.

Shimizu *et al.* (1968) は, 豚において S. D. D. S. は sulfamonomethoxine に劣らぬ抗 Tp 症効果を報告している.

Sp については, 最初 Garin & Eyles (1958) が抗 Tp 剤の作用のあること, Chodes & Habegger (1961), Gils *et al.* (1964), Cassady *et al.* (1964), 鬼木 (1965) 等はいずれも眼科方面で Tp 性ブドウ膜炎に有効なことを述

べている。Nakayama *et al.* (1963) は, Sp と pyridazine の相乗効果が, pyrimethamine に劣らぬ好成绩を示すことを発表, しかし RH 株と Beverley 株との薬剤の抵抗性に差異がなかったのは, 薬剤投与量の関係だろうと述べている。また中山 (未発表) は, Asp は RH 株と同程度の強毒 K. M. 株には, それほど有効でないのではないかといつている。

以上多くの研究者により, 各種薬剤の治療効果を発表しているが, いずれも急性 Tp 症栄養型虫体には, 有効だが, それでもまだ十分な治療薬は確立されていない。

そこで今回は, Sp より誘導された Asp を使用して, 急性 Tp 症に実験した所, Asp は Sp よりすぐれ, 特に Asp と Daimeton 各 8 mg/day の経口連続投与により副作用もなく, 著しい好成绩を得た。人工胃液に抵抗性の強いといわれている Beverley 株が, RH 株より, Asp に対してより抵抗性が弱いという結果が得られた。Beverley 株は, RH 株より増殖の速度遅く, RH 株よりマウスに対して毒性が弱い株である。Asp が虫体分裂の時期に, 特に効果的に虫体に作用すると考えれば, RH 株の場合, 分裂の頻度が, Beverley 株より多いために, この間に, Asp の作用を受けず生存する虫数も, 計数的に多いとも想像される。しかし, 本成績が如何なる起因によるかは, 現段階として決定することは出来ない。

結 語

Asp の急性 Tp 症に対する効果を検討して, 次の結果が得られた。

1) Acetyl-spiramycin の効果について, RH 株虫体数 3,000 を, マウス腹腔内に接種当日より Asp 8 mg/day, 4 週継続経口投与して検索した。111 匹中 32 匹 (28.8%) が 4 週生残し, このうち 27 匹 (24.7%) に Tp 根絶が証明された。Beverley 株についても同様な実験を行った所, 38 匹中 4 週以上生残マウスは 33 匹 (86.5%) で, このうち Tp の根絶マウス数は 29 匹 (76.3%) であった。

2) Acetyl-spiramycin の効果を Spiramycin のそれと比較するために, RH 3,000 虫体数接種し, Sp 8 mg/day 経口連続投与して, 上記と同様な実験を行った。29 匹中 5 匹 (17.2%) が 4 週以上生残し凡てに Tp の根絶が認められた。

3) Acetyl-spiramycin と Daimeton の併用効果を検するため, RH 3,000 虫体数接種, 両薬剤各 8 mg/day 4 週継続経口投与した。42 匹中 4 週以上生残マウスは, 41 匹 (97.6%) の高率を示し, 40 匹 (95.2%) に Tp 根絶

が認められた。この良好な成績が, Daimeton によるかどうか検するため, RH 3,000 接種し, 同薬剤 8 mg/day 4 週経口投与した。23 匹中 17 匹 (73.9%) が 4 週生残したが, Tp の根絶の認められたマウスは, 僅かに 3 匹 (13.0%) であった。

終りに, 終始御指導下され, また御校閲を賜った, 松林教授, 中山講師に深謝致します。本研究の要旨は, 昭和 43 年 10 月 5 日, 第 28 回日本寄生虫学会東日本支部大会で発表した。

文 献

- 1) Carsady, J. V., Bahler, J. W. and Hinker, H. V., (1964) : Spiramycin for toxoplasmosis. *Am. J. Ophthal.*, 57, 227-235.
- 2) Chods, J. B. and Habegger-chodos H. E. (1961) : The treatment of ocular toxoplasmosis with spiramycin. *Arch. Ophthal.*, 65, 401.
- 3) Eyles, E. D., (1953) : The present status of the chemotherapy of toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 429-444.
- 4) Eyles, E. D., and Coleman, V., (1953) : Synergistic effect of sulfadiazine and Daraprin against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Antibiotic Chemother.*, 3, 483-490.
- 5) Eyles, E. D., and Coleman, V., (1952) : Antibiotics in the treatment of toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 64-69.
- 6) Eyles, E. D. and Coleman, N., (1953) : The relative activity of the common Sulfomanides against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 54-63.
- 7) Garin, J. P. and Eyles, E. D., (1958) : La traitment de la toxoplasmose experimentale de la souris per la Spiramycin. *Press. Med.*, 66, 957-958.
- 8) Gils, C. L., Jacobs, L., and Melton, M. L., (1964) : Chemotherapy of experimental toxoplasmosis. *Arch Ophthal.*, N. Y., 119-127.
- 9) 花木琢磨・信藤謙蔵・佐藤卯三郎 (1963) : トキソプラスマ血球凝集反応の BOB 結合, 凍結乾燥感作血球 (B 抗原) の創製について。第 23 回日本寄生虫東日本支部大会記事, 10.
- 10) Jacobs, L., Melton, M. L. and Kaufman, H. E., (1964) : The treatment of experimental ocular toxoplasmosis. *Arch ophthal.*, 71, 111-118.
- 11) Nakayama, I. and Matsubayashi, H., (1963) : Effects of spiramycin on experimental toxoplasmosis in mice. *Keio J. Med.*, 12, 117-125.
- 12) 中山一郎・伊東俊一・田仲基宏 (1966) : 虫体分離により確認したトキソプラスマ症の 2 例。慶

- 応医学, 43, 489-494.
- 13) 中沢昭三ほか(1966) : 新しいスピラマイシン誘導体 Acetylspiramycin に関する基礎的研究. *J. Antibiotics Ser. B.* 19 : 90-94.
 - 14) 鬼木信乃夫(1965) : spiramycin によるトキソプラズマ性網脈絡膜炎の治験例について. *日本眼科誌*, 69, 121-132.
 - 15) 大島慧・稲見芳治・田中英文(1967) : 抗トキソプラズマ性物質に関する研究 V. 実験的トキソプラズマ症豚に対する SDDS の有効量の検討. *日本獣医誌*, 29 suppl, 49.
 - 16) 大島慧・田中英文・稲見芳治(1968) : マウスの実験的急性トキソプラズマ症に対する 2-sulfamonyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone (SDDS) と Pyrimethamine との相乗効果. *寄生虫誌*, 17, 75-80.
 - 17) Summers, W. A., (1954) : The chemotherapeutic effect of 2-4-diamino 5-p-chlorophenyl-6-ethyl pyrimidine (Daraprin) in experimental toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 1037-1044.
 - 18) Shimizu, T., Shirahata, T., and Inami, Y., (1968) : Therapeutic effect of S. D. D. S. (2-sulfamonyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone) on experimental toxoplasmosis. *Jap. J. Vet. Sci.*, 30, 183-195.
 - 19) Sabin, A. B., and Warren, J., (1942) : Therapeutic effectiveness of certain sulfonamides on infection by an intracellular protozoa (Toxoplasma). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 51, 19-23.
 - 20) Sabin A. B., (1953) : Toxoplasmosis, current status and insolved problems introductory remarks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 360-364.
 - 21) Tsunoda, K., Suzuki, K., Ito S., and Tsutsum Y., (1965) : Effects on sulfamonomethoxine alone and with pyrimethamine upon pigs experimentally infected with toxoplasma. *Nat. Inst. Animal Helth. Quat.*, 5, 27-35.
 - 22) 高平汎志ほか(1966) : Acetyl-spiramycin に関する基礎的研究. *J. Antibiotics Ser. B.* 19, 95-100.

AbstractEFFECT OF ACETYL-SPIRAMYCIN ON EXPERIMENTAL ACUTE
TOXOPLASMOSIS IN MICE

TOYOHARU AOKI

(Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo)

Acetyl-spiramycin (Asp) is a new antibiotic which was derived from Spiramcin (Sp) in 1965. The present studies were undertaken to evaluate the effect of Asp alone or combined use of Asp and Daimeton (Sulfa-monomethoxine) on the experimental toxoplasmosis in mice infected with RH or Beverley strain.

About 3,000 trophozoites of RH or Beverley strain were intraperitoneally inoculated into mice. The drugs to be tested were orally administered to these mice every day for 4 weeks, starting on the day of the inoculation of organisms. The daily dose of each drug was 8.0 mg.

By the administration of Asp to mice infected with RH strain, 32 (28.8%) out of 111 mice survived for more than 4 weeks and the organisms were eradicated in 27 (24.7%) of the 111 mice. In cases of Sp administration 5 (17.2%) out of 29 mice survived after the inoculation of RH strain, indicating that the Asp was more effective than Sp in the acute infection.

By the administration of Asp to mice infected with Beverley strain, 33 (86.5%) out of 38 mice survived more than 4 weeks after the inoculation, and the organisms were eradicated in 29 (76.3%) out of 38 mice treated. These data indicated that Beverley strain was more sensitive than RH strain to Asp.

Combined use of Asp and Daimeton proved highly effective in RH infection: In 40 (95.2%) out of 42 mice treated the organisms were eradicated. When Daimeton used alone, 17 (73.9%) out of 23 mice infected with RH strain survived the infection. The organism was, however, disappeared from only 3 mice among them. The synergistic effect of these two drugs, therefore, is conspicuous.