

マウスの実験的急性トキソプラズマ症に対する 2-sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone(SDDS) と pyrimethamine との相乗効果

大 島 慧 田 中 英 文 稲 見 芳 治

田辺製薬株式会社生物研究所

(1968年1月23日 受領)

Sulfonamides あるいは sulfones の様に *p*-アミノ安息香酸(PABA)との拮抗を主たる作用機序として抗原虫作用を発揮する薬剤を、これに続く代謝経路である folic acid から folinic acid への変換過程に作用する pyrimethamine と併用すると、相乗効果が認められることは多くの例について良く知られている (Greenberg, 1950; Eyles & Coleman, 1953, 1955, 1957; Eyles & Jones, 1955; Joyner & Kendall, 1955; Lux, 1954; Rollo, 1955; Beverley & Fry, 1957; Horton-Smith *et al.*, 1960; Basu *et al.*, 1962; Ramakrishnan *et al.*, 1963; Ball & Warren, 1967). 著者等の発見した抗トキソプラズマ剤 2-sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone (SDDS) (Ohshima *et al.*, 1967) も、sulfones に属する化合物であり、PABAとの拮抗も認められる(大島, 未発表)ことから、当然 pyrimethamine との相乗作用が期待された。

SDDS は、豚の実験的急性トキソプラズマ症に対して、発症翌日から単独 10 mg/kg/day 7日間の筋注で、体内の同原虫を一掃する効力が認められている(大島ら, 1967)が、更に有効かつ安全な治療法開発の手掛りをつかむ事を期待しつつ、マウスの実験的急性トキソプラズマ症に対して、SDDS ならびに pyrimethamine を腹腔内注射あるいは飼料添加経口投与し、治癒率を指標として、両剤の相乗効果の解析を試みたので報告する。

実験材料および方法

RH株トキソプラズマ原虫を、dd系雌マウス(6週令, 20±2g)に、1匹当たり 2×10^4 腹腔内接種し、約3時間後からSDDSとpyrimethamineを、種々な投与量の組合せて腹腔内注射あるいは飼料添加経口投与して、延命日数と治癒率を観察した。

腹腔内注射は、1日1回7日間とし、両剤とも非水溶

性なので、0.3乃至0.4% CMC (carboxymethylcellulose) 加減菌生理食塩液に懸濁し、注射液量が1匹当たり0.2 ml/dayになる様にした。飼料添加経口投与は Eyles & Coleman (1955)に準じて粉末飼料(日本クレア(株), CE-2)中に両剤を加え、1匹当たり4 g/dayの割で14日間与えた。両剤の投与量は、腹腔内注射の場合にSDDSは3.125から100 mg/day, pyrimethamineは0.05から12.5 mg/kg/dayとし、飼料添加の場合には、夫々3.125から100 mg% (約6.25から200 mg/kg/day) および0.3125から20 mg% (約0.625から40 mg/kg/day)として、この範囲で種々な組合せを作った。いずれも、1群の動物数は10匹とし、前者の場合は3回、後者の場合は2回に分けて実験を行ったので、動物数は夫々10乃至30および10乃至20匹であった。

生存日数を感染後45日観察し、それ以上生存したマウスについては、常法通り脳乳剤を健康マウスへ接種し発症および斃死を指標として原虫の有無を探索し、原虫が見出されなかった場合には、治癒していたものと判定した。

推計学的解析は、治癒率についてのみ実施し、延命日数については行なわなかった。即ち、10乃至100%の治癒率を示した群について、グラフの縦軸に治癒率、横軸にpyrimethamineの投与量の対数を取り、SDDS各投与量に於ける治癒率をプロットすれば各々略々S字状曲線を示すことを確認し、SDDSの各投与量に於いてpyrimethamineの投与量を増していった時に、100%の治癒率を示した最少投与量の治癒率を99%に修正して、それ以下の治癒率のすべてをプロビット変換し、期待プロビットを求め、両剤併用における両剤夫々の投与量と治癒率との関係について重回帰分析(Finney, 1952)を行なった。

Table 1 Effect of SDDS and pyrimethamine by intraperitoneal injection in various combinations on acute experimental toxoplasmosis in mice

Dose (mg/kg/day) of SDDS (X ₁)	Per cent cured (Mean survival days of mice which died after infection)*													
	0	0.05	0.1	0.2	0.3125	0.4	0.625	0.8	1.25	1.6	2.5	3.125	6.25	12.5
100	6.6(17.8)	0(18.5)	10(18.4)	55(-)	-	90(-)	95(-)	-	100(-)	100(-)	-	100(-)	-	-
50	0(13.0)	0(13.5)	0(14.6)	0(16.7)	-	60(-)	60(-)	-	90(-)	80(-)	-	80(-)	95(-)	-
25	0(9.1)	0(10.7)	0(10.7)	0(13.2)	-	0(14.6)	35(-)	-	80(-)	80(-)	-	100(-)	95(-)	-
12.5	0(7.5)	-	-	-	-	-	-	-	80(-)	80(-)	-	100(-)	100(-)	100(-)
10.0	-	-	-	-	0(13.4)	-	0(14.2)	-	0(17.8)	-	80(-)	70(-)	90(-)	100(-)
6.25	-	-	-	-	0(10.2)	-	0(11.3)	-	0(12.3)	-	10(18.1)	-	-	-
5.0	-	-	-	-	0(8.7)	-	0(9.0)	-	0(11.4)	-	10(15.2)	-	-	-
2.5	-	-	-	-	0(8.0)	-	0(7.9)	-	0(8.3)	-	-	-	-	-
1.25	-	-	-	-	0(7.7)	-	0(7.8)	-	-	-	-	-	-	-
0.625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(8.2)	0(9.5)	-
0	0(7.0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0(12.6)

* - : not examined, (-) : not calculated.

Treatment was initiated 3 hours after intraperitoneal inoculation of mice with 2×10^4 RH trophozoites and continued once daily for 7 days.

実験成績

1. 腹腔内注射の場合

両剤を組合せて腹腔内投与した実験は、3回に分けて行なったが、対照群の平均生存日数はそれぞれ6.9日、6.9日および7.1日で、すべてのマウスが6日から8日の間に死亡しており、推計学的に異質のものではなかったので、解析は3回の結果をまとめて行なった。

実験の結果は、Table 1 に示した如くで、SDDS と pyrimethamine の投与量 (mg/kg/day) を夫々 X₁, X₂ とすれば、X₁ × X₂ = 10 を境界に、X₁ × X₂ がより小さい範囲では治癒が殆どなく、延命効果のみ認められ、一方、より大きい範囲では治癒が多かった。両範囲を通じて、相乗作用は、両剤夫々単用の場合と比較して、明らかであった。この境界は可成り判然として居り、例えば、SDDS 100+pyrimethamine 0.1 (いずれも mg/kg/day, 以下同様)、即ち X₁ × X₂ = 10 では治癒率 10%、死亡マウスの平均生存日数 18.4 日であったが、100+0.2 では 50%、100+0.4 では 90% が治癒した。又、50+0.2 では治癒が認められなかったが、50+0.4 では 60% 治癒、10+1.25 では治癒が認められなかったが、10+2.5 では 80% 治癒した。同様のことは、SDDS の各投与量に対して pyrimethamine の投与量を増していった場合に、殆ど例外なく認められた。

以上の結果について、併用時の両剤夫々の投与量(mg/kg/day) と治癒率 (%) との関係重回帰分析したところ、Table 2 に示した如く、高度に有意な回帰性が認められ、2つの偏回帰係数も夫々高度に有意であった。得られた回帰式は

$$P(\%) = \left\{ \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{(2.1810gX_1 + 2.6710gX_2 + 2.24) - 5} e^{-1/2u^2} du \right\} \times 100$$

(但し、X₁, X₂ は夫々 SDDS と pyrimethamine の投与量 (mg/kg/day), P は治癒率)

Table 2 Analysis of variance of the percentage of cure for each of the doses of SDDS and pyrimethamine in Table 1

	s.s.	d.f.	m.s.	F ⁰
Regression	57.68	2	28.84	29.309**
error	17.72	18	0.984	
Total	75.4	20		

** P > 0.01

Table 3 Effect of SDDS and pyrimethamine given in food in various combinations on acute experimental toxoplasmosis in mice

Dose (mg% in food) of SDDS (X_1)	Per cent cured (Mean survival days of mice which died after infection)*							
	Dose (mg% in food) of pyrimethamine (X_2)							
	0	0.3125	0.625	1.25	2.5	5	10	20
200	100(—)	—	—	—	—	—	—	—
100	40(32.2)	—	—	—	100(—)	100(—)	—	—
50	10(23.0)	80(—)	100(—)	100(—)	100(—)	100(—)	100(—)	—
25	—	60(—)	80(—)	100(—)	95(—)	90(—)	100(—)	100(—)
12.5	—	0(19.1)	10(21.3)	80(—)	100(—)	100(—)	100(—)	90(—)
6.25	—	0(9.4)	0(13.1)	30(20.4)	60(—)	—	100(—)	100(—)
3.125	—	0(7.2)	0(10.5)	0(12.4)	30(25.6)	—	—	—
0	0(7.3)	—	—	—	—	0(7.9)	0(15.1)	60(—)

* — : not examined, (—) : not calculated.

Treatment was initiated 3 hours after intraperitoneal inoculation of mice with 2×10^4 RH trophozoites and continued for 14 days. The food given was 4 g per mouse per day.

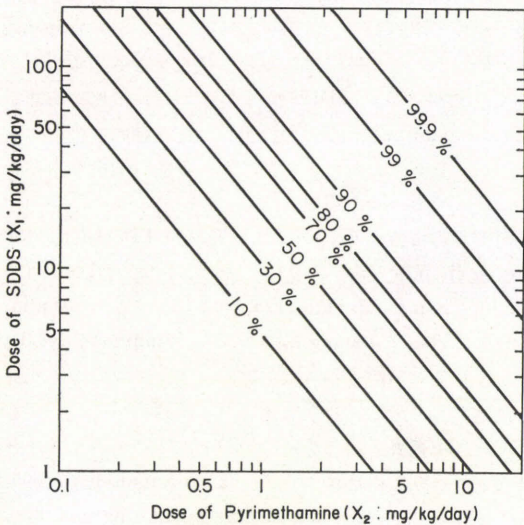


Fig. 1 Regression lines for estimation of the percentage of cure of toxoplasmosis in mice treated with various combination of SDDS and pyrimethamine by intraperitoneal injection.

の如くで、この式から種々な治癒率について回帰直線を引けば、Fig. 1 の様であった。

2. 飼料添加経口投与の場合

飼料添加経口投与での実験は、2回に分けて行なったが、結果は腹腔内注射の場合と同様まとめて解析した。成績は Table 3 に示した如くで、相乗効果のあることは明らかであった。

投与量は、飼料中の添加率 (mg%) で表わしたが、これを mg/kg/day に換算するには、数字を2倍すれば

良い (例えば、100mg% は約 200mg/kg/day に相当する)。しかしながら、マウスが弱って来た場合には、飼料摂取量が減少したため、特に効果の低い組合せで、この換算は正確ではなかった。

両剤それぞれの添加率 (mg%) を X_1' および X_2' とした場合、 $X_1' \times X_2' > 7.5$ の範囲で治癒が認められ、それ以下では延命効果のみが認められた。この境界は、腹腔内注射の場合のそれより、更に明瞭であり、例えば、SDDS 3.125+pyrimethamine 1.25 (ともに、mg%)、以下同様) では治癒なく、平均生存日数は 12.4 日で、投薬期間にさえ満たなかったが、3.25+2.5 では 30% 治癒し、死亡マウスの平均生存日数も 25.6 日となった。同様の関係は、6.25+0.625 と 6.25+1.25 群との間にも認められた。飼料添加の場合には、強制投与と異なり、弱ると薬剤が体内に摂取されないことが、境界を判然とさせた原因と考えられた。

以上の結果を重回帰分析したところ、Table 4 に示す

Table 4 Analysis of variance of the percentage of cure for each of doses of SDDS and pyrimethamine in Table 3

	s.s.	d.f.	m.s.	F ⁰
Regression	41.23	2	20.615	132.743**
error	1.71	11	0.155	
Total	42.94	13		

** P > 0.01

如く、高度に有意な回帰性が認められ、2つの偏回帰係数も夫々高度に有意であった。併用時の両剤夫々の添加率 (mg%) と治癒率 (%) との関係は

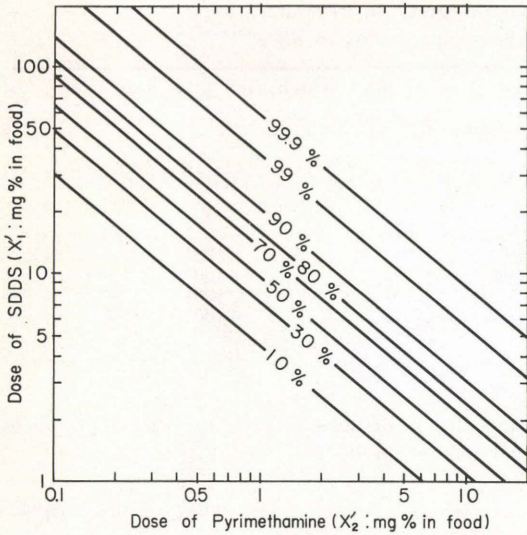


Fig. 2 Regression lines for estimation of the percentage of cure of toxoplasmosis in mice treated with various mixtures of SDDS and pyrimethamine in food.

$$P(\%) = \left\{ \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{(3.981 \log X_1' + 3.281 \log X_2' + 1.03) - 5} e^{-1/2u^2} du \right\} \times 100$$

(但し, X_1' , X_2' それぞれ SDDS および pyrimethamine の添加率 (mg%), P は治癒率)

なる回帰式で示された。この式から、種々な治癒率について回帰直線を引けば、Fig. 2 に示す如くであった。

考 察

Eyles & Coleman (1955) は、飼料添加経口投与による sulfadiazine と pyrimethamine とのマウスの実験的急性トキソプラズマ症に対する相乗作用について、詳しく報告しているが、上述の SDDS と pyrimethamine との併用時の結果から、マウスの系統を除いて全く同様な実験条件のところを、彼等の成績と比較してみると、SDDS+pyrimethamine の方がよりすぐれた効果を示したことが認められる。このことは、主として SDDS が sulfadiazine より効力が強い (Ohshima *et al.*, 1967) ことに因るものと考えられるが、相乗性を高める何等かの因子が関与しているかも知れない。

Eyles & Coleman (1953, 1955) は、sulfadiazine と pyrimethamine 併用の実験で、平行線法 (parallel line

assay) で両剤それぞれ単用の場合と 50% 治癒をもたらす量の比較を行ない、相乗効果を係数で表わしているが、上述の著者等の成績にこの方法を応用することは、特に腹腔内注射の場合に、毒性の現われぬ用量で pyrimethamine 単独で治癒が期待出来ないことから、無理があった。又、一定日数以上生存率での比較 (Eyles & Coleman, 1957) も、治癒マウスが併用群で多かったことから、適当ではないと考えられた。そこで、両剤それぞれ単用時との効果比較による解析は行わず、併用群における両剤の夫々の投与量と治癒率との関係を重回帰分析法で解析してみた。この結果得られた回帰直線から、種々な治癒率を得ることを期待するために必要な両剤の組合せが算出出来る。例えば、飼料添加経口投与の場合に、上述の実験条件で、治癒率 50% あるいは 90% が期待される SDDS+pyrimethamine の組合せの内、総添加率を最も少なくするのは、 $3.84+3.17$ および $5.77+4.76$ (mg%) である。実用的には、総投与量を少なくすることよりも、毒性の低い SDDS を主体に、毒性の比較的強い pyrimethamine を副作用の惧れのない範囲で併用することが、考えられるべきであろう。非経口的投与の場合にも、この点は全く同様である。

SDDS の毒性は非常に弱く、マウスの LD_{50} 値は 5,150 mg/kg (i. p.) (大島, 未発表) で、これは、DDS の 430 mg/kg (i. p.) (Aviado, 1967) はもとより、sulfadiazine 1,500~1,750 mg/kg (s. c.) (Feinstone, 1940) よりも、大きい値であった。更に、ラットでの亜急性毒性試験でも、毒性が非常に低いことが認められている (藤田ら, 未発表) ことから、効力と毒性の両者を考え合わせると、現在広く推奨されている sulfonamides+pyrimethamine 投与よりも、SDDS+pyrimethamine 投与の方が、更に副作用の危惧が少なく、かつ有効なトキソプラズマ症の治療手段となり得る可能性が認められる。

要 約

抗トキソプラズマ剤 2-sulfamoyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone (SDDS) は、他の sulfones あるいは sulfonamides と同様に、pyrimethamine との間に相乗作用が期待されたので実験を行なった。

1. SDDS と pyrimethamine を、種々な組合せで、RH株トキソプラズマ原虫を1匹当たり 2×10^4 腹腔内接種したマウスに、3時間後から、1日1回7日間腹腔内注射あるいは14日間飼料添加経口投与し、生存日数と

治癒率を観察した。

2. いずれの投与方法においても、両剤併用時の相乗効果は明らかであって、腹腔内注射した場合、SDDS と pyrimethamine のそれぞれの投与量 (mg/kg/day) を、 X_1 , X_2 とすれば、 $X_1 \times X_2 > 10$ の範囲に治癒が認められた。飼料添加の場合には、両剤の投与量 (飼料中 mg%, 1日 4g/マウス) を、それぞれ X_1' , X_2' とすれば、 $X_1' X_2' > 7.5$ の範囲に治癒が認められた。

3. SDDS および pyrimethamine の、併用時のそれぞれの投与量と治癒率との関係について、治癒率10%以上を示した群の成績から、重回帰分析を行ない、得られた回帰式を用いて推定治癒率を示す回帰直線を引いた。

稿を終るに当り、推計学的処理につき御指導をたまわった内山裕幸氏、実験に御協力頂いた矢沢正明氏ならびに新井和文氏に、深甚なる謝意を表する。

本研究の内容は、昭和43年3月29日第36回日本寄生虫学会総会で、その一部を発表した。

文 献

- 1) Aviado, D. M. (1967): Pathological physiology and chemotherapy of *Plasmodium berghei*. I. Suppression of parasitemia by sulfones and sulfonamides in mice. Exptl. Parasit., 20, 88-97.
- 2) Ball, S. J. and Warren, E. W. (1965): Synergism in the chemotherapy of *Eimeria* infections of chicks. Vet. Rec., 77, 1028-1030.
- 3) Basu, P. C., Mondal, M. M. and Chakrabarti, S. C. (1962): Treatment of human malaria by diaminodiphenyl-sulfone (DDS), singly and in combination with pyrimethamine. A preliminary study of their effect in *P. vivax* and *P. falciparum* infections in Rajasthan, India. Ind. J. Malariol., 16, 157-175.
- 4) Beverley, J. K. A. and Fry, B. A. (1957): Sulfadiazine, pyrimethamine and dapsone in the treatment of toxoplasmosis in mice. Brit. J. Pharmacol., 12, 189-193.
- 5) Eyles, D. E. and Coleman, N. (1953): Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. Antibiotics & Chemotherapy, 3, 483-490.
- 6) Eyles, D. E. and Coleman, N. (1955): An evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine, alone and in combination, on experimental mouse toxoplasmosis. Antibiotics & Chemotherapy, 5, 529-539.
- 7) Eyles, D. E. and Coleman, N. (1957): An evaluation of sulfones on experimental toxoplasmosis in the mouse. Antibiotics & Chemotherapy, 7, 577-585.
- 8) Eyles, D. E. and Jones, F. E. (1955): The chemotherapeutic effect of pyrimethamine and sulfadiazine on toxoplasmosis of the Norway rat. Antibiotics & Chemotherapy, 5, 731-734.
- 9) Feinstone (1940): Bull. Johns Hopkins Hosp., 67, 427. (Spector, W. S. (1956): Handbook of Toxicology, vol. I, W. B. Saunders, Philadelphia, 408pp. より引用)
- 10) Finney, D. J. (1952): Probit Analysis, 2nd ed., Cambridge Univ. Press, London, 318 pp.
- 11) Greenberg, J. and Richerson, E. M. (1950): Potentiation of the antimalarial activity of sulfadiazine by 2,4-diamino-5-aryloxy-pyrimidines. J. Pharmacol. Exptl. Therap., 99, 444-449.
- 12) Horton-Smith, J., Long, P. L. and Collier, H. O. J. (1960): Potentiation of sulfadiazine by 2,4-diamino-6,7-diisopropyl-pteridine and other 6,7-disubstituted 2,4-diaminopteridine against *Eimeria* infections of chicks. Brit. J. Pharmacol., 15, 298-303.
- 13) Joyner, L. P. and Kendall, S. B. (1955): Synergism in the chemotherapy of *Eimeria tenella*. Nature, 176, 975.
- 14) Lux, R. E. (1954): The chemotherapy of *Eimeria tenella*. I. Diaminopyrimidines and dihydrotriazines. Antibiotics & Chemotherapy, 4, 971-977.
- 15) Ohshima, S., Tanaka, H. and Inami, Y. (1967): The chemotherapeutic effect of 2-sulfamoyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone (SDDS) on acute experimental toxoplasmosis in mice. Jap. J. Parasit., 16, 331-338.
- 16) 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.
- 17) Ramakrishnan, S. P., Basu, P. C., Singh, H. and Wattal, B. L. (1963): A study on the joint action of diaminodiphenyl-sulfone (DDS) and pyrimethamine in the sporogony cycle of *Plasmodium gallinaceum*: Potentiation of the sporontocidal activity of pyrimethamine by DDS. Ind. J. Malariol., 17, 141-148.
- 18) Rollo, I. M. (1955): The mode of action of sulfonamides, proguanil and pyrimethamine on *Plasmodium gallinaceum*. Brit. J. Pharmacol., 10, 208-214.

Abstract

SYNERGISTIC EFFECT OF 2-SULFAMOYL-4, 4'-DIAMINODIPHENYLSULFONE (SDDS)
AND PYRIMETHAMINE AGAINST EXPERIMENTAL TOXOPLASMOSIS IN MICE

SATOSHI OHSHIMA, HIDEFUMI TANAKA AND YOSHIHARU INAMI
(*Biological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd.,
Toda-shi, Saitama, Japan*)

2-Sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone (SDDS), a recently discovered antitoxoplasmic (Ohshima *et al.*, 1967), was examined for synergistic effect with pyrimethamine as other sulfones or sulfonamides had been hitherto examined.

Experimental results were as follows:

1) SDDS and pyrimethamine were administered in various dose combinations to mice that had been intraperitoneally inoculated with RH strain of *Toxoplasma* 2×10^4 per mouse. Medication was started 3 hours after inoculation. The drugs were administered by intraperitoneal injection once daily for 7 days, or mixing in food for 14 days. Survival days and percentage of cure were observed as indices of the drug efficacy.

2) Synergistic effect of SDDS and pyrimethamine was obvious in either case of the administration routes. If the intraperitoneal doses (mg/kg/day) of SDDS and pyrimethamine are expressed as X_1 and X_2 respectively, cure of the mice was generally observed when $X_1 \times X_2 > 10$. When SDDS and pyrimethamine were administered in food at the doses of X'_1 and X'_2 (mg % in food, 4 g/mouse/day) respectively, cure was generally observed when $X'_1 \times X'_2 > 7.5$.

3) Relationship between percentages of cure and each of the doses of SDDS and pyrimethamine were analyzed by multiple regression analysis with probit transformation of per cent cured in experimental groups which showed more than 10 per cent cure. Regression lines for estimating the percentages of cure in mice treated with various mixtures of SDDS and pyrimethamine were drawn in Figs. 1 and 2.