

Toxoblasma gondii のサルファメトピラジン耐性株の 産生および耐性の持続性について

青 木 豊 治

(慶応義塾大学医学部寄生虫学教室)

(昭和49年8月9日 受領)

化学療法の普及発達に伴って出現した薬剤耐性菌株の問題は、細菌感染症治療上での重要性や遺伝生物学的な興味によつて活発な研究が行われ数多くの輝かしい知見が得られている。一方寄生原虫類の薬剤耐性については、マラリア原虫のそれがよく知られており、現在では用いられている殆んど全ての治療薬に対する耐性原虫株の存在が世界各地から報告されている (Peters, 1970)。その他の原虫としては、トリパノソーマ類、トリコモナス類、赤痢アメーバ、トキソプラズマと近縁種の家畜寄生のアイメリア (Tsunoda, 1963) など薬剤耐性上昇の有無に関して少数の報告は見られるが、抗生物質で代表される細菌類の薬剤耐性ほど著明な耐性上昇はこれらの原虫類では見られないようである。

トキソプラズマ (Tp) の薬剤耐性については本原虫の人体内の全時期に確実に奏効する薬剤が未だ知られていないことや、*in vitro* での実験的証明が方法論的に極めて困難であるなどの理由から研究が殆んど行われていない現状である。併しながら現在 Tp 症の治療薬としてもつとも広く用いられている Pyrimethamine およびサルファ剤はそれぞれマラリア原虫あるいは細菌類で容易に耐性の上昇することが知られている薬剤であるから、Tp での薬剤耐性を系統的に研究することは治療学上極めて重要と思われる。

本論文では Tp 症の治療に用いられているサルファ剤 Sulfamethopyrazine (SMP) に対する Tp の耐性獲得の有無、産生された耐性株の耐性の持続性、他剤との交叉耐性、耐性株の対マウス毒力などの諸点について検討を行った。

実験材料および方法

使用 Tp 株：

使用 Tp 株は当教室で10年余に亘りマウスを通じ継代保持された RH 株である。この株はマウスに強毒であり、虫体数 1,000 個の腹腔内接種によつて約7日間前後

で確実にマウスを斃す。SMP 耐性株は後述する方法でこの RH 株から産出されたものである。

動物：

実験動物としては体重20g前後の市販マウスを性別に関係なく使用した。

感染の有無の判定：

Tp 虫体の所定量をマウス腹腔内に接種して感染させた。Tp 感染死の判定には、4週以内に死亡したマウスは、その腹水中の虫体の有無を鏡検し、虫体検出不能のマウスは、その脳を乳剤化し、1ml 宛2匹の正常マウス腹腔内に接種し、死亡マウス中の虫体の存否を検し、死因の探究に努めた。4週以上生存マウスは、脳塗抹圧平標本にて、ミストを検し、前記同様、これらの脳を乳剤として、正常マウスに接種し、生存期間および虫体保有の如何を検した。接種4週生存マウスは、その血清について、化血研製 Tp 感作血球を用い、花木・信藤・佐藤法 (1964) によつて感作血球凝集反応値 (HA 値) を測定した。凝集値 256 倍以上を陽性とした。

薬剤：

使用した薬剤の Sulfamethopyrazine (2-sulfanilamido-3-methoxypyrazine) はイタリアで1961年に合成された持続性 Sulfa 剤で本剤の抗 Tp 作用については既に報告されている (花木, 1968; 青木, 1971)。投与方法としては、所定濃度の薬剤の蒸溜水浮遊液を作り使用前によく攪拌し、その0.5 ml をピニール管付き注射器にてマウスの胃内に注入する方法を用いた。投薬量は、1~53代までのマウスには一日量 0.5 mg (25 mg/kg) を連続6日、それ以後80代までのマウスには一日量を 1 mg (50 mg/kg) に増量した。上記の使用量は前報 (青木, 1971) によつて致殊量以下であり投与マウスは長期間元気に生存することが証明されている。

交叉耐性試験に使用した薬剤は、Sulfa 剤では Sulfamonomethoxine, Sulfadimethoxine を蒸溜水浮遊液として使用した。これらの薬剤の抗 Tp 性についてはそれ

ぞれ Tsunoda *et al* (1965), 島袋 (1967) によつて確かめられている。また同じく抗 Tp 作用をもつことの知られている (青木, 1969) Acetylspiramycin では N/10 H₂SO₄ 添加蒸留水乳剤を用いた。前者では一日量 2 mg, 後者では 8 mg とした。これらの薬剤の投与方法は SMP の場合と全く同一である。

耐性株産出方法：

12匹のマウスを2群に分け、各マウスに3,000個の RH 株虫体を接種し、1群は直ちに SMP の投薬を開始し、他群は無投薬のままそれぞれ6日後に生残したマウス腹水中の虫体数を算定した。虫体数算定は、生食水 2 ml を腹腔内に注入し腹部を軽くマッサージしたのちに吸引して得た腹腔洗滌液の 1 ml 中の虫数を血算盤にて算え腹腔内の虫体濃度を推測する方法によつた。虫体数が非常に多数の場合は生食水にて腹水を5倍に稀釈して同様に算定したのち換算した。次代からの継代は、SMP 投薬マウスの腹水中で虫体が最も増殖したマウスから虫体を採取し、これを前記同様2群のマウスに接種し、それぞれの群を薬剤投与、あるいは非投与として飼育観察し腹水中の虫体数を算定する操作を反覆した。しかし投薬の影響により虫体の増殖不活発のため16代以後の継代には接種虫数を3万個に増した。

耐性判定方法：

SMP の連続投与継代によつて耐性株が出現したか否かを判定するため次の方法を用いた。投薬を受けた継代 48, 53および60代のマウスより採取した1,000個の虫体を12~16匹のマウスに接種した。そのマウスを2群に分け、1群は2 mg (100 mg/kg) の SMP を投薬し、他群は無投薬とした。マウスの生存日数および腹腔内虫体数を両群について比較して有意差の認められない場合これを耐性株虫体とみなした。

耐性安定性についての検討：

生じた耐性株の耐性安定性を以下の方法で検討した。継代48, 53, 60および80代の投薬マウスからの虫体を正常マウスに接種し、投薬せず20~100代の継代を行った。この継代期間中5継代毎のマウス腹腔から虫体を採取し、その1,000個の虫体を2群各6~8匹のマウス腹腔内に接種した。1群は2 mg または 8 mg (400 mg/kg) の SMP をマウス死亡時迄連日投薬し他群は無投薬とし両群のマウス生存日数を比較した。

上記の如く1,000個という多数虫体の接種を行つて耐性の安定性を検討したのに加えて、その耐性株からのクローンについて耐性安定性の検索を行った。この目的に用

いた虫体は継代53代と60代投薬マウスから次の操作にて得られた。滅菌した破碎カバーガラスの小片上に稀釈した虫体浮遊液1滴を滴下し顕微鏡下で1個の虫体が検出されたガラス小片を選出してこの小片を正常マウスの腹腔内に開腹して封入した。マウス腹腔内で虫体が増殖した後に耐性の安定性を前記の方法で検した。

他の Sulfa 剤および Acetylspiramycin との交叉耐性試験：

前掲のごとく Sulfa 剤として Tp 抗作用を有する Sulfamonomethoxine, Sulfadimethoxine および Acetylspiramycin (Asp) との交叉耐性を検べた。継代53代マウスから得られた耐性株を無投薬で25代マウスに継代して得られた虫体を正常マウス腹腔内に接種し上記薬剤の経口投与をうけたマウスの生存日数を対照無投薬マウスと比較した。薬剤用量は Sulfa 剤の場合は一日量 2 mg, Asp の場合は 8 mg である。また接種虫体数は両 Sulfa 剤の場合1,000個, Asp の場合は Nakayama (1972) の例にならつて3,000個とした。

耐性株の毒力検出方法：

投薬継代マウス、48, 53, 60, 80代より採取した耐性虫体と、感受性 RH 株虫体をそれぞれ1,000個宛2群のマウスに接種して両群マウスの生存日数を検することによつて感受性株と耐性株のマウスに対する毒性の差異を検討した。

実 験 成 績

1. 耐性株の産生について

SMP の虫体の増殖抑制効果を検して継代投与する SMP の量を決定するためマウス腹腔内虫体数を日を追つて算定した。3,000個の RH 虫体を腹腔内に接種し、その直後に所定量の投薬を7日間行つた。接種後3, 5, 7日経過後に10匹宛マウスを殺し、それらの腹腔洗滌液 1 ml 中の虫体数を算定した。SMP 一日量0.5 mg を連日投薬した場合、虫体数は5日に最高に達し 2×10^6 個となり、7日後には減少して 8.3×10^4 個となつた。投薬量を1日2 mg および8 mg に増量した場合、3日、5日後の検査では殆んど虫体増殖は認められず、7日後に至り僅少の虫数の増加が認められ、それぞれ 2×10^4 個、 1.1×10^4 個の虫体が算定された (図1)。対照としての非投薬マウス腹腔内の虫体は、著明に増殖し5日後に最高の約 10^6 個に達し、7日後まではほぼ同一数を保持した。以上により継代投与量を初めは一日量0.5 mg とした。

SMP 投薬マウスの腹腔内虫体数の継代による変動：各継代マウスで接種6日後に腹腔内虫体数を算定し

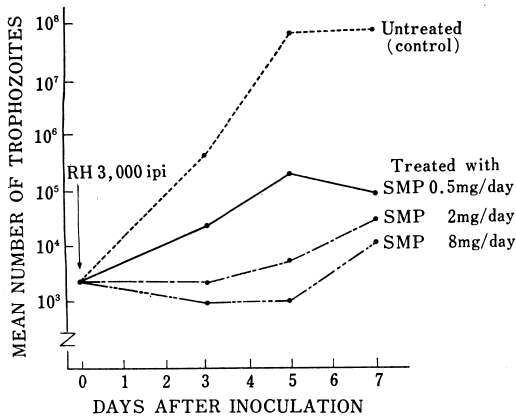


Fig. 1 Mean number of parasites detected in 1 ml of peritoneal fluid* after daily administration of sulfamethopyrazine.

* Counting of parasites was made on the fluid obtained by washing with 2 ml of saline injected into the peritoneal cavities of the mice, and the average number indicated were obtained from mice in each sample.

た。SMP 一日量の0.5 mg の投薬をうけたマウスでは1~30代間に虫体数は10⁵から10⁷に次第に増加したが、非投薬マウスでは全織代を通じ10⁷以上の虫体が検出された。30~44代の投薬マウスおよび同一織代数の非投薬マウスの虫体数を比較したところ投薬マウスでの虫体数もほぼ10⁷と安定して来たことが認められた。その後、

投薬、非投薬の両群とも増加して約10⁸に近づき、織代53代以後投薬量を一日量1 mgに増量したが、両群間の虫体数は同じく約10⁸に接近し差異は認められなかつた(図2)。

投薬織代を続けた感染マウスの生存日数:

投薬継代マウスからの虫体を2群の正常マウスに接種し、1群は実験群として投薬し、他群は対照として全く投薬せず両群マウスの生存日数を比較した。SMP投薬マウス22代と37代からの虫体3,000個を正常マウスに接種し、SMP一日量8 mgで治療した場合の実験群マウスは4週以内に全て死亡したがその平均生存日数は9.3日であり、無投薬の対照Iでは1週間後に全て死亡し平均生存日数は6.7日であつた。投薬を受けていない感受性RH株の虫体を3,000個正常マウスに接種し同時に一日量8 mg投薬された167匹(対照II)ではその78匹(46.7%)が4週間生存した。これらのマウスの脳を正常マウス腹腔内に接種したところ、このうち23匹(13.8%)が4週間元気に生存しその間、腹腔内からの栄養型虫体の検出もすべて陰性であり、脳内シストも検出されず、またこれらのマウスのHA値もすべて陰性であつた。対照IIIの感受性RH株虫体3,000個接種、非投薬のマウスは1週間前後で急性Tp症で死亡した(表1)。従つて十分なSMP耐性株はまだ産生されていない。

一方48, 53および60代よりの1,000個の虫体を接種しSMP一日量2 mg投薬したマウスの生存日数は57匹の

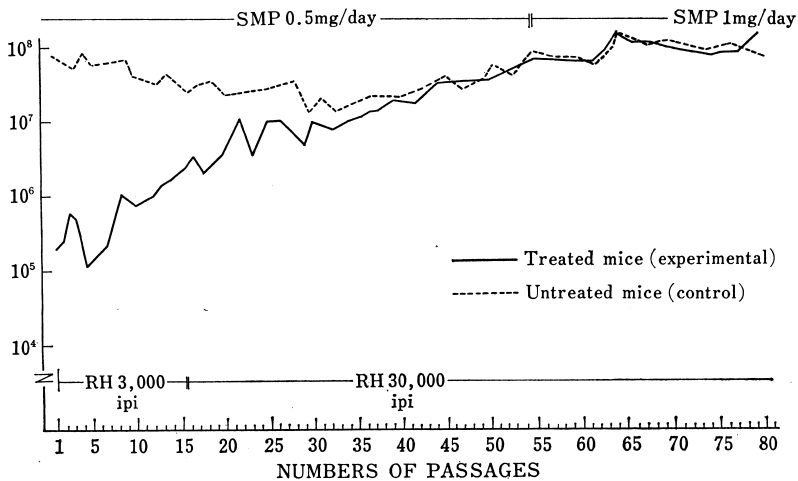


Fig. 2 Mean number* of trophozoites detected in the peritoneal cavities of mice receiving Sulfamethopyrazine (SMP)-treatment daily.

Counting of trophozoites was performed on the surviving mice 6 days after infection.

* Number of trophozoites indicates the numbers in 1ml of abdominal fluid washed by 2 ml saline.

Table 1 Effect of SMP treatment on survival of mice infected with RH toxoplasma which were obtained after serial passages through mice receiving administration of sublethal doses of SMP.

| Passage Number | No. of parasites injected | Daily dose of drug | No. of mice examined | No. of mice survived for | | | | Mean survival days | |
|----------------|---------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|-----|-----|---------|--------------------|-----|
| | | | | 1 wk. | 2 | 3 | 4 | | |
| p*-22, -37 | Exp. | 3,000 | 8 mg | 24 | 14 | 8 | 2 | 0 | 9.3 |
| | Cont. I | 3,000 | — | 24 | 12 | 0 | | | 6.7 |
| Sensitive RH | Cont. II | 3,000 | 8 mg | 167 | 163 | 124 | 95 | 78(46.7%) | |
| | Cont. III | 3,000 | — | 15 | 8 | 0 | | | |
| p-48, -53, -60 | Exp. | 1,000 | 2 mg | 57 | 45 | 0 | | | 7.3 |
| | Cont. I | 1,000 | — | 51 | 40 | 0 | | | 7.2 |
| Sensitive RH | Cont. II | 1,000 | 2 mg | 50 | 47 | 27 | 14(28%) | | |
| | Cont. III | 1,000 | — | 20 | 12 | 0 | | | |

p* indicated the passage number of parasites through mice treated with Sulfamethopyrazine. SMP (Sulfamethopyrazine) was orally administrated into mice everyday.

すべてで2週間以内に感染死亡し平均生存日数は7.3日であった。対照I群マウス51匹もすべて2週間以内に死亡しその平均生存日数は7.2日であった。対照IIでは、感受性RH株虫体1,000個接種一日量2mg連日投薬を受けた50匹のマウスのうち14匹(28%)が4週間生存した。これらの生存マウスの脳を正常マウスに接種したところ1匹(2%)のみが4週以上元気に生存しHA値も陰性であったが、他の脳接種を受けたマウスはすべて多数の虫体が腹腔内に検出され1週間前後で死亡した。対照IIIの感受性RH株虫体1,000個接種、非投薬マウスは同様1週間前後で死亡した。

これらの所見は、少なくとも投薬継代48代以後においては、腹腔内虫体数やマウス生存日数の点で非投薬対照と差異が認められないことを示しており、虫体がSMPに耐性を持つに至ったものと考えられた。

2. SMP耐性株の安定性

継代48代マウスから得られた虫体を、非投薬マウスに3日間隔で100代継代した。5代毎に虫体を採取し、その1,000個を正常マウス腹腔内に接種し、SMPを一日量2mgまたは8mg投薬しこれらの生存日数を非投薬の対照と比較した。投薬マウスは計204匹で、非投薬マウスは計184匹であった(表2)。SMP投薬マウスはすべて2週間以内に急性Tp症で死亡しその平均生存日数は7.2日であった。対照の非投薬マウスもまたすべて2週間以内に死亡し平均生存日数は7.0日であり両群の平均生存日数に有意義の差はなかった。53, 60および80代のマウスからの虫体についても同様の実験を行ったが、両群間の平均生存日数に差は認められずすべて2週間以内に死亡した。

本実験に用いたマウスを合計すると、投薬マウスは621匹、非投薬マウスは466匹であり、それぞれ平均生存日数は7.0および6.9日で、両者間に生存日数についての差異は認められなかった。

3. SMP耐性株のマウスに対する毒性について

投薬継代48, 53, 60および80代のマウスから採取した耐性株虫体各1,000個をそれぞれマウス腹腔内に接種した。これらの被接種マウス数は計71匹であった。同数の感受性RH株虫体を計86匹のマウスに接種して対照とし両者の生存日数を比較することによつて耐性株と感受性株のマウスに対する毒性比較試験を行った。SMP耐性株虫体感染マウスの平均生存日数は7.2日、感受性株虫体のそれは6.6日で両者は統計学的に有意の差を示した($t_0=2.30 > t=1.97$, $p=0.05$, $v=155$)。感染1週間後の生存マウス数は両群に明らかな差があり、前者は58匹(82%)、後者は49匹(57%)であった。これらの所見から、SMP耐性株は感受性株よりマウスに対してやや弱毒であった。

4. 耐性株1個の虫体から出発した(クローン)虫体のSMP耐性

耐性株1個の虫体を正常マウス腹腔内に接種し、増殖した後の虫体について耐性の持続性を観察した。1個の虫体接種の10日後に腹腔内からの増殖虫体 10^4 個宛を3匹の正常マウス腹腔内に接種した。SMP投薬を行わず3日間隔で本株のマウス継代を続けた。継代中5代毎にマウスから1,000個の虫体を2群のマウス腹腔内に接種した。1群のマウスは一日量2mgまたは8mgを投薬し、他群は投薬せず対照として両群マウスの生存日数を検した。投薬、非投薬の両群マウス間の平均生存日数に

Table 2 Stability of resistance to SMP after successive transfers of the parasites through mice without treatment.

| Organism isolated from passage | No. of | | Daily dose | No. of mice examined | No. of mice survived for | | Mean survival days |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------|------------|----------------------|--------------------------|-------|--------------------|
| | Passages without treatment | Parasites injected | | | 1 wk. | 2 wk. | |
| 48* | 5 to 100 | 1,000 | Exp. 2 mg | 144 | 99 | 0 | 7.1 |
| | | | Exp. 8 mg | 60 | 44 | 0 | 7.3 |
| | | | Cont. — | 184 | 113 | 0 | 7.0 |
| 53* | 5 to 80 | " | Exp. 2 mg | 117 | 65 | 0 | 7.0 |
| | | | Exp. 8 mg | 80 | 45 | 0 | 7.1 |
| | | | Cont. — | 134 | 62 | 0 | 7.0 |
| 60* | 5 to 60 | " | Exp. 2 mg | 68 | 44 | 0 | 7.0 |
| | | | Exp. 8 mg | 72 | 50 | 0 | 7.0 |
| | | | Cont. — | 104 | 64 | 0 | 6.9 |
| 80* | 5 to 20 | " | Exp. 2 mg | 44 | 28 | 0 | 6.9 |
| | | | Exp. 8 mg | 36 | 24 | 0 | 7.0 |
| | | | Cont. — | 44 | 24 | 0 | 6.8 |
| Total (2 mg and 8 mg) | | | Exp. 2 mg | 373 | 236 | 0 | 6.9 |
| | | | Exp. 8 mg | 248 | 163 | 0 | 7.1 |
| | | | Cont. — | 466 | 263 | 0 | 6.9 |
| Total (Resistance) | | | Exp. | 621 | 399 | 0 | 7.0 |
| | | | Cont. | 466 | 263 | 0 | 6.9 |

*Figures indicate the number of passage of the parasites through mice receiving the treatment of SMP.

Table 3 Comparison of the survival periods of mice infected with *Toxoplasma* strains resistant or sensitive to Sulfamethopyrazine.

| Strain used | No. of mice examined | No. of mice survived for | | Mean survival days |
|--|----------------------|--------------------------|-------|--------------------|
| | | 1 wk. | 2 wk. | |
| Resistant strain from p* 48, -53, -60, -80 | 71 | 58 (82%) | 0 | 7.2 |
| Sensitive RH-strain | 86 | 49 (57%) | 0 | 6.6 |

P* Indicates the passage number of parasites through mice treated with Sulfamethopyrazine. Inoculum size is the trophozoites of 1,000 in number.

有意差はなかつた(表4)。すなわち投薬マウス計238匹と非投薬マウス計158匹の平均生存日数はそれぞれ6.9日と7.0日であった。上記の結果は、SMPに対する耐性がクローンの虫体についても安定し、非投薬マウス継代50代後においても不変に保たれていることを示している。

5. SMP 耐性虫体のサルファ剤およびアセチルスピラマイシンとの交叉耐性

前述の成績に基いて SMP 連続投薬継代53代のマウスからの虫体を非投薬マウスに25代継代後に得られた虫体

を SMP 耐性虫体と判定してこれを本実験に使用した。その1,000個の虫体をマウス腹腔内に接種し同時に投薬を開始した。その結果 SMP 耐性株は Sulfamonomethoxine (SMM), Sulfadimethoxine (SDM) のいずれにも耐性を示した。すなわち SMM, SDM の投薬マウスは全て1週間前後で死亡しその平均生存日数はそれぞれ7.1日および6.9日であり対照の SMP 投薬マウスの平均生存日数7.2日と有意差はなかつた。他方感受性株の接種を受けた正常マウスでは、SMM, SDM 投薬によってそれぞれ27.3%, 7.5%が4週間以上生存した。一方

Table 4 Stability of resistance of the clone obtained from SMP-resistant parasites

| Organisms used | No. of | | Daily dose | No. of mice examined | No. of mice survived for | | Mean survival days |
|-----------------------|----------------------------|--------------------|------------|----------------------|--------------------------|-------|--------------------|
| | passages without treatment | parasites injected | | | 1 wk. | 2 wk. | |
| 53* | 5 to 50 | 1,000 | Exp. 2 mg | 72 | 38 | 0 | 6.9 |
| | | | Exp. 8 mg | 48 | 26 | 0 | 7.0 |
| | | | Cont. — | 80 | 35 | 0 | 7.0 |
| 60* | 5 to 50 | " | Exp. 2 mg | 62 | 35 | 0 | 7.0 |
| | | | Exp. 8 mg | 56 | 35 | 0 | 7.1 |
| | | | Cont. — | 78 | 29 | 0 | 6.9 |
| Totals (2 mg and 8mg) | | | Exp. 2 mg | 134 | 73 | 0 | 6.9 |
| | | | Exp. 8 mg | 104 | 61 | 0 | 7.0 |
| | | | Cont. — | 158 | 64 | 0 | 7.0 |
| Total | | | Exp. | 238 | 134 | 0 | 6.9 |
| | | | Cont. | 158 | 64 | 0 | 7.0 |

*These organisms are resistant to SMP and the figures indicate the number of passages of the parasites through mice receiving SMP-treatment.

Table 5 Sensitivity of SMP-resistant parasites* to sulfa drugs.

| Strain and No. of Parasites injected | Drug used | Daily dose | No. of mice examined | No. of survived for | | | | Mean survival days | Eradication of parasite in mice |
|---|--------------------|------------|----------------------|---------------------|----|----|----------|--------------------|---------------------------------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 (wk) | | |
| SMP-resistant strain 1,000 parasites | Sulfamonomethoxine | 2 mg | 20 | 18 | 0 | | | 7.1 | |
| | Sulfadimethoxine | 2 mg | 40 | 28 | 0 | | | 6.9 | |
| | SMP (cont) | 2 mg | 20 | 17 | 0 | | | 7.2 | |
| SPM-sensitive strain 1,000 parasites | Sulfamonomethoxine | 2 mg | 33 | 32 | 27 | 20 | 9(27.3%) | | 1(3%) |
| | Sulfadimethoxine | 2 mg | 40 | 32 | 10 | 6 | 3(7.5%) | | 0 |
| | No treatment(cont) | — | 30 | 17 | 0 | | | 6.6 | |

*SMP-resistant parasites, which were obtained from the 53 rd passage of mice receiving SMP treatment and transferred serially 25 times without SMP-treatment, were used for these experiments.

Table 6 Sensitivity of SMP-resistant parasites* to Acetyl-spiramycin.

| drug | No. of parasites injected | Daily dose | No. of mice examined | No. of mice survived for | | | | Mean survival days | Eradication of parasite in mice |
|-------------------|---------------------------|-------------|----------------------|--------------------------|----|----|-----------|--------------------|---------------------------------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 (wk) | | |
| Acetyl-spiramycin | SMP-resist 3,000 | 8 mg | 33 | 21 | 19 | 13 | 9(27.5%) | | 7(21.2%) |
| " | sensit. RH-st 3,000 | 8 mg | 111 | 109 | 83 | 51 | 32(28.8%) | | 27(24.7%) |
| Cont.-1 | SMP-resist 3,000 | 8 mg of SMP | 30 | 20 | 0 | | | 7.1 | |
| Cont.-2 | sensit. RH-st 3,000 | — | 25 | 16 | 0 | | | 6.7 | |

*The SMP-Resistant parasites used were the same as those in Table 5.

対照の感受性株接種、非投薬マウスの平均生存日数は6.6日であった。これらの成績から SMP 耐性株は、他の Sulfa 剤 SMM, SDM に交叉耐性を示したと考えられた(表5)。

SMP と Acetylspiramycin (ASP) 間の交叉耐性について検したが、表6のごとく耐性株を接種し ASP 連続投薬を行った場合の4週間生存マウスは27.5%、感受性株を接種し投薬した場合のそれは28.8%とほぼ同じであった。従つて SMP と ASP 間には交叉耐性は認められなかった。

考 察

Tp 症が人の感染症として治療の対象となつたのは Wolf and Cowen (1937, 1939) による脳炎症例の報告以来であるがその数年後には早くも Sabin and Warren (1941, 1942) および 1942 年 Biocca and Pasqualin (Eyles, 1956による)によつて Sulfa 剤が有効であることが動物実験で確かめられている。その後 Eyles and Coleman (1952)によつて pyrimidine 誘導体の抗マラリア剤 Pyrimethamine が本症に対し卓効のあることが報じられ、また Summers (1953)も独自にこのことを発表している。さらに Sulfa 剤と pyrimethamine の併用は相乗の効果のあることが知られて以来 (Eyles and Coleman, 1953; 1955) この療法が Tp 症治療のもつとも標準的方法とされ今日に至っている。

その他の治療剤としてはマクロライド系抗生物質の一つである Spiramycin に抗 Tp 作用のあることが Garin and Eyles (1958)によつて報じられて以来その効果の評価について多数の報告があるが Spiramycin または Acetylspiramycin の場合も Sulfa 剤との併用によつて作用が増強することが知られている (Nakayama and Matsubayashi, 1963; 青木, 1969)。

以上に述べたごとく今日の Tp 症の治療としては Pyrimethamine を第1選択、Spiramycin を第2選択として、それらに Sulfa 剤を併用する方法が広く用いられている。従つて Sulfa 剤は本症の治療に殆んど必ず用いられる薬剤としてその意義は大きい。

用いられる Sulfa 剤の種類については枚挙にいとまのない程多数の発表があり、古典的な同剤の効力比較は Eyles (1953)によつて行われている。それによると Sulfadiazine, Sulfamerazine などが有効であるが Sulfapyrimidine 系統のものおよび Sulfapyrazine がより強力であつたという。その後上記両系統の Sulfa 剤

の検討が続けられ、Supronal (Bimmer and Mohr, 1958, Kabelitz and Kabelitz, 1961), Sulfamethoxy-pyridazine (Midtvedt, 1964), Sulfamonomethoxine (Tsunoda, *et al*, 1965), Sulfadimethoxine (島袋, 1967) などの有効性が報じられている。また最近では従来の Sulfa 剤よりも更に強力に作用し、しかも毒性の少ない Sulfamoyl-diaminodiphenylsulfone (SDDS) (大島ら 1967, 1968, Shimizu, *et al*, 1968) が注目されつつある。

本実験に使用した Sulfamethopyrazine (SMP) も花木(1968), 青木(1971), 百瀬ら(1972)などによつてその有効性が確かめられている。SMP は金政ら(1967)によると本剤のマウス経口投与による急性毒性 LD₅₀ は 1,710 mg/kg で少なく血漿蛋白結合率、赤血球吸着率などの点からも他の Sulfa 剤に勝つていて現在細菌にもつとも有効な Sulfa 剤の一つとされている。

この様に Sulfa 剤が本症の治療に広く用いられている現在、Sulfa 剤に対し Tp が耐性を示すか否かは重要な問題である。

もつとも Hutchison *et al* (1969)の一連の研究によつて Tp がネコの腸管上皮細胞を主な寄生局所とするコクシジウムであり、人への伝播には感染ネコの糞便中のオオシストが重要な意味をもつことが明らかになつた現在、Tp の薬剤耐性の問題はマラリア原虫のそれとは著しく異なり疫学的な重要性はないが、個々の症例での治療に際しては影響を持つ問題である。

Sulfa 剤に対する Tp 耐性株の産生の試みは既に行われているが完全な耐性株は未だ産生されていない。すなわち、Sander and Midtvedt (1971)は、一日量 0.5 mg の Sulfamethoxazole (SMO) を飼料に加えて飼育し、5~6日間隔で腹水中の虫体をマウスに継代し 290 日後に至つて SMO に対して耐性株の産生を得た。この耐性株および感受性 RH 感染マウスの SMO による治療効果をみると、マウスの生存日数は前者において明らかな短縮が認められたが、この耐性株接種後、投薬マウス 60匹のうち 5匹が 20日生存したことから、この株の耐性は不完全なものであつて完全な耐性とは考え難い。

また、角田(1963, a, b)は著者の実験と同様、マウスの実験 Tp 症に対し Sulfamethazine を用いて耐性獲得の有無、耐性復帰、交叉耐性などについて実験を行った。それによると RH 株を接種したマウスの飲料水中に一定量の Sulfamethazine を加え、マウスの死亡前にその腹水を正常マウスに接種して同様な飼育を反覆する

方法を採った。その結果 Sulfamethazine 0.015%投与群ではマウス継代5代、0.03%投与群では継代8代で薬剤非投与飼育マウス群と生存日数がほぼ同一となつたので、その実験マウスに更に大量の薬剤を投与したが治療効果が認められなかつたことから、これらのマウスは耐性獲得したものと判定している。つまり5代および8代継代という短期間に既に耐性が獲得されているが、この点著者の成績と大きく異なる。薬剤投与方法が著しく相違するために単純な比較を行うには無理があるかも知れないが著者の成績では48代継代以後にはじめて完全な耐性を示したものである。また耐性獲得に要した日数については著者の成績は Sulfa 剤不完全耐性を誘導した Sander and Midtvedt のそれに近い。交叉耐性については著者の結果と同じく他の11種の Sulfa 剤には耐性を示したとしている。著者の成績との相違は復帰試験にも現われている。本実験では耐性株を無投薬マウスに100代継代したのちもその耐性に変化が見られなかつたが、角田の実験では20代以内の継代で感受性は復帰している。また著者の場合は耐性虫体1匹から出発したクローンにおいても同様に耐性が維持されていた。これらの点から考えると角田の認めた耐性は遺伝的に安定した形質ではなく著者のものとは本質的な相違がある様である。これを適応現象による獲得耐性と角田は表現しているが、この考え方は一般的な微生物の薬物耐性の概念とは異つていると思われる。

Sulfa 剤以外の抗 Tp 剤の薬剤耐性については Acetylspiramycin (ASP) と Pyrimethamine (PM) での成績が発表されている。

Nakayama (1972)は ASP を用い著者の実験と全く同一な方法で耐性株の産生に成功し、耐性獲得までの期間、耐性持続性、病原力など多くの点で著者の SMP での成績と同一傾向の結果を得ている。勿論 Sulfa 剤との交叉耐性はない。

PM については組織培養系を用いた Cook (1958)の研究があり、0.001 mg%から16 mg%へと著しく耐性上昇させることに成功している。薬剤と実験方法との相違から著者の実験とは比較出来ぬとしても、類似した作用機序をもつ PM と Sulfa 剤に対して Tp は比較的容易に耐性を示すことは興味深い。

Sulfa 剤および PM の Tp に対する作用機序に関しては Summers (1947), Frenkel and Hitching (1957), Eyles and Coleman (1960)の研究があり、何れも前者ではパラアミノ安息香酸 (PABA) との拮抗作用、後者

では dihydrofolate reductase の阻害を示す結果が得られている。すなわち葉酸の生合成路上の出発点と終末との異つた2点においてそれぞれの薬剤が作用するのである。Sulfa 剤のこの機序に関して *Escherichia coli* を用いて Pato and Brown (1963)は変性酵素の出現を証明しているが同様な機序が Tp の場合にも適用するか否かは分らない。

一般に耐性菌株の病原性は原株のそれに比較して低下することがいわれている。著者の得た耐性 Tp 株は元の RH 株に比べて僅かであるがマウスに対する毒力の減弱が認められた。同様に病原性を比較した実験で Nakayama (1972)は ASP 耐性株の病原性は低下したとしているが一方角田(1963 b)は Sulfamethazine 耐性株では原株と同一の病原性を示したとしている。

本実験の結果は、Tp は緩徐ではあるが Sulfa 剤に対して確実に感受性の低下を示すということである。Tp 症の治療は Pyrimethamine あるいは Spiramycin と Sulfa 剤を併用し数週に及ぶ長期投薬を行うのが普通である。その場合 Sulfa 剤に対する感受性の低下が生じ長期間に治療効果の減退する可能性を十分に考慮することが臨床上に必要であろう。

結 論

著者は前報において Sulfamethopyrazine がマウス実験 Tp 症に対し著明な治療効果を示したことを報告した。

この Sulfamethopyrazine を用いて RH·Tp 虫体の本剤に対する耐性株の産生を試み次の結果が得られた。

RH 株虫体の腹腔内接種と同時に0.5 mg~1.0 mg/day の Sulfamethopyrazine をマウスに投与し、継代を続けたところ48代以後のマウスから得られた虫体は本剤への完全な耐性を示すに至つた。この虫体の耐性は正常マウス100代の無投薬継代によつても維持されていた。耐性虫体1匹から出発したクローンにおいても同様な耐性が認められた。この耐性株のマウスに対する病原性は原株のそれに比べ僅かながら低下していた。

Sulfamethopyrazine 耐性は他の2種の Sulfa 剤には交叉耐性を示したが、Acetylspiramycin には耐性を示さなかつた。

終りに御校閲、御指導を賜つた、当寄生虫学教室浅見敬三教授ならびに東海大学医学部寄生虫学教室中山一郎教授に深謝致します。本研究の要旨は、第32回日本寄生虫学会東日本大会および第42回日本寄生虫学会大会で発

表した。

文 献

- 1) 青木豊治(1969) : マウスの実験的急性トキソプラズマ症に対する Acetylspiramycin の治療効果について. 寄生虫誌, 18, 190-195.
- 2) 青木豊治(1971) : マウスの実験的急性トキソプラズマ症に対する Sulfamethopyrazine の治療効果ならびに死虫ワクチンの併用効果. 寄生虫誌, 20, 132-138.
- 3) Bimmer, E. und Mohr, W. (1958) : Therapie-Versuche bei experimenteller Mäuse-Toxoplasmosis. Zschr. Tropenmed. Parasitol. 9, 225-234.
- 4) Cook, M. K. (1958) : The development of a pyrimethamine-resistant line *Toxoplasma* under in vitro condition. Am. J. Trop. Med. Hyg. 7, 400-402.
- 5) Eyles, D. E. (1953) : The present status of the chemotherapy of toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2, 429-444.
- 6) Eyles, D. E. (1956) : Newer of knowledge of the chemotherapy of toxoplasmosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 64, 252-217.
- 7) Eyles, D. E. and Coleman, N. (1952) : Tests of 2, 4-diamino pyrimidines on toxoplasmosis. Publ. Hlth. Rep. 67, 249-252.
- 8) Eyles, D. E. and Coleman, N. (1953) : Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. Antibiotic. chemother, 3, 483-490.
- 9) Eyles, D. E. and Coleman, N. (1955) : An evaluation of the curative effects of pyrimethamine and sulfadiazine alone in combination on experimental mouse toxoplasmosis. Antibiotic. Chemother. 5, 529-539.
- 10) Eyles, D. E. and Coleman, N. (1960) : The effect of metabolites on the antitoxoplasmic action of pyrimethamine and sulfadiazine. Am. J. Trop. Med. Hyg. 9, 277-283.
- 11) Frenkel, J. K. and Hitching, G. H. (1957) : Relative reversal by vitamins (p-aminobenzoic, folic, and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on *Toxoplasma*, mouse and man. Antibiotic. Chemother. 7, 630-638.
- [12) Garin, J. P. and Eyles, D. E. (1958) : La traitement de la experimentale de la souris per la Spiramycin. Press. Med. 66, 957-958.
- 13) 花木琢磨・信藤謙蔵・佐藤卯三郎(1964) : トキソプラズマ血球凝集反応に関する研究. 日獣医誌, 26, 378.
- 14) 花木琢磨(1968) : E 183 (ポリサイダル)のトキソプラズマ感染マウスに対する効果. エーザイ文献, PCD-A-1-14.
- 15) Hutchison, W. H., Dunachie, J. F., Siim, T. C. and Work, K. (1969) : Life cycle of *toxoplasma gondii*. Brit. Med. J. 4, 806, 27 Dec. 69.
- 16) Kabelitz, E. und Kabelitz, H. J. (1961) : Indikation und Ergebnisse der medikamentösen Therapie bei postnatal erworbener Toxoplasmosis. Zschr. Tropenmed. Parasitol. 12, 172-190.
- 17) 金政泰弘・河部 靖・金沢 保・大郷利治・池田友久・佐藤 勝(1967) : Sulfamethopyrazine の基礎的検討, 第1報, 第2報. Chemotherapy, 15, 571-576, 577-580.
- 18) Midtved, T. (1964) : Acute experimental toxoplasmosis in mice treated with some new chemotherapeutics and antibiotics. Acta. Microbiol. Scand. 61, 67-74.
- 19) 百瀬 皓・井上潤一・峰 克彰・Navin, C. Rai. (1972) : 抗トキソプラズマ剤としてのサルファ剤の考察—特にスルファメトピラジンについて. 臨眼科, 26, 1155-1160.
- 20) Nakayama, I. (1972) : *Toxoplasma gondii* : Production of acetylspiramycin-resistance, with special reference to stability of its resistance. Jap. J. Parasit. 21, 230-240.
- 21) Nakayama, I. and Matsubayashi, H. (1963) : Effect of spiramycin on experimental toxoplasmosis in mice. Keio, J. Med. 12, 117-125.
- 22) 大島 慧・稲見芳治・田中英丈(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. 日獣医誌, 29, Suppl. 49.
- 23) 大島 慧・田中英丈・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-sulfamoyl-4-4'-diaminodiphenylsulfone (SDDS) と pyrimethamine との相乗効果. 寄生虫誌, 17, 75-80.
- 24) Pato, M. L. and Brown, G. M. (1963) : Mechanisms of resistance of *Escherichia coli* to sulfonamides. Arch. Biochem. 103, 443-448.
- 25) Peters, W. (1970) : Chemotherapy and drug resistance in malaria. Acad. Press. London.
- 26) Sabin, A. B. and Worrin, J. (1941) : Therapeutic effect of sulfonamides on infection by intracellular protozoan (*Toxoplasma*). J. Bact. 41, 80.
- 27) Sabin, A. B. and Warren, J. (1942) : Therapeutic effectiveness of certain sulfonamides

- on infection by intracellular protozoon (*Toxoplasma*). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 51, 19-23.
- 28) Sander, J. and Midvedt, T. (1971) : Development of sulphonamide resistance in *Toxoplasma gondii*. Acta. Path. Microbiol. Scand. B. 79, 531-553.
- 29) 島袋 哲(1967) : スルファジメトキシシンとピリメサミンの併用によるトキソプラズマ人工感染豚の治療について. 日獣会誌, 20, 442-445.
- 30) Shimizu, T., Shirahata, T. and Inami, Y. (1968) : Therapeutic effect of S.D.D.S. (2-sulfamoyl-4-4'-diaminodiphenylsulfone) on experimental toxoplasmosis. Jap. J. Vet. Sci. 30, 183-195.
- 31) Summers, W. A. (1947) : Antagonism of sulphonamide inhibition by paraaminobenzoic acid and folic acid in *Toxoplasma* infected mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 66, 509-511.
- 32) Summers, W. A. (1953) : The chmotherapeutic efficacy of 2-4-diamino-5-p-chlorophenyl-6-ethylpyrimidine (Daraprim) in experimental toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2, 1037-1044.
- 33) Tsunoda, K. (1963) : Drug-resistant chicken coccidia (*Eimeria tenella*) and experimental treatment of chickens infected with them. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 3, 133-141.
- 34) 角田 清(1963 a) : トキソプラズマの薬剤耐性. 家畜衛生試験場年報, 121-123.
- 35) 角田 清(1963 b) : *Toxoplasma* 原虫の薬剤耐性について. 水曜日記事, 12, 30-31.
- 36) Tsunoda, K., Suzuki, K. Ito, S. and Tsutsumi, Y. (1965) : Effect of sulfamonomethoxine also and with pyrimethamine upon pigs experimentally infected with *Toxoplasma*. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 5, 27-35.
- 37) Wolf, A. and Cowen, D. (1937) : Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis). A new protozoan disease of man. Bull. Neuro. Inst. N. Y. 6, 306-371.
- 38) Wolf, A., Cowen, D. and Baige, B. H. (1939) : Toxoplasmic encephalomyelitis. III. A new cases of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan. Am. J. Pathol. 15, 657-694.

AbstractDEVELOPMENT OF RESISTANCE OF *TOXOPLASMA GONDII* TO SULFA DRUG,
WITH SPECIAL REFERENCE TO STABILITY OF ITS RESISTANCE.

Toyoharu AOKI

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

The present paper deals with the development of *Toxoplasma gondii* (Tp) resistant to sulfamethopyrazine (SMP) by successive passages of the sensitive RH strain of Tp through mice. In the previous paper, SMP was proved to have a therapeutic effect on experimental toxoplasmosis, as shown by prolongation of survival period of the infected mice or by eardication of the parasites in mice.

RH Tp, which were transferred serially through mice treated with SMP in dosages of 0.5 mg to 1 mg daily, developed SMP resistance after the 48th passage. The resistant strain thus produced tolerated the treatment 8 mg/day and actively multiplied in the peritoneal cavity of inoculated mice causing rapid death. The SMP resistance was found to be invariably stable, being maintained even after 100 passages through mice without administration of SMP. The SMP-resistant strain was found to have lower virulence than the SMP-sensitive strain.

The parasites originating from a single trophozoite of SMP resistant parasites were also found to retain the resistance even after 50 passages without exposure to SMP. Cross resistance between SMP and other sulfa drugs such as Sulfamonomethoxine and Sulfadimethoxine was observed, but there was no cross resistance to acetylspiramycin.