

環状燐酸エステル 2-phenyl-4H-1, 3, 2-benzodioxaphosphorin-2-sulfide (K-15) の抗フィラリア作用

田中英文 大島 慧

田辺製薬株式会社薬理研究所

小林準三 橋口淳一

東京大学医科学研究所寄生虫研究部

大島 康義

明治大学農学部

(昭和51年10月29日 受領)

有機燐化合物が各種糸状虫のマイクロフィラリアを殺す作用を持っていることが知られている (Lämmler and Grüner, 1975). 著者らは Eto and Oshima(1962)および Eto *et al.* (1963) が合成した環状燐酸エステル12種についてコットンラットの *Litomosoides carinii* 感染に対する作用を検討し、その内 2-phenyl-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-sulfide (K-15) に強い抗マイクロフィラリア活性を見出し、*in vivo* および *in vitro* の各種実験を試みた。しかし、残念ながら K-15はマウスにおいて強いコリンエステラーゼ阻害を示し、また貧血を起させることが明らかになったので、抗フィラリア剤としての検討は中止してしまつた。以下に、K-15の抗フィラリア活性を示す最少限の成績を報告する。

実験材料ならびに方法

1. 動物実験

コットンラットに *Litomosoides carinii* の感染子虫を保有するイエダニ *Ornithonyssus bacoti* を2週間付着させ、以後60日以上経過してから、末梢血中にマイクロフィラリア (Mf) が出現していることを確認し、実験に供した。

被検化合物は、少量のカルボキシメチルセルロース (CMC) を加えた生理食塩液に溶解または懸濁し、腹腔内注射または経口投与した。

Mf に対する作用は末梢血中の Mf 数の消長によつて判定した。すなわち、コットンラットの尾端を針で刺し、血液 2.5cmm をメランジュールに吸引してスライ

ドグラス上に蛇行状に塗抹し、乾燥後ギムザ染色を施こして鏡下で Mf の全数を計数した。成虫に対する効果は、コットンラットをエーテル麻酔で殺し、直ちに胸腔および腹腔内に生理食塩液を入れ、絡みあつた虫体を取り易くしてピンセットで取り出し、雌雄に分けてそれぞれ計数すると同時に生死の別を観察して判定した。

2. 試験管内実験

感染コットンラットから成虫および Mf を、感染イエダニから感染子虫をそれぞれ採取し、成虫は雌雄各2隻ずつ、感染子虫は10隻ずつ、Mf は1,000~1,500隻ずつそれぞれ pH 7.4 に調整した Eagle 液中に入れ、被検化合物を種々な濃度に溶解した生理食塩液を10%の割合で加えた後、37C に保ち、1、4および24時間後に運動性と生死を観察した。

実験成績

1. 動物実験

環状燐酸エステル類の *L. carinii* の Mf に対する作用： 12種の環状燐酸エステルについて、最大投与量を 100mg/kg/日×4日とし、毒性が発現した場合には減量して、それぞれ腹腔内注射し、以後経口的に血中 Mf 数を調べた。化合物の構造とその Mf に対する効果は Table 1 に示す如くであつた。

これらの化合物の中で、K-15は100mg/kg 1回の投与で Mf を完全に殺滅した。K-15の S を O に置換した K-1は100mg/kg 投与で毒性を示したが、50mg/kg 1回投与では毒性はなく、K-15に次ぐ Mf 数の減少を認め

Table 1 Anti-filarial activity of some cyclic phosphorus esters on cotton rat filariasis

No.	Compound			Dose (mg/kg /day× days)	Animal No.	Body weight (g)	No. of Mf. in 2.5 cmm of blood						
	Structure						Days after the 1st injection						
	X	R	Y				0	1	2	3	4	5	6
K-15	S	Ph	H	100×1	1-1 1-2	160 100	1790 2048	8 0	2 0	1 0	0 0	0 0	1 0
K-1	O	Ph	H	50×1	1-3	180	2610	11	17	26	ND*	67	ND
K-103	O	Ph	4-Me, 6-Me	25×5	1-4	120	1380	820	598	476	320	ND	663
K-16	S	OPh	H	100×1	1-5	170	1700	1291	1586	2260	ND	ND	ND
K-66	S	SPh	H	50×1	1-6	120	625	684	562	455	ND	ND	ND
K-10	O	NHPh	H	25×1	1-7	150	1508	697	812	1440	ND	ND	ND
K-69	O	NHMe	H	3×4	1-8	160	1239	548	528	540	ND	716	1547
K-22	O	NHEt	H	1×2	1-9	140	1910	ND	516	ND	656	ND	ND
K-40	O	NH ν Pr	H	25×4	1-10	130	927	168	ND	ND	208	138	59
K-42	O	NH ν Bu	H	100×4	1-11 1-12	180 100	1744 506	ND ND	ND ND	ND ND	2079 360	ND	ND
K-101	S	NH·2- ν Pr, 5-MePh	H	100×1	1-13	150	315	370	ND	ND	Died		
K-47				100×1	1-14	140	1836	575	834	1024	ND	ND	ND

* ND: not determined.

Table 2 Effect of K-15 by a single intraperitoneal injection on cotton rat filariasis

Dose (mg/kg)	Animal No.	Body weight (g)	No. of Mf. in 2.5cmm of blood										No. of adult worms	
			Time after K-15 administration										Male Female	
			0 hr.	1	2	10	1 day	5	10	20	30			
100	2-1	180	2592	2562	1312	64	14	1	31	232	387	34	30	
	2-2	145	2058	1394	975	89	10	3	20	126	276	36	71	
	2-3	160	1790	1950	ND*	37	8	0	0	7	86	4	16**	
	2-4	100	2048	414	26	ND	0	0	ND	3	56	0	6	
50	2-5	130	1349	1650	756	176	23	8	28	109	180	29	24	
	2-6	140	928	955	235	13	0	0	36	287	512	20	17	
25	2-7	110	3064	2144	1512	831	362	152	319	603	1232	47	23	
	2-8	70	1665	856	1071	286	250	43	143	460	510	83	86	
12.5	2-9	100	2744	2760	1301	958	902	388	404	986	1053	62	54	
	2-10	90	1360	970	640	257	106	32	149	450	756	44	61	
Control	2-11	110	730	715	890	605	990	710	997	992	882	15	20	
	2-12	150	1420	2030	2380	834	2890	1080	1330	1198	1640	73	63	

* ND: not determined. ** 13 were died worms.

た。他の10種の化合物は Mf 殺滅効果が認められないかあるいは K-15および K-1にくらべて微弱であった。

K-15腹腔内1回投与の *L. carinii* に対する作用: K-15を100, 50, 25および12.5mg/kg ずつそれぞれ腹腔内注射し、24時間後まで経時的に、15日後まで毎日あるいは隔日に、その後は5日毎に血中 Mf 数を調べ、35日後に剖検して成虫を観察した。表には5~10日毎の成

績のみ示した。

結果は Table 2 に示す如くであり、100mg/kg 投与したコットンラットでは投与後2~10時間の内に Mf 数が投与前の10%以下に減少し、その後完全に消失した。Mf 数の回復は個体によって遅延があり、4頭中2頭では10日以上0またはそれに近い値が続いたが、他の2頭では0になった翌日から漸次増加した。50mg/kg を

Table 3 Effect of K-15 by a single oral administration on cotton rat filariasis

Dose (mg/kg)	Animal No.	Body weight (g)	No. of Mf. in 2.5 cmm of blood										No. of adult worms	
			Time after K-15 administration										Male	Female
			0 hr.	1	2	10	1 day	5	10	20	30			
100	3-1	150	4325	5520	2149	403	165	2	87	345	936	36	20	
	3-2	150	4817	3704	603	28	39	17	95	483	1020	14	24	
	3-3	100	1620	ND	ND	ND	0	6	Died			7	28	
50	3-4	120	1890	4003	1246	91	10	100	8	120	263	6	11	
	3-5	150	760	546	157	47	3	108	271	302	385	11	19	
25	3-6	190	2943	1496	1447	581	639	291	196	986	907	3	7	
	3-7	170	1584	1547	994	195	59	144	299	1088	1002	13	15	
12.5	3-8	170	2761	2532	1815	1603	1307	1092	768	1410	1939	6	11	
	3-9	150	1456	868	1402	371	189	228	210	862	937	12	12	
Control	3-10	160	663	573	544	894	501	366	544	904	865	3	3	
	3-11	125	624	241	488	396	396	1159	1322	354	569	5	8	

投与した2頭の内、1頭は0に、他の1頭は血液2.5 cmm 中3隻まで Mf 数が減少し、以後100mg/kg 投与群の内回復の早かった2頭とほぼ同じ経過をたどって回復した。25mg/kg および12.5mg/kg 投与群でも、Mf 数はそれぞれ1.0および2.4%、ならびに7.8および1.1%まで減少し、明らかに作用が認められた。成虫は100 mg/kg 投与の4頭中1頭にのみ死虫(16隻中13隻死)が見られた外はすべて生きていた。

K-15経口1回投与の *L. carinii* に対する作用: K-15を100, 50, 25および12.5mg/kg ずつそれぞれ経口投与し、上述の腹腔内投与の場合と同様に観察した。表には5~10日目毎の数値のみ示した。

結果は Table 3に示す如く、経口投与でも有効なことは明らかであり、12.5mg/kg 投与においても Mf 数の減少が認められた。しかしながら、減少の程度はいずれの投与量においても腹腔内投与時の同用量のそれにくらべてやや劣り、回復も早かった。投与35日後に成虫はすべて生きていた。

2. 試験管内実験

各期虫体に対する K-15の直接的な効果は Fig. 1に示す如くであった。すなわち、成虫は100 μ g/ml 以上で雌雄とも、30 μ g/ml で雄のみが死に到つたが、1 μ g/ml 以下では全く作用が認められず、3および10 μ g/ml では活動が低下したにとどまった。感染子虫は10 μ g/ml 以上で活動の低下を来たしたが、100 μ g/ml 以上ではじめて半数以上が死亡した。Mf は成虫および感染子虫より感受性が強く、3 μ g/ml 以上で大部分が死亡した。

考 察

K-15の類縁化合物には、強い殺虫効果を示すもの(サ

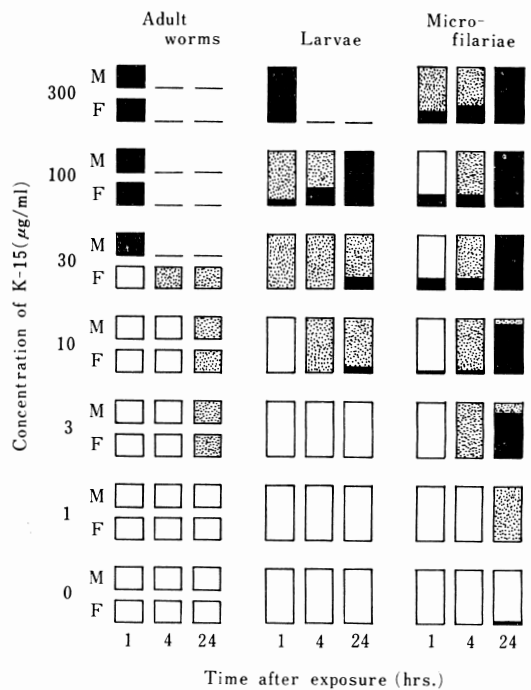


Fig. 1 Effect of K-15 on adult worms, larvae and microfilariae of *Litomosoides carinii* in vitro.

Each column or square represents the condition of worms in K-15 solutions at 1, 4 and 24 hours after exposure respectively (open: active, dotted: inactive: filled: died).

リチオン, Eto *et al.*, 1963), 殺線虫作用を持つもの(三原・江藤, 1975) などがあり、比較的生物学活性の高い化合物群と考えられる。上述の実験に加えて、K-15

については連続腹腔内投与および投与時の Mf に対する作用、ダニ体内およびコットンラット体内の発育期子虫に対する作用などを検討したが、前述の如く、マウスにおいて副作用が認められ、抗フィラリア剤としての検討を中止したので、成績の報告はしないことにした。

抗フィラリア剤はそれが発育環のいずれの期に作用するかが問題になる。環状磷酸エステル K-15は、*in vivo* では Mf にしか効果がなかったが、このことは *in vitro* の実験において K-15に対する Mf の感受性が成虫あるいは感染子虫のそれより 10~30 倍高かったことと Mf の生息部位を考えあわせれば当然の結果と考えられる。Mf にしか奏効しなかった点は Lämmler and Grüner (1975) の各種有機燐剤についての知見と一致した。

ま と め

環状磷酸エステル12種について、コットンラットフィラリア、*Litomosoides carinii*、に対する活性を調べ、2-phenyl-4H-1, 3, 2-benzodioxaphosphorin-2-sulfide (K-15) に強い作用を見出した。K-15は注射および経口投与で感染コットンラットの血中マイクロフィラリアを減少あるいは消失させた。

試験管内実験においては、K-15に対するマイクロフィラリアの感受性が成虫および感染子虫のそれより10~30倍高かった。

K-15はマウスにおいて副作用を示したので、抗フィラリア剤としての検討は中止した。

終りに、本研究に使用した化合物について御便宜を賜

わった九州大学農学部江藤守総教授、御指導を賜った東京大学医科学研究所寄生虫研究部佐々学教授（現国立公害研副所長）、田中寛教授ならびに同研究部各位に感謝する。

文 献

- 1) Eto, M. and Oshima, Y. (1962) : Synthesis and degradation of cyclic phosphorus esters derived from saligenin and its analogues. *Agr. Biol. Chem.* 26, 452-459.
- 2) Eto, M., Kishimoto, K., Matsumura, K., Oshita, N. and Oshima, Y. (1966) : Studies on saligenin cyclic phosphorus esters with insecticidal activity. Part IX. Derivatives of phosphonic and phosphonothionic acids. *Agr. Biol. Chem.* 30, 181-185.
- 3) Eto, M., Kinoshita, Y., Kato, T. and Oshima, Y. (1963) : Saligenin cyclic methyl phosphate and its thiono analogue: new insecticides related to the active metabolite of tri-*o*-cresyl phosphate. *Nature* 200, 171-172.
- 4) Lämmler, G. and Grüner, D. (1975) : Chemotherapeutic studies on *Litomosoides carinii* infection of *Mastomys natalensis*. 6. The filaricidal activity of organophosphorus compounds. *Tropenmed. Parasitol.* 26, 359-369.
- 5) 三原一優・江藤守総(1975) : 殺虫性サリゲニン環状りん酸エステルの研究(第13報) フェニルチオノホスホン酸エステル類の殺線虫活性. 九大農芸誌, 30, 105-108.

AbstractSTUDIES ON THE ANTI-FILARIAL EFFECT OF A CYCLIC PHOSPHORUS
ESTER, 2-PHENYL-4H-1, 3, 2-BENZODIOXAPHOSPHORIN-2-SULFIDE (K-15)

HIDEFUMI TANAKA, SATOSHI OHSHIMA

(Pharmacological Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Toda, Saitama)

JUNZO KOBAYASHI, JUNICHI HASHIGUCHI

*(Department of Parasitology, Institute of Medical Science, University of Tokyo,
Minato-ku, Tokyo)*

AND

YASUYOSHI OSHIMA

(Faculty of Agriculture, Meiji University, Kawasaki, Kanagawa)

A number of cyclic phosphorus esters were examined for activity against cotton rat filaria, *Litomosoides carinii*. Among the compounds tested 2-phenyl-4H-1, 3, 2-benzodioxphosphorin-2-sulfide (K-15) was found to possess a marked antifilarial activity.

By intraperitoneal injection of K-15 at a dose of 15 mg/kg to cotton rats infected with *L. carinii* the number of microfilariae in the blood started to decrease gradually several hours after injection and eventually disappeared. K-15 was also effective by oral administration. K-15 showed no effect on the adult worm nor on growing larvae of *L. carinii* in cotton rats. Results of *in vitro* test revealed that microfilariae were 10 to 30 times more sensitive to K-15 than adult worms and larvae.

Experiments on K-15 as an antifilarial agent were discontinued since the compound showed a potent inhibitory effect on cholinesterase in mice.