

## Sulfamoyldapsone (2-sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone, SDDS) の *Leishmania donovani* 感染に対する治療効果

森重和久<sup>1)</sup> 安治敏樹<sup>1)</sup> 綿矢有佑<sup>1)</sup> 保田立二<sup>3)</sup> 石井 明<sup>4)</sup>

(掲載決定: 平成5年1月29日)

### 要 約

*Leishmania donovani* 2S-15 M 株 promastigote  $1 \times 10^8$  を BALB/c マウスに尾静脈接種し, sulfamoyldapsone (2-sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone, SDDS) の治療効果を判定した。SDDS は経口投与 (感染後13日間) および非経口投与 (感染2日後から1日おき5回投与) で投与方法を変えて比較した。治療効果は感染2週後の肝 stamp smear の Giemsa 染色により Leishman-Donovan units (LDU) (1,000個の肝細胞核に対する *L. donovani* amastigote の数 $\times$ 肝重量 (g)) により判定した。SDDS 100mg/kg 経口13回投与は生食投与群に比べ70%の抑制率を, 100mg/kg 筋肉内注射での5回投与では65%の抑制率を示した。liposome に封入した5mg/kg 静脈内注射では抑制率51%であった。SDDS 100mg/kg の経口投与および筋肉内投与は Pentostam の効果に匹敵した。SDDS はその投与量, 投与方法を適当に選べば, *L. donovani* 感染症の治療薬となりうる。

**Key words:** *Leishmania donovani*, sulfamoyldapsone (SDDS) liposome-entrapped SDDS

### 緒 言

*Leishmania donovani* 感染症 (Kala Azar) は今でも世界の熱帯・亜熱帯の各地で蔓延している (WHO, 1984)。その治療薬として Pentostam に勝るものがほとんど見られない。しかし, Pentostam による治療のために *L. donovani* 感染者が死亡したという副作用が報告され (Thakur, 1986), 最近では Pentostam 抵抗性の *L. donovani* も出現してきた (Ullman *et al.*, 1986) ことから, より毒性の少ない新しい治療薬の開発が望まれている。

そこで, *L. donovani* 感染マウスに対して抗 *Toxoplasma* 剤として動物用に用いられている sulfamoyldapsone (SDDS) を筋肉内, 経口および liposome に封入しての静脈内投与によって原虫に対する増殖抑制効果を検討した。

### 材料および方法

実験動物は BALB/c, CrSlc マウス, 8週令, 雄23

~28g (日本エスエルシー社) を用い, random allocation によって4-5匹ずつのグループ分けをした。

用いた薬剤は 2-sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone (sulfamoyldapsone, SDDS, フリートミン<sup>®</sup>, 田辺製薬) (Fig. 1), sodium stibogluconate (Pentostam<sup>®</sup>, Wellcome Foundation, U. K.) および対照としての注射用生食水である。

*L. donovani* 感染は東京慈恵会医科大学寄生虫学教室, 片倉賢博士から提供を受けた 2S-15 M 株を *in vitro* 培養して得た promastigote をマウス当たり  $1 \times 10^8$  静脈内投与 (以後 i. v. と略す) した。培養は 25 mM HEPES (pH 7.4), hemin  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , hypoxanthine  $0.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ , gentamycin  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  を添加した M 199 培地で行なった (Wataya and Hiraoka, 1984)。

SDDS の投与方法と効果を調べるため, 実験1では (1) 10mg/kg, (2) 20mg/kg, (3) 100mg/kg を筋肉内注射 (以後 i. m. と略す) した。実験2では (1) 20mg/kg, (2) 100mg/kg を経口ゾンデ針により水溶液としたものを経口投与 (以後 p. o. と略す) した。実験3では, liposome に封入した 5mg/kg を i. v. 投与した。投与回数として, i. m., i. v. は1日おき5回の投与とし, p. o. は感染翌日から前日までの毎日13日間投与とした。それぞれの実験には治療効果の比較として, 原虫を感染

<sup>1)</sup> 岡山大学医学部寄生虫学教室

<sup>2)</sup> 岡山大学薬学部薬品化学教室

<sup>3)</sup> 岡山大学医学部細胞工学教室

<sup>4)</sup> 国立予防衛生研究所寄生動物部

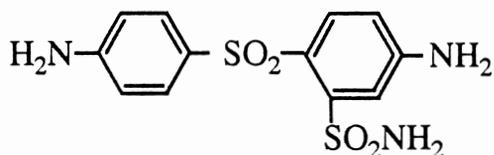


Fig. 1 Chemical structure of 2-sulfamoyl-4,4'-diaminodiphenylsulfone (SDDS, sulfamoyldapson).

させた後、陽性コントロールとして Pentostam 40mg/kg i. v. 投与群、陰性コントロールとして生食0.2ml/マウス i. v. 投与群をおいた。非感染群には薬物、生食を投与せず、感染群における薬物の副作用、感染の影響を比較した。

SDDS 封入 liposome の作製は Tadakuma et al. (1985) の方法に従った。SDDS 5 mg をクロロホルム、メタノール (1:1) 混合液に溶解した後、egg yolk phosphatidylcholine 20  $\mu$  M, cholesterol 20  $\mu$  M, dipalmitoylphosphatidic acid 2  $\mu$  M と共にロータリーエバポレータで乾燥し、薄い均一な脂質膜を作製し、最後にリン酸緩衝生食水 (PBS) を 2 ml 加え、SDDS を 2.5mg/ml を含む liposome 製剤とした。

*L. donovani* 感染後、2 週間の治療後に、Bradley and Kirkley (1977) の方法により、肝臓の Leishman-Donovan units (LDU) を測定して、薬剤の効果を判定した。その方法を略述すると、感染マウスをエーテル麻酔のもとに開胸し、大動脈、大静脈を切開、放血し、肝、脾重量を測定した後、肝臓 stamp smear を作製し、メタノール固定後、Giemsa 染色をした。肝 stamp smear での 1,000 肝細胞核に対する *L. donovani* amastigote を数え、これに肝重量 (g) を掛けたものを LDU で表した。次のような計算式によって抑制率を出し薬物効果とした。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{生食投与群の平均 LDU} - \text{薬物投与群の平均 LDU}}{\text{生食投与群の平均 LDU}} \times 100$$

なお全身に対する副作用の指標として、実験期間中体重を測定し、終了時点でマイクロキャピラリーによってヘマトクリット値を、屈折計によって血漿蛋白質濃度の測定を行なった。

## 成 績

薬物の効果判定は表 1 にまとめた。薬物が投与されなかった生食投与群の LDU は 336 から 2,405 の値を示し、実験によりその感染レベルに差が見られた。

実験 1 の筋肉内投与の効果は SDDS 100mg/kg では、有意な抑制率 (65%,  $P < 0.01$ ) を示し、20mg/kg でも

41% 抑制率を見せ有意差 ( $P < 0.05$ ) があつた。実験 2 の経口投与の効果について 20mg/kg では 47% 抑制率だったが、100mg/kg では 70% の有意な抑制率 ( $P < 0.01$ ) を見せた。実験 3 の liposome 封入の静脈内投与の効果は 5mg/kg liposome で 51% の抑制率 ( $P < 0.01$ ) を示した。Pentostam 40mg/kg i. v. は全ての実験で 80% から 96% の間にあり平均 88% の抑制率を示し生食投与群とは  $P < 0.01$  で有意差があつた。Pentostam の抑制率は SDDS 投与群との間で、20mg/kg i. m., p. o. とは有意に効果があつたが、100mg/kg の投与では i. m., p. o. 投与ともに有意差はなかつた (Table 1)。

非感染群との肝脾重量の比較を Table 2 に示した。生食投与群の肝重量は非感染群と比較して平均 1.06 倍で肝重量の変化と LDU の変化との相関は見られなかつた ( $\gamma = 0.186$ ) (Fig. 2 a)。SDDS 投与時の肝重量は SDDS 20mg/kg i. m. で 1.18 倍、100mg/kg i. m. で 1.14 倍と増加したが、20mg/kg p. o., 100mg/kg p. o. ではそれぞれ 0.87, 0.88 倍と減少傾向が見られた。これらの肝重量についていずれの投与群も有意差は見られなかつた。

脾重量は生食投与群では非感染群に対して平均 1.47 倍、Pentostam 投与群では 1.42 倍となり、肝重量の増加率より著しく高い。生食投与群の LDU と脾臓の相対的重量は正の相関が見られた ( $\gamma = 0.715$ ) (Fig. 2 b)。SDDS 投与群の脾重量も非感染群よりも全て増加していた。特に 5mg/kg liposome では 2.52 倍となった。

体重経過、ヘマトクリット値と血漿蛋白質濃度はいずれも非感染群、生食投与群、SDDS 投与群、Pentostam 投与群間に目立った変化はなかつた。

## 考 察

Katakura and Kobayashi (1985) によれば *L. donovani* 2S-15 M 株の  $1 \times 10^8$  i. v. 感染 2 週後の LDU 値は平均 2,182 と報告しているが、我々の実験の生食投与群の LDU の平均値は 1,230 だった。これは *L. donovani* promastigote を培養した際の微妙な条件の違いか、感染接種直前の promastigote の活力差が virulence の差となつたのかもしれない。LDU 値が少なかった場合、抑制率の正確度は劣ると考えるかもしれないが、我々の実験では LDU が 300 以上を示す場合、薬剤の抑制率はそれほど差がなかつた。

抗 *Toxoplasma* および抗 malaria 活性を有する SDDS (Ishii et al., 1968) の薬理作用は para-aminobenzoic acid との競合によって葉酸合成を阻害すると考えられているが、従来から使用されている Pentostam の作用機序は分かつていない (Gustafsson et al., 1987)。

Table 1 Comparison of inhibitory effects of SDDS against *L. donovani* in mice

Experiment	Dose	Route	No. of mice	LDU	Inhibition Inhibition (%)
1. Intramuscular administration					
(1) Saline	0.2 ml	i.v.	5	837 ± 186	0
SDDS	10	i.m.	5	671 ± 139	20
Pentostam	40	i.v.	5	31 ± 19*	96
(2) Saline	0.2 ml	i.v.	5	336 ± 51	0
SDDS	20	i.m.	5	198 ± 104†	41
Pentostam	40	i.v.	5	33 ± 17*	90
(3) Saline	0.2 ml	i.v.	5	2405 ± 857	0
SDDS	100	i.m.	4	853 ± 330*	65
Pentostam	40	i.v.	5	152 ± 33*	94
2. Oral administration					
(1) Saline	0.2 ml	i.v.	5	2616 ± 583	0
SDDS	20	p.o.	5	1384 ± 261	47
Pentostam	40	i.v.	5	160 ± 42*	82
(2) Saline	0.2 ml	i.v.	4	802 ± 72	0
SDDS	100	p.o.	5	237 ± 127*	70
Pentostam	40	i.v.	5	160 ± 42*	80
3. Intravenous administration					
Saline	0.2 ml	i.v.	5	382 ± 47	0
L-SDDS	5	i.v.	5	189 ± 43*	51
Pentostam	40	i.v.	5	47 ± 30*	88

Values with a common superscript differ significantly by: \*P < 0.01, †P < 0.05.

L-SDDS: liposome-entrapped SDDS.

SDDS 100mg/kg p. o. は実験 2 で 70% の抑制効果を見せ、この時の陽性コントロールの臨床適用量である Pentostam 40mg/kg に匹敵した。SDDS 100mg/kg i. m. も抑制率 65% で陽性コントロール Pentostam とほぼ同じ値を示した。これらのことからリュウシュマニア症に対する治療効果について、Pentostam は効果は強いが、静脈又は筋肉投与しかできない。それに対し SDDS は効力は少し劣るが、経口投与で治療効果が得られるという利点がある。適切な経口薬が見当たらない現在、有望といえる。

また liposome に封入した SDDS 5 mg/kg i. v. は 51% の抑制率を見せた。以前に報告した 3'-deoxyinosine を用いた実験（森重ら、1988）で liposome に封入した薬は free drug の約 10-20 倍の効果を示したことから比較すると liposome 封入 SDDS 5 mg/kg はやや効果が少なかった。本剤は微粉末ではあるが粒子サイズが大きく、溶解性が悪く、liposome に取り込まれにくい薬物であったので、効果がそれほど発現しなかったのではないかと考えられた。もし 10mg/kg で投与した場合、抑制率は増加するかもしれないが、肝脾重量がさらに増加し、副作用が出てくる懸念がある。

この薬物を liposome に封入するにはさらに微細な粒子にする必要があると思われる。

*L. donovani* 2 S-15 M 株がマウスに感染すると、肝脾重量は 2 週目でそれぞれ感染時の 1.25 倍、2 倍に増加すると記述されている（Katakura and Kobayashi, 1985）。我々の感染 2 週目の生食投与群の肝重量は一定した傾向を示さず、コントロールに比べて 98-110% の値をとった。これに対して生食投与群の脾臓の相対的重量は平均 1.47 倍であり、感染によって増加した（Fig. 2 a）。

感染によって重くなった脾重量は SDDS, Pentostam による治療後、やや減少したが、非感染群の脾重量にまでは回復しなかった。

副作用の指標としての非感染群、SDDS 投与群、Pentostam 投与群における体重の変化、ヘマトクリット、血漿蛋白質濃度には差が見られなかった。しかしデータに示していないが、SDDS 1,000mg/kg p. o. 投与では 5 匹中 1 匹死亡マウス（感染 7 日目）が出た。おそらく肝細胞変性、造血障害のためと思われる（Sakuma *et al.*, 1968）。この群のマウスではヘマトクリット値、血漿蛋白質濃度とも非感染群よりも低下し、副作用が顕著

Table 2 Comparison of weights of the liver and spleen, and their relative percent

Experiment Drug	Dose (mg/kg)	Route	Liver weight (g)	Relative percent (%)	Spleen weight (mg)	Relative percent (%)
1. Intramuscular administration of SDDS						
(1) No infection						
Saline	0.2 ml	i.v.	1.24 ± 0.05	100	88 ± 5	100
SDDS	10	i.m.	1.23 ± 0.05	99	135 ± 9*	153
SDDS	10	i.m.	1.22 ± 0.05	98	127 ± 11*	144
Pentostam	40	i.v.	1.20 ± 0.09	97	129 ± 10*	147
(2) No infection						
Saline	0.2 ml	i.v.	1.04 ± 0.10	100	79 ± 4	100
Saline	0.2 ml	i.v.	1.14 ± 0.09	110	105 ± 2*	133
SDDS	20	i.m.	1.23 ± 0.15	118	85 ± 6	108
Pentostam	40	i.v.	1.24 ± 0.03	119	112 ± 20*	142
(3) No infection						
Saline	0.2 ml	i.v.	1.38 ± 0.14	100	95 ± 9	100
Saline	0.2 ml	i.v.	1.48 ± 0.17	107	169 ± 28*	178
SDDS	100	i.m.	1.57 ± 0.18	114	186 ± 19*	196
Pentostam	40	i.v.	1.52 ± 0.08	110	134 ± 9*	141
2. Oral administration of SDDS						
(1) No infection						
Saline	0.2 ml	i.v.	1.40 ± 0.04	100	92 ± 4	100
Saline	0.2 ml	i.v.	1.38 ± 0.18	98	144 ± 18*	157
SDDS	20	p.o.	1.22 ± 0.10	87	133 ± 10*	145
Pentostam	40	i.v.	1.45 ± 0.12	104	153 ± 8*	166
(2) No infection						
Saline	0.2 ml	i.v.	1.27 ± 0.10	100	89 ± 6	100
Saline	0.2 ml	i.v.	1.33 ± 0.07	105	121 ± 9*	136
SDDS	100	p.o.	1.12 ± 0.10	88	116 ± 20†	130
Pentostam	40	i.v.	1.21 ± 0.16	95	124 ± 25*	139
3. Intravenous administration of SDDS						
No infection						
Saline	0.2 ml	i.v.	1.13 ± 0.12	100	97 ± 4	100
Saline	0.2 ml	i.v.	1.20 ± 0.06	106	120 ± 8*	124
L-SDDS	5	i.v.	1.26 ± 0.09	112	244 ± 51*	252
Pentostam	40	i.v.	1.13 ± 0.08	100	115 ± 16†	119

Value with a common superscript differ significantly by: \*P<0.01, †P<0.05.

L-SDDS: liposome-entrapped SDDS.

であった。

SDDS 投与群の20mg/kg p. o., 100mg/kg p. o. の肝重量はLDUの結果と関係なく非感染群よりも軽くなっていた。しかし、それぞれの量のi. m. 投与ではかえって増加していた。投与方法の違いというよりも投与回数の違い(i. m. は5回, p. o. は13回)によって肝への負担の差が見られたものと考えられた。肝機能の指標として、1つの実験でGPT, GOTを調べたが、感染群と非感染群、およびSDDS投与群との間には差が見られなかった。

結論として、SDDS 100mg/kg p. o. 13回とSDDS 100mg/kg i. m. 5回投与はPentostam 40mg/kg i. v. 5回投与には及ばなかったが、それに近い効力を示した。しかし、肝毒性、造血機能障害もありうることから5~6日毎の1クールとし、数日間の休薬期間をおき、数クールを繰り返す方法か、あるいは筋肉内投与として、隔日

5回を1クールとし、数クールを繰り返す方法をとれば、副作用は比較的低い条件で保菌者の体にも影響を少なく、効果を発揮できるのではないと思われる。また、この実験では行っていないが、Pentostamとの併用治療によって互いの濃度を下げることが可能になり、副作用も少なく、より高い治療効果が得られる可能性が考えられた。

## 文 献

- 1) Bradley, D. F. and Kirkley, J. (1977) : Course of *Leishmania* infection in mice, Clin. Exp. Immunol., 30, 119-129.
- 2) Gustafsson, L. L., Beerman, B. and Abdi, Y. A. (1987) : Handbook of drugs for tropical parasitic infections, Taylor & Francis, London, New York and Philadelphia, 30-33 pp.

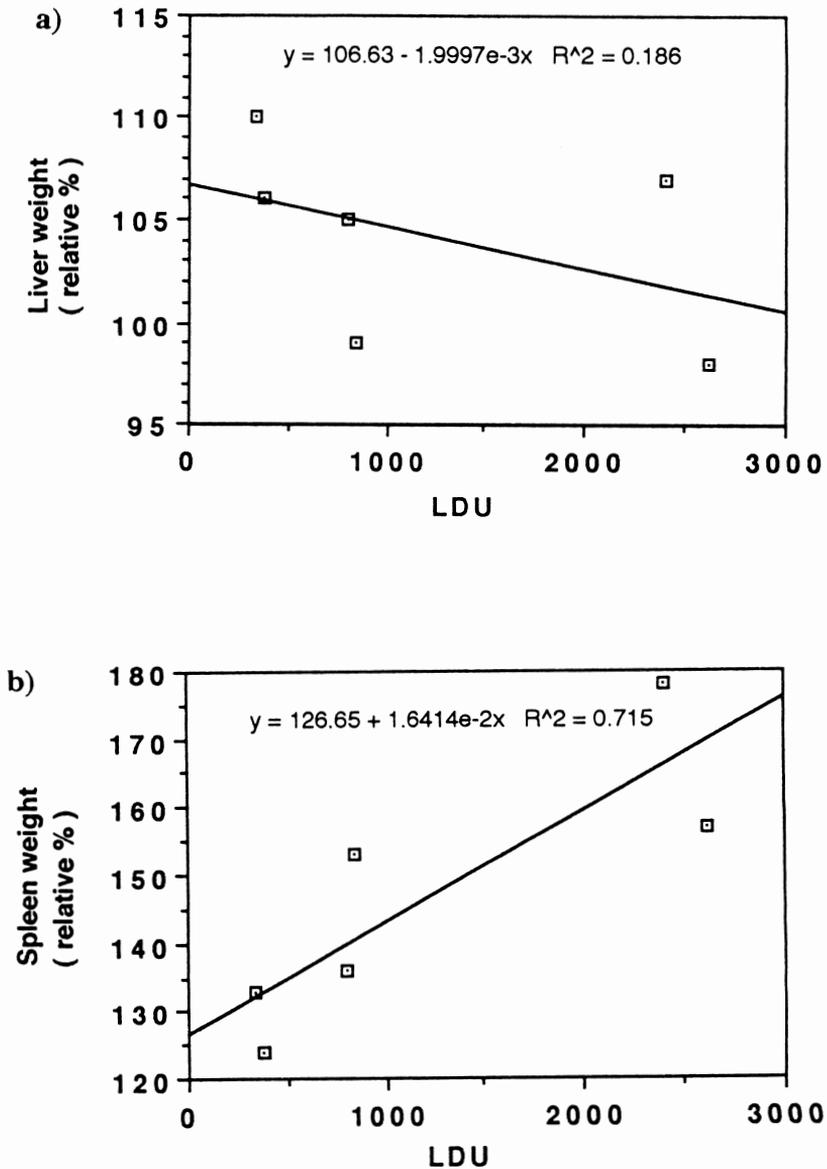


Fig. 2 Correlation between relative liver weight or spleen weight and LDU in saline groups.

- 3) Ishii, A., Sasa, M., Chinzei, H., Ohshima, S., Tanaka, H. and Inami, Y. (1967) : Preliminary studies on the anti-malarial activity of SDDS (2-sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone) against *Plasmodium gallinaceum* in experimental animals, Jap. J. Exp. Med., Vol. 37, (4), 301-321.
- 4) Katakura, K. and Kobayashi, A. (1985) : Enhancement of infectivity of *Leishmania donovani* promastigotes by serial mouse passages, J. Parasit. 71, (3), 393-394.
- 5) 森重和久・安治敏樹・石井明・綿矢有佑・保田立二

- (1988) : *Leishmania donovani* 感染マウスに対する liposome に封入した inosine analog の薬物効果について. 日本熱帯医学会誌, 16 (増刊), 85.
- 6) Sakuma, S., Fujita, T., Ohshima, S. and Kiyomoto, A. (1968) : Toxicology and Pharmacology of 2-sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone (SDDS), *Pharmaco-metrics*, 2, (2), 184-195.
- 7) Tadakuma, T., Ikewaki, N., Yasuda, T., Tsutsumi, M., Saito, S. and Saito, K. (1984) : Treatment of experimental salmonellosis in mice with streptomycin entrapped in liposomes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 28, 28-32.
- 8) Thakur, C. P. (1986) : Harmful effect of high stibogluconate treatment of kala-azar in India, *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 80, 672-673.
- 9) Ullman, B., Carrero-Vallenzuela, E. and Coons, T. (1989) : *Leishmania donovani* : isolation and characterization of sodium stibogluconate (Pentostam) -resistant cell lines, *Exp. Parasitol.*, 69, 157-163.
- 10) Wataya, Y. and Hiraoka, O. (1984) : 3'-Deoxyinosine as anti-leishmanial agent : the metabolism and cytotoxic effects of 3'-deoxyinosine in *Leishmania tropica* promastigotes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123, 667-683.
- 11) WHO. (1984) : Geographical distribution of foci of the leishmaniasis. In WHO (ed.), *The leishmaniasis*, WHO, Geneva, 23-54 pp.

Abstract

THERAPEUTIC EFFICACY OF SULFAMOYLDAPSONE (SDDS) AGAINST  
*LEISHMANIA DONOVANI* IN MICE

KAZUHISA MORISHIGE<sup>1)</sup>, TOSHIKI AJI<sup>1)</sup>, YUSUKE WATAYA<sup>2)</sup>,  
TATSUJI YASUDA<sup>3)</sup> AND AKIRA ISHII<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Parasitology, Okayama University Medical School, Sikatacho, Okayama 700, Japan

<sup>2)</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Tsushima, Okayama 700, Japan

<sup>3)</sup>Department of Cell Chemistry, Institute of Cellular and Molecular Biology,  
Okayama University Medical School, Shikatacho, Okayama 700, Japan

<sup>4)</sup>Department of Parasitology, National Institute of Health, Shinjuku-ku, Tokyo 141, Japan

The therapeutic efficacy of sulfamoyldapson (2-sulfamoyl-4, 4'-diaminodiphenylsulfone, SDDS) was tested in mice infected with  $1 \times 10^8$  promastigotes of the 2S-15M strain of *Leishmania donovani* via the tail vein. Effects of SDDS were evaluated at the end of treatment of oral administration (every day for thirteen days after infection) or parenteral administration (five times on alternate days, beginning two days after infection). Effects of each treatment were evaluated in impression smears of the liver tissue stained with Giemsa. Leishman-Donovan units (LDU), the number of amastigotes per 1000 liver cell nuclei multiplied by liver weight (g), was used the evaluation of the therapeutic efficacy. Oral and intramuscular administration of SDDS 100 mg/kg caused 70% and 65% inhibitory effect, respectively, compared with non-treated group. Liposome-entrapped SDDS (5 mg/kg) by intravenous administration had 51% inhibition. SDDS is thought to be a good candidate for the alternative of Pentostam against *L. donovani* infection.