Leishmania donovani ならびに *Trypanosoma gambiense* 感染マウスに対する inosine analog の薬物効果について

森重 和久¹・安治 敏樹¹・木村 Julieta Y.・石井 明¹・
綿矢 有佑²・松田 彰³・上田 亨³

昭和63年7月25日 受付／昭和63年11月10日 受理

緒 言

Leishmania donovani 感染症 (Kala Azar 病) は今でも世界の熱帯、亜熱帯の各地で、蔓延しているが、治療薬としてアンチモン剤に勝るものがほとんどみられない。また *Trypanosoma gambiense* 感染症 (睡眠病) はアフリカ中央部から西部が分布域であるが、これも治療薬としては Pentamidine, その他砒素剤が用いられている (Harrison, 1984; WHO, 1984) が、より毒性の少ない殺原虫率の高いものを考えていく必要にせまられている (Croft, 1986)。

Leishmania の核酸代謝は宿主とは異なり、プリンヌクレオシドの新生合成が欠損しており、そのために寄生原虫はサルベージ経路により、宿主からプリン類の供給を受けている (Marr and Barends, 1985)。そこに着目し、Hiraoka *et al.* (1986), Wataya and Hiraoka (1984), 綿矢ら (1986) は *in vitro* において 3'-deoxyinosine, および carbocyclic inosine (c-c-inosine) が *Leishmania donovani* の promastigote または amastigote に対し毒性効果を持ち、また c-c-inosine は *Crithidia fasciculata* に対しても有効であると報告した。Marr *et al.* (1984), Fish *et al.* (1985) も *in vitro* において inosine analog のうちのいくつかは *L. donovani*, *T. gambiense*

のいずれにも有効だったと述べている。

我々は *L. donovani* 感染マウスおよび *T. gambiense* 感染マウスを用いて、3'-deoxyinosine と c-c-inosine の *in vivo* での治療効果を検討したので、その概要を報告する。

材料および方法

1) *Leishmania donovani* に対する効果

L. donovani 治療実験は3回行った。実験動物は BALB/c マウス, 8 週齢, ♀, 23-28 g (Charles Rivers 社) で, random allocation によってグループ分けをした。

実験1: マウスは control 群 6 匹, 生理的食塩

Figure 1 Chemical constitution of 3'-deoxyinosine and carbocyclic inosine.

1 岡山大学医学部寄生虫学教室 〒700 岡山市鹿田町2-5-1

2 岡山大学薬学部薬品化学教室 〒700 岡山市津島中1-1-1

3 北海道大学薬学部薬品化学教室 〒060 札幌市北12条6丁目

本論文の要旨は第29回日本熱帯医学会総会, 横浜 (1987) において発表した。

水投与群6匹, 3'-deoxyinosine(ヤマサ醤油株式会社より供与)(図1)投与群6匹, Pentostam (100 mg/ml, Wellcome Foundation, U. K.)投与群6匹の4群に分けた。

実験2: マウスは control 群5匹, 生理的食塩水投与群4匹, 3'-deoxyinosine 投与群5匹, c-c- inosine(ラセミ体, 東洋醸造株式会社より供与)投与群5匹, Pentostam 投与群5匹の5群に分けた。実験1, 2の薬物投与量と投与法は生理的食塩水0.2 ml/マウス, 3'-deoxyinosine 100 mg/kg, c-c- inosine 100 mg/kg, Pentostam 400 mg/kg とし, control 群以外の, マウスに2日後より1~2日おきに5回ずつ全て尾静脈注射とした(以後 i. v. と略す)。

実験3: マウスは control 群5匹, 生理的食塩水投与群5匹, c-c- inosine 50 mg/kg 投与群6匹, c-c- inosine 10 mg/kg 投与群5匹, Pentostam 投与群5匹の5群に分けた。生理的食塩水, Pentostam の投与量および回数は実験1, 2と同様にした。

感染虫体 *L. donovani* promastigote は東京慈恵会医科大学寄生虫学教室小林教授, 片倉博士らから提供を受けた2S-15M株の継代培養されたもので, その培養法は30%の熱不活化牛胎児血清, 25 mM Hepes (pH 7.4), hemin 5 μ g/ml, hypoxanthine 0.7 μ g/ml, gentamicin 25 μ g/ml を付加した M199 培地で発育させた。それを control 群以外のマウス全てに, 1匹当たり 1×10^8 を i. v. 接種した。

L. donovani 感染後, 治療期間中体重をモニターし, 4週間後に, Bradley and Kirkley (1977)の方法により実験に供した全てのマウスについて, エーテル麻酔のもとに開胸し, 大動脈, 大静脈を切開, 放血した。肝重量, 脾重量を測定し, 肝 stamp smear をメタノール固定後, Giemsa 染色をした。肝 stamp smear の1,000肝細胞核に対する *L. donovani* amastigote を数え, これを Leishman-Donovan units (LDU)で表わし, 薬物の治療効果を評価した。なお全身に対する副作用のモニターの1つとして, マイクロキャピラリーによるヘマトクリット, 屈折計による血漿蛋白量の測定も行った。

2) *Trypanosoma gambiense* に対する効果

T. gambiense 治療実験は2回行った。実験動物には ddY マウス (北山ラベス株式会社), 7週齢, ♂を用いた。

実験1: 生理的食塩水投与群6匹, Pentamidine (May & Baker Ltd., England)投与群6匹, c-c- inosine 投与群7匹, 3'-deoxyinosine 投与群6匹の4群に分け, 感染1時間後に最初の日の治療を行い, その後, 1日1回毎日, 計4回行ったが, Pentamidine 投与群だけはさらに4日間治療を行った。

実験2: 3'-deoxyinosine の効果をさらに詳細に検討した。マウスを3'-deoxyinosine (感染前日投与) 群7匹, 3'-deoxyinosine (同日投与) 群6匹, 3'-deoxyinosine (翌日投与) 群7匹, 生理的食塩水 (前日投与) 群6匹, Pentamidine (前日投与) 群6匹の5群に分け, 3'-deoxyinosine の3つの群は1日1回, 10日間治療, 生理的食塩水, Pentamidine 投与群の治療は毎日1回, 4日間とした。

薬物投与量と投与法は生理的食塩水0.2 ml/マウス, 筋肉内注射(以後 i. m. と略す), Pentamidine 4 mg/kg, i. m., c-c- inosine 200 mg/kg, 3'-deoxyinosine 200 mg/kg 腹腔内注射とした(以後 i. p. と略す)。実験2の3'-deoxyinosine 投与量は同量を i. p. 投与した。

虫体は大阪大学微生物病研究所, 中林教授から提供を受けた凍結保存の *Trypanosoma gambiense* trypomastigote を用い, マウス当たり 1.0×10^4 を i. p. 接種した。

薬物の効果判定は生存率と体重のモニターと Giemsa 染色による血液塗抹標本に対物レンズ40倍の鏡検で, 虫体数が1視野当たり1~10を1+, 11~100を2+, 101以上を3+として表わした。

成 績

1) *L. donovani* 治療実験

体重経過では図1に示すように control 群を含めどの治療群も, ほとんど大きな変化, 差違も認められなかった。しかし, 実験2でのc-c- inosine 100 mg/kg 投与群だけは4回目の治療後

Figure 2 Time course of mouse body weight in the experiment (2) with *L. donovani*. Treatment were done at day 2, 5, 7, 9 and 12 of the infection. All of mice treated with c-c-inosine (100 mg/kg) died at day 15.

から急速に体重低下となり、15日目にはこの群の全てのマウスが死亡した。c-c-inosine 50 mg/kg 投与群, 10 mg/kg 投与群, 3'-deoxyinosine 投与群, 生理的食塩水投与群, Pentostam 投与群では体重変化はあまりなかった (図2)。

感染4週後の肝臓と脾臓の重量はどの投与群においても LDU に正比例していた。しかし、実験2の c-c-inosine 100 mg/kg 投与群は control 群と比較すると、15日目死亡時には、肝臓は72%、脾臓は50%の重量になった。しかし、c-c-inosine 10 mg/kg 投与群では生理的食塩水投与群よりも逆に肝脾とも重くなっており、control 群に比べると肝は1.09倍、脾は1.6倍であった。3'-deoxyinosine 投与群は肝脾とも生理的食塩水投与群と Pentostam 投与群の中間値となっていた (表1, 2)。

肝 stamp smear による LDU について3回の実験結果を見ると、生理的食塩水投与群で、実験1:291±128, 実験2:48±31, 実験3:29±28となり、感染数は減少した。それぞれの実験結果を総

Table 1 Liver weight in the 4th week of the infection (g)

Experiment	Control	Saline	3'-deoxyinosine	Pentostam	c-c-inosine* 100 mg/kg	c-c-inosine 50 mg/kg	c-c-inosine 10 mg/kg
1st	1.60 ±0.22	1.80 ±0.06	1.68 ±0.17	1.52 ±0.12			
2nd	1.31 ±0.10	1.40 ±0.08	1.34 ±0.04	1.33 ±0.09	0.94 ±0.05		
3rd	1.48 ±0.09	1.52 ±0.09		1.60 ±0.16		1.47 ±0.08	1.60 ±0.13
Average ratio of liver weight	1.00	1.08	1.04	1.02	0.72	1.00	1.09

*At day 15 of infection.

Table 2 Spleen weight in the 4th week of the infection (mg)

Experiment	Control	Saline	3'-deoxyinosine	Pentostam	c-c-inosine* 100 mg/kg	c-c-inosine 50 mg/kg	c-c-inosine 10 mg/kg
1st	160 ± 20	226 ± 25	181 ± 34	162 ± 14			
2nd	95 ± 6	124 ± 5	120 ± 7	114 ± 5	48 ± 6		
3rd	113 ± 5	164 ± 12		134 ± 24		152 ± 22	181 ± 39
Average ratio of spleen weight	1.00	1.39	1.20	1.13	0.50	1.34	1.60

*At day 15 of infection.

Figure 3 LDU in the 4th week of the infection in the experiment (2) with *L. donovani*. Only c-c-inosine group is measured LDU at day 15 of the infection.
Cont: Control, inos: 3'-deoxyinosine, Pent: Pentostam, c-c-inosi: c-c-inosine.

Figure 4 LDU in the 4th week of the infection in the experiment (3) with *L. donovani*.
Cont: Control, c-c-50 mg: c-c-inosine 50 mg/kg, c-c-10 mg: c-c-inosine 10 mg/kg, Pent: Pentostam.

合してみると、3'-deoxyinosine 投与群は生理的食塩水投与群の約36%を示し、c-c-inosine 100 mg/kg 投与群 (4 ± 0.5) は Pentostam 投与群 (2 ± 0.5) に近い数値であった (図3)。実験3における c-c-inosine 50 mg/kg 投与群は生理的食塩水投与群の59%を示し、c-c-inosine 10 mg/kg 投与群は生理的食塩水投与群よりも、むしろ増加していた (図4)。

実験3の際行ったヘマトクリット値と血漿蛋白質量をみると、c-c-inosine 50 mg/kg 投与群はヘマトクリット、血漿蛋白質量とも他の群より低値を示した。Pentostam 投与群は血漿蛋白質量の低さが目立った (図5)。

2) *T. gambiense* 治療実験

体重経過では、実験1で生理的食塩水、3'-deoxyinosine、Pentamidine 投与群はいずれも日数経過とともに増加していったが、c-c-inosine 投与群だけは増加傾向を見せなかった。実験2では5つのグループ、3'-deoxyinosine(前日)、3'-deoxyinosine(同日)、3'-deoxyinosine(翌日)、生理的食塩水、Pentamidine はいずれも、日数とともに低下していった。

Figure 5 Values of hematocrit and plasma total protein in mice at the 4th week of the infection in the experiment (3) with *L. donovani*.
Cont: Control, c-c-50 mg: c-c-inosine 50 mg/kg, c-c-10 mg: c-c-inosine 10 mg/kg, Pent: Pentostam.

Figure 6 Survival rate in the experiment (1) with *T. gambiense*. Treatment was done at day 0, 2 and 3 of the infection. Only Pentamidine group treated for 4 more days.

Figure 7 Time course of parasite number on blood smear in the experiment (2) with *T. gambiense*.
-:0, +:0-10, 2+:11-100, 3+: ≤ 101

Figure 8 Survival rate in the experiment (2) with *T. gambiense*.

感染後のマウスの生存率は実験1において、3'-deoxyinosine は生理的食塩水投与群の約2倍生存し、また5日目までは血液塗抹でも1+以下であった。一方、c-c-inosine 投与群は生理的食塩水投与群とはほぼ変わらず、血液塗抹でも3日目には3+となり、5日で死亡した(図6)。実験2では Pentamidine 投与群を除く治療群の中で、3'-deoxyinosine (前日投与) 群が生理的食塩水投与群の約2倍生存し、血液検査でも Pentamidine を除くどの投与群よりも少し低い値(2+以下)を11日目まで示していた(図7)。3'-deoxyinosine (同日投与) 群は生理的食塩水投与群と同じ6日目には死亡した。3'-deoxyinosine (翌日投与) 群は7匹のうち1匹だけは14日目まで生存したが、それ以外は6日目に死亡した(図8)。

考 察

L. donovani 治療実験において、Segovia and Martin-Luengo (1986) によれば犬由来の強毒株 *L. donovani* amastigote はハムスターグループに接種後、10~14日で全てのハムスターが死亡したと述べているが、今回の実験で用いた 2S-15M 株の promastigote によって死亡したものはなかった。感染4週後の LDU は Katakura and Kobayashi (1985) によれば平均800だったが、我々の生理的食塩水投与群での平均は123であり、この株で実験を重ねるごとに LDU が低下していった。譲渡直後の株を、何回か培養を重ねたためと思われる。従って、今回の病原体はあまり強毒性を表わさなかったことになる。

肝脾重量は大部分の治療グループで LDU と正比例していた。しかし、c-c-inosine 100 mg/kg 投与群の肝脾重量は control 群よりも軽くなっていた。それは薬物の毒性のためと思われる。Katakura and Kobayashi (1985), 片倉, 小林 (1986) はこの株による感染マウスの肝脾はともに1.3~1.9倍になったと述べているが、我々の実験では1.1~1.4倍であった。

治療に用いた c-c-inosine は 10 mg/kg, 50 mg/kg では効果は見られなかった。100 mg/kg 投与では、LDU を比較すると生理的食塩水投与

群に比し、約92%の減少効果を示した。ところが5回目の投与後、マウスは体重低下をきたし、死亡した。50 mg/kg 投与群でも control 群に比しヘマトクリットは低く、血漿蛋白質量も正常値(5.7~7.3) (関ら, 1981) に比べ低くなっていたことから c-c-inosine は肝臓又は造血系に毒性を示したのではないかと思われた。このことから少量で効果をあげるためには、リポゾームによる c-c-inosine の封入を、今後考慮すれば解決するかもしれない。

3'-deoxyinosine は生理的食塩水投与群に比し、約63%の減少効果を有したので、投与回数を増やすとか、リポゾームに封入する方法を用いればさらに効果が上がると思われる (Black *et al.*, 1977; Croft, 1986)。

現在、最もよく治療に使用されている Pentostam は従来の文献通り (Harrison, 1984; WHO, 1984) 圧倒的效果を見せ、LDU から見ると、生理的食塩水投与群に比し平均98%の減少効果だった。しかしながら、血漿蛋白質量が低下したので、肝毒性が示唆された。

結局、LDU からみた治療効果は Pentostam, c-c-inosine 100 mg/kg, 3'-deoxyinosine 100 mg/kg, c-c-inosine 50 mg/kg, 生理的食塩水の順となった。

c-c-inosine の *in vitro* での効果は Hiraoka *et al.* (1986), Wataya and Hiraoka (1984) によれば *L. donovani* promastigote に対し EC_{50} は 1.3×10^{-7} M, amastigote には 7.5×10^{-6} M, 3'-deoxyinosine は promastigote に対し 4.43×10^{-7} M で、amastigote に対しても効果があったとしている。*in vivo* で c-c-inosine は 100 mg/kg i. v. で著効を示した。3'-deoxyinosine は 100 mg/kg i. v. で有効性を見せたが、少し不足のようであった。

最近、海外の多くの文献に allopurinol の *in vitro*, *in vivo* での報告が発表されているが、成績内容が確立されていない (Berman, 1985)。

T. gambiense の治療実験において、c-c-inosine は生理的食塩水投与群とほぼ同じ survival rate を示した。Hiraoka *et al.* (1986) の *in vitro* における *Crithidia fasciculata* に対する

c-c-inosine の EC_{50} は 1.9×10^{-7} M であったが、*in vivo* では c-c-inosine は *T. gambiense* に対し無効であった。

3'-deoxyinosine は 200 mg/kg 投与で生理的食塩水投与群の約 2 倍の survival rate (図 5) を示し、また実験 2 の前日投与群で 9 日目までの血液塗抹標本の虫体数は中等度以下で、マウスの半数は生存し、生存率は 2.5 倍 (図 6, 7) で、結果として増量により有効性が増した。しかし、効果はまだ不十分で、治療の応用はまだ検討せねばならない。

この実験の Pentamidine 投与群も 3 匹のマウスが死亡したが、虫体は見られないので、Pentamidine の副作用であったかもしれない。

このように Pentamidine も毒性が強く、Suramin sodium もこれ以上の副作用を有すると思われる (Beaver *et al.*, 1984)。

要 約

L. donovani promastigote 2S-15M 株を感染させた BALB/c マウスに対し、3'-deoxy-

inosine は 100 mg/kg, 1～2 回おき 5 回、静脈内投与で約 63% の治療効果、c-c-inosine は 100 mg/kg, 1～2 日おき 5 回静脈内投与で約 92% の治療効果が見られた。しかし、c-c-inosine は 100 mg/kg の量では副作用が見られた。

T. gambiense trypomastigote を感染させた ddY マウスに対し、3'-deoxyinosine は 200 mg/kg, 腹腔内投与、感染前日からの治療で、少し治療効果を示したが、有効と言えるまでには至らなかった。また c-c-inosine 200 mg/kg, 腹腔内投与は無効であった。

謝 辞

今回の治療実験に際し、*L. donovani* promastigote 2S-15M 株を提供頂いた東京慈恵会医科大学寄生虫学教室小林昭夫教授、片倉 賢博士、また *T. gambiense* trypomastigote を提供頂いた大阪大学微生物病研究所中林敏夫教授に深謝します。Pentostam を分与された東京大学医科学研究所、田中 寛教授に深謝します。

文 献

- 1) Beaver, P.C., Jung, R.C. and Cupp, E.W. (1984): Clinical Parasitology, 9th ed. pp 85, Lea & Febiger
- 2) Berman, J.D. (1985): Leishmaniasis, 130-133, Elsevir Sci. Pub., Amsterdam, New York and Oxford
- 3) Black, C.D.V., Watson, G.J. and Ward, R.J. (1977): The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis, Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 71, 350-352
- 4) Bradley, D.F. and Kirkley, J. (1977): Course of *Leishmania* infection in mice, Clin. Exp. Immunol., 30, 119-129
- 5) Croft, S.L. (1986): Liposomes in the treatment of parasitic diseases, Pharm. Int., 9, 229-233
- 6) Fish, W.R., Marr, J.J. and Berens, R.L. (1985): Inosine analogs as chemotherapeutic agent for African trypanosomes, Antimicrob. Agents Chemother., 27 (1), 33-36
- 7) Harrison, C.S. (1984): Hunter's Tropical Medicine, 6th ed., W. B. Saunders Co., 552-565
- 8) Hiraoka, O., Sakata, H., Iguchi, S., Matsuda, A., Ueda, T. and Wataya, S. (1986): Carbocyclic inosine as a potent anti-leishmanial agent, Biochem. Biophys. Res. Commun., 134 (3), 1114-1121
- 9) Katakura, K. and Kobayashi, A. (1985): Enhancement of infectivity of leishmania, J. Parasit., 71 (3), 393-394
- 10) 片倉 賢, 小林昭夫 (1986): ドノバンリユーシュマニアの前鞭毛型強毒株のマウス体内における増殖の特性, 寄生虫誌., 35 (1), 8

- 11) Marr, J.J., Barends, R.L., Cohn, N.K. and Nelson, D.J. (1984): Biological action of inosine analogs in leishmania and trypanosoma spp., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25 (2), 292-295
- 12) Marr, J.J. and Barends, R.L. (1985): *Leishmaniasis*, 65-78, Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, New York and Oxford
- 13) Segovia, M. and Martin-Luengo (1986): Comparative study of the virulence of two *Leishmania donovani* isolates of different origin, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 80, 5, 519-524
- 14) 関 正利, 平嶋邦猛, 小林好作 (1981): 実験動物の血液学, 313-325, ソフトサイエンス社, 東京
- 15) 綿矢有祐, 佐竹弘靖, 平岡 修, 松田 彰, 上田 亨, 王 炳南, 森重和久, 石井 明 (1986): 抗リューシマニア活性を有する inosine analog の検索とその作用機構について, *寄生虫誌.*, 35 (増), 103
- 16) Wataya, Y. and Hiraoka, O. (1984): 3'-Deoxyinosine as anti-leishmanial agent, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123 (2), 677-683
- 17) WHO (1984): *The Leishmaniasis*, 23-61, WHO, Geneva

THERAPEUTIC EFFECT OF INOSINE ANALOGS
IN MICE INFECTED WITH *LEISHMANIA DONO-*
VANI OR *TRYPANOSOMA GAMBIENSE*

KAZUHISA MORISHIGE¹, TOSHIKI AJI¹, JULIETA Y. KIMURA¹, AKIRA ISHII¹,
YUSUKE WATAYA², AKIRA MATSUDA³ AND TOHRU UEDA³

Received July 25 1988/Accepted November 10 1988

BALB/c mice infected with *L. donovani* and ddY mice infected with *T. gambiense* were treated with inosine analogs (carbocyclic inosine and 3'-deoxyinosine) for appraising therapeutic effects. The mice infected with *L. donovani* promastigotes were treated with 5 different doses of each drug administered on alternate days. Four weeks after the infection, impression smear of the liver was prepared to determine the parasite load which was expressed as LDU by 1,000 hepatic cell nuclei. In the mice infected with *L. donovani*, 3'-deoxyinosine 100 mg/kg i. v. showed about 63% effect as compared with the group of mice administered saline, and carbocyclic inosine 100 mg/kg i. v. showed about 92% effect as compared with saline. The mice infected with intraperitoneal injection of *T. gambiense* trypomastigotes were treated with drugs once a day for 4-8 days. The effect of drugs was measured by counting number of parasite on blood smear stained with Giemsa solution and survival rates of the mice. The group infected with *T. gambiense* and treated with carbocyclic inosine died all on the fourth day. On the other hand, 3'-deoxyinosine showed an effect to some extent. The mice treated with 3'-deoxyinosine showed twice longer survival time than the mice administered saline.

Department of Parasitology, Okayama University Medical School¹, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University² and Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University³