ガマ線虫 *Rhabdias bufonis* を以てする 蛔虫驅虫薬の効力検定法に就て

武田 健一 玉村幸治郎 峰下 鋌雄

村上 靖 廣瀬 勝己

(鹽野義研究所)

(昭和二十五年十二月十二日受付)

I. 緒 言

1937年 O. Gros¹⁾ は蛙の直腸に寄生する吸虫 *Paramphistoma Subclavatum* を対象に諸種條虫驅虫薬の効力検定を生体内實驗で試みて、此の方法が其の目的に使用可能であることを述べておる。その後、1939年山野上²⁾ は Gros の此の實驗を追試して同様な結果を報告した。

吾々はガマ *Bufo vulgaris japonicus*, Schlegel の大腸上部に寄生する線虫類眞線虫目の *Rhabdias bufonis* を用いて蛔虫驅虫薬の効力検定を試みた。*Rhabdias bufonis* は體長1~2cmの白色線虫で外觀上、恰も蛔虫を小さくした様である。此の線虫のガマ腸管に於ける寄生場所は大腸の上部で小腸への移行部に極く近い。殆どすべてのガマに、而も四季を通じて認められ、多い場合は1匹のガマに2000匹を算することも尠くない。従つて、此の線虫を用いて試験管内實驗のみならずガマに經口的に藥物を投與して生体内實驗も可能な譯である。

本研究では此の線虫を対象に試験管内並に生体内實驗を併行的に行つた。その結果は大體臨牀家の評價と大きなへだたりもないものゝようである。之に依つて多數の檢體に就て迅速に一應の見當をつけることが出来ると考えられる。更に又、より深く研究することに依つて一段と精細にして眞價に近い成績を得るように改めることも可能であろうが茲に一旦結末を報告しておく次第である。本實驗に使用した29種の驅虫薬は當研究所に於て合成せられた。

II. 實 驗 方 法

1. 試験管内實驗法

ガマの腸管から採集した線虫で1cm以上の元氣なものを選んで、豫め藥物の種々濃度を準備しておいた各シヤールに夫々5匹投入する。其後虫の運動狀況を逐時的に觀察し、運動正常の場合を(+)、それより弱れる程度に随つて(+), (±)(刺戟して辛うじて反應あるもの)及び全然反應せざるに至つたものを(-)とし、逆に運動が興奮狀を呈するものを(++)とした。

之ら藥物中水に不溶のものはアラビヤゴムを用いて乳劑として使用した。

2. 生体内實驗法

體重500g前後のガマ3匹を選んで體重1kgに對し50mg, 100mg, 及び200mgの割に胃ゾンデを以て經口的に投與した。藥物を投與したガマはブリキ函の中に各1匹づつ濕潤狀態に飼育し、投與の翌日から6日間毎日1回一定時刻に函を檢査して排泄された虫数を算えた。最後の日の排出虫数の檢査が終つたならばそのガマを剖檢して腸管内に残つておる虫の数を算え、更に消化器系統、肝、腎、心、脾等の主要臓器の變化を調べた。

體外に排出された虫の數並に剖檢に依つて得た殘存虫數よりして次の如く排出率並に驅虫率を算出した。

排出率: $\frac{\text{排虫数}}{\text{ガマ腸内総虫数}} \times 100$

驅虫率: $\frac{\text{排虫数} + \text{腸内残留死虫数}}{\text{ガマ腸内総虫数}} \times 100$

II. 実験成績

A. 豫備試験的觀察

ガマ線虫を對象にしたこれら *in vitro* 並に *in vivo* の實驗を行うに當り、先づ之に關する基礎的な觀察を試みた。

1. ガマ線虫寄生の季節的動搖

約1ヶ年に亘つて各月に調査した成績を綜括すれば次の通りである。總計631匹のガマに就ての所見であるが線虫寄生を認めないものは皆無で、1匹のガマに普通は300~500平均476を寄生しておる。月別に見て、之の季節的差異を認めなく、特に夏冬の別がない。

2. ガマ線虫の自然排出

供試用ガマを一定容器内に飼育しつつ觀察したが排虫は排便に伴つて見られる。その排便の頻度は飼育環境の乾燥又は濕潤の狀態如何に依つて異り、又、夏、冬によつても多少異つておる。夏の乾燥狀態では5~7日に1回、同濕潤狀態では糞量は少いが2~3日に1回であるのに冬乾燥狀態では7~10日に1回、同濕潤狀態では4~5日に1回が普通である。自然排虫は概して夏期に多いようであるが之もせいぜい1%迄である。腸管内自然死率の方は冬季に認められたが、之も1%を越すことはない。

3. 線虫のガマ體外に於ける生存期間とその生活條件

水道水中の場合は夏季室温で大體22~48^h生存する。0.6% NaCl 液中では夏季室温で57~104^h、氷室内では272^h、孵卵器内では27~81^hであつた。即ち、水道水よりも0.6% NaCl 液がよく、又低温が適している。

B. 諸驅虫薬試験成績

1. Alkylthiocarbamin-酸-ester-誘導體

Thiocarbamin-酸の Alkylester を有する Phenyl-基或は Naphthyl-基よりなる16種(表1)に就て實驗した。

a. 試験管内實驗

虫を殺すのに1:1000では孰れも3^h以上、1:10000では4^h以上を要し、大體に殺す力は弱い。その中で比較的強いのは Phenylthiocarbamin-酸-äthylester 及び同-allylester である(表1)。

b. 生体内實驗

100mg/kg, 200mg/kg投與で排虫率並に驅虫率で最も優つてゐるものは Phenylthiocarbamin-酸-Methyl-ester で同 allylester は之に次いでゐる。α-Naphthylthiocarbamin-酸の化合物は孰れも著明な作用を呈していない。即ち、Phenylthiocarbamin-酸化合物と α-Naphthylthiocarbamin-酸を比較すると概して前者が優つてゐる。

剖檢所見で特に著明なものはない。唯だ、僅かに胃、十二指腸粘膜に充血、溢血を認める例が200mg/kg投與の場合認められた。膽嚢膨滿は他の無處置ガマでも往々認められるもので必ずしも藥物作用に依るものとは斷定出来ない。

以上の實驗成績を見るに此の類に屬するものは試験管内實驗よりも、生体内實驗に於て作用を呈してゐることが特徴である。融點から見れば70°~100°Cのものが有効なようである。Alkyl の炭素數と効力との關係は瞭らかでない。Naphthyl-基を有するものは檢體數も少いが見る可きものがないようである。

第1表. 試験管内実験成績.

(1:10 000作用)

薬 物	時 間	前	5 ^m	10 ^m	15 ^m	20 ^m	30 ^m	45 ^m	60 ^m	90 ^m	2 ^h	3 ^h	4 ^h	5 ^h	6 ^h	20 ^h
Phenylthiocarbamin-sre-methyl-ester		++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	±	-
" -// -äthyl- "		++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	±	±	-		
" -// -propyl- "		++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	±	±	±	±	-
" -// -butyl- "		++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	±
" -// -amyl- "		++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	±
" -// -cetyl- "		++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
" -// -allyl- "		++	++	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	-
α-Naphthylthiocarbamin-// -methyl- //		++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	±	±	-		
" -// -äthyl- "		++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	±
" -// -butyl- "		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
4-Isoamyl-resorcinol		++	++	+	+	+	+	+	+	+	±	-				
4-Isoamyl-6-chlor-resorcinol		++	+	+	±	±	±	±	-							
4-n-Hexyl-resorcinol		++	±	-												
4-n-Hexyl-6-chlor-resorcinol		++	+	±	±	-										
4-n-Hexyl-2,6-chlor-resorcinol		++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Para-cyclohexyl-phenol		++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-
Para-cyclohexyl-6-chlor-resorcinol		++	++	++	++	+	+	±	±	-						
Cyclo-hexanol-iso-malon-sre-äthyl-ester		++	++	++	++	++	++	++	+	+	±	±	±	-		
Resorcin-mono-iso-amyl-äther		++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-				
4-Oxydiphenyl		++	++	++	++	++	+	±	±	±	±	-				
3-Chlor-4-oxydiphenyl		++	±	±	±	±	±	-								
2-Oxydiphenyl		++	++	+	+	+	±	±	±	±	-					
5-Chlor-2-oxpdiphenyl		++	++	++	++	++	+	+	±	±	±	±	-			
3-Chlor-2-oxydiphenyl		++	++	+	±	±	±	-								
Phenothiazin		++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	±	±	±	±	±
Phenothiazon		++	++	++	++	++	++	+	+	±	±	±	-			
Mono-chlor-phenothiazon		++	++	++	+	+	+	+	±	±	±	-				
Di-chlor-phenothiazon		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±
Phenothiazon-methyl-sulfonate		++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±

註: (++)興奮状態, (++)正常運動, (+)運動衰弱, (±)運動停止, (-)死

2. Alkylresorcin-誘導體

表1に見る如く9種のものに就て實驗した.

a. 試験管内實驗

1:1 000作用でも1:10 000作用でも大體作用が強く, 9種の中6種は夫々30^m又は3^h以内に虫を殺してゐる. 即ち, 4-Isoamyl-RES (resorcinを略記す), 6-Chlor-4-isoamyl-RES, 4-n-Hexyl-RES, 6-Chlor-4-n-hexyl-RES, 6-Chlor-4-cyclohexyl-RES 及び RES-monoisoamyl-äther 等であるが特に n-Hexyl-RES は抜群である(1:1 000で5^m以内に殺虫). ところが Cyclohexyl-RES になると幾分殺虫力微弱である. 以上のものは之をCl化すると Iso-amyl-RES, Cyclohexyl-RES では多少強くなつてゐるが, Hexyl-RES では却つて殺虫力は少し弱くなつてゐる. 中毒死を來した虫の體表面は肉眼的に白色に變じ光輝を失つてゐる. 鏡檢によつて虫體表面全

長に亘る恰もエロジオンの状を認める。

b. 生体内試験

100mg/kg, 200mg/kg 投與例で排虫率並に驅虫率が夫々著明なものは n-Hexyl-RES, Chlor-hexyl-RES 及び RES-Monoisoamyläther である(表2)。大體、排虫率と驅虫率は平行してゐるが、Hexyl-RES の100 mg/kg投與の場合は排虫率が極めて小である。

Cl化の場合特に Hexyl-RES では幾分弱くなつており、Di-Cl-はMono-Cl-より更に弱いようである。

剖検所見では、大部分の胃腸粘膜に出血又は充血を認める。特に Hexyl-RES, RES-Monoisoamyläther の如き作用顯著なもの程肉眼的變化は著しい。逆に驅虫作用の弱いもの程胃腸粘膜の變化は軽く、此の著しい例は Cyclohexanol-isomalon-酸-äthylester である。之らの關係は又 Hexyl-RES のCl化の局所作用と驅虫力價との間の關係にも認められ、Cl化に依つて局所作用は弱まるが同時に驅虫力價も低下してゐる(表2)。

以上を要するに、此の種の誘導體は大體試験管内實驗成績に於て著明な殺虫力を示して居る。此の點で、前項のものとは逆である。

融點から見れば Hexyl-RES は67~68°Cであるが之に近似な融點を有する Isoamyl-RES は此の實驗では抜群の効力を示して居ない。

3. Diphenyl-誘導體

表1に記す5種に就て實驗した。

a. 試験管内實驗

此の類は試験管内では大體殺虫力が認められる。殊に著明なのは 3-Chlor-4-oxy-diphenyl, 3-Chlor-2-oxy-diphenyl, 2-Oxy-diphenyl である。1:1 000作用の例では前項の Alkyl-RES 類にも匹敵する成績である(表1)。

化學構造式と殺虫力との關係を見るに、OHが Para 位(4位)にある場合と Ortho 位(2位)にある場合とでは判然たる差異は認められない。然し夫々Cl化した場合には Para-oxydiphenyl では強くなり、Ortho-oxy-diphenyl ではCl化がOHに隣接して3位にある場合にのみ強く、OHから離れた場合は却つて弱いようである。

b. 生体内實驗

生体内實驗で作用著明なものは 2-Oxydiphenyl で之に次ぐものは 2-Oxy-5-chlorodiphenyl である(表2)。OH の位置から見ると Ortho 位 (2位)のものが Para 位(4位)に比してより強く、Cl化した場合の 4-Oxy-5-chlorodiphenyl では強いが、2-Oxy-diphenyl ではCl位に依つて弱くなる場合がある(2-Oxy-3-chlor-diphenyl)。

剖検所見では消化管に於ける局所作用は大體弱く、有つても粘膜の軽度の充血程度である。

以上のように、此の Diphenyl-誘導體は主として試験管内實驗に於て作用をし、此の點 Alkyl-RES系と相似ては居るが、局所作用は多少弱い。然し驅虫効力の強いと認められるものは局所作用も強く現われてゐる。融點から見る時は60~80°Cを有するものに有効なものが多いようである。

4. Thiodiphenylamin-誘導體

此の類に屬するものは一體に融點が高く、150°C(Phenothiazon)が最低である。

a. 試験管内實驗

此の類のものゝ試験管内での殺虫効力は強くない。4種中最強のものは mono-chlor-phenothiazon であるが、虫を殺すに1:10 000で3hを要してゐる(表1)。

b. 生体内實驗

試験管内實驗が無効なのに引換えて生体内實驗では Phenothiazon-methylsulfonate の例外を除けば他は大體良好な成績を示してゐる。特に Phenothiazon は著明で(200mg/kgの驅虫率は95%)此の研究で取扱つた

第2表. 生体内実験成績
(100mg/mg投與 驅虫率: — 排虫率: ……)

薬 物	排虫率驅虫率	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
Phenylthiocarbin-sre-methyl-ester																				
" -// -äthyl- "																				
" -// -propyl- "																				
" -// -butyl- "																				
" -// -amyl- "																				
" -// -cetyl- "																				
" -// -allyl- "																				
α-Naphthylthiocarbin-// -methyl- "																				
" -// -äthyl- "																				
" -// -butyl- "																				
4-Isoamyl-resorcinol																				
4-Isoamyl-6-chlor-resorcinol																				
4-n-Hexyl-resorcinol																				
4-n-Hexyl-6-chlor-resorcinol																				
4-n-Hexyl-2,6-chlor-resorcinol																				
Para-cyclohexyl-phenol																				
Para-cyclo-hexyl-6-chlor-resorcinol																				
Cyclo-hexanol-iso-malon-sre-äthylester																				
Resorcin-mono-iso-amyl-äther																				
4-Oxydiphenyl																				
3-Chlor-4-oxydiphenyl																				
2-Oxydiphenyl																				
5-Chlor-2-oxydiphenyl																				
3-Chlor-2-oxydiphenyl																				
Phenothiazin																				
Phenothiazon																				
Mono-chlor-phenothiazon																				
Di-chlor-phenothiazon																				
Phenothiazon-methyl-sulfonate																				

註: 驅虫率: $\frac{\text{排虫数} + \text{腸管内残留死虫数}}{\text{ガマ腸管内寄生總線虫数}} \times 100$

排虫率: $\frac{\text{排 虫 数}}{\text{ガマ腸管内寄生總線虫数}} \times 100$

29種中の随一である(表2).

剖検所見は消化管に對する局所作用として粘膜の輕度充血を認むる程度である.

IV. 總 括

1. 蛔虫驅虫薬の効力検定法の一新法としてガマの腸管に寄生する線虫 *Rhabdias bufonis* を對象に試験管内實驗並に生体内實驗を併行し兩者の成績から力價を判定した.

2. 本法に依つて Alkylthiocarbin-酸-ester, Alkylresorcin, Diphenyl 及び Thiodiphenylamin 等の夫々の誘導體29種を検するにその成績は次の通りであつた(附表参照).

a) Alkylthiocarbin-酸-ester 誘導體は生体内實驗で効力を現わすものが多く試験管内實驗成績でその効力の秀でているものはなかつた. 此の類で大體, 考慮に値するものとしては Phenylthiocarbin-酸-äthyl-

ester, 同-allylester である。

b) Alkylresorcin-誘導體は前者に反して主として試験管内實驗に於て奏効してゐる。此の類9種の中で優れてゐるものは、4-n-Hexylresorcinol, Resorcin-mono-isoamyl-äther であるが之らは試験管内のみならず生体内實驗でも奏効を示してゐる。剖檢所見では有効なもの程消化管粘膜の障礙は著明である。

c) Diphenyl-誘導體は主に試験管内成績が良好で、Ortho-Oxydiphenyl は生体内成績に於ても他に勝り此の類の5種藥物中最も有効である。

d) Thiodiphenylamin-誘導體の作用は主に生体内實驗に現われてゐる。此の類の中で最も有効と認められるものは Phenothiazon である。

3. 以上の成績を通覽するに此の検定法に依つて之ら藥物作用の大體が窺われる。即ち、藥物に依つて試験管内で直接虫を殺す作用のみが驅虫効力を左右してゐる場合があり、又は生体内實驗で初めて驅虫効力を發現する場合があることを識別し得る。

V. 結 論

1. ガマ線虫 *Rhabdias bufonis* を對象にしての試験管内實驗と生体内實驗に依つて29種の合成品を試験した上で力價を判定するに、この試験で一應考慮に値するものは多くは實際使用に依つて既に有効又は稍々有効と見做されて居るものが多い。即ち、大體のところは實際使用上の結果と相一致するものゝようである。

2. 此の方法に依る時は藥物の驅虫作用が試験管内試験のみで明らかなるものか或は生体内に於て甫めて効を現すものかの判定をなし得る。

3. 本法は實驗條件等を一層檢討改善することに依つて更に眞價に近い實驗結果を期待出来るものと信ずる。

引 用 書 目

- 1) O. Gros: Archiv f. exp. Pathol. u. Pharmacol. 187, 100 (1937).
- 2) 山野上牧夫: 日本藥物學雜誌 28, 第13回日本藥理學會記事 31 (昭和5年).

cc/kg a diphasic curve appears in which the second peak is higher than the first. (3) With doses of less than 0.5 cc/kg a diphasic curve in which the first peak is higher than the second is obtainable. If the doses injected are reduced to 0.125 cc/kg or less, one of the two peaks is extinguished and a monophasic curve established. The author has further analysed a large series of fever curves and suggested that the second peak has some meaning in the tolerance against pyrogenic reactions of the test animals.

Author

12. **TAKEDA, Ken-ichi, TAMAMURA, Kojiro, MINESITA, Tetuo, MURAKAMI, Yasushi and HIROSE, Katsumi.** Department of Pharmacology, Shionogi Research Laboratory, Shionogi & Co., Osaka *A new testing method of anthelmintics using toad worms, Rhabdias bufonis* (pp. 86-91) Tables 2

Rhabdias bufonis which can be found plentifully in every toad intestine throughout the year, were employed in these experiments consisting *in vitro* and *in vivo* examinations. Experiment *in vitro*: Each group of five worms were put in drug solutions. The changes in their movement in the solution were recorded until the moving stopped, estimating the toxicities of the drugs to the worms. Experiment *in vivo*: The drugs were given toads *per os*. From the following day observations on the numbers of worms excreted from the toads were continued for six days. On the last day of the observations, these toads were dissected to see the pathological changes caused by drugs in the alimentary canal and other organs concerned. Twenty nine drugs were tested by this method. Some of them were effective *in vitro* experiment and others were effective *in vivo* experiment, while most popular anthelmintics were proved to be effective in both experiments.

Minesita-Osaka