U. D. C. 615.733.092.259

306. 稲垣 勲, 久田末雄: 条虫駆除力の検定法に関する研究 (第1報)

in vivo の新検定法に就いて*Isao Inagaki and Sueo Hisada: Studies on the Assay for Anthelmintic Activities to Taenifuges. I. A New *in vivo* Assay Method.

(School of Pharmacy, Nagoya City University**)

A group of mice infected with *Hymenolepis nana* was administered orally with drugs, the number of worm eggs in the feces was counted once a day for a few days, and fluctuation in the number was recorded. Finally, the small intestine was cut open and the presence or absence of mature worm and their size were examined. The animal in which the number of worm eggs had markedly decreased or disappeared and in which mature tapeworm (over 10 mm. in length) no longer remained was taken as the effective case and the animal in which the mature worm remained was taken as the ineffective case. Since the eggs of *H. nana* repeatedly hatches inside the intestines to become a mature worm, the remaining eggs will again hatch into small tapeworms during the counting of eggs even if mature worms were entirely eliminated. This is the reason why limitation is placed on the mature worm. The number of eggs in the feces fluctuates without any direct relation with the number of worms and the calculation of eggs may be omitted. In such a case, the animal is autopsied on the day after the end of drug administration and if worms are found in the intestines, even below 10 mm. in length, the animal is taken as the ineffective case. The anthelmintic percentage (A. P.) is calculated from the following equation, where a is the number of animals in effective cases and b, the number in ineffective

$$A. P. = \frac{a}{a + b} \times 100$$

tive cases. The comparison of A. P. is made by the calculation of statistical probabilities. A few experimental examples are given in Tables I to IV.

(Received June 27, 1956)

条虫駆除力の検定には各種の *in vitro* 法¹⁾ と *in vivo* 法²⁾ が報告されているが, *in vitro* の成績は *in vivo* のそれとはかなりの相違があり, *in vivo* 法でも冷血動物を寄主に用い条虫とは異類の寄生虫を用いて条虫駆除力を論ずることは甚だ冒険といわねばならない. *in vivo* 法の中 Holton³⁾ はナナ条虫 *Hymenolepis nana* 寄生のマウスを, Seelkopf⁴⁾ は *H. diminuta* 寄生のラットを用い寄主動物個々について駆虫の比率を出しているが, Holton 法は湿润虫体の重量測定に誤差を生じ易く, Seelkopf 法は 1 検体に多数のラットを要し Oelkers⁵⁾ のいう如く甚だ面倒である. 著者等は成るべく簡易な *in vivo* の定性的駆虫力検定を目的としてナナ条虫寄生の 1 群のマウスに薬物を与え, 後解剖して完全駆虫率を求める方法を試みた.

実験方法 前処置 多数のナナ条虫卵を含むマウスの糞を Bunge 液で適宜に希釈したもの約 0.2 cc を生後約 1 ヶ月, 体重 15 g 前後のマウスにゾンデで経口的に投与し 14~15 日後, 糞を鏡検し虫卵を認めたものを検

* 稲垣, 久田: 第 73 回日本薬学会年会発表 (1953). ** Hagiya-ma-cho, Mizuho-ku, Nagoya.

1) W. Schroeder: Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **18**, 381(1884); **19**, 291(1885). W. Straub: Ibid. **48**, 1(1902). P. Trendelenburg: Ibid. **79**, 190(1916). R. Wasicky: Ibid. **97**, 454(1923); **103**, 313(1924). T. Sollmann: J. Pharmacol. Exp. Therap. **12**, 129(1919). C. Kofler: Arch. Pharm. **264**, 644(1930). S. Yagi: Z. ges. exp. Med. **III**, 64(1914). 寺田: 満洲医 **16**, 639(1932). 松尾: 岡山医学会 **48**, 2930(1936). 山上: 東医学会 **47**, 119(1933). 風祭: 東医学会 **49**, 1490(1935).2) O. Gros: Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **187**, 100(1937). 山野上: 東医学会 **56**, 27(1942). K. N. Hsieh: Am. J. Hyg. **56**, 287(1952). J. K. Weston: J. Pharmacol. Exp. Therap. **107**, 315(1953). 峰下: 日本薬理誌 **44**, 3, 23(1949).3) P. Holton: Brit. J. Pharmacol. **2**, 100(1947); J. H. Burn: "Biological Standardization" (Oxford Univ.) **II**, 365(1950).4) K. Seelkopf: Arzneimittel-Forsch. **2**, 55(1952).5) H. A. Oelkers: Ibid. **3**, 623(1953).

定用とする。

薬物投与 検卵後直ちに薬物をゾンデで経口的に与える。投与量は検体の効力をできるだけ発揮させるために原則として中毒死を起さない最大限の量とする。多くの場合単一化合物は 0.2~0.4 mg/体重 g, 生薬または生薬製剤は 0.6~6.0 mg/g を用い, この量で致死例の多い場合は成るべくその起らない量まで減量した。薬物は水に溶かすか微量のアルカリに溶かし水で希釈した液, アラビアゴムを加えた水または飽和 MgSO_4 液との乳剤, ヒマシ油または流バラ溶液等としその 0.05~0.2 cc を与えた。投与回数は 1 日 1 回, 連続 2~6 回とする。必要ある時は投与 3 時間後下剤として飽和 MgSO_4 液 0.1~0.2 cc を与える。

卵数計算 投薬開始 2 日目頃から毎日各マウスの糞数個宛を集めその個数に 0.0056 (マウス乾燥糞 1 個の平均重量 g) を乗じた数の 30 倍の cc (例えば 5 個なら 0.84 cc, 12 個なら 2.0 cc) の Bunge 液を加え小硝子球と共に振りまぜた混濁液 0.1 cc をメスピペットで界線 object glass にとり鏡検し 0.1 cc 中の全卵数を算出する*。卵数計算は 1 日 1 回 5~6 回行う。薬物に強い駆虫力があると卵数の急激な減少消失または激増 (排出された虫体が糞に混じた時) が認められることがある。然し卵数の多少或いはその経日的変化は虫体数や駆虫力と常に直接の関係があるとは言えない⁹⁾ からこの卵数計算は省略しても差支えない。これにより本検定法は著しく簡易となる。

虫体検査 投薬終了の翌日または卵数計算を 5~6 回行つた後マウスの小腸全部を取出し Bunge 液内で切開し, 残留する虫体の有無, 大小 (10 mm 以下を小, 10~20 mm を中, 20 mm 以上を大とする), 虫数, 運動状況等を検査する。ナナ条虫の成熟虫体は卵から孵化した後 20 日頃から漸次自然排出され 30 日以後は長大の成虫を殆んど認めず却つて残留した卵から二次的に成育した微小虫体を認めるようになる^{7,8)} から卵数計算, 虫体検査は卵投与後 20 日以内に完了する必要がある。

効果判定 数回卵数計算を行つた後解剖した場合は小腸内に成熟条虫 (10 mm 以上) を全く認めないものを有効例とし, 成熟条虫を認めたものを無効例とする。この場合特に「成熟」と限定したのは本虫卵は中間宿主を経ずに腸の絨毛内で孵化成育するから, たとえ薬物により全虫体が駆除されても若し腸内に卵が残留しておれば数日の卵数計算の間に条虫体となるからである。但しこのような虫体はまだ微小で 10 mm を超えない。従つて 10 mm 以下の虫体は駆虫後成育したものと見なし虫体数に算入しない。卵数計算を行わず投薬終了の翌日解剖したような場合は大小に拘らず小腸内に全く虫体を認めないものを有効例, 10 mm 以下の虫体が 1 条でも認められたら無効例とする。

駆虫百分率 Anthelmintic Percentage (A. P. と略す)** 次式で求められる。

$$\text{A. P.} = \frac{\text{有効例のマウス匹数}}{\text{薬物を投与したマウス総数 (途中死亡したものを除く)}} \times 100$$

或いは有効例の匹数を a , 無効例の匹数を b とすれば $\frac{a}{a+b} \times 100$

二種の薬物の A. P. の比較 推計学的確率計算によつて行う。例えば salicylaldimethone (S. D.) (22 匹中有効例 18 匹, A. P.: 81.8%) と extractum aspidii (E. A.) (22 匹中有効例 11 匹, A. P.: 50%)*** の場合はこの度数分布をする確率の総和を計算すると 0.027~0.028 になるから 2.7~2.8%の危険率でそれぞれの投与量に於いて S. D. は E. A. より効力が強いといふことができる。

実験例 1. カマラ (新しく購入した市販日本薬局方品)

A. P. (A), (B) 100%. No. 3, 4 は小腸内の残存虫体が 10 mm 以下であつたから有効例とする。(C) 0%.

A. P. の比較: (A) (B) の方が (C) より有効である (危険率 0.014, 0.0048).

* 本法は人糞について行われる Stoll の希釈卵数計算法をマウス用に改変したものである。

6) C. Lane: Lancet 228, 1459 (1935).

7) R. A. Wardle, J. A. McLeod: "The Zoology of Tape Worms" (Minnesota Univ.) 449 (1951). 宮川: "臨床人体寄生虫病学" (蠕虫病篇) (克誠堂) 第3版, 378 (1941). その他.

8) 佐伯: 児科雑誌 230, 88 (1919); 238, 203 (1920); 239, 275 (1920); 241, 585 (1920); 267, 959 (1922); 東医事新 2259, 2450 (1921). 西尾: 実医 23, 253, 530, 693 (1939).

** これは所謂「完全駆虫率」であるが母百分率 (これを「駆虫率」anthelmintic rate と言うべきである) と区別するためにかく称する。

***第2報参照。

Table I. Fluctuation of Number of Eggs and of Tapeworms (Kamala)

Drug	Mouse No.	Number of eggs										11**	Number of worms
		Date 1	2	3 *	4 *	5 *	6 *	7 *	8	9	10		
(A)	1	28	32	—****	—	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	88	158	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	32	5	—	—	5	0	0	10	27	9	> 30*** <u>sm.</u>	alive
	4	267	357	—	—	0	0	0	0	0	0	> 100	"
	5	615	576	—	—	3	0	3	0	0	0	0	0
	6	363	69	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
(B)	7	18	75	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	69	54	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	160	176	—	—	4	0	0	0	0	0	0	0
	10	80	21	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0
(C)	11	32	5	—	—	0	16	0	165	27	59	{ 1 <u>m.</u> alive > 30 <u>sm.</u>	{ "
	12	7	48	—	—	0	27	0	85	27	293	{ 3 <u>m.</u>	{ "
	13	27	139	—	—	16	11	48	37	37	277	{ 6 <u>l.</u>	{ "
	14	48	16	—	—	43	0	48	288	224	27	{ 4 <u>l.</u> 1 <u>sm.</u>	{ "

(D) All mice Nos. 15~22 became weak and were dead in the 1st or 3rd day after administration.

Dosage: (A) 0.02 g Kamala in MgSO_4 soln. 0.2 cc, without triturating, for a mouse (weight ca.

15~20 g). (B) 0.04 g Kamala; other conditions similarly to (A). (C) 0.005 g Kamala as an emulsion, triturated thoroughly with 0.2 cc aq. and acacia. (D) 0.01 g Kamala; other

conditions similarly to (C).

* drug administered.

** small intestine dissected.

*** sm: smaller worms than 10 mm. in length. m: medium 10~20 mm. l: larger than 20 mm.

**** — egg counting not carried out.

例 2. hexanoylphloroglucinol (phlorocapronophenone)⁹⁾ (PH と略す)

Table II. (Hexanoylphloroglucinol)

Drug	Mouse No.	Number of eggs										11
		Date 1	2	3 *	4 *	5	6	7	8	9	10	Number of worms
(A)	1	48	16	—	—	44	0	0	0	0	0	0
	2	101	384	—	—	44	24	4	37	52	4	3 l. alive
	3	176	134	—	—	11	0	85	64	6	32	0
	4	163	44	—	—	69	59	48*	16	0	0	2 <u>sm.</u> "
	5	180	84	—	—	232	456	240	244	39	32	60 <u>sm.</u> "
	6	84	160	—	—	0	0	0	0	0	4	0
	7	88	64	—	—	76	84*	0	0	0	0	0
	8	408	144	—	—	168	0	0	0	0	0	0
(B)	9	48	16	—	—	5	37	43	0	0	0	{ 3 l. almost 6 m. motionless
	10	11	32	—	—	21	165	21	37	0	37	{ 6 m. ∞ <u>sm.</u> "
	11	5	11	—	—	21	91	32	0	0	16	{ 2 l. 3 m. "
	12	101	53	—	—	107	112	139	0	0	394	58 <u>m.</u> "

9) 刈米, 稲垣: 本誌 69, 431 (1949).

13	5	5	—	—	5	11	176	0	32	5	{ 5 m. "
											{ ∞ sm.
14	21	16	—	—	27	0	0	0	16	0	{ 1 l. "
											{ 6 m.

* In feces tape worms found.

Dosage: (A) The first day 3 mg. H.P. dissolved in 0.2 cc. of 1% Na₂CO₃ sol., the next day 6 mg. H.P. in 0.2 cc. satd. MgSO₄ sol., (B) The same doses as (A), dissolved in 0.1 g. liq. paraffine.

(A) A. P. 87.5%, (B) 0%. 本例は同一量を投与したのにも拘らず配伍した下剤または溶剤の如何により結果に著しい相違を来した例である。

例 3. filixic acid (I), flavaspidic acid (II), filicinic acid butanone (III), albaspidin (IV)†. (卵数計算を省略した例)

Table III.

Filixic acid (I)		Flavaspidic acid (II)		Filicinic acid butanone (III)		Albaspidin (IV)	
Mouse No.	Number of worms	Mouse No.	Number of worms	Mouse No.	Number of worms	Mouse No.	Number of worms
1	0	7	3 m. alive	13	28 m. alive	18	0
2	20 m. alive	8*	5 l. almost motionless	14	1 sm. "	19	0
3*	3 l., 8 sm."	9	4 m. "	15	23 sm. "	20	0
4	0	10	∞ sm. "	16	∞ sm. "	21	0
5*	0	11	1 m. "	17	3 m. "	22	0
6	9 m."	12*	6 sm. "				
			1 l. "				

* Mice were dead before the second administration.

Dosage: All (I)~(IV) 3 mg. on the first day, 1.5 mg. on the next day dissolved in buffer soln. (12% Na citrate soln., 0.5 N NaOH soln. and 0.5 N acetic acid pH 8.8)⁴⁾. After 3 hrs. 0.2 cc. satd. MgSO₄ soln. was given. On the day, after the drug administration small intestines were dissected.

A. P. (I) 50%. (II) 0%. (III) 0%. (IV) 100%. (IV) と (I) の間には有意の差は認められないが, (IV) と (II), (III) の間には認められる (危険率 0.002~0.004). なお本例では投薬終了の翌日解剖したから大小に拘わらず虫体を見出したものは全て無効例とした。

〔附〕 *in vitro* の毒性試験. (I)~(IV) を微量の NaOH 液に溶かし Bunge 液を加えて 0.1% 溶液としたもの

Table IV. Toxicity of Crude Drugs against *H. nana* and the Constituents of Ext. Aspidii.

Drug	Duration before death of <i>H. nana</i> (mins.)
Ext. aspid. (A)	3~5
" (B)	"
Crude filicin*	"
Filixic acid	"
Flavaspidic acid	"
Filicinic acid butanone	ca. 500
Albaspidin	"
Kamala	90
Control (Bunge soln.)	ca. 500

(A) Preparation "Merck". (B) Prepared by authors from Aspidium gathered in Mt. Fujiwara, Miye Prefecture. *) Prepared by authors from (B) according to J. P. VI. All in 0.1% solution.

にマウスの腸内から取出した活潑なナナ条虫 10 条内外を投じ 37~38° に保ちながら死 (液に 低圧の電流を通じても動かなくなる) までの時間を測定した (Table IV). Table I, III, IV から *in vitro* の毒性試験の成績は例 1, 及び 3 の *in vivo* の駆虫試験のそれと全く平行しないこと並びに毒性の弱い kamala や albaspidin が毒性の強い filixic acid や flavaspidic acid よりも駆虫力が強い (kamala と filixic acid の駆虫効力には 0.035 の危険率で有意の差がある) ということができる。

名古屋市立大学薬学部

U. D. C. 615.733. -092.259

307. 稲垣 勲, 久田末雄, 小川宗治, 野呂征男, 石原利克: 条虫駆除力の検定法
に関する研究 (第2報)

種々の薬物の条虫駆除力検定実験結果とその考察*

Isao Inagaki, Sueo Hisada, Muneharu Ogawa, Yukio Noro, and Toshikatsu Ishihara:

Studies on the Assay for Anthelmintic Activities to Taenifuges. II. Results
of Assay *in vivo* for Anthelmintic Activities of Various Compounds
against Tapeworms (*Hymenolepis nana*).

(School of Pharmacy, Nagoya City University)

Qualitative potency tests by the *in vivo* assay method for anthelmintic power for tapeworms were carried out with 14 kinds of acyl and alkyl derivatives of phloroglucinol and methylphloroglucinol, 4 kinds of C-acyl derivatives of dimedone, 3 kinds of dimethone (aldomedone), 4 kinds of filicinic acid derivatives, 15 kinds of crude drugs, crude drug preparations, and plant principles, 6 kinds of pigments, and 7 miscellaneous substances. The results obtained are listed in Tables I to IV and some summarized considerations on the results were made.

(Received June 27, 1956)

前報に述べた方法によつて phloroglucinol 及び methylphloroglucinol の acyl 誘導体^{2,3)} 12 種, alkyl 誘導体²⁾ 2 種, dimedone の C-acyl 誘導体⁴⁾ 4 種, dimethone (aldomedone) 類 3 種, filicinic acid 誘導体⁵⁾ 4 種, 生薬, 生薬製剤, 植物成分 15 種, 色素類 6 種, その他 7 種, 計 53 種の薬物につき定性的に *in vivo* のナナ条虫駆除力の検索的検定を行つた。その結果を Table I~IV に示す。これらの Table は便宜上 (I) A. P. 100~75%, (II) 75 未満~50%, (III) 50 未満~25%, (IV) 25 未満~0%に分けて駆虫百分率 (A. P.) の順に列挙したものであるが, A. P. による序列は必ずしも常に駆虫力の序列を示すものでなく, A. P. の比較は有効例無効例の度数分布から確率計算によつて行わるべきであり, 従つて組合せの如何によりあるときは有意の差がありあるときはそれが認められないものがある。

Table I. A. P. 100~75%.

Drug	Dose daily (mg.)	Days treated	Mice treated	Mice cleared	Anthelmintic percentage (%)
1. Acrinamine (Quinacrine)	{ 3 6	6	6 6	6 6	} 100
2. Kamala	{ 20 40	6	4 6	4 6	} 100
3. Albaspidin (synthetic) ⁵⁾	1.5~3	2	5	5	100
4. Isohexanoylphloroglucinol ³⁾	3~6	6	6	6	100
5. Isohexanoylmethylphloroglucinol ³⁾	3~6	6	6	6	100
6. "Filmaron oil" (Boehringer)	0.02~0.05 cc.	6	9	8	88.8

* 稲垣, 久田, 小川, 野呂: 第 74, 75 回日本薬学会年会発表 (1954, 1955).

2) 刈米, 稲垣: 本誌 69, 431 (1949).

3~5) 本誌 76, 1253, 1256, 1258 (1956).