

# 鉤仔・成虫の行動におよぼす各種駆虫剤 の影響に関する研究

安 羅 岡 一 男

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和 31 年 12 月 25 日受領)

## まえがき

従来鉤虫駆虫剤の *in vitro* での効果判定には、主として鉤仔虫あるいはガマ線虫等が材料として用いられている。いうまでもなく鉤虫駆虫剤は成虫駆除のために用いられるのであつて、したがつて *in vitro* でのその効果判定も成虫を用いるのが至当と考えられるが、なお仔虫等がよく用いられているのは、これが実験材料として容易に得られるということや、成虫の生体外飼育に成功しなかつたこと等がその大きな理由になつていられる。しかしここで問題になるのは、仔虫等によつて得られた薬剤の効果果が成虫におけるそれと同様であらうかという点であるが、これに関する検討はいまだない。すなわち既知の薬剤についてその効果を仔虫と成虫の両者について検討し、若し両者が同様の結果を示したとすれば、鉤虫駆虫剤の *in vitro* 試験が仔虫を用いてもなし得る可能性を示唆すると考えられるが、反対に両者における結果が違つたものであれば、仔虫を用いることはもはや意味のないことになる。

又、現在使用されている鉤虫駆虫剤のすべては、ほとんど水に不溶か或は難溶であつて、これら薬剤を *in vitro* で作用させる場合にはその稀釈方法が作用効果の重要な一要因となり得ると考えられるが、これも各研究者によつてまちまちというのが現状である。

筆者らは犬鉤虫成虫の生体外飼育を試みてある程度の成功をおさめ (Komiya, Yasuraoka & Sato, 1956), それに基いて筆者は成虫の *in vitro* での行動を観察し報告した (安羅岡, 1956)。又仔虫についても特に温度に対する動性について詳細に報告した (安羅岡, 1955)。こ

のように鉤虫の成虫および仔虫のそれぞれについてそれらの運動状態が把握されたので、これを対照として更に各種鉤虫駆虫剤の鉤仔・成虫の行動に対する影響を観察し、上述の問題に対する若干の知見を得ることが出来たのでここに報告する。

## 材料および方法

材料：本実験で用いた犬鉤虫仔虫は、感染仔虫 150~200 個体を経口感染させた犬から得た虫卵を 28°C で瓦培養して得たものである。更に出来るだけ正常な、運動活潑な仔虫を得るよう、又仔虫水を清浄にするために、これを再び瓦上にとり一昼夜経過後周囲の水中に遊出した個体を用いた。実験は培養開始後 7~14 日間に行つた。

又成虫は仔虫 150~200 個体を犬に経口投与して 4~5 週後に小腸を剖出し、37°C の Krebs-Ringer bicarbonate sol.+0.5% glucose (pH 7.4) (以下 K-Ringer と略す) 中で切開して得たものを直ちに実験に供した。本実験を通じて用いられた犬は合計 13 頭であつた。

1つの case (1 薬剤の 1 濃度) について最少、仔虫は 50 個体、成虫は ♂ ♀ 5 対を用いた。

温度：薬剤の作用温度はその効果にいちじるしい影響をおよぼすと考えられるが、既に筆者が報告したように、成虫では 37°C 附近で最も安定した律動的運動を示し、又 *in vivo* での薬剤の作用ということも考え併せて、成虫については 37°C で実験を行うこととした。又仔虫では 20~35°C の広範囲にわたつて安定した律動的運動が見られる。そこで 20°C, 28°C および 35°C の各温度で、Thymol 1000 倍, Hexylresorcinol 2000 倍の水溶液で仔虫に対する効果の温度影響を観察した。その結果は Fig. 1 に示す通りで、20°C < 28°C < 35°C の順に効果の促進が認められた。したがつて作用温度に関しては特に注意をはらい、実験はすべて 20~23°C の範囲内で行われた。

KAZUO YASURAOKA: The effect of various anthelmintics on the behavior of the larvae and adults of *Ancylostoma caninum* *in vitro*. (Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo)



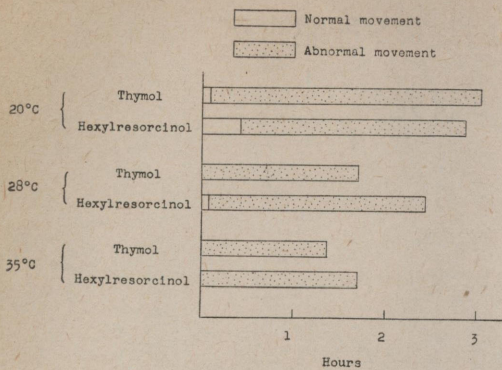


Fig. 1 Movement and survival of larvae in 1/1000 thymol and 1/2000 hexylresorcinol at various temperatures

運動の変化および生死の判別：駆虫剤の仔・成虫の行動におよぼす影響は、薬剤へ投入後の虫体の正常運動の消失、自発運動の消失、刺戟反応の消失までに要した時間を各虫体について測定し、その平均値を求めた。この場合、仔虫はたとえ水中にあつても刺戟が与えられないときは静止して全く自発運動が認められないことがあるので、仔虫の自発運動の有無については記載しなかつた。運動の変化は各観察時間毎に頭端の搏動数を測定し、この値を既に報告した正常運動のそれ（安羅岡, 1955, 1956）と比較して有意の差が認められたときに正常運動が消失したものと判別した。又生死は加温刺戟および機械的刺戟によつてもなお不動の個体を死と判別した。機械的刺戟には白金棒を用いたが、Trim (1944) も指摘しているように cuticle の機械的損傷が透過性を高めることが考えられるので、圧迫による障害を与えぬように注意した。

観察時間：作用後30分迄は連続観察し、以後6時間迄10分間隔に行い、6~12時間では30分毎、それ以後は1時間毎に仔虫は48時間後、成虫では24時間迄行うのを原則としたが、これは効果の現われる状態によつて適宜伸縮された。観察時間を仔虫は48時間としたのはこれ以後では exsheath する個体が多く、したがつて体表の透過性がいちじるしく変ることが予想されたこと、又成虫で24時間としたのはこれ以後に control の正常運動の失われる個体が見られたことによる。

駆虫剤の稀釈方法：本実験で用いた駆虫剤は、Thymol, 1-Bromo-Naphthol (2) (以下 BN と略す), Hexylresorcinol, (以下 HR と略す), Ascaridol (90%),

Table 1 Solubility of various anthelmintics in water (Merck Index)

Anthelmintics	Solubility in water
Thymol	1 : 1000
1-Bromo-Naphthol (2)	1 : 30000
Hexylresorcinol	1 : 2000
Ascaridol	
Tetrachloroethylen	1 : 10000
Tetrachlorocarbon	1 : 2000

Tetrachloroethylen (以下四エと略す)、および Tetrachlorocarbon (以下四炭と略す) の6種の鉤虫駆虫剤と、対照として用いた Piperazine hexahydrate の合計7種である。これら鉤虫駆虫剤は水にほとんど不溶かあるいは難溶で、水中の溶解度は第1表に示す通りである。そこでこれらを *in vitro* で虫体に作用させるにあつては、現在迄多くの研究者によつて種々の稀釈法が用いられている。

笹田 (1934) は人鉤虫および東洋毛様線虫仔虫の鉤虫駆除剤に対する抵抗力を見るとき、Thymol はアルコールを溶媒として稀釈しているが、四炭およびヘノポジ油は原液のまま使用している。大浜 (1941) もアルコールを溶媒としてネマトール、Thymol について鉤仔虫の抵抗試験を行つている。中村 (1950) は HR を豚蛔虫に作用させるにあたり、粉末を直接虫体に塗布するか、0.1% および 1.0% 生理食塩水にエマルジョンとして使用し、桐野 (1952) も HR をエマルジョンとして犬鉤成虫に作用させ、四エはエマルジョンの形にもならないので原液のまま用いたと述べている。又岩田ら (1953) は BN を乳鉢ですり微粒子として 1% および 0.1% 加温水懸濁液とし、犬鉤成虫に対する影響を観察している。福本 (1955) は犬鉤仔虫に対し、BN, HR, Thymol およびヘノポジ油等を 1% になるよう Tween 20 で溶解したものを用いて居り、松本 (1955) は Tween 80 を用いて犬鉤成虫に対する駆虫剤の殺虫効果を見ている。

以上を通覧すると、従来用いられている薬剤の稀釈、作用の方法は、(1) エマルジョンにする、(2) アルコール等の溶媒を用いる、(3) 原液のまま用いる、および (4) 界面活性剤を用いる、の4者に要約される。

水に難溶な鉤虫駆虫剤の *in vitro* で効果判定にあつては、薬剤の稀釈方法によつて虫体に対する作用条件が異なり、したがつてその効果にも種々の影響をおよぼすと考えられる。そこで筆者は、次に述べるような5種



Table 2

Anthelmintics	Tween 20			Tween 80		
	Transmissivity	Size of particle	pH	Transmissivity	Size of particle	pH
Thymol	0.8%	<0.5 $\mu$	6.8	1.2%	<0.5 $\mu$	6.7
1-Bromo-Naphthol (2)	83.5%		6.1	80.0%		6.5
Hexylresorcinol	89.0%		6.1	88.8%		6.4
Ascaridol	96.5%		6.2	92.5%		6.4
Tetrachloroethylen	96.3%		6.5	81.0%		6.7
Tetrachlorocarbon	94.5%		6.1	61.5%	<1.0 $\mu$	6.7
Piperazine	97.0%		10.9	96.0%		10.9

Tween 20 (9%) was used for blank (transmissivity=100%)

の方法でそれらの比較を試みることにした。

(1) 界面活性剤を用いる方法 非イオン性界面活性剤の Tween 20 および 80 の 0.9 cc に薬剤 0.1 g あるいは 0.1 cc を加えて完全に溶解させた後、仔虫の場合は水、成虫では K-Ringer 9 cc を加えて 100 倍液を作る。このときの液の濁度、particle の大きさおよび pH は第 2 表に示すごとくである。濁度は Tween 20 の 9.0% 液を blank (透過率=100%) として光電比色計で測定した光透過率であらわしたが、Thymol は Tween 20 で 0.8%, Tween 80 で 1.2% を示して白濁しているが、particle は 0.5 $\mu$  以下でブラウン運動が見られた。四炭も Tween 80 で透過率 61.5% を示しわずかに白濁するが、particle は 1.0 $\mu$  以下であった。その他はすべて透過率 80% 以上で、ミセル形成による可溶化が見られほとんど透明であった。1/1000 および 1/10000 倍液でも、Tween 濃度は 9.0% になるよう調製した。美間ら (1953) も言っているように、界面活性剤の生体に対する毒性はきわめて弱いとされているが、Tween 20 および 80 の 10%, 20%, 30% 液のそれぞれで仔虫と成虫に対する影響を観察したのが Fig. 2, Fig. 3 である。仔虫はそれらの 30% の濃度でも 48 時間以内に運動への影響は認められなかつたが、成虫では 10% でも図に見られるような影響を認めた。

(2) 水に直接溶解する方法

第 1 表に示す駆虫剤の水可溶限界量、およびそれ以下の濃度で作用効果を見る。

(3) Propylene glycol を用いる方法 Propylene glycol 2 cc に薬剤 10 mg を溶解後、徐々に水を加えて全量 10 cc とし、1,000 倍液を作る。したがって Propylene glycol は 20% 液となるが、これは 20% 以下の濃度では BN の溶解が不可能であつたことによる。Propylene glycol を用いて溶解可能なのは、Thymol, BN および HR の 3 種で、他の薬剤は不可能であつた。Propylene glycol 単独の仔・成虫におよぼす毒性を調べたが (Fig. 2, 3), 仔虫においてもかなりの毒性が認められ、特に成虫のそれはきわめて強い。そこで成虫については Propylene glycol を用いず、仔虫についてのみ使用することにした。

(4) エムulsion法 粉剤 (Thymol, BN, HR) を乳

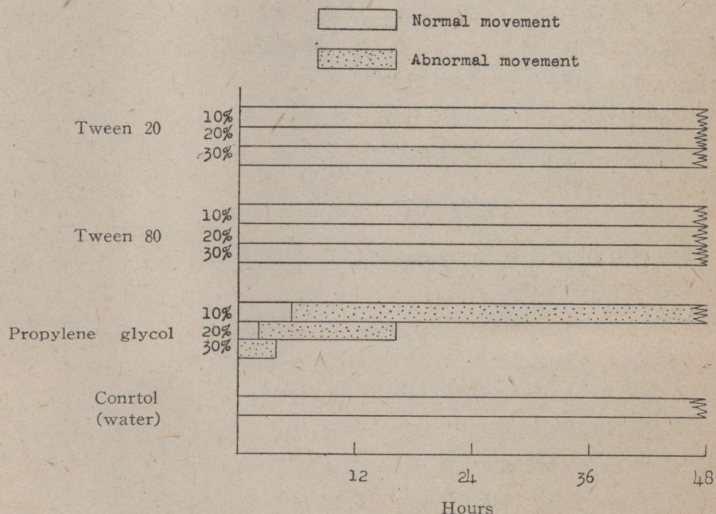


Fig. 2 Movement and survival of larvae in various dilutions of Tween 20, 80 and propylene glycol with water



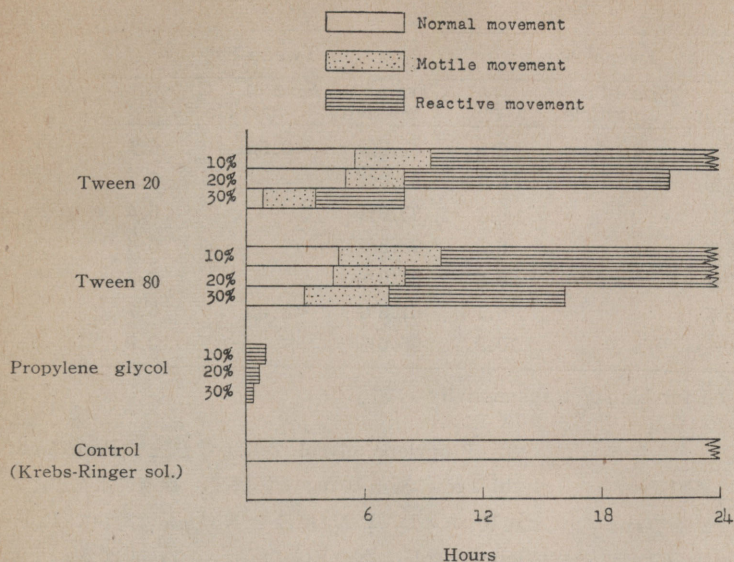


Fig. 3 Movement and survival of adults in various dilutions of Tween 20, 80 and propylene glycol with Krebs-Ringer solution

鉢でよくすり、微粒子として徐々に水を加え1000倍液を作ろうとしたが、Thymol と HR は結晶が凝集してエミュジョンの状態にならず、又油剤 (Ascaridol, 四エ, 四炭) もエミュジョンにならないので、BN についてののみ実験を行った。BN でも時間の経過にもなつて沈澱するのでしばしば攪拌するようにした。

(5) 原液のまま用いる方法 Ascaridol, 四エ, 四炭を原液のまま作用させるのであるが、この場合虫体周囲の water film が薬剤との接触を妨げないように、虫体を解剖針でつり上げ体の一部をろ紙にふれさせて体表の water film をとり直ちに薬液に入れるようにした。

実験成績

1. 仔虫の行動におよぼす各種駆虫剤の影響

(1) 界面活性剤で水溶にした駆虫剤の影響

Tween 20 で水に溶解した駆虫剤の  $1/100$ ,  $1/1000$  および  $1/10000$  の各濃度における、48時間におわたる観察の結果は Fig. 4 の如くである。Thymol, BN, HR は  $1/100$  の高濃度でも仔虫の運動には全く影響が見られなかった。しかし Ascaridol では  $1/100$  で投入後30~40分で正常運動が消失し、以後不規則な運動が続くが次第に緩慢となり、平均10時間20分後に伸展状となつて死滅した。 $1/1000$  では25時間迄正常運動を示し、以後不規則な

運動であるが48時間後でも死滅せず、 $1/10000$  では全く影響が認められなかった。四エでは  $1/100$ ,  $1/1000$  ともに投入後1~2分でふるえるような不規則運動を呈し、 $1/100$  では平均21時間50分、 $1/1000$  では42時間20分で死滅した。しかし  $1/10000$  では効果が見られなかった。四炭も  $1/10000$  では運動に変化は見られなかったが、 $1/100$ ,  $1/1000$  共に作用後1~2分でふるえ運動となり、 $1/100$  で平均21時間後、又  $1/1000$  で43時間30分後に死滅した。

上述のような結果は Tween 80 でもほとんど同様に見られた。

(2) 水に溶解された駆虫剤の影響  
結果は Fig. 5 に示すように、界面活性剤を用いた場合よりもはるかに著しい薬剤効果が見られた。Thymol の水可溶限界濃度  $1/10000$  では5分後に不規則動運が始まり、緩慢なのたくり運

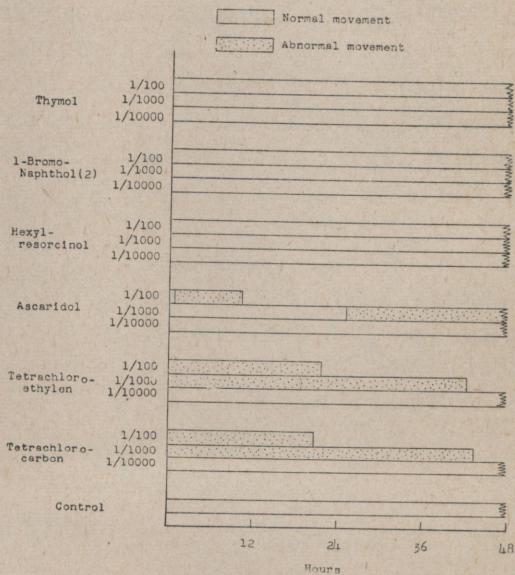


Fig. 4 Movement and survival of larvae in various dilutions of various anthelmintics with Tween 20

動から平均2時間50分後に死滅した。 $1/2000$  では10分後に正常運動が消失し、以後48時間にいたつてものた



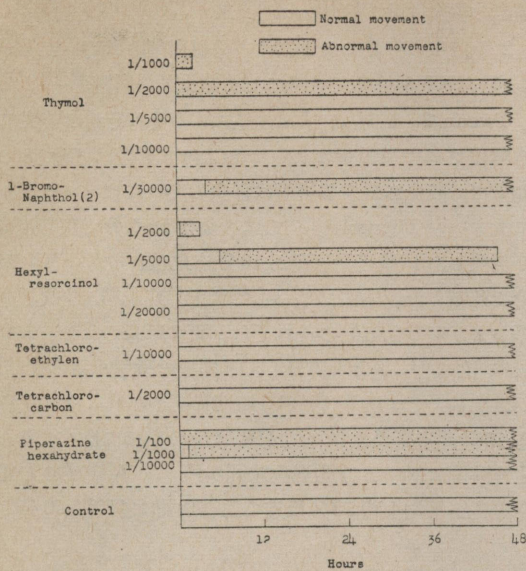


Fig. 5 Movement and survival of larvae in various dilutions of various anthelmintics with water only

した。四エ  $1/10000$ , 四炭  $1/2000$  では仔虫に影響が全然見られなかつた。Piperazine は  $1/100$  で投入後 10 分ではほとんど静止し、時々 2~3 回頭端搏動して又静止するという状態になり、1 時間後には伸展状態で全く静止し、機械的の刺戟を与えると 4~5 回搏動し、5 時間後には刺戟を与えても 1~2 回搏動するのみで直ちに静止し、このような状態が 48 時間後にも見られるが死滅する個体はない。 $1/1000$  でも同様の結果が認められたが、 $1/10000$  では 48 時間にわたって正常な運動を示した。

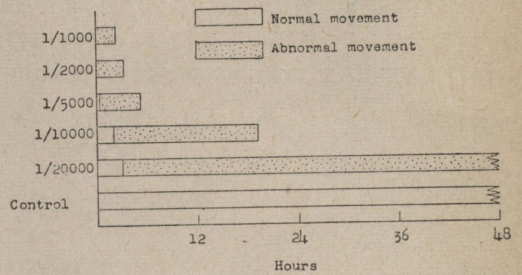


Fig. 7 Movement and survival of larvae in emulsion of various dilutions of 1-bromo-naphthol (2)

くり運動が見られたが、 $1/5000$  および  $1/10000$  では全く影響が認められなかつた。BN  $1/30000$  中では 4 時間後迄正常運動を示し、以後活潑な不規則運動を見せるが 48 時間後でも 2% 死滅するのみであつた。HR は  $1/20000$  で 30 分後迄正常運動、以後不規則運動となり体前端から黒化しはじめるとともに、平均 2 時間 50 分で死滅した。 $1/5000$  では 5 時間 50 分迄正常運動が見られたが、以後不規則な運動から平均 46 時間 30 分後に死滅した。しかし  $1/10000$ ,  $1/20000$  では 48 時間以上にわたり正常運動が持続

(3) Propylene glycol で水溶にした駆虫剤の影響  
 実験は  $1/1000$  倍の濃度で行い、結果は Fig. 6 に示した。Thymol は 7 分で正常運動が消失してノタクリ運動となり平均 3 時間 25 分で死滅した。BN は 5 分で不規則なふるえ運動となつて 50 分で死滅し、HR は 12 分で運動は不規則となり、体前端から黒化し始めるとともに平均 1 時間 25 分で死滅した。

(4) BN エミュルジョンの影響

Fig. 7 に示すように、 $1/1000$  および  $1/2000$  では投入後 1~2 分ではふるえ運動となり、 $1/1000$  で平均 2 時間 20 分、 $1/2000$  では 3 時間 40 分で反応は見られなくなる。 $1/5000$  では 5 分後まで正常運動、平均 4 時間 50 分後に死滅した。 $1/10000$ ,  $1/20000$  はそれぞれ平均 2 時間 10 分、2 時間 40 分まで正常運動を示し、 $1/10000$  は平均 19 時間 10 分で死滅するが、 $1/20000$  では 48 時間にいたるも活潑な不規則運動を示した。

(5) Ascaridol, 四エ, 四炭の影響

Ascaridol, 四エ, 四炭のいずれにおいても仔虫は投入直後に全く運動しな

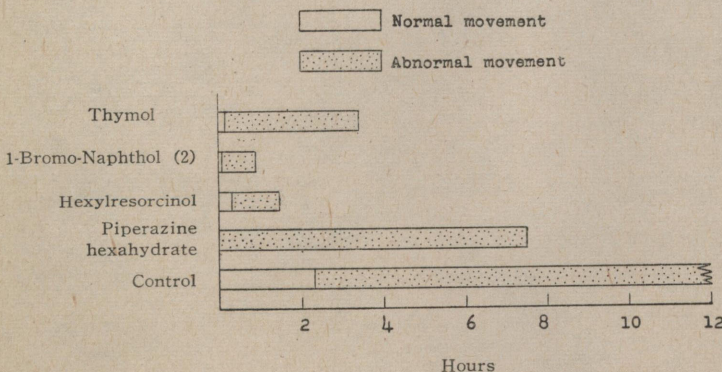


Fig. 6 Movement and survival of larvae in 1/1000 dilution of various anthelmintics with propylene glycol



くなるので、浸漬後の種々の時間に再び水中にもどして運動の回復状態を調べた。Ascaridol は投入してから30秒後に水中にもどすと、反応は残るが10分後に死滅し、投入1分後では水中にもどしても反応を示さなくなる。四エでは投入後20分迄は水中にもどすと仔虫は10分以内に再び正常運動を回復するが、投入後40分では正常運動回復迄に3時間を要し、投入後1時間のそれは24時間を要した。そして浸漬が1時間以上にあつたものは仔虫は正常運動を回復しなかつた。四炭では投入後3分迄は10分以内に正常運動を示すようになるが、浸漬が20分になると回復に3時間を要し、50分浸漬では24時間を要するようになり、50分以上になると正常

運動の回復は見られなかつた。

2. 成虫の行動におよぼす各種駆虫剤の影響

(1) 界面活性剤で水溶にした駆虫剤の影響

Tween 20で  $1/100$ ,  $1/1000$ ,  $1/10000$  のそれぞれの濃度で水溶化された駆虫剤の成虫におよぼす影響は Fig. 8 の如くで、成虫に対する影響は仔虫のそれに比べてはるかに大きい。Thymol  $1/100$  では♂共1~2分で正常運動が消失し、以後自発運動が10分迄見られるが、平均55分で死滅した。 $1/1000$ ,  $1/10000$  では正常運動期、自発運動期および刺戟反応期のそれぞれが更に延長された。BNでは  $1/100$ ,  $1/1000$  ともにほとんど同様の効果が見られたが、 $1/10000$  では正常運動が3時間迄認められ、その生存も19時間迄延長された。HR は他の薬剤に比べてその生存時間に対する正常運動時間が長く、 $1/1000$  で♂の正常運動が平均1時50分後迄で生存時間は4時間20分、

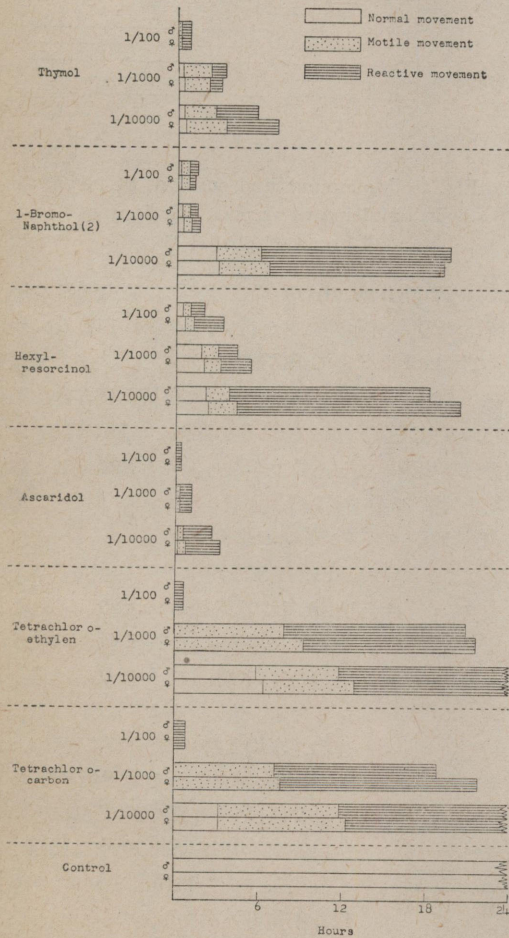


Fig. 8 Movement and survival of adults in various dilutions of various anthelmintics with Tween 20

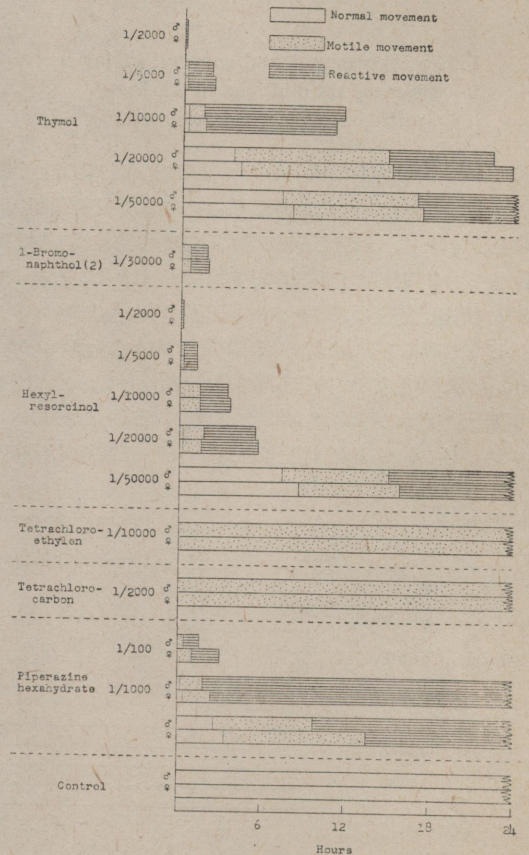


Fig. 9 Movement and survival of adults in various dilutions of various anthelmintics with water only



♀は正常 2 時間、生存時間 5 時間 20 分であつた。刺戟反応期の末期には体の頭端から黒化が始まり、刺戟反応とほとんど同時に及ぶ現象、又 Lanason (1935) が見たような体表 cuticle 層の水疱状膨化が認められた。Ascaridol の効果は強く、 $1/100$  で直後に自発運動も消失し 20 分で刺戟不応となり、 $1/10000$  でも正常運動は 3 分で消失し、♂ 2 時間 40 分、♀ 3 時間 10 分で死滅した。四エおよび四炭はほとんど同様の結果を示し、 $1/100$  では直ちに自発運動が消失し、四エでは 35 分、四炭で 45 分でそれぞれ死滅したが、 $1/1000$  になると直後から正常運動は見られないが、その生存は 18 時間以上にわたつた。上述のような結果は Tween 80 でも、ほとんど同様に認められた。

(2) 水に溶解された駆虫剤の影響

仔虫の場合と同様に、界面活性剤を用いたときよりはるかにいちじるしい薬剤効果が認められた (Fig. 9)。Thymol は  $1/2000$  で最初から不規則なノタクリ運動となり、5 分で自発運動も消失し平均 10 分で全く反応を失つた。そして  $1/20000$  でも平均♂ 3 時間 40 分、♀ 4 時間 10 分で正常運動が消失し、♂ は 22 時間 10 分、♀ 23 時間 30 分で死滅した。BN は  $1/30000$  で最初から正常運動は見られずに 20 分で静止し、♂ 1 時間 45 分、♀ 2 時間で死滅した。HR は  $1/2000$  で 1 分後に静止し、12 分で反応を失つた。そして  $1/20000$  でも正常運動は♂ ♀ ともに平均 20 分続くが、♂ 1 時間 40 分、♀ 1 時間 30 分で自発運動もなくなり、♂ 5 時間 20 分、♀ 5 時間 30 分で死滅した。体の黒化および体表の水疱状膨化は Tween の場合と同様に認められた。四エの  $1/10000$ 、四炭の  $1/2000$  では最初から正常運動が消失したが、24 時間以上にわたつて活潑な自発運動が認められた。Piperazine の反応運動期では、成虫の刺戟に対する反応形式が前述の仔虫の場合と全く同様であつた。

(3) BN エムルジョンの影響

Fig. 10 に示すように、 $1/10000$  で♂は 2 分、♀ 3 分で不規則なふるえ運動となり、♂は 9 分、♀は 12 分で刺戟反応を消失した。 $1/2000$  から  $1/5000$  になると正常運動、自発運動、生存時間も少しづつ延長されたが、 $1/10000$  でもなお正常運動は♂ 9 分、♀ 10 分で消失し、不規則な自発運動から♂ 24 分、♀ 27 分で死滅した。

(4) Ascaridol, 四エ, 四炭の原液の影響

成虫を四エに投入すると約 5 秒で全く静止し、1 分浸漬後に K-Ringer にもどすと直ちに自発運動を示し、3 時間後には正常運動を恢復した。しかし 5 分浸漬では

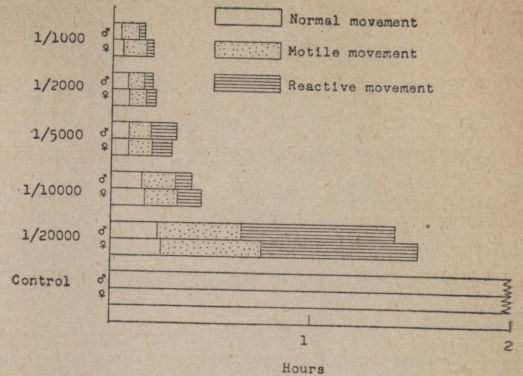


Fig. 10 Movement and survival of adults in emulsion of various dilutions of 1-bromo-naphthol (2)

K-Ringer にもどしても自発運動を恢復するのみで、24 時間後では正常運動は恢復しなかつた。更に 10 分浸漬後では虫体は刺戟反応も示さなくなつた。四炭でも投入後 5 秒で静止し、1 分後に K-Ringer にもどすと刺戟反応は見せるが、24 時間後でも自発運動を恢復しなかつた。5 分浸漬後では刺戟反応も消失した。Ascaridol では 1 分浸漬ですでに刺戟反応すら認められなかつた。

(5) 食道を結紮した成虫におよぼす影響

上述のように、成虫における薬剤効果は仔虫のそれに比べていちじるしく大きい。その原因の 1 として成虫では薬剤が体表から透入すると共に、口から入つた薬剤が消化管壁からも透入するということが考えられる。そこ

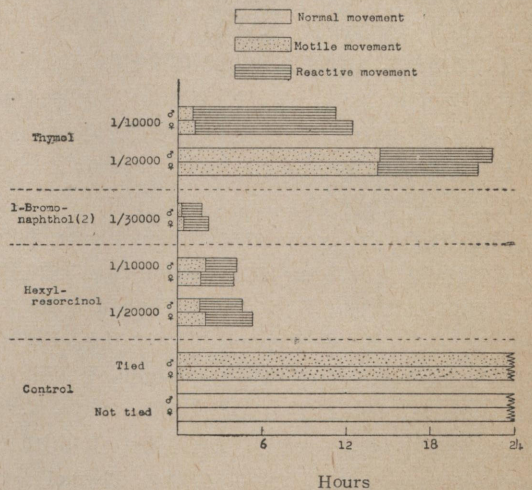


Fig. 11 Effect of anthelmintics on adults which esophagus was tied



で成虫体の食道の中間部を毛髪で結紮し、薬剤が消化管内に入らぬようにして見た。こうすることによつて成虫は K-Ringer 中でも正常運動を示さなくなるが、24 時間以上にわたつて活潑な自発運動が認められたので、これらに対する薬剤の影響を観察した。その結果は Fig. 11 の通りで、結紮をしない Fig. 9 の結果と比較してほとんど差は認められなかつた。

#### 駆虫剤の効果におよぼす各種界面活性剤の影響

前述したように界面活性剤—Tween 20, 80 の添加は、水に難溶な各種鉤虫駆虫剤を高濃度に可溶化する利点をもつと同時に、又その効果をいちじるしく抑制することが明らかにされた。Trim (1944) は HR の濃度を一定にし、その溶液中に活性剤 Sodium oleate を加えてゆくと、HR の透入率が漸減し、ある一定濃度で完全に透入抑制の起ることを認めた。更に Alexander *et al* (1946) は Sodium oleate, Cetyltrimethyl ammonium bromide でも高濃度では同様の抑制を認め、しかも一定の稀釈範囲では逆に HR 透入に促進的に働くことを明らかにした。又万波 (1952) はガマ線虫に対する HR の殺虫効果が、陽イオン活性剤の Cetylmethyldiethyl ammonium menthosulfate, Cetylmethyl piperidinium menthosulfate, 陰イオン活性剤の Sodium oleate, Dioctylester of sodium sulfosuccinic acid, 非イオン活性剤の Span 20 の各々の低濃度で HR の効果が促進され、高濃度で抑制されることを観察し、非イオン活性剤でも Tween 系のそれは促進効果を見ることなしに抑制だけがあつたものと述べている。

そこで筆者は、鉤虫駆虫剤の水溶解性を高めるための活性剤の添加にさいし、(1) 活性剤濃度がどの程度で薬剤効果を抑制するか、又 (2) 種々の活性剤で促進あるいは抑制効果がどのようにあらわれるか、の 2 点について次のような実験を行つた。

界面活性剤は陰イオン活性剤の Sodium oleate, 非イオン活性剤として Span 20 と Tween 20 の 3 種を用い、駆虫剤は比較的高濃度に水溶の Thymol と HR を用いた。仔虫に対する Thymol の濃度は  $1/1000$ , HR は  $1/2000$  とし、成虫に対しては HR のみを用いその濃度は  $1/20000$  とした。成虫で  $1/20000$  の濃度を用いたのは、これ以上の濃度では効果が大き過ぎて促進効果を見落すことをおそれたからである。この一定濃度の Thymol および HR に、0.001%, 0.002%, 0.005%...0.1%, 0.2% および 0.5% になるよう活性剤を添加し、仔・成虫

におよぼす影響を観察した。Sodium oleate は K-Ringer で油酸イオンと Ca イオンの結合による沈澱が出来るので、稀釈には 0.85% NaCl 液を用いた。

#### (1) Sodium oleate

仔虫に対する Thymol 効果への影響は Fig. 12 に示すように、Sodium oleate 量が 0.001% から 0.01% と増量してもその効果にはなんらの影響も与えることなしに、0.2% から急激な抑制が見られた。又 HR では Sodium oleate の 0.001% ~ 0.01% の範囲で僅かに促進らしい傾向が認められ、そして 0.02% から抑制があらわれた (Fig. 13)。

成虫に対する HR 効果は Fig. 14 に示すように、Sodium oleate の 0.002% から次第に促進があらわれ、0.02% から 0.1% の間で最大となり、0.2% から抑制があらわれた。

#### (2) Span 20

仔虫に対する Thymol 効果への Span 20 の影響は Fig. 15 に示すように 0.002% の低濃度から徐々に抑制が見られ始め、0.1% からそれは更に強く見られた。HR では Span 20 の 0.02% から抑制が起り、0.05% から 0.1% になると更に強く抑制された (Fig. 16)。

成虫に対する HR でも Fig. 17 のように促進を見ることなく 0.1% から急速に抑制された。

#### (3) Tween 20

仔虫に対する Thymol 効果への Tween 20 の影響は Fig. 18 に示すように Span 20 の場合と同様、促進を見ることなく 0.1% から抑制があらわれた。HR でも促進を見ることなしに、0.05% から急速な抑制が見られた (Fig. 19)。

成虫に対する HR 効果でも Tween 20 は促進効果を示さずに、0.1% からの強い抑制だけが顕著に認められた (Fig. 20)。

上述の Sodium oleate による薬剤効果の促進又は抑制は、Alexander からも述べているように活性剤の添加によつて溶液の界面張力が下降し、それと同時に薬剤の透入が増加し、そしてそれ以上に活性剤の濃度が増加すると再び界面張力が上昇することにより薬剤の透入が減少するのであろう。Span 20 や Tween 20 においては HR あるいは Thymol との結合が強固なために、石鹼を残して薬剤分子の透入が困難となり、抑制だけが見られたと考えられる。

いずれにしても薬剤の効果を抑制しないためには、活性剤の濃度は Sodium oleate ならば 0.01% 以下、



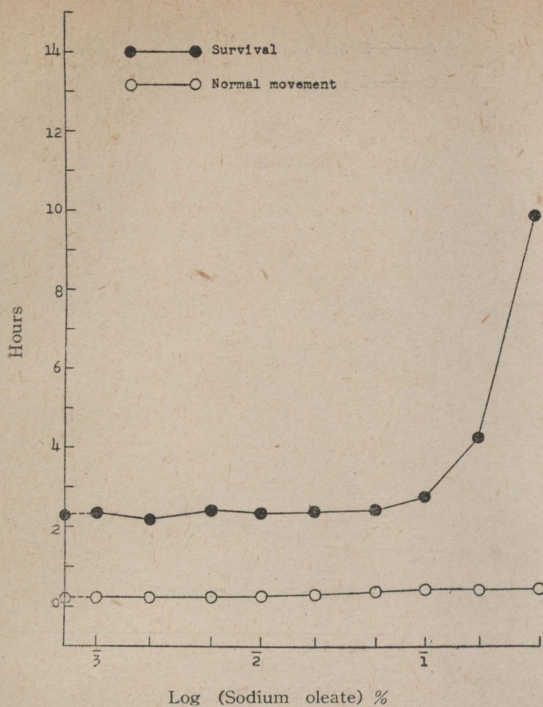


Fig. 12 Movement and survival of larvae in 1/1000 thymol solution adding various amounts of sodium oleate

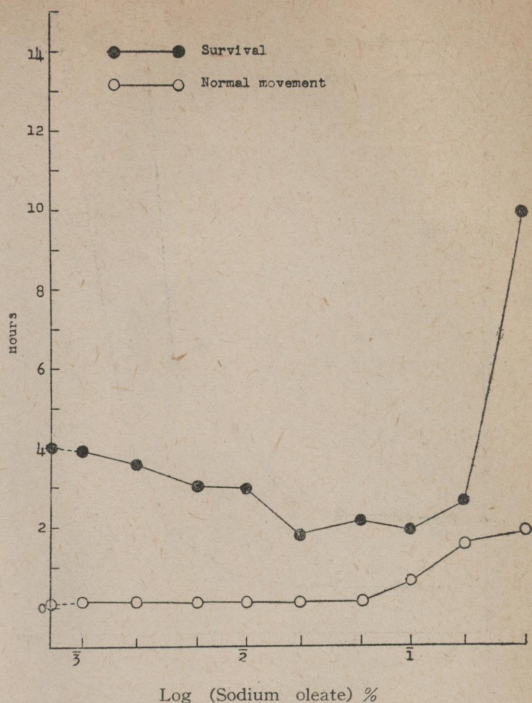


Fig. 14 Movement and survival of adults in 1/20000 hexylresorcinol solution adding various amounts of sodium oleate

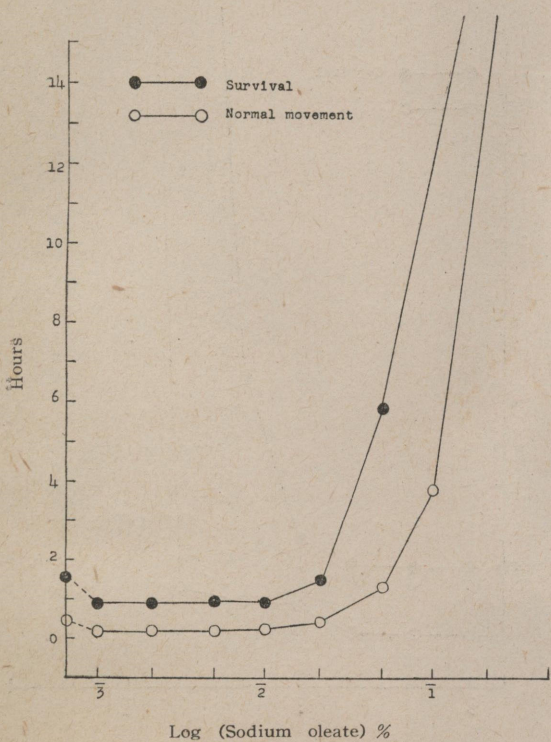


Fig. 13 Movement and survival of larvae in 1/2000 hexylresorcinol solution adding various amounts of sodium oleate

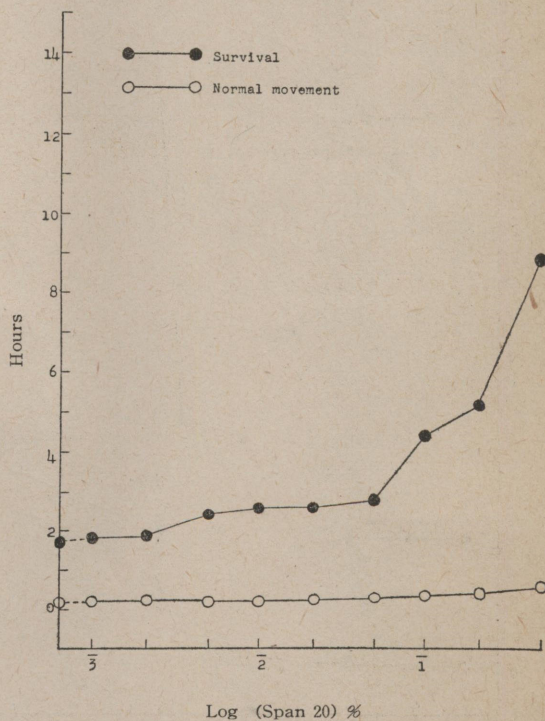


Fig. 15 Movement and survival of larvae in 1/1000 thymol solution adding various amounts of Span 20



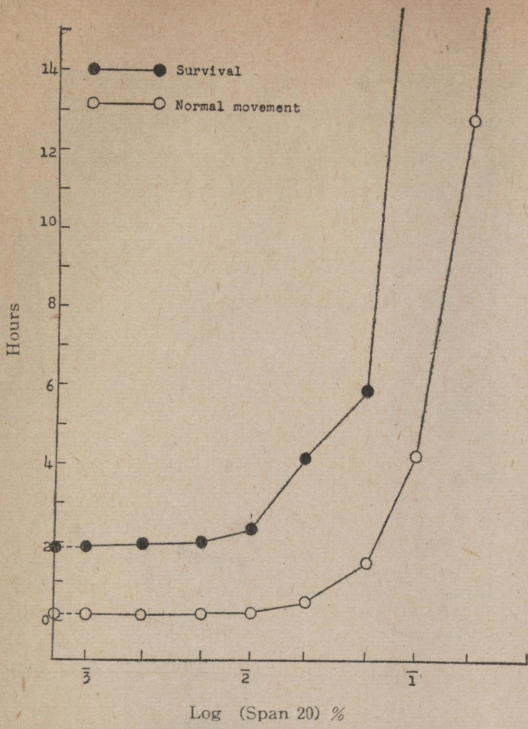


Fig. 16 Movement and survival of larvae in 1/2000 hexylresorcinol solution adding various amounts of Span 20

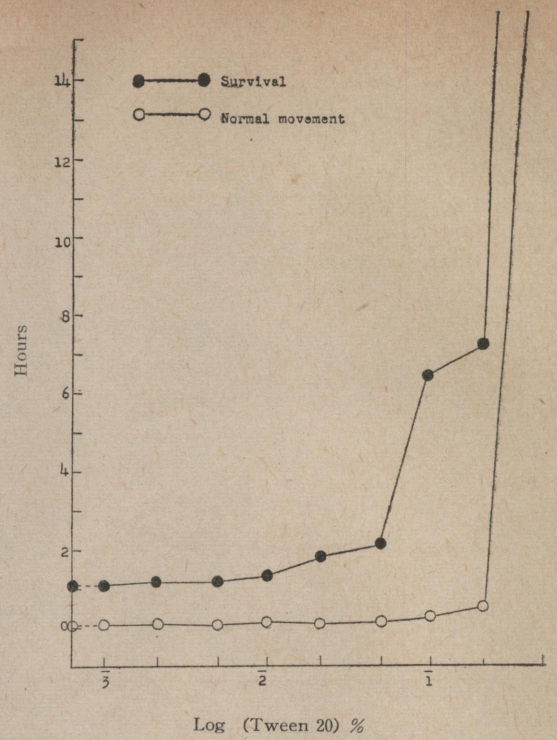


Fig. 18 Movement and survival of larvae in 1/1000 thymol solution adding various amounts of Tween 20

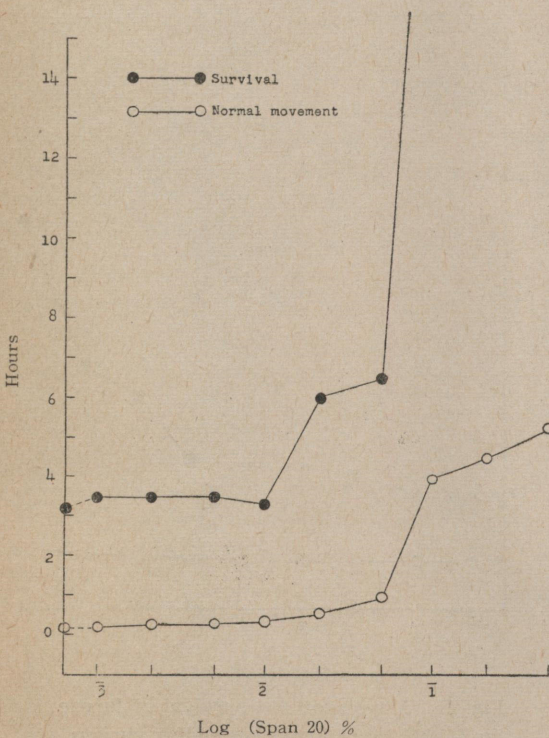


Fig. 17 Movement and survival of adults in 1/20000 hexylresorcinol solution adding various amounts of Span 20

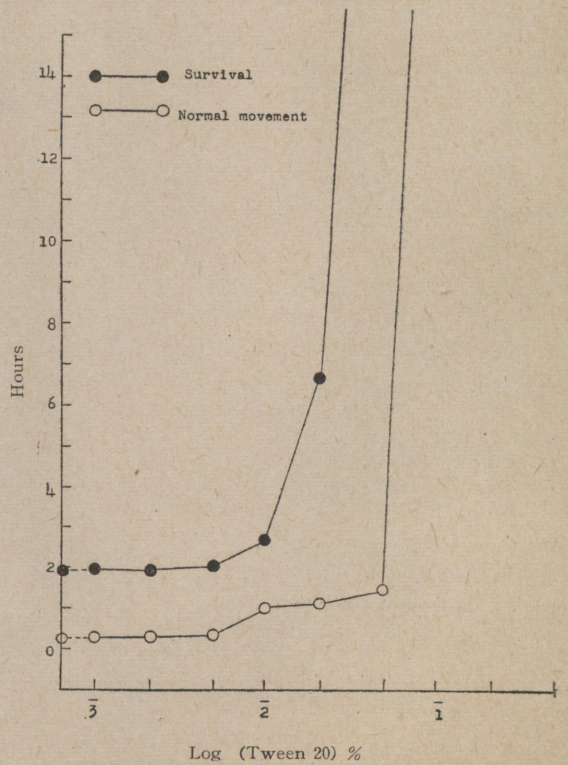


Fig. 19 Movement and survival of larvae in 1/2000 hexylresorcinol solution adding various amounts of Tween 20



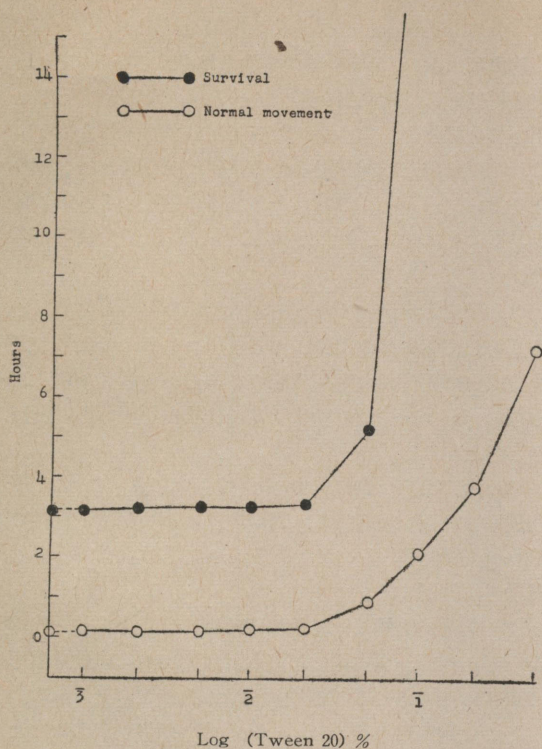


Fig. 20 Movement and survival of adults in 1/20000 hexylresorcinol solution adding various amounts of Tween 20

Span 20 で 0.002 % 以下, Tween 20 で 0.02 % 以下でなければならぬが, これらの低濃度では難溶な鉤虫駆虫剤を水への可溶限界量以上に可溶化ないしエミュルジョン化することは出来ない。

論 議

既にまえがきに提出したように, 鉤虫駆虫剤の *in vitro* での効果判定にあたって最も問題になるのは, (1) 水に難溶な鉤虫駆虫剤をどのような稀釈方法によつて作用させるか, (2) 材料として成虫を用いるべきか, あるいは仔虫を用いても可能か, の 2 点であると考えられる。

水に難溶な駆虫剤を 100 倍, 1000 倍というように高濃度に溶解させる現在最もすぐれた方法は, 界面活性剤とりわけ HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) 値の高い Tween 系を用いることである。しかも Tween 系活性剤の生体に対する毒性は一般に少いとされ, 筆者も鉤仔虫の行動には 30 % の濃度でも影響を認めず, 成虫において若干それを認めるのみであつた。しかし界面活

性剤には薬剤の効果を促進あるいは抑制する現象が見られ, 特に Tween 系は低濃度から抑制効果をあらわす。そして抑制効果が現われないような活性剤の濃度では, 駆虫剤をその可溶限界量以上に水に可溶化ないしエミュルジョン化することは不可能である。福本および松本は Tween 20 又は 80 を用いて駆虫剤を水に溶解し, その効果を観察しているが, Tween には薬剤効果の抑制作用のあるということに気がついていない。

薬剤が溶解したときの安定度, 作用条件の一定等から考えれば, 駆虫剤の可溶限界量まで水に直接溶解して虫体に作用させるのが最も望ましい。そしてこれは成虫に対しては最もすぐれた方法であると思われるが, この方法は現在迄全く行われていない。しかし Thymol, HR のような比較的高濃度に水溶するものは別として, BN, 四エ, 四炭等はその水への可溶量では仔虫に対してなんらの効果も認められない。

又, Propylene glycol はその強い毒性の点から成虫に対して用いることは出来ず, 辛うじてエミュルジョンになり得るのは BN のみであり, 原液として使用し得るものは Ascaridol, 四エ, 四炭だけである。

一方, どのような溶解方法を用いても, 又作用温度が仔虫は 20~22°C, 成虫は 37°C ということを考慮に入れても, 駆虫剤の仔虫に対する効果と成虫に対するそれとの間には, 大きな隔りが認められ, 成虫での効果は仔虫のそれに比べていちじるしく大きい。又種々の方法によつて溶解された各種駆虫剤の仔, 成虫に対する効果を, その大きさの順に列記すれば次のようになる。

水溶の場合

仔虫 BN > HR > Thymol > 四エ = 四炭  
成虫 BN > HR > Thymol > 四エ = 四炭

Tween 20 を用いた場合

仔虫 Ascaridol > 四エ = 四炭 > Thymol = BN = HR  
成虫 Ascaridol > BN > Thymol > HR > 四エ = 四炭

Propylene glycol を用いた場合

仔虫 BN > HR > Thymol  
原液のまま用いた場合

仔虫 Ascaridol > 四炭 > 四エ  
成虫 Ascaridol > 四炭 > 四エ

すなわち同じ仔虫でも又成虫でも, 駆虫剤の稀釈方法によつて効果の系列に違いが認められる。又駆虫剤を水溶の状態で作ると, 仔虫において得られた効果の系列は成虫のそれとよく一致するが, Tween 20 を用いて水溶にした場合は, 仔虫における効果系列と成



虫のそれとの間にかかなりの相違が認められる。

薬剤の接触という観点から考えられる仔虫と成虫の体制上の大きな相違は、体表構造、口腔の閉鎖状態の有無、体の大きさ等にあると思われる。仔虫は皮鞘で包まれ口は外に開いていないが、成虫は吸血のための強い吸引力をもった食道部を従える口を有するので、特に成虫では薬剤が体表から接触すると共に、*in vitro* では消化管壁からの透入ということも考えられるが、これは Fig. 11 の実験からして一応無視しても差支えないと思われる。そして虫体の大きさも成虫は仔虫に比べてはるかに大きく、したがって体積に比して表面積は仔虫の方が広く薬剤の接触面も広いわけであるが、効果は逆に成虫に強くあらわれているから、この点も一応考慮の外に置いてよいであろう。しかし仔虫の体表が皮鞘でおおわれ、その故に外界の種々の物理的・化学的条件に対する抵抗も強く、そして脱鞘した仔虫の抵抗力が著しく減ずることは、既に多くの学者によつて認められている処である。成虫が恒温動物の腸内という比較的単純な変動の少ない環境に生存するのに比べて、仔虫は外界の複雑な環境条件下で長期にわたつて感染機会をまつという生態的な面からも、仔虫の皮鞘の存在はきわめて好適な適応ともいえるわけである。そしてこれが仔虫と成虫の間における薬剤効果のいちじるしい相違の最大の原因になつていふと考えられる。

すなわち仔虫と成虫とでは薬剤の透入に大きな相違があり、駆虫剤は成虫に対して用いるものであり、又今日既に成虫の生体外飼育が可能であるという諸点から、駆虫剤の *in vitro* での効果判定には成虫を用いるのが適当と考えられる。

以上述べてきた種々の観点からして筆者は、鉤虫駆虫剤の *in vitro* での効果判定は次のような方式によつて行われることを提唱したい。(1) 材料は成虫を用いる。(2) 薬剤は可容量の水溶として作用させる。(3) 若し(2)が不可能の際は界面活性剤を用いるが、これには薬剤効果の促進あるいは抑制作用のあることに注意する。しかし(4) Thymol の1000倍、HR の2000倍のように比較的少量に水に可溶性な薬剤については、それらとの比較において仔虫を材料にすることも可能で、又(5) エムルジョンになるものは BN との比較が出来、(6) 油剤のものは原液のまま使用して Ascaridol, 四エ、四炭との比較が出来る、と考えられる。

## 要 約

鉤虫駆虫剤の *in vitro* での効果判定にさいして、(1) 実験材料として鉤成虫を用いるべきか、あるいは仔虫を用いても可能か、(2) 水に難溶性な駆虫剤を作用させるには、その稀釈方法が作用効果の重要な一要因となると考えられるが、そこでどのような方法を用いるのがよいか、の2点について検討を試み、次のような結果を得た。

(1) 仔虫と成虫とでは薬剤効果にいちじるしい差がある。そして駆虫剤は成虫に対して用いるものであり、又今日成虫の生体外飼育が可能であるという諸点から、駆虫剤の *in vitro* での効果判定には成虫を用いるのが適当と考えられる。

(2) 水に難溶性な鉤虫駆虫剤を高濃度に水溶にする現在最もすぐれた方法は、HLB 値の高い界面活性剤の Tween 系を用いることであるが、これは低濃度から薬剤効果を抑制する。

(3) 薬剤が溶解したときの安定度、作用条件の一定等から考えれば、駆虫剤の可溶限界量まで水に直接溶解して虫体に作用させるのが最も適当な方法と考えられる。

そこで鉤虫駆虫剤の *in vitro* での効果判定は次のような方式によつて行われることを提唱する。(1) 材料は成虫を用いる。(2) 薬剤は可容量の水溶として作用させる。(3) 若し(2)が不可能の際は Tween 系界面活性剤を用いるが、これには薬剤効果の抑制作用のあることに注意する。しかし(4) Thymol の1000倍、Hexylresorcinol の2000倍のように比較的少量に水に可溶性な薬剤については仔虫を材料にすることも可能で、又(5) エムルジョンになるものは BN との比較が出来、(6) 油剤のものは原液のまま使用して Ascaridol, 四塩化エチレン、四塩化炭素との比較が出来る。

稿を終るにあたり、終始御指導御鞭撻をたまわり、御校閥の労をとられた部長小宮義孝博士に深く感謝の意を表す。又御助言を頂いた石崎達博士、実験にあつて種々御援助を願つた田中清子嬢に感謝する。

## 文 献

- 1) Alexander, A. E., et al. (1946): The biological activity of phenolic compounds. The effect of surface active substances upon the penetration of hexyl resorcinol in to *Ascaris lumbricoides var suis*. Proc. Roy. Soc. Ser. B, 133, 220-234.
- 2) 福本圭士 (1955): 鉤虫の呼吸及び組織呼吸に関



する研究, 寄雑, 4, 180. —3) 岩田繁雄・他 (1953) : 一新鉤虫駆虫剤の研究, 4 ブローム 1 ナフトールに就て, 大阪医大雑, 14, 26. —4) 岩田繁雄・他 (1954) : 鉤虫駆虫剤の効果判定について, 寄雑, 3, 125. —岩田繁雄・他 (1954) : 1 ブロム 2 ナフトールの犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* 成虫に及ぼす影響, パンフレット. —6) 桐野明夫 (1952) : ヘキシールレゾルシン並びに四塩化エチレンの作用機転に関する実験的研究, 第一報~第三報, 岡山医雑, 64, 47-59. —7) Komiya, Y., Yasuraoka, K. & Sato, A., (1956) : Survival of *Ancylostoma caninum* *in vitro*. (1), Jap. J. Med Sci. Biol., 9, 283-292. —8) 小宮義孝 (1955) : 鉤虫駆虫剤, 診療, 8, 40-48. —9) Lamson, P. D., et al. (1952) : Anthelmintic studies on alkylhydroxybenzenes, J. Pharm. Exp. Therap. 53, 198. —10) 万波忠三郎 (1952) : Cyclohexylchlororesorcinol のガマ線虫 (*Spinicauda japonica* Wilkie) 殺滅効力におよぼす界面活性剤の影響, 日薬理雑, 48, 159-171. —11) 松本季彦 (1955) : 犬鉤虫成虫の体外飼育法による各種駆虫剤の殺虫効果判定に関する研究, 大阪市大雑, 4, 386-400. —12) 美間博之 (1953) : 界面活性剤の生理作用と新しい応用——特に非イオン性活性剤について——, 化学の領域, 7, 689-698. —13) 中村逸郎 (1950) : 豚蛔虫駆虫剤 (就中アルキルレゾルシン) の駆虫機転に関する研究 (第 1 報~第 6 報), 大阪医大雑, 11, 84-91, 12, 28-41. —14) 日本化学会編 (1956) : 実験化学, 7, 界面化学, 丸善. —15) 大浜信賢 (1941) : *Necator americanus* 並び *Ancylostoma duodenale* の成熟仔虫の諸種化学薬品に対する抵抗試験, 台湾医雑, 40, 2100-2113. —16) 笹田丁二 (1934) : *Ancylostoma* 種 *Necator* 種人十二指腸虫並びに東洋毛様線虫感染仔虫に対する諸種化学薬品の影響について, 慶応医学, 14, 1331-1364. —17) Trim, A. R. (1944) : Experiments on the modes of action of hexylresorcinol as an anthelmintic. Parasit. 35, 209. —18) 山崎英正 (1955) : 駆虫薬の薬理, 診療, 8, 21-31. —19) 安羅岡一男 (1955) : 鉤虫仔虫の行動に関する研究,

1, 犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* 感染仔虫の温度に対する動性 Kinesis について, 寄雑, 4, 74-78. —20) 安羅岡一男 (1956) : 犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* 成虫の *in vitro* での行動に関する研究, 寄雑, 5, 457-461.

### Summary

The effect of seven anthelmintics (thymol, 1-bromo-naphthol (2), hexylresorcinol, ascaridol, tetrachloroethylen, tetrachlorocarbon and piperazine) on the behavior of the larvae and adults of *Ancylostoma caninum* *in vitro* was studied.

Anthelmintics for hookworm is slightly soluble in water as shown in Table 1, so various dilution methods were performed. Although the solubility of anthelmintics in water was increased by the addition of surface active agents such as Tween 20 or 80, Tween, at the same time, exert an inhibitory effect on anthelmintics. The resistance of the larvae against the anthelmintics was stronger than that of the adults.

The assay of effectiveness of anthelmintics *in vitro* was considered to be performed by the following procedures. (1) The adult is to be used as materials. (2) Anthelmintics is to be diluted directly with water within the limits of the solubility. (3) If the procedure of (2) is impossible, anthelmintics is to be made soluble in water by use of the surface active agents such as Tween 20 or 80. (4) The larvae may be able to be used as materials for some anthelmintics which shows comparatively high solubility in water such as thymol and hexylresorcinol. (5) The effect of anthelmintics capable becoming an emulsion in water may be compared with that of 1-bromo-naphthol (2). (6) Liquid anthelmintics may be compared with ascaridol, tetrachloroethylen and tetrachlorocarbon without diluting.