

二、三の新抗生物質の培養赤痢アメーバに対する作用

高 田 季 久

大阪大学微生物病研究所寄生虫原虫学部*

(部長 森下薫教授 主任 猪木正三教授)

(昭和 32 年 1 月 18 日受領)

緒 言

抗生物質の研究の進歩につれて、真性細菌類に対して効力があるのみならず、同時に真菌類並に原虫類に対しても効力を示す物質、或は後者に選択的に働く様な抗生物質の発見報告が、盛に行われる様になつて来た。

特に抗原虫剤の研究は、その一部生物学的性状の類似性から、抗ガン性抗生物質の研究と相俟つて、近年非常に重要視される様になつて来ている。

筆者は、數年来新しく発見報告されている多くの新抗生物質及びその他の化学薬品等に就て、その抗原虫作用特に赤痢アメーバに対する作用に就て種々検討しているが、その内 *in vitro* に於て、他と比較し、かなり優秀な抗アメーバ作用を示し、且その臨床的応用も有望と思われる 4 種の抗生物質を見出したので、それ等の抗アメーバ作用の概要を報告すると共に、併せて他の數種の既知の抗アメーバ剤に就ての観察成績をも附記し、これと比較検討したいと思う。

実験材料

試供赤痢アメーバ：比較的培養成績の安定し、且各々他の株と比較して生物学的に特長をもつと思える次の 4 株のアメーバを使用した。

Y 株：1950 年 11 月患者便中の栄養型を分離したもの

H 株：1951 年 5 月同上分離培養

U 株：1952 年 5 月 "

W 株：1953 年 1 月患者回復期のチステより分離

各株共に後述の W. B. 1 培地により継代培養を行つており、37°C 48 時間後に最も良く増殖する。

各アメーバ株は、使用に際して、あらかじめ多くの培地に充分増殖せしめ、48 時間後にそれ等を集め、1 cc 中

SUEHISA TAKADA: On the *in vitro* antiamebic actions of a few new antibiotics. (Department of Parasitology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University.)

* 現在所属 大阪市立大学医学部医動物学教室

に 15 万乃至 20 万前後の原虫を含む浮游液として使用した。

使用培養基：実験に必要な量のアメーバを得るため、増殖用培地として、二層性の W. B. 1 培地を用い、薬剤検定用としては、全血加液体培地を使用した。

これ等 2 種の培地は、共に猪木等 (1950, 1951, 1953) の考案報告によるものであり、その優秀性を確認し賞用している培地である。

被検薬剤：第 1 表に示した 4 種の抗生物質であり、

第 1 表 試供抗生物質及びその生産菌

1) Eurocidin (中沢等 1953)	<i>Streptomyces albireticuli</i>
2) Trichomycin (細谷等 1952)	<i>St. hachijoensis</i>
3) Candimycin (柴田等 1954)	<i>St. ehimeensis</i>
4) Candimycin-Na (上記ナトリウム塩)	

その内 Eurocidin (E), Candimycin (C) 及び Candimycin Na (C-Na) は共に武田薬工研究所に於て発見されたものであり、(中沢等, 1953, 1955, 柴田等 1954) 直接研究所より製品の分与を受けた。

又 Trichomycin (細谷等, 1952) (T) は三洋化学株式会社の製品であり、製品番号 "L-74 Ae" 1900 u/mg である。

実験方法

次に述べる二つの方法により、増殖阻止作用及び直達作用(殺滅作用)を観察した。

増殖阻止作用の検定：被検抗生物質を一定濃度加えた検定用培地にアメーバを移植し、その後、日を追つてその生育状況を観察する方法であり、主としてアメーバの増殖阻止作用を見る実験である。その順を追つて記載すると次の様になる。

1) 各抗生物質 5 mg を直接培地液を用いて 1000 倍溶液とし、これを原液とする*。

2) 上記の各原液を培地液により所要の濃度に稀釈し、その各々 4 cc 宛を 3 本の試験管に分注する。

3) 各試験管に米粉を 2~3 白金耳宛加える。

4) 各試験管に前記アメーバ浮游液を約 0.2~0.3 cc 宛移植する。

5) その後 37°C で培養し、各々 24 時間、48 時間、時には、72 時間後に、各試験管に於けるアメーバの生育状況を検査する。

アメーバの生死の判定は、その形態及び 1% エオジン染色法により判定し、最終決定には、培養によつて判断した。

以上の各場合、薬剤の入れぬ対照実験を行うのは勿論であるが、各実験は、各アメーバ株及び各薬剤について、3 回乃至 6 回以上繰返して行い、その総合成績を採つた。

直達作用の検定法： 各抗生物質の一定濃度により、アメーバがどの様な影響を受けるかを知る方法で、主として運動性及び生死を目標として 37°C の保温顕微鏡下に於て観察した。

先ずアメーバ浮游液の少量をスライドガラス上 2 カ所に採り一方を対照として培地液を同量加え、他方には、それと同量の各抗生物質の原液 (1000 倍液) を加えて、各々を 2000 倍となる様にし、両方共手早く混和し、その上にカバーガラスを載せ、周囲をワセリン又は流動パラフィンで囲み水分の蒸発を防ぎ、時間を追つて観察した。

アメーバの生死に就ては、型の如く核の状況、細胞質中の顆粒の状態により推定すると共に、最終判定には、1% エオジン液による判定法を用いた。

以上に述べた二種の方法により各抗生物質の作用を観察したが、之等と対照の意味に於て、同時に塩酸エメチン及びオーレオマイシン等を用いて適時並行実験を行つた。

* Trichomycin 及び C-Na は比較的楽に培地液に溶けるが、E 及び C は次の様な一定の手順を経ないと溶け難い。即ち、E は原末 5 mg を先ず N/10 HCl 1.5 cc に充分溶解し、次いで N/10 NaOH 1.5 cc をもつて徐々に混和しながら中性に戻し、その後培地液 2 cc を加えて全量 5 cc として原液とする。次ぎに C の場合は、原末 5 mg を 1 cc のエチレンジグリコールに充分溶解し、之に同じく培地液 4 cc を徐々に加えて、原液とする)

実験成績

I 増殖抑制作用

4 種の抗生物質についての成績は、各々第 2, 3, 4 表に別個に表示したが、4 種共ほぼ同様の成績を示した。

第 2 表 Trichomycin の抗アメーバ作用

アメーバ株		Y	H	W	U
濃度	培養時間	24	48	72	24
		×	1000	---	---
	1200	---	---	---	---
	1400	---	⊕	---	---
	1600	---	+ ⊕	---	---
	1800	---	+ ±	---	---
	2000	⊕	---	++ +	⊕
	2200	+	---	++ +	±
	2400	+	---	++	+
	2600	+	---	++	+
	3000	++	---	++	++
	5000	++	---	++	++
	8000	++	⊕	---	---
	10000	++	+	±	++
	11000	++	++	±	++
	12000	++	++	±	++
	14000	++	++	+	++
対	照	++	++	++	++

註 + 1 視野 (×100) にアメーバ 1 コ以下
 ++ " " 2 コ~10 コ
 +++ " " 10 コ以上
 --- アメーバ陰性又は死滅
 ± アメーバ陰性又は陽性 (試験管に依り)

第 3 表 Eurocidin の抗アメーバ作用

アメーバ株		Y	H	W	U
濃度	培養時間	24	48	24	48
		×	10000	---	---
	12000	---	⊕ ⊕	---	---
	14000	---	± ± ±	±	---
	16000	⊕	+++	⊕	---
	18000	+	+++	+	⊕
	20000	+	⊕	+++	+
	22000	++	±	+++	++
	24000	++	+	+++	++
対	照	++	++	+++	+++

第 4 表 Candimycin 及びその Na 塩の抗アメーバ作用

薬 物	Candimycin					Candimycin-Na								
	アメーバ株		Y	W	U	Y	H	W	U	Y	H	W	U	
培養時間														
濃度														
×	10000	-	-	-	-	-				±	-	-	-	
	12000									±	-	-	-	
	18000									⊕	-	-	-	
	20000	-	-	⊕	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	22000										⊕	-		
	25000			+	⊕	-				+	±	±	-	⊕
	30000	±	-	+	+	+	⊕	-	++	-	+	-	+	
	35000	⊕	-				+	-	++	⊕				
	40000	+	-	+	+	+	+	-	++	±				
	80000	++	-											
	100000	++	-	+	++		++	-			++	⊕		
	120000	++	-				++	-			++	+		
	140000	++	⊕	+	++		++	⊕						
	対 照	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

即ちH株を除いた他の株に対しては、24時間観察で平均して各々、T……20,000倍、E……16,000倍、C……25,000倍、C-Na……22,000倍、の濃度又はそれ以上の高濃度を含む培地では、アメーバは死滅し認められず、48時間後では、各々T……80,000倍、E……18,000倍、C……140,000倍、C-Na……100,000倍程度で十分に増殖を抑制する様である。

各薬剤について24時間目と48時間後の成績は、かなり異なり、場合によつては、数倍の差が見られるが、今これをTを例に取つて説明すると、Y株の場合は24時間後では1:20,000以上の濃度ではすべて原虫が死滅して見られなくなるが、之は移植したアメーバが薬剤により殺滅されたものと考えられ、広義のCidal作用と見なされる。次いで、20,000倍から80,000倍の間では、24時間後に生き残つてはいるが、全く増殖が阻止されているか又は、一部増殖したものでも薬剤作用に抗し切れず、48時間後には遂に死滅するのであろうと考えられ、広義のStatic作用と思考される。以上の事は他の3種の抗生物質に就ても全く同様の事が云えるのであつて、増殖抑制作用の判定には、48時間目が適当と思われる。

ただH株に対する作用のみは、すべての場合他の株の例と比較して悪い成績を得た。同様の例は、ただ今回の

第5表 塩酸エメチン及びオーレオマイシンの抗アメーバ作用

薬 物	塩酸エメチン						オーレオマイシン		
	アメーバ株		Y	W	Y	Y	Y	Y	Y
培養時間									
濃度									
×	1000	-	-	-	-	-	-	-	-
	1500								
	2000	⊕	-	-	⊕	-	-		
	2500								
	4000	+	-	-	+	-	-	-	-
	5000								
	8000	++	⊕	-	+	⊕	±		
	10000	++	+	±	+	-	±	⊕	-
	15000							+	⊕
	20000							++	+
25000							++	++	
対 照	++	++	++	++	++	++	++	++	++

場合のみならず、他の既知の抗アメーバ薬剤の効力検定を行つた時にも筆者の経験した事であり、非常に変異し易く、且株によつて、しばしば特異な性質を示す赤痢ア

第6表 4種の既知薬剤に依る抗アメーバ作用

薬物	Milibis			Ca-rbamisin			Emetine-HCl			Atabrine		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
培養時間												
濃度												
× 400	—	—	—									
500	—	—	—									
700	±	—	—									
800	±	—	—	—	—	—						
1000	+	±	—	±	—	—				±	—	—
1500							—	—	—	±	—	—
2000	++	—	—	±	—	—	±	—	—	+	±	—
2500							+	—	—	++	+	—
3000	++	—	—	++	—	—				++	+	—
4000	++	—	—	++	—	—						
4500	+++	±	—	+	±	—						
5000	+++	±	±	++	±	—						
6000	++	±	±	+	±	—						
対照	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

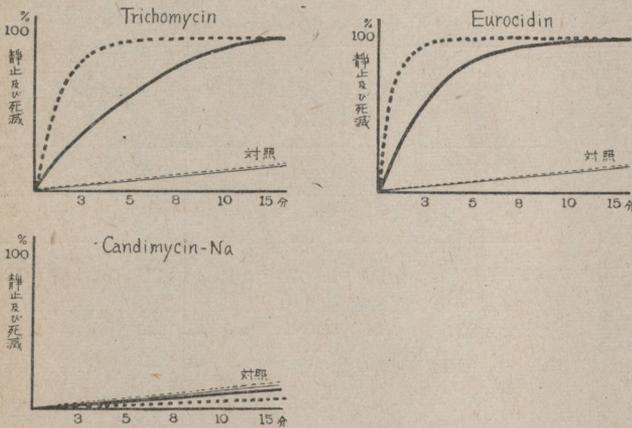
II 直達作用について

材料の都合上、被検薬剤としては、T, E, C-Na, 及び塩酸エメチンの4種を用い、試供アメーバとしては、最も運動の活潑であつたW株を用いた。薬剤の濃度、観察時間及び方法等にまだ検討すべき点はあるが、第1図に示した如く、各薬剤のアメーバに対する直達作用の大概を知り得るものと思ふ。

即ち、4種の内 E, が最もその作用が強く、T が之に次ぎ、C-Na 及びエメチンは全くその作用を認めなかつた。E及びTの場合共に先ず運動静止が著明に起り、殆んどすべてのアメーバが1分乃至3分以内に静止し、之に續いて徐々に死滅原虫数が増加し、15分後にはすべてのアメーバは死滅した。之に反して C-Na の場合は、当初よりむしろ運動が活潑となる様であり、30分以内では、対照と大差を認めなかつた。又塩酸エメチンの場合も、一部運動が抑えられる様ではあつたが、明らかな原虫殺滅効果は認められなかつた。

総括考按

種々な、薬剤の抗アメーバ作用を検定する場合、他の細菌及び原虫に於ける時と同様に、*in vitro* の試験、動物実験、及び臨床実験の三者を併用する事が望ましいが、しかし最近の様に多くの新抗生物質及び各種の化学薬剤が続々と創製される場合、其の一つ一つに就て上述の3種の方法を行う事は、非常に難しい事である。この点 *in vitro* の試験によつて、その抗アメーバ作用の大概を推定する方法が最も簡単であり又有力な方法でもある。ただしその場合注意しなければならぬ事は、赤痢アメーバの純培養は今の所不可能であり、その培養には必ず他の何等かの細菌又は共棲生物を必要とする。そのため特に抗菌作用の強い物質を検定する場合、その薬剤が果して直接アメーバに作用したのか又は、先ず共棲細菌に作用して、二次的にアメーバの發育を阻止したものであるかの判定がかなり面倒な問題となる。しかしながら、幸にして本実験に用いた4種の抗生物質は、一般に真性細菌に対しては全く無効であるか又は非常に作用が弱い事が確認されており、筆者の得た経験からも上述の様な憂は全く無いものと思われる。この様な物質を用いてその *in vitro* の抗アメーバ作用を知るには、今回筆者の行つた方法が最も適切であり、且有意義なものであると考える。



第1図 各抗生物質の赤痢アメーバに対する直達作用

- (註) 1. 運動静止曲線
 ———— 死滅曲線
 2. 各抗生物質×2000液使用
 3. W株アメーバを使用
 4. エチメンは作用を認めず

アメーバにとつては、良く有り勝ちな事であり、その詳細な理由については、未だ不明である。しかし、第5、6表に示した、オーレオマイシン、エメチンをはじめ各種の既知の抗アメーバ剤の成績と比較して、4種共に遙かに優れた成績を示しており、かなりの抗アメーバ作用を持つているものと考えられる。

多くの菌体抽出物質がそうである様に、本実験に用いた 4 種の抗生物質も、毒性が強く、溶血作用もかなり強度であつて、*in vitro* の成績のみをもつて直ちに臨床的にも有効であると断定出来ないのは勿論であるが、しかし細谷等 (1954) はすでに T を経口的に与えて人間のカンディダ症 (Candida 症) 及びトリコモナス症に有効であつた事を報告されている様であり、その製剤方法を改善し毒性を下げる事により、かなりの臨床効果が期待出来るのではないかと思う。この点将来の動物実験及び臨床試験等の成果を期待したい。

結 論

筆者は、先に猪木等の報告した全血加液体培地が、*in vitro* の抗アメーバ薬剤検定に好適のものであることを再確認すると共に、新抗生物質 Trichomycin, Eurocidin, Candimycin 及び Candimycin-Na が *in vitro* に於てかなりの抗アメーバ作用を示す事を認めた。その成績は次に示す通りである。

1. 増殖抑制作用は、各々 T \cdots 80,000 倍, E \cdots 18,000 倍, C \cdots 140,000 倍, C-Na \cdots 100,000 倍以上の濃度で認められた。

2. 直達作用は、各抗生物質 2000 倍の濃度で T 及び E は 15 分間で全アメーバを死滅せしめたが、C-Na は 15 分間観察して何等の作用をも認めなかつた。

終に御校閲を賜つた森下教授及び猪木教授に深謝すると共に、本研究に対し試料の分与を受けた、本学川俣教授、及び武田薬工研究所浜田学兄に対して心から感謝します。

(本論文要旨は第 23 回日本寄生虫学会総会に於て発表した)

追記: Trichomycin を提供された三洋化学株式会社は現在、藤沢薬品株式会社に合併し、共に Trichomycin の精製に努力しかなり高単位の製品の創製に成功している様である。

文 献

1) 浜田義雄 (1955): *Trichomonas vaginalis* の生物学的研究, (第 6 報), Eurocidin の抗 *Trichomonas*

作用, 阪大医誌, 7(3), 237-245. —2) 細谷省吾 (1953): 抗原虫抗カビ抗酵母性抗生物質トリコマイシン, 薬学研究, 25, 435-441. —3) 細谷省吾・小松信彦・添田百枝・山口辰良・園田洋子 (1952): 抗トリコモナス抗カビ作用を有する新抗生物質 Trichomycin に就て, J. Antibiotics, 5(10), 564-566. —4) 猪木正三・永井光・高田季久・北浦敏行 (1950): 赤痢アメーバの培養に関する研究, 第 1 報, 余等の所謂全血加培地に就て, 阪大医誌, 2(2), 71-84. —5) Inoki, S., Nagai, A., Kitaura, T., Takada, S. and Nakabayashi, T., (1951): Studies on the new culture methods of *Endamoeba histolytica*. Med. J. Osaka Univ., 2, 53-72. —6) Inoki, S., Takada, S. and Nakabayashi, T., (1953): New culture methods for *Endamoeba histolytica*. Amer. J. Clin. Path., 23(2), 197-199. —7) 中沢鴻一・柴田元雄・田中一雄・三宅彰 (1953): 放射状菌に関する研究新抗カビ抗酵母物質 Eurocidin について, 第 72 回日本抗生物質学術協議会発表, 28, 7. 24. —8) 中沢鴻一 (1955): 放射状菌に関する研究 (I, II, III), 日本農芸化学会誌, 29(8), 644-652. —9) 柴田元雄・徳井安雄・中沢鴻一・本疋美喜雄 (1954): 放射状菌に関する研究, 新抗カビ抗酵母物質 Candimycin について, 第 79 回日本抗生物質学術協議会発表, 29. 3. 26.

Summary

It was examined about the antiameobic actions of some new antibiotics by our Whole Blood Liquid medium. Consequently, four of those antibiotics, namely Trichomycin, Eurocidin, Candimycin and Candimycin-Na were found to be effective *in vitro*.

The results are summarized as follows;

1) The growth of *Entamoeba histolytica* was inhibited after 48 hrs. incubation in a concentration of 1; 80000 of Trichomycin, 1; 18000 of Eurocidin, 1; 140000 of Candimycin, and 1; 100000 of Candimycin-Na respectively.

2) Trichomycin and Eurocidin showed remarkable cidal action against *E. histolytica* within 15 min. after exposed on slides in a concentration of 1; 2000, while Candimycin-Na had no such action under the same condition.