

犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* の仔虫に対する diethylcarbamazine の誘出及び消失作用について

中 林 敏 夫

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)

(昭和34年3月12日受領)

まえがき

Hewitt, *et al.* (1947), 及び Santiago-Stevenson, *et al.* (1947) 以来, diethylcarbamazine (Hetrazan, Supatonin) の抗糸状虫剤としての効力に関する報告は多く, その人畜糸状虫症に対する治療効果は極めて高く評価されている。この薬剤の作用で特に注目されるのは, 抗仔虫作用で, 他の抗糸状虫剤に比し, 治療によつて速かに末梢流血中より仔虫の減少, もしくは消失を来すのが特徴である。この事と共に, さらに興味ある現象は, 本剤の末梢血への仔虫の一時的な誘出作用で, この現象は糸状虫症の屋間診断に好んで応用されてきた。

ひるがえつて, 仔虫 (以後mfと記す) の定期出現性機作については, 古くから多くの研究者により, いろいろな説明が求められてきたが, まだ明確な解答が得られないのが現状である。diethylcarbamazine の mf 誘出作用あるいは治療による速やかな消失効果は, この定期出現性機作の一端を明らかにする有力な手がかりとも考えられ, 各種研究に応用されている。

Hawking, *et al.* (1950) は *Litomosoides carinii* を用い Hetrazan の作用が Opsonin 様の効果を mf に与えるものであるとの成績を発表している。他方, 梶屋ら (1958) は人糸状虫症で mf は Supatonin 含有血からの本能的逃避を示すものであろうとの見解を報告しているのは興味深い事である。犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* は患犬の入手の容易さからも実験的糸状虫症の研究にしばしば使用されるが, すでに大石・久米 (1954, 1958) の詳細な研究によつても Supatonin の誘出及び消失効果は明らか

である。著者もまた犬糸状虫について Supatonin (1-diethyl-carbamyl-4-methylpiperazine citrate) 及び Hetrazan (註) (同 hydrochloride) の作用を検討する機会を得たので, これら薬剤のそれぞれ1回投与後に及ぼす末梢流血中のmf数の変動, 及び内臓殊に肝臓内のmf数を検査し, その成績を報告する事とした。

実験材料及び方法

供試患犬: 患犬は No. 1, 体重 7 kg, 雌, No. 2, 5.5 kg, 雌, No. 3, 10 kg, 雄, の各雑種成犬で, これらはあらかじめ末梢血中の mf 数を調べ, 研究に供しえる事を確めたものである。同一犬は薬剤投与の間隔を少くとも10日以上にし, 薬剤の影響が次回に及ぶ事を可及的避ける事とした。

実験施行時刻: 犬糸状虫 mf は昼夜共末梢血中に出現するが, 明らかに周期性を示す事はよく知られている。予備検査の結果, およそ午前9時より午後0時頃に最少値を示し, 深夜に最高数に達する様であつた。故に実験は成績の統一的解釈と比較検討に誤りを来さない様, 可及的同一時刻に施行する事とし, mf 数の増加期のほぼ中間である午後2時乃至6時の間を選んだ。

薬剤投与: 薬剤は Supatonin 及び Hetrazan 共純末を使用し, 経口投与の場合は蒸留水に, 皮下注射の場合は生理的食塩水にそれぞれ溶解して用いた。投与後10~20分後に嘔吐を来す事があり, 増量にしたがい皮下注射を主とした。

採血及び mf 数の計算: 薬剤投与後の採血は初期の約30分間はおおよそ5分毎, 以後は10~15分間隔で行い,

(註) 現在のヘトラザン, スパトニンは共にクエン酸塩であるが, 本実験に使用したヘトラザンは塩酸塩のものであつた。したがつて, 本文中のヘトラザンに関しては塩酸塩と理解されたい。

TOSHIO NAKABAYASHI: On the increase or decrease of microfilaria of dog filaria, *Dirofilaria immitis*, by diethylcarbamazine (Department of Parasitology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

本研究には文部省科研費の補助を受けた。記して謝意を表する。

1 時間乃至 2 時間観察した。採血は普通両耳朶の背面を完全に脱毛し、注射針で耳朶小静脈を穿刺し、自然流出の血液を材料とした。採取は Sahli's hemometer 用のピペットを用い、直接耳朶から 20cmm の血液を吸取り、直ちにスライドガラスに吹出して厚層標本とした。標本は自然乾燥後、蒸留水で溶血、再乾燥後メタノール固定、ギムザ染色を行い、全視野中の mf 数を計算した。

Supatonin の血中濃度測定：Supatinin 50mg/kg, 100 mg/kg 皮下注射の時のみ投与直後から適当な時間毎に静脈血を採取しその血中濃度を測定した。測定法は Lub-ran (1950) 及び片峰 (1955), 藤巻 (1955, 1956) の報告を参照し第 1 表の様にして diethylcarbamazine base を定量した。

実験成績

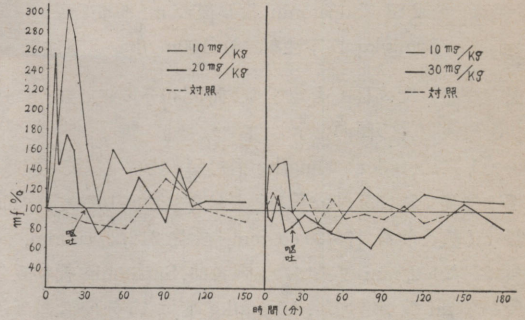
患犬の単位末梢血中の mf 数は例え同一時刻を選んでも、日により相当の違いが生じるものの様であつたが、同一日の観察時間中の変動はおおよそ規則的なものと思われた。すなわち、比較的少数の場合でも、急増したり、また逆に多数のものが急減したりする様な事はほとんど認めえなかつた。したがつて、実験成績の mf 数はすべて薬剤投与前の値を 100 とし、以後の数をパーセントで表現した。なお、薬剤投与に先立つ数日の間に、投

与時とほぼ同じ時刻を選んで mf 数の算定を行い、それぞれの対照とした。

A. Supatonin (1-diethylcarbamy1-4-methylpiperazine citrate) 投与実験

供試犬 No. 1, 体重 7 kg, 雌, (1) 10mg/kg, 20mg/kg 各経口投与, (2) 10 mg/kg, 30 mg/kg 各皮下注射, (3) 50mg/kg 皮下注射, (4) 100 mg/kg 皮下注射の各成績を図示すれば第 1 図, (1) (2) 及び第 2 図, (3), (4) となる。

各実験例共対照 mf % は常に 100 前後約 25% の範囲に



第 1 図 Supatonin 投与後の mf % 変動

(1) 10mg/kg, 20mg/kg 経口投与 (2) 10mg/kg, 30mg/kg 皮下注射

第 1 表 血液中の diethylcarbamazine base 定量法

1 ml, 3.8% クエン酸ソーダ + 4 ml 液供試血液

遠心沈澱で血漿を分離

血漿 3 ml + 1 ml, 30% NaOH + 5 ml, ethylen-dichloride (E.D.C.)

大型遠心沈澱管中で約 5 分間手動振盪

遠心沈澱, 5,000 r.p.m., 10 分

(底部) E.D.C. 層無色透明, 固型層を穿通して注射器で吸引, 東洋濾紙 No. 4 で濾過, 3 ml, E.D.C. 層液 + 1 ml, 0.05%, pH 7.0, B.T.B., 小型遠心沈澱管中で約 3 分間手動振盪

(中部) 薄い固型層

(上部) 混濁血清層 (棄)

遠心沈澱 2,000 r.p.m. 5 分

(下層) E.D.C. 液 (黄乃至青色) 東洋濾紙 No. 4 で濾過

2 ml, 濾液 + 2 ml, N, NaOH

小型遠心沈澱管中で 2 乃至 3 分間手動振盪

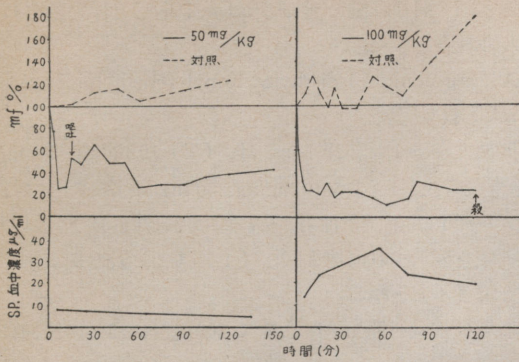
(上層) (棄)

遠心沈澱 2,000 r.p.m. 5 分

(上層) 黄乃至青色の水液 Coleman Spectrophotometer (波長 620 mμ) で測定

(下層) 無色透明の E.D.C. 液層 (棄)

計算 $\frac{\text{試料の読み} \times 10}{\text{対照 (10 } \mu\text{g/ml, 水) の読み}} = \mu\text{g/ml}$



第2図 Supatonin 投与後の mf % 変動

(3) 50mg/kg 皮下注射 (4) 100mg/kg 皮下注射

止まった。たゞし(4)では1時間30分後に140%に達し、以後上昇の傾向を示した。

(1) 10mg/kg, 20mg/kg 各経口投与, 前者の投与時刻は午後2時17分, 後者のそれは午後2時10分で, 100% mf 数は前者 175/20 cu. mm, 後者 212/20 cu. mm, 対照 228/20 cu. mm であつた。両者共, Supatonin 投与5分後から mf 数が増加し, 10 mg/kg では15分後に最高値 300.6% に達し以後減少, 40分後からは対照と大差なく経過した。20 mg/kg では5分後に最高 256.1% で25分後からは著変なく移動した。この場合 10 mg/kg 投与の方が mf % が高く, かつ増加時間も長期に及んだ事は注目された。20mg/kg 投与時に患犬の嘔吐が見られたが, これは投与30分後の事であり, これによる影響と直ちに考える事は困難であろう。

(2) 10mg/kg, 30 mg/kg 各皮下注射, Supatonin 投与時刻及び 100% mf 数はそれぞれ前者が午後2時30分 437/20cu. mm, 後者が午後2時20分, 326/20cu. mm, 対照 100% mf 数は 480/20cu. mm である。10mg/kg 投与では3分後より増加, 20分後に対照値と等しく, この間15分後の149% が最高であつた。20分以後は約30分間程逆に mf 数の減少を思ふ様であつたが, その後は著変なく移行した。30mg/kg では1分後及び10分後に 113.8% となつたが, 以後はむしろ低値を示す様であつた。したがつて, 10mg/kg では僅かであるが一過性の増数を認めたと反し, 30mg/kg では, mf 数の変動は著明でない結果となつた。

(3) 50mg/kg 皮下注射, 投与時刻, 午後2時30分, 100% mf 数は 479/20cu. mm, 対照は 430/20cu. mm である。投与2分後から2時間30分の間観察時間中, mf 数は著しく減少し, その間の最低値は5分後の24.6%であ

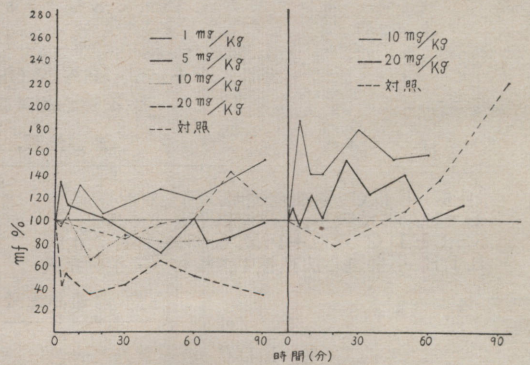
つた。30分後64.3%と一時的回復の様子が見られたが, その後は再び低値に止まつた。故に 50mg/kg 皮下注射では明らかに mf の末梢血からの消失あるいは駆逐作用を認める事が出来た。なお, Supatonin の血中濃度は5分後 7.94 μ g/ml を最高に以後次第に減少し, 2時間後まで証明する事ができたが, その後は検査を施行しなかつた。投与直後の mf 数の著明な減少と, Supatonin 血中濃度の急増は互に関連する様で注目された。

(4) 100 mg/kg 皮下注射, 投与時刻, 午後2時40分, 100% mf 数 552/20cu. mm, 対照, 479/20cu. mm である。投与後1, 3, 5分と mf % は激減し, 10分後より2時間後まで20~30%の低値を維持し, 著明な消失効果を観察し得た。Supatonin 血中濃度は投与後50分まで増加し, 以後は漸減した。50分値は36.4 μ g/ml であつた。

なお, 本実験は投与前に手術的に肝小片を採取し, さらに実験後患犬を屠殺し, 内臓切片を採取したが, その成績は後に記す事とする。故に, 本実験のみ対照時, 投与時共, 午後2時にエーテル麻酔を施行し, 覚醒後に行つたものである。

B. Hetrazan (1-diethylcarbamyl-4-methylpiperazine hydrochloride) 投与実験

(1) 供試犬 No. 2, 体重 5.5 kg, 雌, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg それぞれ皮下注射を施行した。成績は第3図, (1) に示す。



第3図 Hetrazan 投与後の mf % 変動

(1) 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20mg/kg 皮下注射 (2) 10mg/kg, 20 mg/kg 皮下注射

Hetrazan の投与時刻は前2者が午後5時25分, 以下同35分, 15分, 100% mf 数は 442/20cu. mm, 580/20cu. mm, 690/20cu. mm, 686/20cu. mm で, 対照は 595/20cu. mm であつた。

1 mg/kg, 5 mg/kg 皮下注射では投与後短期間の増数が見られ、その最高値は前者で10分後 130%, 後者で2分後 133.4%であった。なお後者では以後幾分減少の気配を示しつつ経過した。10 mg/kg では変動は著明でなく、何れかと言えば幾分減少の傾向を維持したが、その値は強調するに当たらない。20 mg/kg では明らかに減少し、15分後の33.7%を最低として終始減少を示した。したがって 5 mg/kg 以下では mf の誘出を、20 mg/kg では消失効果を観察し、10 mg/kg では著明な変動を示さなかつたと言えよう。

(2) 供試犬 No. 3, 体重10kg, 雄, 10 mg/kg, 20 mg/kg 皮下注射の各実験成績を示すと第3図(2)となる。Hetrazan 投与時刻及び 100% mf 数は前者午後2時40分, 57/20cu.mm, 後者午後2時35分, 80/20cu.mm 対照は46/20cu.mm であつた。

本実験は前の実験で10mg/kg 皮下注射の場合の mf 数の変動が不鮮明の為、再検討の意味で施行したものである。10mg/kg 投与では5分後 188%, 30分後 181%に達し、その間、及び以後に若干減少が認められたものの、明瞭な誘出作用を観察できた。他方、20mg/kg では25分後に 152.8%と増加したものの以後著変なく、対照に比べ mf 数の変化は著明なものとは考えられなかつた。おそらくは、より大量ではかえつて駆逐作用を発揮するものかもしれない。

C. Supatonin 100 mg/kg 皮下注射の前後における内臓殊に肝臓内 mf 数の検査

供試犬 No. 1 の 100 mg/kg 皮下注射時に投与前の肝小片, 投与2時間後で mf %が19.8%の時期に肝, 肺, 腎, 脾, 脳, 心筋の各小片をそれぞれエーテル麻酔下に採取した。各臓器は型の如く切片標本とし、ヘマトキシリン, エオジン染色を行い検鏡した。各標本は 100視野(200倍拡大顕微鏡の対眼レンズ内に矩形の黒枠を挿入し、100視野の標本面積を約 10 mm² になる様調整した)中の mf 数を各6回づつ計算し、その平均値を算出した。成績は第2表に示したが、Supatonin 投与後の各臓器中の mf 数は肝, 肺, 腎, 脾, 脳, 心筋の順となり肝及び肺内 mf 数は他臓器に比し、はるかに多数であつた。肝内 mf 数は Supatonin 投与前に対し投与2時間後には約 2.4倍に増加した。

考 察

犬糸状虫 mf の末梢血中への誘出, あるいは消失作用については、すでに大石・久米(1954, 1958)の報告が

第 2 表 Sp. 100 mg/kg 皮下注射前後の臓器中の mf 数

臓器	Sp. 注射の前後	100 視野(10 mm ²) 中の mf 数						平均
		1	2	3	4	5	6	
肝	前	32	25	29	19	16	18	23.2
肝	2時間後	61	38	59	62	52	59	55.2
肺	"	14	29	43	33	18	29	27.7
腎	"	28	8	13	21	17	7	15.7
脾	"	19	5	3	18	8	11	10.7
脳	"	3	6	4	7	4	4	4.7
心筋	"	5	7	2	7	3	3	4.5

ある。その成績では経口1回投与の作用として、50 mg/kg 以上で減少、35mg/kg 以下では誘出の各効果が著明である事が示されている。今回の著者による実験成績でも、Supatonin については、およそそれと類似の結果を得たものと言えよう。すなわち、10mg/kg, 20mg/kg 各経口投与、10 mg/kg 皮下注射では何れも誘出作用が見られ、30mg/kg 皮下注射では著変なく、50mg/kg, 100 mg/kg 皮下注射では共に著明な消失作用が示された。大石らは30mg/kg, 35mg/kg 経口投与で誘出を認めたに反し、本成績では30mg/kg 皮下注射でその作用を認めるには至らなかつたのは相違点と考えられた。また大石らによれば 50 mg/kg 経口投与で、投与直後1時的 mf 数の増加、しかる後急減の変動を示したが、著者の成績では同量の皮下注射で直ち減少の一途をたどるものとなつた。これらの相違は薬剤投与方法あるいは投与時刻によるものかも知れないが、なお吟味すべき事であろう。

Supatonin (1-diethylcarbonyl-4-methylpiperazine citrate) による成績に比し、Hetrazan (同 hydrochloride) を用いた成績では誘出と消失両効果の移行薬剤量が、後者が前者より少量で、供試犬 No. 2 では 10 mg/kg, 同 No. 3 では20mg/kg でほぼ mf 数の変化が生じない結果となつた。これはクエン酸塩と塩酸塩としての両薬剤の分子量から、用いた薬剤量を換算すると、塩酸塩 20mg はクエン酸塩のほぼ33mg に相当する為、塩酸塩が少量で同じ効果を期待できる事は一応説明し得る。しかしながら患犬 No. 2 及び No. 3 の差異は明確でなく、患犬の個体差を考えねばならぬかもしれない。

誘出 mf 数は供試犬 No. 1 の 20 mg/kg 経口投与時の 300%が最高で、また最高増多時刻はほとんど5~15分後の間にあり、誘出維持時間は15分乃至1時間であつ

た。この点、最増多数値が数倍から20倍以上に達し、維持時間も長い大石らの成績とは違ったものとなつた。

mf 消失効果は投与直後から減少が著しく、数分以内に殆んど最少値に達し、以後観察時間中(1~2時間)減少値を維持した。Supatonin 50mg/kg, 100mg/kg 皮下注射時の血中濃度は投与5分後から1時間位は高い血中濃度を示し、以後減少する様で、mf 数の急減少と血中濃度の速かな増加とは互に関連するものと考えられた。

Supatonin 100mg/kg 皮下注射前後の内臓内 mf 数については、投与前では肝臓のみの採取に止まつた為、詳細な研究を行ひ得なかつたが、投与2時間後の肝内 mf 数は投与前の約2.4倍となつた。Hawking, et al. (1950) の *Litomosoides carinii* による成績では Hetrazan 投与後肝内 mf 数は著しく増加し、さらに病理組織学的知見を加えて Hetrazan の Opsonin 様作用説の論拠とした。梶屋ら (1957, 1958) の人糸状虫症に関する詳細な報告では、mf の集積部はもつぱら肺毛細管中で、肝その他の腹部臓器内 mf 数の変動は、末梢血管中のそれと行動を共にするものであると述べ、また、Supatonin 含有血より mf は本能的逃避を営むもので誘出も自然 turnus と同じく肺中 mf の末梢血への移動であるがその本態は同じとは考えられないとしている。久米 (1956) は犬糸状虫でも肺内に mf が集積する事を報告している。かかる観点から薬剤作用による mf 数の変動と自然定期出現性による mf 数の変化とは、当然同一機序に基くものと考え難い事は、宿主、mf 相互関係においてのみ理解し得る mf の態度に関して、この種薬剤の演じる効果は多くの手がかりを提出するものと思われる。

結 論

犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* の末梢血中の mf に対する diethylcarbamazine の誘出及び消失作用を検討し、次の結論を得た。

1. Supatonin (1-diethylcarbamyl-4-methylpiperazine citrate) 投与では、経口投与、皮下注射共20mg/kg 以下では明らかな mf の誘出を、50mg/kg 以上では著明な消失効果を観察し得た。30mg/kg 皮下注射では明瞭な mf 数の変化を示さなかつた。

2. Hetrazan (1-diethylcarbamyl-4-methylpiperazine hydrochloride) の皮下注射では誘出と消失両作用の移行点は、1例では10mg/kg、他例は20mg/kg、すなわち、この薬剤量では mf 数の明らかな変動は示されなかつた。

3. 誘出効果は投与後5~10分後に最高値に達し、以後約1時間持続する。消失効果は直後から顕著で、2時間以上維持された。この消失作用は薬剤の血中濃度の急速な土昇と相関的であつた。

4. Supatonin 100mg/kg 皮下注射2時間後の肝内 mf 数は投与前の約2.4倍を示した。また、投与2時間後の内臓中の mf 数は、単位面積当り肝臓に最も多く、以下肺、腎、脾、脳、心筋の順であつた。

本論文要旨は第11回日本寄生虫学会西日本支部大会(昭和30年、米子)において発表した。

御指導、御校閲を頂いた森下薫教授及び御協力を頂いた大阪府立大学農学部野田亮二助教授に深謝する。Supatonin は田辺製薬株式会社から呈供された。附して謝意を表する。

文 献

- 1) Fawking, F., Sewell, P. & Thurston, J.P. (1950): The mode of action of Hetrazan on filarial worms, Brit. Jour. Pharmac. Chemoth., 5, 217-238. —2) 藤巻博教 (1955): 糸状虫症の化学療法に関する研究, 第1報 Diethylcarbamazine の体液中濃度の測定法, 長医学会誌, 30(11), 1596-1598. —3) 藤巻博教 (1956): 糸状虫症の化学療法に関する研究, 第2報 Diethylcarbamazine の血中濃度と尿中排泄量について, 長医学会誌, 31(11), 930-947. —4) Hewitt, R.J., White, E., Wallace, W. S., Stewart, H., Kushner, S. & SubbaRow, Y. (1947): Experimental chemotherapy of filariasis. II Effect of piperazine derivatives against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs, Jour. Lab. Clin. Med., 32, 1304-1313. —5) 浜田康治 (1958): Filaria 症の病態生理に関する研究, 肝及び2, 3の腹部臓器におけるマイクロフィラリアの分布について, 鹿大医誌, 9(6), 補, 1453-1485. —6) 久米清治 (1956): 犬糸状虫の研究, 昭和31年度文部省総合研究報告集録, 52. —7) 川崎兼陽 (1958): フィラリア症の病態生理に関する研究, フィラリア仔虫の定期出現性機序について, 鹿大医誌, 9(6), 補, 1486-1512. —8) 片峰大助, 藤巻博教 (1955): ヘトラザンの血中濃度について, 寄誌, 4(2), 150. —9) Lubran, M. (1950): Determination of Hetrazan in biological fluids, Brit. Jour. Pharmac. Chemoth., 5, 210-216. —10) 梶屋富一・桶谷巖・川崎兼陽・白井洗 (1958): フィラリア症の病態生理, 定期出現性の機序に関する考察, 寄生虫誌, 7(3) 258. —11) 梶屋富一・川崎兼陽・藤林繁・阿部康男・堀栄太郎 (1958): フィラリア症の病態生理に関する研究, スパトニンのフィラリア仔虫に対する作用機序

に関する一考察, 鹿大医誌, 10 (3), 249-258. —12) 大石勇・久米清治 (1954) : 糸状虫症の治療試験, 犬糸状虫に対する Supatonin の作用, 日獣医師会誌, 7 (7), 318-322. —13) 大石勇・久米清治 (1958) : 犬糸状虫症の診断に関する研究, 1. スバトニン誘出法について, 日獣医師会誌, 11 (2), 69-72. —14) Santiago-Stevenson, D., Oliver-Gonzalez, J. & Hewitt, R. I. (1947) : Treatment of filariasis bancrofti with 1-diethylcarbamyl-4-methylpiperazine hydrochloride (Hetrazan), Jour. Amer. Med. Assoc., 135, 708-712.

Summary

The effects of diethylcarbamazine on microfilaria of *Dirofilaria immitis* were investigated by counting the numbers of microfilariae (mf.) in peripheral blood of the infected dogs after the oral or subcutaneous administration of Supatonin (1-diethylcarbamyl-4-methylpiperazine citrate) or Hetrazan (hydrochloride of the same). With pipette of Sahli's hemometer, 20 cmm of peripheral blood was directly taken and made into the thick dropped preparate stained by Giemsa's solution. All microfilaria in the preparates were counted out and the numbers after drug administration were shown in percentage basing the number just before administration as 100. In two cases of Supatonin its concentration in serum were measured

according to the modified method (Katamine and Fujimaki) of Lubran's one.

Results obtained were summarized as follows :

1. In the cases of Supatonin the obvious increase of mf % in the oral or subcutaneous administration of 20 mg/kg or less and the marked decrease in the subcutaneous injection of 50 mg/kg or more were observed. In 30 mg/kg of subcutaneous route no remarkable change was shown.
2. In the cases of Hetrazan the turning points of increase and decrease, i. e., the drug amounts in which no remarkable change in mf count was found, were 10 mg/kg in one case and 20 mg/kg in another.
3. The effect of increase rises up to maximum after five to ten minutes and was maintained for about one hour. The effect of decrease was conspicuous over two hours from immediately after administration and relative to the rapid rising up of Supatonin concentration in blood.
4. The mf number in liver two hours after subcutaneous injection of Supatonin 100 mg/kg was about 2.4 times as many as of before. The mf numbers in a certain area (100 fields) of several organs two hours after administration were the most in liver and less in order in lung, kidney, spleen, brain and heart muscle.