

オキシキノリン誘導体の赤痢アメーバに対する作用

平 林 明

北里研究所寄生虫室

(昭和34年9月30日受領)

Oxyquinoline の誘導体は、吐根の有効塩基 Emetine、砒素製剤 Carbarsone 及び抗アメーバ作用を有する抗生物質 Oxytetracycline, Fumagillin, Anisomycin 等と共に赤痢アメーバ症の治療に極めて重要な薬剤である。

Halogenated hydroxyquinoline として、Yatren が赤痢アメーバ症に有効である事を1921年に Mühlen & Menk が紹介したのを初めとして、1931年に Anderson *et al.* 及び1933年に David *et al.* によつて Vioform が、又1936年には Tenney によつて Diodoquin が腸管の赤痢アメーバ症に有効である事を報告した。更に Conan (1948) は Chloroquine がアメーバ性肝炎に有効である事を証明した。

著者は先に北里研究所秦研究室の協力により放線菌の培養濾液より抽出した Protomycin が培地内においてもまたモルモット腸管感染においても赤痢アメーバを死滅せしめるに有効に作用するとう成績を得たことを報告した。今度は同研究所松村研究室の協力によつて Yatren, Vioform 及び Diodoquin 等既に臨床的に使用されている薬剤を含めて64種の Oxyquinoline の誘導体と3種の類似化合物について *in vitro* における抗アメーバ作用を検査した。更にそれ等の化合物の中より多少とも有効であると思われる10種の化合物についてマウスへの経口投与による毒性実験を行った。続いてそのうちの4種の化合物を赤痢アメーバ感染モルモットに経口投与して治療実験を行った。その結果、新たな3種の化合物はそれぞれモルモットの赤痢アメーバ症に対して有効な治療成績を示した。

赤痢アメーバの無菌培養が出来ない現在、*in vitro* における純粋な“direct amebicidal” action を検査する事は困難である。多くの化合物が水に難溶である為に培地内でアメーバに充分に作用をあらはす事が出来ず、又化合物の抗菌性が赤痢アメーバの随伴細菌に影響を及ぼす事を考える時に“apparent amebicidal” dilution を以て直ちに *in vivo* の成績を予測する事は出来ない。こ

れ等化合物が盲腸内に直接濃厚な感染を起させたモルモットの赤痢アメーバ症に対して有効に作用した事は、人の腸管或は肝における赤痢アメーバ感染による種々なる病型の治療に際して、腸腔内のアメーバの殺滅、組織内のアメーバ殺滅及び組織の損傷の治療等の目的に何等かの効果を期待出来るように思われる。

実験材料

実験に使用した赤痢アメーバは、Balamuth's egg yolk infusion medium に数年継代培養した H 株 (アメーバ赤痢患者の血便中より分離培養した株) で、数種類の細菌を随伴し、比較的安定した増殖を続けた。

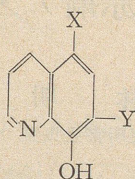
継代培養及び *in vitro* における screening test には一貫して Balamuth 培地を使用した。卵黄浸出液に同量の phosphate buffer solution を加え、更に全量に 0.5% の peptone を加えて、pH 7.0 乃至 7.2 になる様に調節した。培養に際して少量の滅菌米粉を加えた。

実験方法と成績

1) 試験管内における screening test

被検化合物は松村研究室において合成されたもので、64種に及ぶ Oxyquinoline 誘導体と3種の類似化合物である。これ等の中には合成の出発点となつた 8-Hydroxyquinoline を初めとし、既に臨床的に用いられている Yatren, Vioform 及び Diodoquin も含まれている。これ等の化合物は水に可溶なものはそれに溶解し、多くの難溶性化合物は50%EtOH に100倍、1,000倍、10,000倍の濃度に溶解した。No. 2 (Diodoquin) はアルカリ性でないと難溶のため50% EtOH に0.5%の割合に NaOH を加えて溶解した。更にこれ等被検化合物の溶液を Balamuth 培地に、10倍稀釈を第1管とする10本の試験管に倍数稀釈した。一方24時間乃至48時間培養した増殖旺盛な赤痢アメーバ栄養型を、数本乃至拾数本の試験管底から0.5ml 宛をプールし、10万個/ml 乃至50万個/ml の赤痢アメーバ浮游液とし、その0.1ml を各稀釈試験管に加えた。37°C 孵卵器に入れ24時間乃至48時間培養後

第1表 8-Quinololinol compounds



番号	置 換 分		有効濃度 ($\times 10^4$)	溶 媒	備 考
	X	Y			
30	H	H	32	50%EtOH	
52	Cl	H	128	50%EtOH	Halogen, sulfo- or nitro-halogen compounds
53	Br	H	128	50%EtOH	
54	I	H	64	50%EtOH	
56	Cl	Cl	8	50%EtOH	
57	Br	Br	1	50%EtOH	
2	I	I	32	50%EtOH 0.5%NaOH	
58	Cl	I	4	50%EtOH	
1	SO ₃ Na	I	0.2	H ₂ O	
41	SO ₃ Na	Br	0.2	H ₂ O	
43	NO ₂	I	64	50%EtOH	
34	NH-COCH ₃	H	0.04	50%EtOH	Amino, halogen- or sulfo-amino compounds
22	H	NH-COCH ₃	4	H ₂ O	
33	Cl	NH-COCH ₃	8	50%EtOH	
44	SO ₃ Na	NH ₂	0.1	H ₂ O	
48	SO ₃ Na	NH-SO ₂ --NH ₂	0.1	H ₂ O	
45	SO ₃ Na	NH-COCH ₃	0.1	H ₂ O	
5	H	CH ₂ -N< C ₂ H ₅ C ₂ H ₅	2	H ₂ O	
3	Cl	CH ₂ -N< C ₂ H ₅ C ₂ H ₅	2	H ₂ O	
17	Br	CH ₂ -N< C ₂ H ₅ C ₂ H ₅	4	50%EtOH	
16	CH ₂ -N< C ₂ H ₅ C ₂ H ₅	Br	8	50%EtOH	
35	COONa	H	4	H ₂ O	Carboxycompounds and their esters
13	COONa	I	32	H ₂ O	
70	COO • Ethyl	H	128	50%EtOH	
36	COO • Butyl	H	8	50%EtOH	
31	COO • Ethyl	I	512	50%EtOH	
12	COO • Butyl	I	128	50%EtOH	
23	COO • Butyl	NH ₂	8	50%EtOH	
29	COO • Butyl	NH-COCH ₃	32	50%EtOH	
9	CO-CH ₃	H	64	H ₂ O	
18	CO-CH ₃	I	128	50%EtOH	
10	CO-CH ₂ Cl	H	32	50%EtOH	
20	CO-CH ₂ Cl	I	16	50%EtOH	
71	CO-CH ₂ I	H	8	50%EtOH	
32	CO-CH ₃	NH ₂	8	50%EtOH	
47	C=NOH • CH ₃	H	8	50%EtOH	
26	CO-	H	512	50%EtOH	
42	CO-	I	512	50%EtOH	

番号	置 換 分		有効濃度 ($\times 10^4$)	溶 媒	備 考
	X	Y			
59		H	8	50%EtOH	
69	H		8	50%EtOH	
24	I		32	H ₂ O	
8	CH(OH) · CCl ₃	H	16	50%EtOH	Alcohol derivatives
19	CH(OH) · CCl ₃	I	64	50%EtOH	
21	CH(OH) · CCl ₂ -I	H	2	50%EtOH	
38	H	CH(OH)-	64	50%EtOH	
50	N=N-	H	1	H ₂ O	Azo dyes
51	SO ₃ Na	N=N-	1	50%EtOH	
4	SO ₃ Na	Hg-OH	0.8	H ₂ O	Organo-mercury compounds

の赤痢アメーバの増殖状態を鏡検した。

被検化合物の minimum inhibitory concentration は各試験管の管底 0.5ml を残して上層を捨て、攪拌して鏡検し、アメーバが消失しているか或は僅かに残存するアメーバの大部分が変形している試験管における化合物の稀釈度によって決定した。溶媒として使用した水、EtOH 及び NaOH は同様の方法により何倍迄影響があるかを検査した。

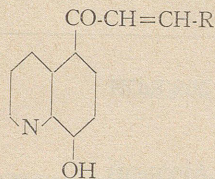
amebicidal concentration は対照試験管の増殖が最も盛んな48時間培養後の判定を記載したが、その数値は直ちに被検化合物の“direct amebicidal” action と考える事は出来ない。何故ならば、a) 8-Hydroxyquinoline, Yaten, Vioform 及び Diodoquin 等を初めこれ等大多数の化合物は抗菌性を有し dilution の各段階において、種々の程度に随伴細菌はその増殖が阻止され、対照試験管に比較して培地の混濁や菌膜形成は相違を認めた。b) 水に難溶の化合物は50% EtOH に溶解してから10倍を第1管とする倍数稀釈を行つた。No. 2 (Diodoquin) は更に 0.5% NaOH を含んでいる。これ等の溶媒は水では10倍稀釈(水1, 培地9の割合)以下の濃度で全くアメーバの増殖に影響ないが、EtOH では20倍稀釈(EtOH 1, 培地19の割合)迄はアメーバは殺滅され40倍稀釈迄

は増殖に影響が認められた。NaOH を含む EtOH も同様であつた。c) 50% EtOH に溶解使用した化合物の中には Balamuth 培地に dilution すると析出するものがあり、更に沈澱を起してアメーバの増殖する試験管底に重層した。d) 培地成分と結合して培地組成を変えたと思われる化合物があつた。各被検化合物のアメーバ殺滅に必要な最少濃度は第1表より第4表に亘つて示してあるが、以上の理由によつて明らかなように、これらの表の数値はみかけ上の殺アメーバ濃度であつて、それらが必ずしも直接に各化合物の優劣を示すものとは出来ない。

被検化合物 67 種は次の様な group に分類する事が出来る。

- 1) 8-Hydroxyquinoline
- 2) Halogen, sulfo- or nitro-halogen compounds 10種
- 3) Amino, halogen- or sulfo-amino compounds 10種
- 4) Carboxy compounds and their esters 8種
- 5) Keto compounds 12種
- 6) Alcohol derivatives 4種
- 7) Azo dyes 2種
- 8) Organo-mercury compounds 1種
- 9) α , β unsaturated keto compounds 8種

第2表 α, β unsaturated keto compounds of 8-Quinolinol



番号	R	有効濃度 ($\times 10^4$)	溶媒
37		32	50%EtOH
27		64	50%EtOH
28		8	50%EtOH
60		8	50%EtOH
64		8	50%EtOH
68		16	50%EtOH
66		4	50%EtOH
63		8	50%EtOH

- 10) Styryl-type photosensitizing dyes 6種
- 11) Phthalein dyes 2種
- 12) Allied compounds other than 8-Hydroxyquinoline 3種

このように分類して見ると各 group 間の抗メアーバ性に著しい相違を認めなかつたが、Halogen compounds, Carboxy compounds, Ketocompounds 及び Alcohol derivatives の中に比較的有効な化合物が多かつた。Halogen を持つ化合物特に Iodo を持つ化合物はそれを持たない類似化合物に比較し効力が強い様に思われた。水に溶解した17種の化合物では Keto compound group の No. 9 及び No. 24 と Carboxy compound group の No. 13 が有効であつたが一般に水に難溶の化合物に比較して効力が弱かつた。

大多数の化合物の出発点である 8-Hydroxyquinoline には強い抗菌性があつた。Halogen compound group の No. 52, 53, 54, 56, 57, 2, 58等は抗菌性が強く、又

第3表 Styryl-type photosensitizing dyes

番号	構造式	有効濃度 ($\times 10^4$)	溶媒
67		2	50%EtOH
14		4	50%EtOH
15		2	50%EtOH
11		4	50%EtOH
7		2	50%EtOH
6		0.4	50%EtOH

第4表 Compounds other than 8-Quinololin compounds and Phthalein dyes

番号	構造式	有効濃度 ($\times 10^4$)	溶媒
25		< 0.1	H ₂ O
39		16	H ₂ O
49		0.2	H ₂ O
46		< 0.1	50% EtOH
40		< 0.1	50% EtOH

dilution によつて析出、沈澱を起し amebicidal concentration を正確に求める事が出来なかつた。Amino compound group は一般に抗アメーバ作用が弱かつた。Carboxy compound の No.13 は有効であつたので後に治療実験を行った。又その ester は水に難溶で dilution により析出した。Keto compound group には抗菌性の強いものが多かつたが No. 42 は最も抗アメーバ作用が強い様に思われたので治療実験を行った。Alcohol derivatives の No. 19 も治療実験を行ったが極めて難溶で沈澱を生じた。α, β unsaturated keto compound group は総て抗菌性強く又 dilution により析出した。Azo dyes,

Styryl-type photosensitizing dyes 及び Phthalein dyes 等は効力が弱かつた。

2) 経口投与による毒性試験

10種類化合物についてマウスに経口投与し毒性実験を行つた。動物は2匹づつ数段階に分け、1匹1回の投与量が20gマウスに対して0.1ml乃至0.4mlになる様に被検化合物の濃度を調整して投与した。その後1週間を観察期間とし動物の体重を測定し一般状態を観察した。マウスは小麦及び新鮮な野菜を与え、入手後1週間以上研究室にて飼育観察してから実験を始めた。化合物は水に溶解したが、水に難溶の化合物は suspension にし猶沈澱する化合物は1%澱粉液に suspend して出来るだけ均等な液として投与した。この実験に用いた化合物は第5表に示した10種類である。

No. 1 (Yatren) は水には 200 mg/ml の濃度に難溶であり、80°C15分加温すると一時溶解した。従つてこれを一部溶解一部 suspend したまゝよく振盪した。毒性は極めて少なく2,500 mg/kg に耐えた。No. 2 (Diodoquin) は水に難溶で又パラフィン様の疎水性で、suspend する事が出来ずよく振盪して均等な液にして投与したが20 mg/ml 以上の濃度に溶解する時は stomach tube が閉塞されて投与困難であつた。従つて 500mg/kg 以上の投与は出来なかつた。然しこの量ではマウスは死亡しなかつた。No. 30 (8-Hydroxyquinoline) は20mg/ml の濃度に1%澱粉液に suspend した。比較的毒性が強く耐量 150 mg/kg であつた。No. 13 は水溶性で耐量 375mg/kg であつた。No. 12 は ester で芳香を有し水に難溶、1%澱粉液に suspend して投与、毒性強く耐量 125mg/kg であつた。No. 29 も1%澱粉液に suspend した。No. 12 の Iodo の位置を Acetoamide に代えた為か毒性は弱かつた。No. 42 は1%澱粉液に suspend したが高濃度では沈澱を生ずる為によく振盪して投与した。耐量 500 mg/kg であつた。No. 24 は Keto acid の Na 塩で水に溶解し、耐量 500mg/kg であつた。No. 4 は Hg を持つ化合物で水に溶解して使用、Hg による毒性を予想したが2,000 mg/kg 投与でマウスは死亡しなかつた。No. 19 は難溶疎水性で1%澱粉液に suspend してよく振盪後投与した。毒性少く2,000 mg/kg に耐えた。

3) 治療実験

治療実験は赤痢アメーバ接種モルモットに対して被検化合物を経口的に投与しその効果を観察した。180g乃至250gの出来るだけ幼弱なモルモットを入手し、同時に入手したモルモットは無選択的に3群にわけその1群

第5表 マウスに対する経口投与による毒性

番号	1	2	30	13	12
構造式					
投与量 (mg/kg)	二匹死亡 10,000 一匹死亡 7,500 一匹生存 5,000 二匹生存 2,500 1,250	500 375	300 225 150 75	1,000 502 375 250	500 250 125 62.5
番号	29	42	24	4	19
構造式					
投与量 (mg/kg)	二匹死亡 一匹死亡 一匹生存 二匹生存 500 250	2,000 1,000 500 250	2,000 1,000 500 250	2,000 1,000	4,000 2,000 1,000

は対照群として別々の箱に入れ、1週間以上研究室に飼育観察してから実験を始めた。飼料として“ふすま”及び新鮮な野菜を与え、夏期は通風をよくし、冬期は電熱にて保温につとめ動物を飼育した。赤痢アメーバ感染モルモットに対する治療実験は1958年8月より1959年6月の間に行った。

モルモットに接種した赤痢アメーバは Balamuth 培地に24時間乃至48時間培養した増殖分裂の盛んなH株の栄養型を用い、培養した数本乃至拾数本の試験管底 0.5ml 位を米粉と共にプールし、約10分間静置し粗大な米粉を沈下せしめ上層部を別の管に移して使用し、注射に際し注射器の針に米粉のつまるのを避けた。赤痢アメーバ浮游液はその栄養型が30万個/ml 前後含まれる様に Thoma-Zeiss の血球計算盤で算定して調整した。

赤痢アメーバの動物に対する病原性はその株により相違があるが、著者が先に赤痢アメーバ感染モルモットに対する抗生物質 (Protomycin) の治療実験において用いたH株では治療を行わない対照群で50%乃至 100%の感染を示し、7対照群の平均感染率は75%であつた。今回の治療実験には感染モルモットの腸内容より再び Bala-

muth 培地に分離培養したH株を用いた。治療実験を重ねる際はその前の対照群中の感染モルモットの腸内容より分離培養して次回の実験に使用した。感染回数を重ねてもその間に対照群の感染率が特に変化したとは思われなかつた。

モルモットに赤痢アメーバを接種する方法は、動物に軽いエーテル麻酔をほどこし、腹壁を 1.5cm 位開腹して盲腸部を露出し、注射器で前記アメーバ浮游液 1ml (30万個程度) を直接盲腸内に注入した。注入後腸内容が腹腔内に流出しない事を確めて、腹膜及び筋層と皮膚を二層に連続縫合を行い腹壁を閉鎖した。手術器具及び縫合創にはヨードチンキを塗布した。

赤痢アメーバ接種24時間後に麻酔或は手術の為に死亡又は正常の状態に復し得なかつた動物は実験から除外した。即ち接種24時間後より元気な動物に対して治療のための薬剤投与を始めた。被検化合物は総て経口的に投与した。細い柔軟なビニール管を stomach tube として使用し、動物は麻酔せず左手にて脊位に固定して開口せしめ、長さ7cm、径 0.1cm 位のビニール管を静かに食道に挿入し、他端に注射器を連結して出来るだけ投与量を

正確に注入した。投与量は 200 g モルモットに対して 1 ml 乃至 2 ml になる様に被検液の濃度を調整し、早朝空腹時に 1 日 1 回所定量を連続 5 日間投与した。投与後に逆流嘔吐した例はなく、又気管に注入したこともなかった。

観察期間は赤痢アメーバ接種後 30 日間とし、毎日動物の体重を測定し、下痢、嘔吐等一般状態に注意して記録した。観察期間の中に死亡した動物及びその期間の終りに屠殺した動物は剖検し、腸内容は Balamuth 培地に培養を試みた。

治療実験に使用した化合物は No. 19 (Alcohol derivative), No. 13 (Carboxy compound), No. 42 (Keto compound) 及び No. 2 (Diodoquin) の 4 種である。No. 19 は毒性の弱いものであるが、水に難溶で疎水性の極めて強い物質であるので濃粉液に suspend しても均等な液にならなかった、それで電気キミサーにより 20 分間、強く振盪することにより比較的均等な状態にすることが出来た。No. 13 は 30 mg/ml の濃度に溶かすことが出来た。No. 42 は試験管内では最も抗アメーバ作用の強いと思われたものである。これは水に難溶のため 1% 濃粉液に suspend した。No. 2 は既に臨床的に使用され、効果の認められている化合物である。之は他の化合物との比較の目的で用いた。水に難溶、疎水性の物質であるので No. 19 と同様に濃粉液に suspend し、電気キミサーで均等な液として用いた。

マウスに対する毒性実験の耐量を参考にして 5 日間投与の総量を決定した。平均生存日数は、赤痢アメーバに感染死亡した動物はアメーバ接種より死亡迄の日数を、又不感染で生存した動物は 30 日間の観察期間の終りに総て屠殺したのでその日数を各群について単に算術平均した数値である。体重の平均増減は各動物のアメーバ接種前日と死亡或は屠殺前日の体重の差を各群について算術平均した。死亡又は屠殺した動物は剖検して腸内容及び腸壁を精査し、腸内容は Balamuth 培地に培養した。成績は第 6 表より第 9 表に示した。感染程度は各動物の剖検結果を Taylor and Greenberg の下記のような分類によって (0) から (4) 迄の 5 段階の数値であらわし各群でその平均値を算出した。

Average degree of infection (A.D.I.): by Taylor and Greenberg

0. no gross lesions or amebae observed;
1. no lesions but amebae found;
2. few lesion of the cecum (limited in size and

area);

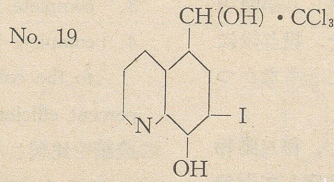
3. complete involvement of the cecum;
4. complete involvement of the cecum, extending into the colon.

percent efficiency (Jones) は次の式によつて求め各群の成績を比較した。

$$\frac{\text{A. D. I. of control} - \text{A. D. I. of treatment}}{\text{A. D. I. of control}} \times 100$$

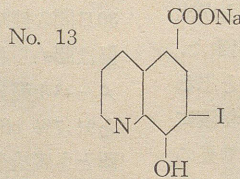
No. 19 (5-CH(OH) · CCl₃-7-iodo-8-hydroxyquinoline) は 3 回の実験を行つた (第 6 表)。初回は 5 匹づつ 3 群に分けたモルモットの第 1 群には 500 mg/kg 量の薬剤を連続 5 日経口投与 (総量 2500 mg/kg)、第 2 群には 250 mg 量を同様連続 5 日投与 (総量 1250 mg/kg)、第 3 群は対照群として薬剤の投与を行わなかつた。第 1 群の 5 匹のモルモットは薬剤の投与期間中に幾分の体重減少を見たがその後は体重の増加も順調で何等症状を認めなかつた。30 日間の観察を終つて動物を屠殺剖検した処、腸壁の損傷は認められなかつたが 1 匹の腸内容の培養によつてアメーバを発見した。A. D. I. は 0.2 で対照群と比較すると 91.7% efficiency となつた。第 2 群の 5 匹の動物は 5 匹とも感染を認め第 3 群の対照以上の感染率であつた。然しながら第 2 群における 5 匹の感染モルモットの平均生存日数は 21.8 日で第 3 群の感染モルモット 3 匹の平均生存日数 11.0 日と比較する時 2 倍の延長が認められた。次に投与量を半分へ減じて同様に治療実験を行つた。125 mg/kg 連続 5 日投与群 (総量 625 mg/kg) の 6 匹の動物はその 4 匹が感染死亡した。A. D. I. は対照群より幾分軽度であるが、生存日数の延長は認められなかつた。更にその半量 63 mg/kg 連続 5 日投与群 (総量 315 mg/kg) においては 5 匹の動物に 3 匹の感染を認め、対照群と殆ど差異がなかつた。マウスにおける毒性実験で耐量は 2,000 mg/kg であつたが、4,000 mg/kg 投与では 1 匹のマウスは死亡し 1 匹は生存した。そこで投与量を増加して第 1 群には 800 mg/kg 連続 5 日 (総量 4,000 mg/kg)、第 2 群には 400 mg/kg 連続 5 日 (総量 2,000 mg/kg) を投与した。その結果第 1 群 6 匹の動物にアメーバの感染は全く認められなかつたが、3 匹は赤痢アメーバ接種後 5 日目に死亡した。又第 2 群においても 6 匹の動物に感染を認めなかつたが観察期間中に 4 匹は赤痢アメーバの感染なしに死亡した。対照群 6 匹中 2 匹に感染死亡を認めたが 2 匹は原因不明の死亡であつた。この治療実験においては、対照群の感染率が悪く、各群に原因不明の死亡例があつたけれども 12 匹の薬剤投与を受けた動物には

第6表 No. 19 による赤痢アメーバ感染モルモットに対する治療実験



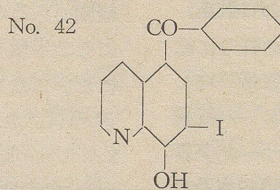
投与量 (mg/kg)	投与日数	動物数	平均生存日数	平均体重増減	腸内アメーバの存在	腸壁の損傷	感染程度 (A.D.I.)	% efficiency
500	5	5	30.0 (日)	+44.0 (g)	1 (匹)	0 (匹)	0.2	91.7
250		5	21.8	-36.0	5	5	3.8	0
対照		5	20.1	+ 3.0	3	3	2.4	
125	5	6	18.2	+ 3.3	4	4	2.0	16.7
62.5		5	22.5	+ 4.0	3	3	2.2	8.3
対照		5	23.4	+34.0	3	3	2.4	
800	5	6	18.8	- 0.8	0	0	0	100
400		6	17.0	+ 1.7	0	0	0	100
対照		6	17.3	- 1.7	2	2	1.2	

第7表 No. 13 による赤痢アメーバ感染モルモットに対する治療実験



投与量 (mg/kg)	投与日数	動物数	平均生存日数	平均体重増減	腸内アメーバの存在	腸壁の損傷	感染程度 (A.D.I.)	% efficiency
150	5	5	27.6 (日)	+41.0 (g)	1 (匹)	1 (匹)	0.8	66.7
75	5	5	15.4	- 9.0	4	4	3.2	0
対照		5	16.8	+ 3.0	3	3	2.4	

第8表 No. 42 による赤痢アメーバ感染モルモットに対する治療実験



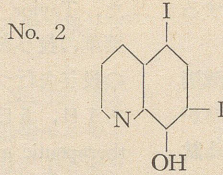
投与量 (mg/kg)	投与日数	動物数	平均生存日数	平均体重増減	腸内アメーバの存在	腸壁の損傷	感染程度 (A.D.I.)	% efficiency
100	5	5	24.2 (日)	+20.0 (g)	2 (匹)	2 (匹)	1.4	41.7
50	5	6	17.1	+ 9.2	4	4	2.7	0
対照		5	17.6	- 2.0	3	3	2.4	

1例の感染もなかつた。第1群の5日目に死亡した動物の盲腸内容を検討するに投与された煉瓦色の薬剤が便の中に濃厚に混在しているのが見られた。

No. 13 (5-COONa-7-iodo-8-hydroxyquinoline) は水に溶解する化合物の中で *in vitro* において比較的有効な化合物であつた。モルモットは5匹づつ3群に分ち、


第1群には 150 mg/kg 連続5日投与 (総量 750 mg/kg) した。5匹の動物は1匹が赤痢アメーバ接種後18日目に感染死亡したが他の4匹は30日間生存した。A.D.I. は 0.8 で対照群と比較すると percent efficiency は 66.7% で有効な成績であつた。第2群は第1群の半量 75mg/kg 連続5日 (総量 375mg/kg) 投与したが、5匹のモルモ

第9表 No. 2 による赤痢アメーバ感染モルモットに対する治療実験



投与量 (mg/kg)	投与 日数	動物 数	平均生 存日数	平均体重増減	腸内アメー バの存在	腸壁の 損傷	感染程度 (A.D.I.)	% efficiency
150	5	6	21.5(日)	+18.3(g)	4(匹)	4(匹)	2.5	0
75	5	5	24.8	+30.0	2	2	1.6	33.3
対照		5	19.2	+20.0	3	3	2.4	

ットは4匹に感染が見られ、A.D.I. は3.2で対照群以上の数値を示し、又感染動物の平均生存日数の延長も認められず全く無効であった。

No. 42 (5-CO——7-iodo—8-hydroxyquinoline) は抗菌性も非常に強かったが *in vitro* で最も抗アメーバ作用の強い薬剤であった。水に難溶で5 mg/ml の濃度に1%澱粉液に suspend して出来るだけ均等な液として投与した。第1群5匹のモルモットには100 mg/kg 連続5日(総量 500mg/kg) 投与した。その結果3匹は感染なく生存したが、1匹は赤痢アメーバ接種後8日目に、1匹は23日目にそれぞれ感染死亡した。A.D.I. は1.4で対照群と比較するに percent efficiency は41.7であった。平均生存日数の延長を認めた。第2群6匹の動物には50mg/kg 連続5日(総量 250mg/kg) 投与したが、4匹に感染が認められ無効であった。

No. 2 (Diodoquin, 5, 7-diiodo-8-hydroxyquinoline) は既に臨的に効果の認められている薬剤で以上3種の化合物と比較する目的で治療実験を行った。水に難溶、極めて疎水性で20mg/ml 以上の濃度にする時は stomach tube が閉塞されて投与困難であった。第1群6匹のモルモットには150mg/kg 連続5日(総量 750mg/kg) 投与したが4匹が赤痢アメーバに感染死亡した。対照群と比較して有意な差を認める事は出来なかつた。併し感染死亡した4匹のモルモットの生存日数はアメーバ接種後12日、17日、18日及び22日で平均17.2日、対照群の感染死亡した3匹の生存日数は、12日、13日、及び13日で平均12.7日に比較すると平均生存日数は明かに延長されている。第2群5匹のモルモットには75 mg/kg 連続5日(総量 375mg/kg) 投与し2匹に感染死亡を認めた。

考 按

培養赤痢アメーバに対する薬剤の抗アメーバ作用を検査するには幾多の困難な問題に直面する。

赤痢アメーバの無菌培養が不可能であるために、随伴細菌の増殖を阻止する薬剤は又間接に赤痢アメーバの増殖をも阻止する。著者に被検化合物について正確な抗菌性検査を行わなかつたが、赤痢アメーバ培養後検定試験管内の培地の混濁、菌膜形成状態及び鏡検時の細菌数よりして、大多数の化合物が種々の程度に抗菌性を示している事が分つた。先に報告した抗生物質(Protomycin)の *in vitro* における抗アメーバ作用検定には、*Clostridium welchii* を24時間増菌した Balamuth 培地に被検物質を dilution し、同菌を随伴せしめた赤痢アメーバを使つて検定した。勿論、被検物質は *Clostridium welchii* の増殖を阻止しなかつた。又 Hrenoff ら(1951)は“direct amebicidal” action を出来るだけ正確に求める為に、赤痢アメーバに *Trypanosoma cruzi* を随伴させて検定を行つた。Hansen (1948~1949) は petrolatum で各検定試験管を封入し、綿栓だけによる場合と比較検定を行つている。

被検化合物を培地に正確に dilution するためには赤痢アメーバの培地は液体でなければならない、幸い Balamuth's egg yolk infusion medium はその目的に適し、赤痢アメーバH株はその培地に安定した増殖状態を続けた。薬剤検定用培地として、猪木ら(1950, 1951, 1953)は全血加液体培地を推賞している。Lynch ら(1956)は Locke's egg slant Locke's overlay medium を使用し、Thompson ら(1956)は Boeck-Drbohlav diphasic medium の aqueous phase を色々に変えて検定を行つている。又 Hansen & Anderson (1948) は Liverproteose-peptone medium を使用している。

水に難溶な化合物は50%エタノールに溶解しこれを Balamuth 培地に、10倍を第1管とする 倍数稀釈を行つたが、この場合 solvent の赤痢アメーバ及び随伴細菌に対する影響を考えなければならない。又 dilution すると

とによって析出する化合物があり更に沈澱して赤痢アメーバの増殖する試験管底の米粉の上に沈澱物が重積する事もあつた。

有効濃度決定において、赤痢アメーバが完全に殺滅消失した試験管は勿論の事、僅かに発見されるアメーバが球状となり原形質が顆粒状となつて明に変形している試験管の濃度も有効とした。この様に変形した僅かのアメーバを subculture する時殆どの例において再びその増殖を見なかつたからである。薬剤投入から検定までの赤痢アメーバの培養時間は24時間と48時間の2回増殖状態を検査した。対照試験管では48時間培養後が最も増殖旺盛であつたのでその時の判定を表示した。各化合物によつて2回の判定の間に殆ど相違のないものと、10倍乃至20倍の差を認めるものもあつた。Thompson ら (1956) は多数の抗生物質の抗アメーバ作用の検定を行つて、培養時間24時間後と48時間後の効力に著しい差異のあるのは、その物質に、培地を赤痢アメーバの増殖に不利な状態に変える様な indirect の作用がなく slow direct action によるものだと云つてゐる。

この様に幾多の改良を要する点があり表に示した amebicidal concentration は被検化合物の direct の作用とすることは出来ないが、数多くの被検化合物の中より動物治療実験のための幾つかの化合物を選出する目的で一応 *in vitro* における apparent amebicidal concentration を定める事によつて、化合物の構造上の group の差違や各化合物の優劣を或程度比較することが出来た。

被検化合物をマウスに経口的に投与した毒性実験において、No. 30 (8-Hydroxyquinoline) は比較的毒性が強かつたがその他の化合物は一般に毒性が弱く極めて吸収の悪い物質の様に思われた。殊に No. 19 の如くモルモットの盲腸内容を鏡検すると投与された化合物はそのまま煉瓦色の粉末として混在するのが見られた。この事は又赤痢アメーバ感染モルモットに対する治療実験において重要な意味を持つのではなからうか。赤痢アメーバ症が急性症状、慢性症状或は肝炎等宿主に対するアメーバの寄生部位及損傷は特異であつて、腸管内のアメーバの殺滅、組織内のアメーバの殺滅、組織損傷の治癒等の目的に対して、これ等難吸収性の物質は腸管内のアメーバに対して特に有効に作用すると考えられる。Yatren, Vioform が急性症状のものに使用すると屢々再発があり、慢性期殊にチステ排泄者によく効果を示すことが報告されている。

著者は赤痢アメーバをモルモットの盲腸内に接種24時

間後より1日1回連続5日治療のための薬剤投与を行つた。Taylor ら (1952) は赤痢アメーバ接種2日前より薬剤の投与を開始し或は2時間乃至4時間前に第1回目の投与を行つて protective の意味を検討し、又投与日数も1日、5日、7日及び14日等色々に変える事によつて therapeutic evaluation を行つてゐる。一般に赤痢アメーバに感染したモルモットを剖検すると腸壁における損傷が盲腸のみに潰瘍を認める場合はその部の潰瘍が相当広範囲に及んでいても比較的長命であるが結腸に潰瘍を生じた動物は盲腸の病変が軽微であつても早期に死亡する。著者の治療実験において治療群が対照群に比較し感染率を低下させることが出来なかつた場合、生存日数の延長を認めた例がある。この様に赤痢アメーバをモルモットの盲腸内に直接大量に注入して濃厚な感染を起させた場合に、アメーバ赤痢の発症及び死亡と薬剤投与による治療との関係も複雑である様に思われる。

赤痢アメーバをモルモットの盲腸内に接種する時、常に100%の感染を起さすことは出来ない。治療実験において赤痢アメーバの株による病原性が問題になる。この実験に使用したH株を同様の方法でモルモットに接種した12の対照群の平均感染率は66%、A. D. I. は2.5であつた。治療実験成績の評価に Taylor ら (1952) は survival index を算出して比較し、Jones ら (1956) は percent efficiency を求めて効果を判定している。著者は各実験に同時に入手した動物を無差別に3分してその1群を対照群とし同時に同様の方法でアメーバを接種して比較検討した。

No. 2 (Diodoquin) は治療実験で150 mg/kg 量を連続5日経口投与したが、有効な成績は得られなかつた。Taylor ら (1952) は同様モルモットに対する赤痢アメーバ治療実験で100 mg/kg 7日間経口投与し感染率59%、A. D. I. は1.7の成績を示し、又 Vioform 及び Chiniofon 等についても同様の実験を行い或程度の効果を認めている。

No. 19は毒性の弱い化合物で大量の投与によつて効果を認める事が出来た。No. 13及びNo. 42も毒性をあらわさない量の投与によつてそれぞれ有効であつた。

結 論

1) Oxyquinoline の誘導體及び類似化合物67種の *in vitro* における抗アメーバ作用を検査し、それ等化合物の構造上の相違、各化合物の優劣、既に臨床的に使用されている薬剤との比較等を行い、動物治療実験のための screening test とした。

2) 10種の化合物を経口的にマウスに投与しその毒性を検査した。モルモットに対する治療実験の投与量決定の参考とした。

3) No. 2 (Diodoquin)と新しい化合物 No. 19, No. 18, No. 42の3種について、赤痢アメーバ感染モルモットの治療実験を行った。新しい化合物の投与によりそれぞれ有効な成績を得た。

御指導、御校閲を賜った松林部長、慶大医学部浅見助教に深く感謝すると共に、薬剤を提供して下さいた北里研究所松村部長に謝意を表す。

文 献

- 1) Anderson, H. H., Bostick, W. L. & Johnstone, H. G. (1953): Amebiasis; Pathology, Diagnosis and Chemotherapy. Charles C Thomas.
- 2) Hirabayashi, A. (1959): Studies on the antiamebic effect of Protomycin, a new antibiotic isolated from the culture filtrate of a species of Streptomycetes. J. Antib. Ser. A, 12, 298-309.
- 3) Hrenoff, A. K. & Nakamura, M. (1951): *In vitro* and *in vivo* studies of a new antibiotic, Fumagillin, with *Endamoeba histolytica*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 77 : 162-164.
- 4) 猪木正三・永井光・高田季久・北浦敏行(1950) : 赤痢アメーバ培養に関する研究, 第1報, 余等所謂全血加培地に就て, 阪大医誌, 2(2), 71-84.
- 5) Lynch, J. E., Bamforth, B. J., & Goeckeritz, D. (1956): The laboratory evaluation of antiamebic activity. The comparative results obtained by the use of *in vitro* and *in vivo* methods. Antib. Chemo., 6(5), 330-336.
- 6) 松林久吉(1947) : 赤痢アメーバ, 東西弘版社.
- 7) Nakamura, M. & Anderson, H. H. (1951) : Evaluation of some chemotherapeutics against *Endamoeba histolytica* in cultures with *Trypanosoma cruzi*. Exper. Parasit., 1, 66-69.
- 8) Phillips, B. P. (1951): Measurements of direct amebicidal potential by a micromethod for the screening of drugs *in vitro*. Am. J. Trop. Med., 31, 561-565.
- 9) 高田季久(1957) : 二,三の新抗生物質の培養赤痢アメーバに対する作用, 寄生虫誌, 6(5), 441-445.
- 10) Taylor, D. J., Greenberg, J., Highman, B., & Coatney, G. R. (1950): Experimental infection of guinea pigs with *Endamoeba histolytica*. Am. J. Trop. Med., 30, 817-828.
- 11) Taylor, D. J. & Greenberg, J. (1952) : Experimental chemotherapy of *Endamoeba histolytica* infections in the guinea pig. Am. J. Hyg., 56, 58-70.
- 12) Thompson, P. E., McCarthy, D. A., Bayles, A., Reinertson, J. W. & Cook, A. R. (1956) : Comparative effects of various antibiotics against *Endamoeba histolytica in vitro* and in experimental animals. Antib. Chemo., 6(5), 337-350.

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE EFFECT OF NEW OXYQUINOLINE DERIVATIVES ON *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*


AKIRA HIRABAYASHI

(*Laboratory of Parasitology, Kitasato Institute, Tokyo, Japan*)

Altogether 67 oxyquinoline derivatives and allied compounds were tested for their antiamebic *in vitro*. Balamuth's monophasic medium was used for the cultivation of amoebae throughout this study. Yatren, vioform and diodoquin were included. Most of these compounds had bacteriocidal activity so that the effects demonstrated *in vitro* may not always indicate the direct amebicidal action of these compounds.

These compounds could be classified into 12 groups according to their chemical structures and generally speaking, highly effective compounds were mostly found in halogen compounds, carboxy compounds, keto compounds and alcohol derivatives (Table 1). Ten compounds were selected from different groups and were given orally to mice to test their toxicity. Some of the compounds were rather toxic and killed mice by the doses of 250-300 mg/kg. Most compounds, however, were not much toxic, mice having survived doses of 500-2,000 mg/kg. Thus approximate doses for therapeutic experiments were decided.

For the experimental treatment, guinea pigs were inoculated intracaecally with *E. histolytica* and compounds were given orally for 5 successive days. Animals were autopsied when they died of infection. When they survived, they were killed 30 days after inoculation. Animals died or killed were examined for the presence of amoebae and lesions in their intestinal tracts. The following compounds were found to be more or less effective with the daily doses indicated.

5-CH(OH)CCl-7-iodo-8-hydroxyquinoline : 500 mg/kg, % efficiency : 91.7%. 5-COONa-7-iodo-8-hydroxyquinolinoline : 150 mg/kg, % efficiency : 66.7%. 5-CO--7-iodo-8-hydroxyquinoline : 100 mg/kg, % efficiency : 41.7%. Diodoquine : 75 mg/kg, % efficiency : 33.3%.