

Dithiazanine iodide (スミレ) 錠による肝吸虫症の治療

(5) Dithiazanine iodide の虫体に対する作用と胆汁からの証明

山口 富雄 高木 一孝 篠藤 満亮

徳島大学医学部病理学教室

(昭和36年10月9日受領)

特別掲載

沃化ジチアザニン Dithiazanine iodide が、肝吸虫に対して著明な殺虫効果を有しており、また、実験的に感染させた動物に対しても、生体内ですぐれた効果のあることは、すでに報告した通りである。

肝内胆管に寄生する肝吸虫に対して殺虫力のあることは、当然、本剤が吸収されて胆汁中に排泄されることを意味する。その場合、果して虫体のどの部分に作用するか、また、胆汁中にどの程度に排泄されるかを確かめることは、投与量、投与期間の決定はもちろん、治療判定の上にも、重要な問題である。われわれは、それらの点を明らかにするために、1960年4月以降、研究をすすめてきたが、漸くにして、虫体に対する作用部位を確かめ、また、胆汁中からの定量に成功したので、今日迄の結果をまとめて報告する。

材料および方法

1. 虫体に対する作用機序の研究

1) 実験動物および投与方法：肝吸虫メタセルカリアを保有する淡水魚「モツゴ」*Pseudorasbora parva* を投与し、実験的に感染させてから38日後のウサギ6頭を使用した。沃化ジチアザニンの製剤としては、スミレ Smiray (エーザイ)を用い、1日量として60~70 mg/kg を連日経口的に与え、1日後、2日後、3日後、4日後、5日後および7日後にそれぞれ致死、剖検し、肝から取り出した虫体について検査した。

2) 固定および染色の方法：取り出した虫体は、蒸留水でよく洗い、7% formalin, 10% formalin, Carnoy液, 無水 alcohol, 冷無水 acetone などで24時間固定後、alcohol または carbowax 1,500 で脱水し、paraffin または carbowax 4,000 で包埋した。paraffin で包埋した虫体は5 μ , carbowax で包埋した虫体は6 μ の連続切片とし、染色は、hematoxylin-eosin 重染色、鍍銀染色、

膠原線維染色、格子状線維染色、多糖類染色、glycogen 染色、核酸染色、phosphatase 染色、脂肪染色などを行なつて観察した。

2. 胆汁からの証明

1) 胆汁の採取：胆嚢瘻をイヌに造設し、Smiray 投与前および投与後の胆汁を採取。

2) 抽出の方法：胆汁5cc に等量の acetone を加え、室温で24時間放置後、硝子フィルターで濾過する。この濾液を、湯ぶねで、ほぼ原量にまで濃縮し、これに等量の蒸留水、さらに30cc の chloroform を加えて、室温で24時間放置する。次いで、分液ロートで分離した chloroform 層を、1% NaOH で3~4回洗い、減圧濃縮後、乾燥し、dimethylformamid で溶解、原量とする。

3) 定量法：日立分光光度計 (EPU-2 型) により、吸光度を測定。検量曲線の作製は、Smiray 投与前の胆汁 (イヌ4頭を使用) をとり、既知濃度の沃化ジチアザニンの acetone 溶液を加え、1cc 当り1 γ , 5 γ , 10 γ , 25 γ , 50 γ および 100 γ となるようにする。これを、上述におけると全く同様の操作を加えて、吸光度を測定した。

成績

1. 虫体の変化

1) 肉眼的所見

1日後では著変なく、2日後には、軽度の青色を呈する。3日後には、淡青色となり、運動も不活潑、4日後では、かなり青味が強くなり、運動も極めて不活潑で、体色は赤色調を失ない白色調が強くなり、ほぼ完全な形態の死虫も認められる。5日後および7日後では、そのほかに、すでに種々の程度に崩壊した死虫を多数見出すことができる。

使用したウサギ6頭における感染状況は、第1表に示す通りである。7日後では、投与前の EPG (糞便 1g 中

第 1 表 ウサギの感染数 (60-70 mg/kg 投与)

No.	感染後 (日)	体 重 (kg)	投与前 EPG	剖検まで の日数	感 染 数
51	38	2.2	81,700	5	410 (中死 165)
52	38	2.2	50,400	3	319
53	38	2.1	22,400	2	142
54	38	2.2	56,300	4	465 (中死 104)
55	38	2.3	62,000	7	76 (中死 54)
56	38	2.4	11,000	1	142

の虫卵数) が 62,000 であった No. 55 が、わずかに 76 匹の虫体を証明したにすぎず、しかも、そのうち 54 匹は死滅した状態であり、5 日間の投与をもつてしても、かなりの殺虫効果が、うかがわれる。

2) 組織学および組織化学的所見

外皮 cuticle: 1 日後から剥離しはじめ、3 日後には殆んど失なわれている。多糖類は減少ないしは消失し、RNA も減少あるいは消失するが、これらの変化は、早期から認められる。

外皮下筋層 subcuticular muscle: 4 日後から軽度の剥離がみられ、染色性の低下と菲薄化があり、死虫では殆んど染色性を失なっている。好銀物質は、死虫では殆んど消失しているが、生虫ではよく残存している。多糖類は、5 日後までは少量ながら認められ、死虫でも認められる。glycogen は、1~2 日後では正常よりもむしろ増加しているが、以後は減少している。RNA は、3 日以後に減少、酸性 phosphatase は、検査の全期間にわたり、生虫ではやや増加し、死虫および崩壊した虫体では認められない。

外皮下細胞 subcuticular cell: hematoxylin-eosin 染色による変化は、4 日後から認められ、核の染色性低下、変性などがみられる。多糖類は、1 日後から減少しはじめ、4 日後からは消失する。glycogen は早期から消失するが、DNA はむしろ増加しており、RNA は 4 日以後に消失している。アルカリ性 phosphatase は早期から消失するが、脂質の分布には殆んど変化がない。

体肉細胞 parenchymal cell: haematoxylin-eosin 染色による変化は、4 日後から認められ、核および細胞質の染色性の低下ないしは消失があり、5 日以後では、細胞の融解もみられる。好銀物質には殆んど変化なく、多糖類は、1 日後ではむしろ増加しているが、2 日以後では減少がみられ、5 日以後では殆んど消失する。glycogen は、1 日後から著明な減少があり、4 日後には殆んど消失している。DNA は、4 日後に若干の変化があるが、生虫では著明でなく、死虫では殆んど消失しており、RNA は、3 日後に著明な減少がみられ、4 日以後では

殆んど消失する。アルカリ性 phosphatase は 1 日後から、酸性 phosphatase は 2 日後から、それぞれ消失するが、脂質の分布は変化が軽度である。

巨細胞 giant cell: この細胞には、殆んど変化を認めない。

口吸盤 oral sucker および腹吸盤 ventral sucker: 外皮の剥離は体表外皮よりも著明で、4 日後からは筋層の剥離も認められ、全般に菲薄となるが、hematoxylin-eosin による染色性の低下は著明でなく、崩壊した虫体でも、比較的によく原型を保っている。好銀物質には殆んど変化なく、多糖類の減少も著明ではないが、glycogen は 4 日後から急激な減少が認められる。核酸の変化は著明でなく、カルカリ性および酸性 phosphatase は 1 日後から消失するが、脂質の分布には殆んど変化ない。

咽頭 pharynx: hematoxylin-eosin 染色による変化は軽度であるが、死虫では、外層および筋層の融解、核の変性、崩壊などがみられる。好銀物質の分布、筋線維の性質などには著変を認めない。多糖類は、4~5 日後から減少しはじめ、glycogen は、2 日後から急速に減少して、5 日以後では殆んど消失する。筋肉の RNA は、3 日以後では減少ないし消失している。アルカリ性 phosphatase は、1 日後から認められないが、脂質の分布には、殆んど変化がない。

食道 esophagus: hematoxylin-eosin 染色による変化は、4 日以後に著明で、外皮層の消失、筋層の染色性低下、変性、融解などがみられる。好銀物質および筋線維には著変なく、多糖類にも著変はみられない。glycogen は、初期に外皮層に増加しているが、以後は軽度に減少している。RNA は、3 日以後に著明な減少ないし消失がみられる。アルカリ性 phosphatase は、初期から消失しているが、脂質の分布には著変がない。

腸 intestine: hematoxylin-eosin 染色では、1 日後から上皮の剥離がみられ、その後は上皮の剥離、全般的な染色性の低下、融解などがみられる。好銀物質、膠原線維などには、著変を認めないが、多糖類は、1 日後から減少しはじめ、2 日以後ではとくに著明である。glycogen は、腸の前半部においてとくに著明に減少している。DNA の変化は著明でないが、RNA は、3 日以後、急速に減少ないし消失がみられ、アルカリ性および酸性 phosphatase も初期から消失し、脂質の変化は殆んど認められない。

排泄囊 excretory bladder: eosin 染色性は、3 日以後には低下し、内腔面の融解もみられ、内腔は強く膨大

し、好銀線維は剝離している。多糖類は、3日以後では減少ないし消失する。glycogen は、5日後までの生虫では増量しているが、死虫では陰性で、7日後には消失している。RNA は、2日以後は認められず、アルカリ性および酸性 phosphatase は早期から消失する。

卵黄腺 vitelline glands: hematoxylin-eosin 染色では、5日以後に細胞の融解がみられるが、好銀線維、多糖類には、殆んど変化がない。glycogen は、4日以後の生虫では軽度増加しているが、死虫および崩壊した虫体では消失している。核酸には、殆んど変化がみられない。アルカリ性 phosphatase は、5日以後に減少し、酸性 phosphatase は、1日後から著明に減少しており、早期に消失する。

卵巣 ovary: hematoxylin-eosin 染色では、殆んど変化なく、多糖類も殆んど不変であるが、glycogen は、1日後から核および細胞質に著明に増加している。核酸および脂質の変化は認められない。

メーリス腺 Mehlis' glands: 殆んど変化はみられない。

受精囊 seminal receptacle: 5日後には、変形精細胞の出現をみるが、細胞数には殆んど変化なく、多糖類の分布も不変である。glycogen は、5日以後に減少をみるが核酸には殆んど変化がない。

子宮 uterus: hematoxylin-eosin 染色による変化の所見は、4日後からみられ、5日後には、卵形成機構および卵の発育は強く阻害され、卵の崩壊もみられ、死滅変性卵も多数出現する。7日後では、これらの変化はさらに強くなり、正常な卵形成機転は全く認められない。しかし、好銀物質は消失せず、多糖類の変化も著明ではない。glycogen は、1日後に軽度減少し、5日後には著明に減少、7日後には殆んど消失し、死滅変性卵には全く認められない。核酸の消長には、著明な変化はないが、アルカリ性および酸性 phosphatase は、初期から減少ないし消失する。

精巣 testicle: 殆んど変化を認めない。

貯精囊 seminal vesicle: 外壁には軽度の変化がみられるが、内容には殆んど変化なく、3日ないし5日後に膨大がみられる程度である。

以上の所見は、感染して6週以後の虫体、約3,000匹の検索所見と比較したものであつて、沃化ジチアザニン投与時における肝吸虫虫体の変化を、明らかにし得たものである。すなわち、本剤を投与すると、虫体における変化としては、合成、貯蔵、補給、排泄囊における再吸

収および本来の排泄などの機能は、急速に阻害される。しかし、腸における吸収、性器における精細胞の発育などにおよぼす影響は軽微であり、本剤は、接触した虫体に直接作用して、細胞の機能を急速に停止せしめるものとする。

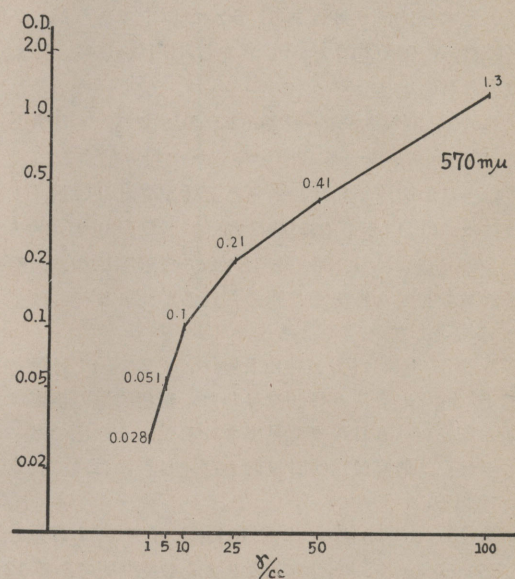
これまでの動物実験の結果からすると、肝内胆管には全く1匹の生きた虫体も認めないにもかかわらず、胆囊内には、死滅、崩壊した虫体、虫卵が多数存し、糞便中には、かなり長期にわたつて虫卵の排出をみる場合がある。この現象は、本剤の虫体に対する作用機転から、当然考えられることであり、投与後における治癒判定に慎重を期す必要がある。

なお、従来用いられているアンチモン剤、例えば、3価のアンチモン製剤である Stibnal の作用機転は、主として性器に変化を与えるとされていたが、著者らのうち高木の詳細な検索により、必ずしもそうでないことが判明した。しかし、虫体後半部においては、一般に変化が著明で、しばしば硝子化が認められる。

2. 胆汁からの証明

1) 検量曲線

イヌの胆汁に、既知濃度の沃化ジチアザニンの acetone 溶液を加え、前述の操作を加えて測定した最大吸光度の曲線は第1図に示す通りである。すなわち、最大吸光度は、570 m μ 付近にある。ところが、沃化ジチアザニンを methanol に溶解し、最終的には dimethyl-



第1図 検量曲線 (イヌ4頭の平均)

formamid で稀釈した $1\gamma/cc$ の最大吸光度は、 $651m\mu$ 付近にあり、沃化ジチアザニンは、胆汁と接触することにより、何らかの変化を受けていると考えられる。

2) 胆汁からの検出成績

イヌに胆嚢瘻を作製した場合、連日胆汁を採取することは、困難なことが多く、まして、長期間にわたつての採取は不可能に近い。今日までに、25頭のイヌに胆嚢瘻を造設したが、Smiray を投与し得たのは11頭にすぎず、しかも比較的連続して検索できたのは、5頭である。

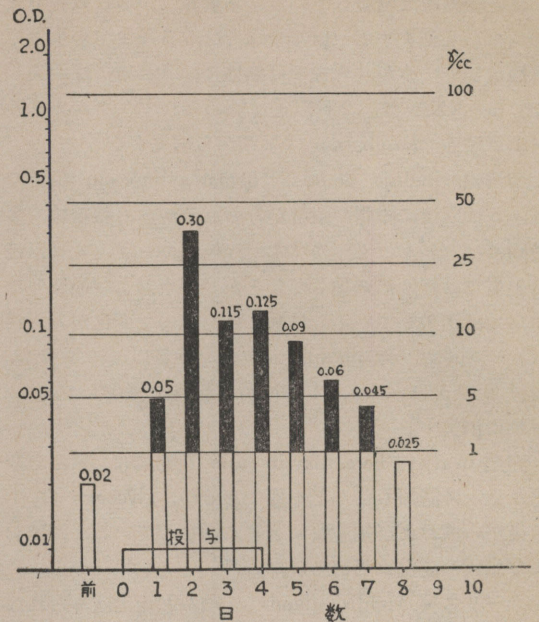
投与前の胆汁に、前述の操作を加えても、とくに着色した物質は得られないが、投与開始後の胆汁からは、淡桃色から淡赤紫色に至る着色物質が得られる。この物質の dimethylformamid 溶液の最大吸光度は、検量曲線の場合と同様に、 $560\sim 570m\mu$ 付近にあり、やはり、腸管から吸収され、胆汁中に排出された場合には、本来の沃化ジチアザニンそのものでなく、ある程度の変化をきたして、類似の物質として排出されるものと考えられる。しかし、この物質が、肝吸虫に対して、著明な殺虫効果を有していることは、従来の動物実験の結果から明らかである。

イヌ No. 1 (第2図) : 体重 5 kg のイヌで、1日量として Smiray 100 mg/kg を、5日間連用した。 $570m\mu$ における投与前の optical density は 0.02 で、検量曲線の $1\gamma/cc$ に達しないが、投与開始1日後では 0.05 (約 $5\gamma/cc$) となり、2日後には、0.30 (約 $40\gamma/cc$) と最高に達する。その後は、6日後まで、 $5\gamma/cc$ 以上であるが、7日後には、0.045 (約 $3\gamma/cc$) と減少し、8日後には、殆んど検出されない。

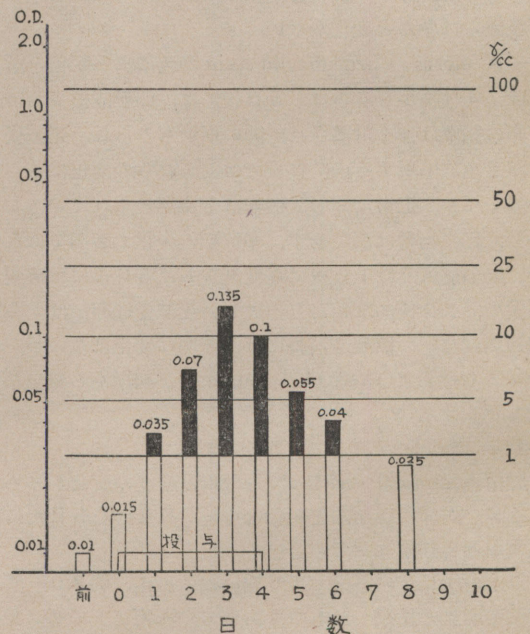
イヌ No. 2 (第3図) : 体重 6 kg のイヌで、1日量として 100 mg/kg を、5日間投与した。投与前および投与開始当日の胆汁からは、もちろん検出されないが、1日後には、O.D. が 0.035 (約 $2\gamma/cc$)、2日後 0.07 (約 $7\gamma/cc$)、3日後には 0.135 (約 $15\gamma/cc$) で最高になり、その後は減少して6日後まで認められるが、8日後には $1\gamma/cc$ にも達しない。

イヌ No. 3 (第4図) : 体重 9 kg のイヌで、1日量として 50 mg/kg を、6日間投与した。着色物質の検出は投与1日後から6日後まで見出されるが、この例では一般に少なく、最高は、2日後および4日後における約 $5\gamma/cc$ である。

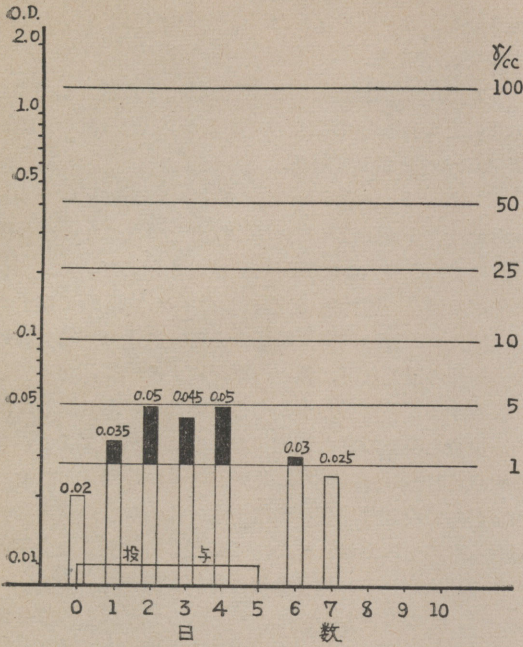
イヌ No. 8 (第5図) : 体重 18 kg のイヌで、1日量として 50 mg/kg を、今回の実験では最も長期間である 12日間、連続して投与した。1日後にすでに O.D. は 0.108



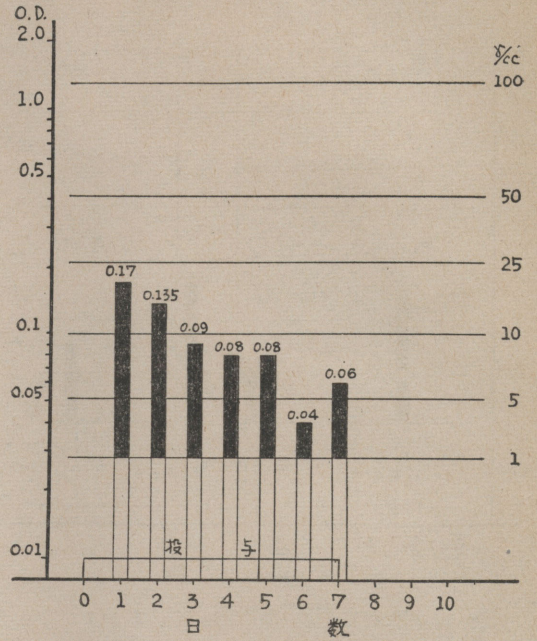
第2図 イヌ No. 1 (体重 5 kg, Smiray 100 mg/kg 5日間)



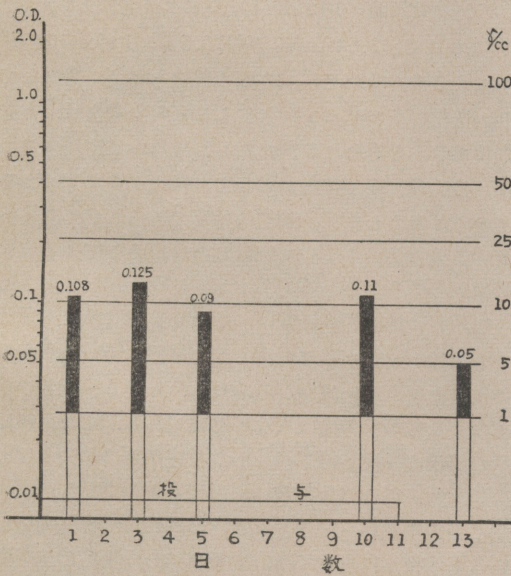
第3図 イヌ No. 2 (体重 6 kg, Smiray 100 mg/kg 5日間)



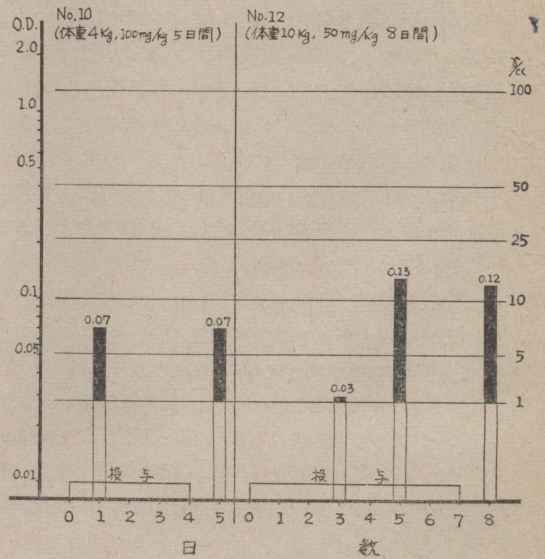
第 4 図 イヌ No. 3 (体重 9 kg, Smiray 50 mg/kg 6 日間)



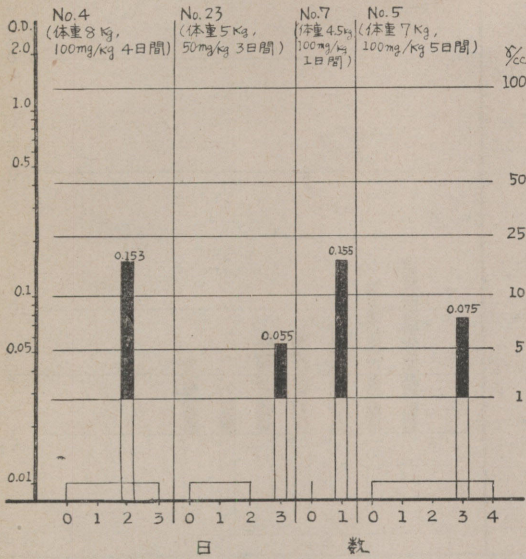
第 6 図 イヌ No. 11 (体重 4 kg, Smiray 100 mg/kg 8 日間)



第 5 図 イヌ No. 8 (体重 18 kg, Smiray 50 mg/kg 12 日間)



第 7 図 イヌ No. 10 および No. 12



第 8 図 イヌ No. 4, No. 23, No. 7 および No. 5

(約 10 γ/cc) と出現し、3日後 0.125 (約 15 γ/cc)、5日後 0.09 (約 8 γ/cc)、10日後 0.11 (約 12 γ/cc) と見出され 13日後でも約 5 γ/cc であるが、最高は、3日後における約 15 γ/cc である。

イヌ No. 11 (第 6 図) : 体重 4 kg のイヌで、1 日量として 100 mg/kg を、8 日間投与した。O.D. は、1 日後に 0.17 (約 20 γ/cc) を示して最高で、2 日後からは減少しはじめて 6 日後には 0.04 (約 3 γ/cc) となるが、7 日後には 0.06 (約 6 γ/cc) となつている。

イヌ No. 10 (第 7 図) : 体重 4 kg のイヌで、1 日量として 100 mg/kg を、5 日間投与した。1 日後および 5 日後に、それぞれ約 7 γ/cc 見出した。

イヌ No. 12 (第 7 図) : 体重 10 kg のイヌで、1 日量として 50 mg/kg を、8 日間投与したが、胆汁の採取、検査は、3 回実施できたにすぎない。3 日後の O.D. は、わずかに 0.03 (約 1 γ/cc) であるが、5 日後は 0.13 (約 15 γ/cc)、8 日後も 0.12 (約 13 γ/cc) を示している。

以下の、第 8 図に示した 4 頭は、投与期間中または投与後に、いずれも 1 回の検査しか実施できなかった例である。

イヌ No. 4 : 体重 8 kg のイヌで、1 日量として 100 mg/kg を、4 日間投与したが、2 日後の検査で 0.153 (約 20 γ/cc) を示している。

イヌ No. 23 : 体重 5 kg のイヌで、1 日量として 50 mg/kg を、3 日間投与した。3 日後の O.D. は、0.055 (約 6 γ/cc) である。

イヌ No. 7 : 体重 4.5 kg のイヌで、1 日量として 100 mg/kg を 1 日投与しただけであるが、翌日には 0.155 (約 20 γ/cc) を示している。

イヌ No. 5 : 体重 7 kg のイヌで、1 日量として 100 mg/kg を、5 日間投与したが、検査を行なったのは 3 日後だけで、O.D. は 0.075 (約 7 γ/cc) を示している。

前述の通り、胆汁瘻を造設したイヌは 25 頭に達するが、挿入ゴム管の閉塞、離脱、あるいは水分補給欠除による胆汁の濃縮など、種々の原因により、胆汁を連続して採取することは必ずしも容易ではない。しかしながら、検査を実施できた範囲において、沃化ジチアザニンの吸収、胆汁中への排泄は、比較的速やかと考えられる。すなわち、投与開始翌日には、すでにかなりの量を証明できるものもみられ、また、この翌日に検査した全例ともに、認められる。検量曲線の作製に当つて、1 γ/cc の部分は、かなり変動が多く、一応、5 γ/cc 以上の部分が信頼できるものと考えるが、胆汁中に排出される量は、多い場合には 40 γ/cc に達するものもある。なお、山口ら (1960, 1961) による沃化ジチアザニンの試験管内殺虫効果からすると、50 γ/cc (2 万倍) で平均 2.2 日、25 γ/cc (4 万倍) 2.4 日、10 γ/cc (10 万倍) 2.4 日、5 γ/cc (20 万倍) 2.8 日、2.5 γ/cc (40 万倍) 3.5 日、1 γ/cc (100 万倍) では 6.9 日、それぞれ、10 匹の成虫を完全に殺滅しており、沃化ジチアザニン投与による肝吸虫殺虫は、十分に期待できると思われる。ただし、胆汁中に出現する物質は、最大吸光度の状況からして、沃化ジチアザニンそのものとは考えられず、類似の物質であろうが、肝吸虫に対する殺虫効力を有していることは、多数の動物実験の結果から明らかである。

胆汁中に排泄される量は、やはり、投与量とも関係があり、100 mg/kg 投与の場合が、一般に 50 mg/kg 投与の場合よりも多い傾向がみられる。しかし、動物の個体差による影響も考慮に入れる必要がある。また、胆汁中への出現は、投与終了後、かなり速やかに消失するように思われ、従つて、蓄積は起らないようである。

これらの点から総合すると、われわれが現在実施している人体投与に当つては、1 日量 30 mg/kg を基準としているので、10 日程度の連用が必要と考える。

まとめ

沃化ジチアザニンが、肝吸虫々体のどの部分に作用す

るか、また、胆汁中に排出されるならば、どの程度に排出されるかなどの点について検索を実施した。その結果、沃化ジチアザニン、接触した虫体に直接作用するものであることが明らかになり、従来用いられているアンチモン剤とは、作用機転をやや異にしている。また、胆汁中から、沃化ジチアザニン、あるいはそれと類似と考えられる着色物質の検出に成功し、本剤が、確かに吸収されて胆汁中に排出される確証を得た。さらに、その定量を実施することにより、人体投与の場合、投与基準も一応決定することができた。

本論文の要旨の一部は、1960年6月、第29回日本寄生虫学会総会、1960年11月、第16回日本寄生虫学会西日本支部大会および1961年4月、第30回日本寄生虫学会総会において、それぞれ発表した。

なお、沃化ジチアザニンは、エーザイ株式会社の提供によつたものである。

参考文献

- 1) 篠藤満亮(1960)：肝吸虫症の治療に関する研究 4. ジチアザニンの胆汁からの証明と肝におよぼす影響。第16回日本寄生虫学会西日本支部大会講演抄録, 40.
- 2) 篠藤満亮(1961)：肝吸虫症の治療に関する研究 7. 胆汁中における沃化ジチアザニンの消長。寄生虫誌, 10(4), 501-502.
- 3) 高木一孝(1960)：肝吸虫の微細構造に関する研究。寄生虫誌, 9(4), 367-368.
- 4) 高木一孝(1960)：肝吸虫の微細構造に関する研究(2)。第16回日本寄生虫学会西日本支部大会講演抄録, 15-16.
- 5) 高木一孝(1961)：肝吸虫症の治療に関する研究 6. 沃化ジチアザニン投与時における肝吸虫虫体の変化。寄生虫誌, 10(4), 494-495.
- 6) 山口富雄ら(1961)：沃化ジチアザニン(スミレ錠)による肝吸虫症の治療 1. *in vitro* における殺虫効果。内科の領域, 9(3), 258-263.
- 7) 山口富雄ら(1961)：沃化ジチアザニン(スミレ錠)による肝吸虫症の治療 2. *in vivo* における殺虫効果。内科の領域, 9(4), 347-352.

DITHIAZANINE IODIDE AS A NEW ANTHELMINTIC FOR THE TREATMENT OF CLONORCHIASIS SINENSIS V. THE MORPHOLOGICAL CHANGES OF ADULT WORMS TREATED WITH DITHIAZANINE IODIDE AND THE QUANTITY OF DITHIAZANINE IODIDE DISCHARGED IN THE BILE

TOMIO YAMAGUCHI, KAZUTAKA TAKAGI & MITSUAKI SHINOTO
(Department of Pathology, School of Medicine, Tokushima University)

In 1960, Yamaguchi *et al.* exposed adult *Clonorchis sinensis* in test tubes to about 60 different medicinal products, and found dithiazanine iodide to be best in clonorchicidal effect. This drug was subsequently noted remarkably effective in animal experiments, too, and was further found to be a very promising drug for the clinical treatment of human cases of clonorchiasis sinensis.

Important for the treatment of parasitic diseases in man is not only the determination to what extent a given drug is efficient in removing or killing the parasite but also knowing what sort of effect the drug is able to exert on the body of the parasite. Besides, *Clonorchis sinensis* is localized in the distal biliary passages of the definitive hosts. Consequently, the effective clonorchicidal drugs must to be discharge in the bile. Dithiazanine iodide would be discharge in the bile from the *in vivo* action for clonorchiasis sinensis, though this drug has been considered as not absorbed from the intestine.

The authors carried out histologic and histochemical studies as to what changes are produced in the body of *Clonorchis sinensis in vivo*, following the use of the newly introduced

dithiazanine iodide, and also carried out quantitative examination of dithiazanine iodide in the bile.

The present report describes the gist of the mode of the action upon the trematode body treated with dithiazanine iodide, and the results of the *in vivo* experiments which have been undertaken with success to confirm the existence of dithiazanine iodide or dithiazanine iodide like substances in the bile.

1. Healthy rabbits weighing 2 to 3 kg were made to be infested by *Clonorchis sinensis* by giving them by mouth a fresh-water fish, *Pseudorasbora parva*, harboring the metacercariae of *Clonorchis sinensis*, and were subsequently used in therapeutic experiments. A dithiazanine iodide preparations, Smiray (Eisai Co. Ltd.) was orally given to the animals at doses of 60 to 70 mg per kilogram of body weight daily. The animals were killed at the time intervals of 1, 2, 3, 4, 5, and 7 days, and the trematodes were found at autopsy were removed.

The collected worms were washed in distilled water for a short time, and then fixed in 7% formol water, 10% formol water, Carnoy's solution, absolute alcohol and cold absolute acetone for 24 hours. The dehydration was performed with alcohol or carbowax 1,500, and the worms were embedded in paraffin or carbowax 4,000. The worms were made to serial sections in 5μ thickness and were stained by Hematoxylin-Eosin methods, silver impregnation method, PAS reaction, Glycogen staining, Nucleic acid staining, Phosphatase staining, and Fat staining.

In consecutive daily administration of a dithiazanine iodide, Smiray, the synthesizing, storing, and supplying functions of nutrients as well as excretion and reabsorption in the excretory bladder of the adult worms were observed rapidly impaired, though absorption from the intestine and the states of the genital organs were little impaired. Dithiazanine iodide, develops its action by contact; the trematode has the functions of its cells stopped rapidly after direct contact with the drug. Especially manifest is the impairment of the sustentacular tissues.

2. Thirty dogs, 5 to 15 kg, were used in the study of the proving of dithiazanine iodide in the bile. After anesthesia with Sodium isomytal, the animals were operated by the technic of biliary fistula by ligaturing the ductus choledocus and cutting the duct between ligatures, and passing a rubber tube from the fundus of the gall bladder outside the body. A dithiazanine iodide, Smiray, was orally administered to the animals at doses of 50 to 100 mg per kilogram of body weight daily.

The galls were collected daily after the administration, and were treated with acetone, chloroform, 1% NaOH, and then performed to depressive distillation. The residue was dissolved with dimethylformamide and the solution was measured in maximum of light absorption by spectrophotometer. The maximum of light absorption in these solutions were showed in $570 m\mu$.

Gall level of dithiazanine iodide or dithiazanine iodide like substances in experimental dogs following oral administration of 50 to 100 mg per kilogram daily of the drug is, though showing individual differences, 30% per ml or 40% per ml of gall in maximum. These rosy to purple coloured substances were proved the duration from the next day of administration to 2 or 3 days after stopping of administration. These findings have never been encountered in the bile of control animals which not or before administered with dithiazanine iodide.

The clonorchicidal value of dithiazanine iodide *in vitro* is demonstrated even 1 per ml, accordingly, the administration of dithiazanine iodide is certainly efficacious in the treatment of clonorchiasis sinensis.