

# *Trichomonas vaginalis* の化学療法に関する実験的研究

## (2) Trichomycin, 2-Acethylamino 5-nitrothiazole 及び Naramycin の呼吸阻害と感染マウスに対する効力

中林 敏夫 河原 勉 分野 寛治  
隅本 修 北村 孝雄

大阪大学微生物病研究所寄生虫原虫学部 (部長 猪木正三教授)

(昭和 36 年 9 月 4 日受領)

### はじめに

著者等 (中林ら, 1961) は先に 22 種の薬剤の *Trichomonas vaginalis* (以下 T.v.) に対する効力を, 培養株を用いて検査した。また, その中で T.v. の増殖阻止作用の顕著な数種薬剤については, 原虫の耐性獲得の如何および 2 種薬剤の併用効果を検討した。

本研究では抗 T.v. 作用の著明な Trichomycin (以下 Tm), 2-acethylamino 5-nitrothiazole (以下 AN) および Naramycin (cycloheximide) (以下 Nm) の 3 種について, T.v. に対する呼吸阻害および T.v. 感染マウスに対する治療効果を検討した。

Tm の T.v. に対する呼吸阻害については, 松元 (1955), 伊藤・塚原 (1956) の検圧法による測定, また岩井 (1959) のメチレンブラウ脱色能におよぼす影響についての検討がある。マウス感染原虫に対する効力検査については高田ら (1960) が腹腔内接種による膿瘍形成が薬剤の効力検査に応用できる事を強調している。

本研究では検圧法によって上記 3 種薬剤の呼吸阻害の有無および高田らによって示された方法にしたがって, マウス腹腔内感染に対する治療効果について検討したものである。

### 実験材料および方法

1. 原虫株および培養: 用いた T.v. 株は 12, 19, 4F の 3 株であり; その培養法は第 1 報 (中林ら, 1961) 記載の通りである。

2. 呼吸阻害の測定: 呼吸阻害は Warburg 検圧計を用いて行った。原虫浮游液は大量培養 (大型試験管に 70~80 ml づつ培養) した原虫を遠心沈澱 (約 3,000 rpm 5~10 分間) して集虫し, さらに pH 6.5 の M/10 磷酸緩衝液と, 0.9% 食塩水の等量液で 2 回遠心沈澱して洗滌した。集められた原虫を洗滌と同じ液中に浮游し, 原

虫数を算定しつつ所定濃度にした。

以後の術式については成績の項に記述した。

3. 腹腔内感染マウスに対する治療: マウスは ddO 系, 体重は 20 g 前後のものを使用した。大量培養原虫を遠心沈澱によつて集虫し, 所定濃度の生理的食塩水浮游液を作り, おおのこのマウスに等量づつ注射した。接種原虫数は各実験群毎に幾分異なつたが, およそ 500~600 万であり, これを 0.2 ml の生理的食塩水中に浮游した。

薬剤は原虫接種当日から連続 5 日間, 腹腔内注射または経口投与を行った。原虫接種後 7 日目にマウスを殺し, 開腹して腹腔内臓器における膿瘍形成の有無および膿瘍中の生原虫の存否を調べた。膿瘍の有無は主として肉眼的に検査したが, 膿瘍またはそれと疑わしいものについては, その部を採取し, 生鮮標本として検鏡した。膿瘍中にはほとんど全例に多数の生原虫が活動するのを認めたが, 一部には生原虫がさきわめて少く, 無数の死虫を認める場合もあつた。

各実験群毎に必づ同数の対照群をとり, 成績判定の基準とした。判定は, 膿瘍形成の有無および生原虫の存否によつたが, 膿瘍形成が全くないか, それと疑わしいものがあつても, 検鏡で全く活動原虫を認め得ない場合には感染を陰性とした。

### 実験成績

1. 呼吸阻害: 検圧法は次の条件下に施行した。容器主室には原虫浮游液 1.0 ml (原虫数は実験毎に幾分異なつたが,  $2 \sim 4 \times 10^7$  の原虫を用いた)。側室には必要にしたがい薬剤液 0.2 ml および基質として M/10 グルコース 0.2 ml の両者またはいずれかを, 副室には 20% KOH, 0.2 ml, さらに全量 2.2 ml となるように主室に磷酸緩衝液食塩水を注加した。反応温度は 37°C, 振盪数

は 100 回/分、ガス条件は空気とし、反応時間は 2 時間とした。薬剤とグルコースは同時に主室に注したが、Tm では Tm の注入後 30 分でグルコースを注した場合もあった。成績を第 1 表に表記した。阻害度は (基質加酸素吸収量 - 原虫のみ酸素吸収量) / (基質および薬剤加酸素吸収量 - 薬剤加酸素吸収量) : (基質加酸素吸収量 - 原虫のみ酸素吸収量) を百分率で示したものである。

第 1 表 *T. vaginalis* の呼吸に及ぼす  
薬剤の阻害作用

薬 剤	濃度 /ml	阻害度 (%)
Tm	1 units	0
	2 u	0
	4 u	0.7
	8 u	0
	16 u	0.5
	2 u *	9.1
	4 u *	15.8
	8 u *	40.0
AN	2 $\mu$ g	0
	4 $\mu$ g	0
	8 $\mu$ g	2.8
Nm	1 $\mu$ g	11.0
	10 $\mu$ g	15.5

\* Tm を主室へ注加して 30 分後にグルコースを注加した。

Tm の阻害成績は Tm とグルコースを同時に添加した場合は第 1 表に示されたように 1 ~ 16 u/ml 濃度では何らの阻害が認められなかった。一方、Tm を添加して 30 分後にグルコースを添加した場合には、2 ~ 8 u/ml 濃度で呼吸阻害を認めた。その阻害度は表中に示されたように Tm 濃度の増加と共に増大した。

AN の阻害は 2 ~ 8  $\mu$ g/ml ではほとんど認められなかったが、Nm では 1 および 10  $\mu$ g/ml である程度の阻害が認められた。なお、自家呼吸に対する阻害は 3 種薬剤ともに認め得なかった。

2. 腹腔内感染マウスの治療: Tm, AN, Nm の各薬剤について、経口投与、腹腔内投与の各投与方法およびそれぞれの投与量に応じ、各群 4 匹のマウスを用いた。各薬剤の投与量は予備実験でマウスに異常を来さない事を検討して定めたもので、少なくともこの投与量では実験期間中にマウスが致死的な影響を受ける事がないと確認された量である。

成績は第 2 表に総括した。この成績からは AN で 2 例、Nm で 1 例の不感染、すなわち、治癒例を認めた以

第 2 表 腹腔内感染マウスに対する  
薬剤の治療効果

薬 剤	投与量 /kg	投与方法*	実験マウス数	治癒マウス数**
Tm	2500 units	経口	4	0
	1250 u	経口	4	0
	1250 u	腹腔	4	0
	625 u	腹腔	4	0
AN	2.5 mg	経口	4	1
	1.25 mg	経口	4	1
	1.25 mg	腹腔	4	0
	0.625 mg	腹腔	4	0
Nm	2.5 mg	経口	4	1
	1.25 mg	経口	4	0
	1.25 mg	腹腔	4	0
	0.625 mg	腹腔	4	0
対照			12	0

\* 薬剤は感染日より連続 5 日間投与した、\*\* 効果判定は感染後 7 日目に行つた。

外は全例に膿瘍形成がみられた。膿瘍は腹腔内各所に形成されたが、胃および肝臓の表面、小網、腸間膜等に形成される事が多かつた。これら膿瘍は点状のものが多く、大きくとも帽針頭大を越えるものは少く、これらはピンセット等によつて比較的容易に形成部位から剝離できた。治癒効果は既述のように、膿瘍形成の有無および生原虫の存否によつて判定した。本実験成績からは用いた 3 種薬剤とも、より大量を投与しなければ、明確な治効量を求める事はできないと考えられた。

## 考 察

著者等は第 1 報において、22 種の薬剤の抗 T.v. 作用を試験管内で検討し、さらにその効力の著明な数種について二三の吟味を加え、その成績を報告した。本研究では、それらの薬剤の中から Tm, AN, Nm の 3 種を選択し、その抗 T.v. 作用についての知見を進める目的で行つたものである。その成績は当初の期待に反して、呼吸阻害においても、感染マウスの治療効果においても、必しも明確な結果を得たものとはならなかつたという事ができる。

薬剤の試験管内における T.v. 増殖阻止作用についての報告はきわめて多いが、動物実験や他の特殊な方法でその作用を検討した報告はさほど多くはない。

呼吸阻害については松元(1955)、伊藤・塚原(1956)は Tm が著しい呼吸阻害を示す事を報告している。伊藤・塚原の成績では 0.31 u/ml 以上の Tm 濃度で著明なグ

ルコース酸化能の阻害を認め、また原虫の homogenate を用いた実験で、Tm は pyruvate 酸化を抑制するが、malate 酸化に影響を与えないとの興味ある結果を示している。今回のわれわれの成績では、Tm によるグルコース酸化の阻害作用はほとんど認められなかった。ただ、予め 30 分間 Tm と接触せしめた場合の原虫では、表中に示したようにかなりの阻害が認められたが、この点についての評価はなお十分な吟味を経なければならぬと考えられる。

AN においては 2 ~ 8  $\mu\text{g/ml}$  では、全く認むべき阻害を示さなかつたが、Nm では 1 および 10  $\mu\text{g/ml}$  で表中に示すような阻害度が認められた。

抗 T.v. 作用を持つ各種薬剤が研究上のみならず、すでに治療剤としてさかんに用いられている。これら薬剤の効果が単に試験管内における増殖阻止のみによつて判断されるに止まらず、実験的に多方面からその作用が検討される事が望ましい。その意味からも、呼吸阻害の有無についての検討は今後も応用価値の大きいものと思われる。

T.v. の実験的感染動物による薬剤の検定には、先ず T.v. の動物感染を確立する事が先決問題であり、今までに多くの研究者によつて感染実験が行なわれている。にもかかわらず、まだ薬剤検定に応用できるような適当な動物感染を得ていない段階という事ができる。猪木・浜田(1953)は T.v. のマウス腹腔内感染によつて、マウスによる継代の可能な感染を得たが、この場合の感染原虫は生物学的性状が *T. foetus* にきわめて類似する変異株となつている事実を報告した。しかしこの猪木・浜田の認めたような変異型原虫によるマウス腹腔内感染については、その後、山田(1954)、石井(1957)、織田・高田(1959)等による追試があるが、いずれも *T. foetus* に類似した変異型原虫の出現を確認していない。著者等による検討の結果も全く *T. foetus* 型株によるマウス腹腔内感染を認めていない。故に T.v. によるマウス腹腔内感染の成立については、一層慎重な検討を要すべきものと考えられる。この点に関して、著者等は最近 T.v. のマウス腹腔内感染において、著者等の保有する 1 株(4 F 株)が腹腔内で原虫が全く遊離のまま増殖し、マウスは感染によつて致死し、またその感染原虫はマウスによつて継代維持できる事実を得ている。この感染株は *T. foetus* とは全然異なり、元の培養 T.v. と全く同じ生物学的性状の原虫であり、この感染株を用いての薬剤効果に関しても、現在研究中である。

マウス腹腔内接種による膿瘍形成を薬剤検定に用いた報告に関しては、先に高田等は、500 万以上の原虫接種により、接種後 6 日目には膿瘍形成およびその膿瘍中に活動原虫が確実に認め得る事実を応用し、薬剤検定を試みている(織田, 1959)。著者等もその方法に準拠し今回の実験を行つたものであるが、結果としては、用いた薬量では満足すべき治療効果を認め得なかつたといえる。織田の得た成績によると、Tm では 0.02mg/20 g の 1 回腹腔内投与、1 日量 2 mg/20 g の 2 日間経口投与、また AN では 1 日 2 mg/20 g の 1 回腹腔内投与、1 日量 4 mg/20 g の 6 日間経口投与で、それぞれ治療効果が認められている。これらの投与量は大体において、著者等の場合よりはるかに大量である。高田等の主張するように、この感染方法が薬剤の *in vivo test* の一つとして十分その価値を持つものである事には異存はないが、この感染では、自然治療傾向が強く、また原虫株、マウス個体によつて感染度に差異を認める事等、および結果判定にマウスの開腹による感染の有無判定を実施しなければならない点等から、薬剤検定に、より確実に応用できる T. v. の実験動物感染の成立が望まれるべきであらう。

## 結 論

*T. vaginalis* に対し顕著な増殖阻止作用を有する、Trichomycin, 2-acethylamino 5-nitrothiazole および Naramycin の 3 種薬剤について、T.v. に対する呼吸阻害および腹腔内感染に対する治療効果を検討し、次の成績を得た。

- 1) Tm の 1 ~ 16  $\mu\text{g/ml}$ , AN の 2 ~ 8  $\mu\text{g/ml}$  では T.v. のグルコース酸化に何らの影響が認められなかつた。Nm の 1 および 10  $\mu\text{g/ml}$  では僅かの阻害が認められた。Tm をグルコースより 30 分先に原虫に加えた場合には相当な阻害が認められた。
- 2) 3 種薬剤とも、本研究で用いた薬量では、腹腔内感染マウスに対する明瞭な治療効果を示さなかつた。

本論文の要旨は日本寄生虫学会西日本支部第 15 回大会(広島市 1959)及び第 29 回日本寄生虫学会総会(札幌市 1960)で発表した。御校閲をいただいた猪木教授、資料の提供をいただいた藤沢薬品 KK. 大阪研究所唐崎正博士に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Inoki, S. & Hamada, Y. (1953): Experimental transmission of *Trichomonas vaginalis* (pure culture) in mice. *J. Infect. Dis.*, 99, 1-3.
- 2) 伊藤泰一・塚原毅 (1956): *Trichomonas vagi-*

- nal* の呼吸に及ぼす Trichomycin の影響. J. Antibiotics, ser. B. IX-7, 325-329.
- 3) 岩井澄雄(1957): 膾トリコモナスの小動物接種実験. 寄生虫誌, 6(2), 136-144.
  - 4) 岩井澄雄(1959): 数種薬剤の *Trichomonas vaginalis* のメチレン青脱色能に及ぼす影響. 寄生虫誌, 8(5), 655-658.
  - 5) 浜田義雄(1953): *Trichomonas vaginalis* の生物学的研究. 第3報 実験動物接種試験(1), 阪大医誌, 5(6), 511-521.
  - 6) 松元重達(1955): 膾トリコモナスに関する実験的並びに臨床的研究. 鹿大雑誌, 7(2), 124-162.
  - 7) 中林敏夫・河原勉・分野寛治・隅本修・北村孝雄(1961): *Trichomonas vaginalis* の化学療法に関する実験的研究. (1) 培養原虫に対する薬剤の効力について(Trichomycin を中心に). 寄生虫誌, 10(6), 650-656.
  - 8) Newton, W. L., Reardon, L. V. & De Leva, A. M. (1960): A comparative study of the subcutaneous inoculation of germfree and conventional guinea pigs with two strains of *Trichomonas vaginalis*. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 9(1), 56-61.
  - 9) 織田行正(1960): 膾トリコモナスのマウス接種実験並に *in vitro* における薬剤検定への応用について. 阪市大医誌, 9(6), 101-124.
  - 10) 織田行正・高田季久(1960): 膾トリコモナスのマウス接種実験. 寄生虫誌, 9(4), 66.
  - 11) Schnitzer, R. J., Kelley, D. R. & Leiwant, B. (1950): Experimental studies on Trichomoniasis I. J. Parasit., 36, 343-349.
  - 12) Stabler, R. M. & Wellentin, R. W. (1953): Effect of 2-amino 5-nitrothiazole (enheptin) and other drugs on *Trichomonas gallinae* infection in the domestic pigeon. J. Parasit., 39(6) 637-642.
  - 13) 山県宏(1954): *Trichomonas* (*T. vaginalis* 及び *T. foetus*) 純粋培養のマウス感染試験. 長崎医誌, 29, 375-379.

STUDIES ON THE EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY IN *TRICHOMONAS VAGINALIS* II. INHIBITING EFFECTS UPON THE RESPIRATION OF PARASITES AND THERAPEUTIC EFFECTS ON INFECTED MICE OF TRICHOMYCIN, 2-ACETYLAMINO 5-NITROTHIAZOLE AND NARAMYCIN

TOSHIO NAKABAYASHI, TSUTOMU KAWAHARA, KANJI WAKENO,  
OSAMU SUMIMOTO & TAKAO KITAMURA

(Department of Parasitology, Research Institute for Microbial Diseases,  
Osaka University, Osaka)

Trichomycin, 2-acetyl amino 5-nitrothiazole and Naramycin, showing a remarkable inhibiting effect upon the growth of cultured *Trichomonas vaginalis*, were examined for their inhibiting effects upon the respiration of parasites by use of Warburg manometer and for their therapeutic effects upon mice intraperitoneally infected with parasites.

On glucose oxidation of parasites, no remarkable effect could not be found with 1 to 16 units per ml of Trichomycin and with 2 to 8  $\mu$ g per ml of 2-acetyl amino 5-nitrothiazole, but a small inhibiting effect could be measured with 1 and 10  $\mu$ g per ml of Naramycin. In the case, in which Trichomycin was added to parasites 30 minutes earlier than glucose, it could be observed that the oxygen consumption of the parasites was inhibited in some grade with 2 to 8 units per ml of Trichomycin. The complete therapeutic effects of these drugs upon infected mice could not be expected in the results obtained in this experiment.