

Trichomonas vaginalis の化学療法に 関する実験的研究

(3) Trichomycin, 2-acetylamino 5-nitrothiazole および Naramycin の効力についての実験的考察

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

前2報の研究にひきつづいて、Trichomycin(以下Tm) 2-acetylamino 5-nitrothiazole (以下 AN) および Naramycin (以下 Nm) の3薬剤について、それらの *T. vaginalis* に対する作用を検討した。これらの3種薬剤は、いずれも V-bouillon 培地中で、顕著な抗 *T. v.* 作用が認められたものであるが、第1報で行った効力検定法は、薬剤を培地へ添加して48時間培養の後に、原虫の増殖の有無によって判定したものであった。

本研究は薬剤の効果をより適確に判定する目的で行ったもので、薬剤の効力の発現に関係する主要因として、濃度の他に原虫との接触時間を考慮し、この両者を関連させて検討した。すなわち、先づ、これら3薬剤が原虫との比較的短時間の接触によって、その後の原虫の生死、増殖にどのような影響を与えるかを観察して薬剤の効力を比較検討した。

つづいて、効力の著明であった Tm については、15分および30分の短時間の接触後、洗滌した原虫体部にかの Tm 量が検出されるかを、*Candida albicans* を用いて微量比濁定量し、きわめて興味ある知見を得た。

その成績は、これらの薬剤、特に Tm の抗 *T. v.* 作用を論じるに当つて、寄与する点が多いと考え、その成績をここに報告する。

実験材料および方法

用いた原虫株は4F株で、培養は V-bouillon を使用した。

原虫浮遊液は次のようにして作製した。48時間培養原

虫を遠心沈澱(約3000 rpm 5分)して集虫し、その上清部を棄て、0.9%食塩水を加えて攪拌し、再び遠心沈澱して集虫し、その沈渣原虫部に所定量の V-bouillon または0.9%食塩水を加えてよく攪拌し原虫浮遊液とした。この浮遊液中の原虫は検鏡によつてその大部分が活発な運動を示すものであることを確めて実験に供した。

この原虫浮遊液と、薬剤の0.9%食塩水溶液との等量を混合し、37°C 孵卵器中に所定時間保温した。以後の操作はそれぞれの実験によつて相違するので、実験成績の項に併せ詳述することとした。

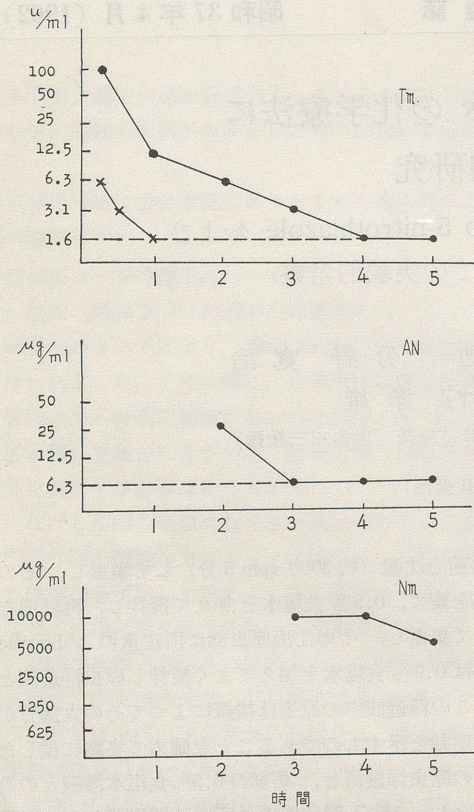
実験成績

1. 薬剤効果と作用時間の関係についての検討

一定時間薬剤と接触した原虫が、正常の培地中に移されて後に、その増殖にどのような影響を受けるかを検討した。

原虫と薬剤の混合液中の原虫数は 10^6 /ml となるようにし、Tm, AN, Nm の各薬剤は、Tm 0.8~100u/ml, AN 0.8~50 μ g/ml (溶媒として用いたエタノールの原虫に対する影響のために、これ以上の濃度は用いることができなかった)、Nm 1~10,000 μ g/ml の各濃度のものを使用した。所定時間37°C に保温して後、各濃度の試料からピペットでそれぞれ1ml を採取し、直ちにその1滴を検鏡して、原虫の生死、運動性の有無を検し、残部には可及的多量の0.9%食塩水を加えて遠心沈澱し、その沈渣原虫部に食塩水を加えて再度遠心沈澱し、その沈渣原虫部をそれぞれ V-bouillon に加えて培養した。

48時間またはそれ以後においても、原虫の増殖を認め



第1図 薬剤の作用時間と増殖阻止効力との関係

●—● V-bouillon 浮遊液の場合
×—× 食塩水浮遊液の場合

ない場合には薬剤が有効であったと判定した。各作用時間毎における薬剤の最小有効量を図示すると第1図のようであった。図中、点線で示した濃度は、対照として同時に行った薬剤の培養基中での原虫に対する最小増殖阻止濃度である（実験方法は第1報記載の通りである）。

Tm は3薬剤中で最も顕著な効果を示したものと判断されたが、浮遊液として V-bouillon を用いたものと食塩水を用いたものとで著しい効力の差異があらわれたことは注目された。V-bouillon 中に浮遊とした場合、その効力は接触1時間で相当著しく、4時間で最小増殖阻止濃度と合致した。食塩水浮遊液では $1/4$ および $1/2$ 時間で、すでに顕著な効果がみられ、1時間では 1.6 u/ml で充分な効力を示した。

AN は3時間で最小増殖阻止濃度である $6.3 \mu\text{g/ml}$ において効力を示し、2時間では $25 \mu\text{g/ml}$ で効力が認められた。しかし、1時間では $50 \mu\text{g/ml}$ で全く効力が認

められなかった。なお $50 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度は、前述のようにエタノールの濃度の関係で実験を行い得なかった。

以上の2者の成績に反し、Nm ではほとんど効果が認められず、5時間接触でなお 5 mg/ml の高濃度でしか効果が示されないような成績となった。前2者の成績とは著しい相違と考えられ、興味ある知見といえよう。

2. 短時間接触後における原虫体部からの Tm の検出について

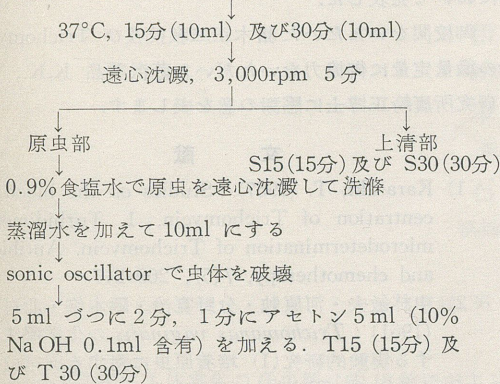
前の実験において、Tm の食塩水浮遊原虫に対する著しい効力はことさらに注目された。この短時間接触での効力の発現の1因として、Tm はきわめて速かに原虫体内に透過するか、あるいは虫体表に吸着するものではなからうかと想像された。この点についての知見を得るためにこの実験を行った。その実験方法を第1表に表記した。Tm 濃度は 10 u/ml 、原虫数は $1.6 \times 10^7/\text{ml}$ (10 mg 湿量/ml) のものを 20 ml 調製し、 37°C 、15分後にその 10 ml を、30分後に残部 10 ml を採取した。採取後直ちに遠心沈澱して原虫部と上清部に分離し、原虫部はさらに 0.9% 食塩水を加えて遠心沈澱し、その上清部は棄てた。原虫部は蒸溜水を加えて sonic oscillator によって虫体を破壊し、液量を元の量 10 ml に補正し、さらにそれを 5 ml づつに2分し、1半はそのまま、他の 5 ml にはアルカリ性アセトンを加え 10 ml としたものを検体とした。したがって第2表の成績のように、計6種の検体についての Tm 量が測定された。

Tm の微量比濁測定は唐崎 (1957) がすでに発表した測定法によつて行つた。すなわち、*Candida albicans* Yu 1200 株を用い、唐崎の modified medium L (0.5% glucose, 0.05% bonito extract, 0.05% peptone, 0.025% sodium chloride, 0.003 u/ml Trichomycin, pH 5.0) に、さらに 0.0005 u/ml ないし 0.003 u/ml の Tm を加え、 28°C 、18時間培養後に、*C. albicans* の増殖度を光電比色計 (波長 $634 \text{ m}\mu$) によつて比濁し標準感性曲線を求め、同培地に $10,000$ 倍稀釈した検体について Tm 量を測定した。

その値は第2表に示すように、上清部には15分および30分材料とも、Tm 量がきわめて少く、これに反し、虫体部からは 6 u/ml 前後の Tm 量が検出された。また、これらの成績では、Tm の接触時間15分および30分の間に、また原虫体部の蒸溜水およびアルカリ性アセトンの各抽出液間には、著明な Tm 量の差を認め得なかった。上清部の Tm 量が僅少で、虫体部にほぼ 60% の回

第1表 Trichomycin と15分及び30分接触後の原虫体からの Tm の検出

0.9% 食塩水原虫浮遊液, 10ml, 2本
10 μ ml の Tm 及び 1.6 \times 10⁷ (10mg 湿量)/ml
の原虫を含む



第2表 *Candida albicans* (Yu 1200) を用いて Tm の bioassay

検 出 材 料	u/ml*
T 15	6.3
T 15 (アルカリアセトン)	5.8
S 15	1.9
T 30	6.4
T 30 (アルカリアセトン)	6.3
S 30	1.4

* u/ml は元の液量に換算した。

収率が認められたことは注目されたが、これがどのようにして虫体部に存在していたかには言及し得ないにしても、短時間の接触によつて、著しい効力を発揮した前実験の成績と併せ考えれば、誠に興味深いものである。なお Tm の約20%は検出されなかつたが、実験操作中の消失か、あるいは Tm の安定性に関係するものであらう。

考 察

従来、多くの研究者が発表した薬剤の抗 T.v. 作用の判定は、培養基中に薬剤を加えて、ある時間後に原虫の増殖の有無を検する方法や、ある時間原虫と薬剤を接触させて後に、原虫の生死を判別する等の方法が多く、これらの結果如何によつて、薬剤の作用が増殖阻止あるいは殺作用である等と説明されていた。

しかし、実際の薬剤作用機序の解析を行なわないで、その作用の特色を云々することには疑問の余地が多いと

いわねばならない。今回、著者等が行つた実験方法は、その意味においては、薬剤の作用機構を明らかにするためのものではないが、効力の如何を薬剤の濃度と接触時間との関係を検討するための新しい一つの試みとして採用したものであつた。

薬剤と接触後の原虫を、遠心沈澱によつて洗滌することにより、薬剤との接触から完全に離れ得るかについては疑問であり、虫体内部に存在する薬剤はもちろん、虫体表に吸着その他の形で存している薬剤がそのまま残存し、その後も作用することは十分に考えられる。この点については、薬剤の性質や、原虫細胞膜透過性等の諸条件に左右されるものといわねばならないが、少なくとも洗滌後の原虫に新しく外部から薬剤の作用が加わる可能性は否定できよう。

接触後の原虫の生死、運動性、細胞内の諸変化等は、検鏡によつてもある程度判明し得るが、検鏡のみによつて正確に原虫の生死、増殖能を判定することはきわめて困難であるといわねばならない。故に、接触後の洗滌原虫を培養する方法は、容易にかつ正確に客観的判定を下し得る点に特徴を有するものといえる。V-bouillon 中で確実な増殖を得るための接種原虫の最小数は、著者等の経験からすれば数千コの原虫である。故に、10⁶/ml の原虫数を用いた本実験で、増殖を来さぬ場合には、少くとも供試原虫の99%以上に、薬剤の効力が充分に発揮されたものと解釈できた。

Tm はきわめて短時間で優れた効果を示したが、原虫浮遊液として食塩水を用いた場合と V-bouillon を用いた場合とで違つた結果を得たのは興味深い所見であつた。AN も同様に優れた効果を示したといえるが、50 μ g/ml 以上の濃度では実験できなかった。この両薬剤ともに3または4時間の接触で、従来知られていた増殖阻止効果と同様の効力を発現し得るものといえる。Nm は予期に反して、第1報記載のような効力とは全くかけ離れた成績を示したが、この点はおお味すべきであらう。

Tmの微量比濁定量によつて、15分および30分接触後の原虫体部から、当初に添加した量の約60%の Tm が検出されたことは興味ある成績であつた。この事實は Tm の有効性と関連さして考えるべきであり、Tm は相当速にかつ多量が原虫体内に入るか、あるいは虫体表に吸着その他の形で存在し、充分な効力を発揮するに至るものと考えられ、Tm の T.v. に対する作用の特徴の一つと解釈された。約20%の Tm は回収し得なかつたが、

これは既に述べたように、操作中の消失か、T_m の安定性に関係するものであろう。

T_m および AN は現在臨床的に有効な抗 T. v. 剤として用いられているが、以上の成績はその効力を薬剤濃度と接触時間との関係から1つの裏付けを与えるものと考えられた。殊に T_m に関しては、本剤の作用機構に対しても、一つの示唆を与え得るものであろう。

結 論

T_m, AN, Nm の各薬剤を1定時間作用させて後の原虫の増殖能力を培養によつて検討し、つづいて、T_m と接触後の原虫体部から微量比濁定量によつて T_m 量を測定し、以下の成績を得た。

1) 原虫浮遊液に培地を用いた場合、T_m および AN はともに秀れた効力を示し、3 または 4 時間の接触で T_m は 1.6u/ml, AN は 6.3μg/ml の濃度で強い効力が認められた。Nm の効力は、きわめて弱く、5 時間後に 5 mg/ml で効力が認められたにすぎなかつた。

2) 食塩水を原虫浮遊液とした場合、T_m の作用はさらに著明で、1 時間接触で 1.6u/ml 濃度で充分な効力が認められた。

3) 10u/ml 濃度の T_m 中で、15 分および 30 分間接触した後に、遠心沈澱によつて洗滌した原虫体部から、

約 6 u/ml の T_m が、一方、遠心沈澱上清部からは約 1.5u/ml ないし 2u/ml の T_m が検出された。

本論文要旨は第29回日本寄生虫学会総会(1960, 札幌)において発表した。

御校閲をいただいた猪木正三教授及び Trichomycin の微量定量に御協力をいただいた藤沢薬品 K.K., 大阪研究所唐崎正博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Karasaki, T. (1957) : Studies on the blood concentration of Trichomycin, 1, Turbidimetric microdetermination of Trichomycin. *Antibiotics and chemotherapy*, 7(5), 209-217.
- 2) 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). *寄生虫学雑誌*, 10(6), 650-656.
- 3) 中林敏夫・河原勉・分野寛治・隅本修・北村孝雄 (1962) : *Trichomonas vaginalis* の化学療法に関する実験的研究(2) Trichomycin, 2-acetylaminio 5-nitrothiazole 及び Naramycin の呼吸阻害及び感染マウスに対する効力. *寄生虫学雑誌*, 11(1), 8-11.

STUDIES ON THE EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY IN *TRICHOMONAS VAGINALIS*

III. FURTHER EXAMINATIONS ON THE EFFECTS 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)

With the experimental methods newly contrived by us, Trichomycin, 2-acetylaminio 5-nitrothiazole and Naramycin were examined for antitrichomonal effect upon the cultural strain of *T. vaginalis*.

Parasites and drug were kept together in saline or V-bouillon in a test tube at 37°C for rather short periods between 15 minutes and 5 hours. Then the parasites were washed twice with saline by centrifuging and inoculated into V-bouillon. Parasites were examined for growth after being kept at 37°C for 48 hours or longer. It was found that Trichomycin and 2-acetylaminio 5-nitrothiazole showed a powerful growth inhibiting effect upon the parasites which had contacted with these drugs for a short time and that even 1.6 units per ml of Trichomycin had the complete inhibiting effect with less than 1 hour's contact with parasites in saline.

Parasites which had been kept with 10 units per ml of Trichomycin at 37°C for 15 and 30 minutes, were washed twice with saline and broken down with sonic oscillator. The broken parasites were resuspended in the same volume of distilled water or alkaline acetone water to the original. With the turbidimetric microdetermination method provided by Dr. T. Karasaki, as much as about 6 units per ml of Trichomycin could be found in these suspensions.