

寄生虫卵殺滅剤に関する研究

(2) 蛔虫卵に対する非水溶性 Thiabendazole の殺卵効果, とくに各種作用条件下における効果

久津見晴彦

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和 38 年 11 月 1 日受領)

緒言

著者は第 1 報で寄生虫中間宿主貝類の殺滅剤として知られる NaPCP (sodium pentachlorophenate) について回虫卵殺卵効果を検討し, 酸性化尿尿中ではその効果が発揮されることを報告した(久津見, 1963). 今回は家畜とくに羊の腸管内寄生線虫に対して優れた駆虫効果を示す新駆虫剤 Thiabendazole (MK-360)につき, 回虫卵殺卵効果を報告する.

Thiabendazole は Brown *et al.* (1961)により駆虫効果を有する薬剤として初めて合成され, その後多くの報告により山羊, 羊, 豚, 犬などの腸管内寄生虫 (*Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Bunostomum*, *Strongyloides*, *Chabertina*, *Trichuris*) 及び *Trichinella* などに有効とされている. これらの動物に対する投薬は 50~100 mg/kg の屯用, 又は飼料に 0.1~0.3 % 混入して長期間投与するが, 中毒作用は全くなく, 造血機能や腎機能にも殆んど障害を与えないとされている (Ames *et al.*, 1963; Baker *et al.*, 1962; Cairns, 1961; Campbell *et al.*, 1961, 1962; Drudge *et al.*, 1963; Dunsmore, 1962; Egerton, 1961).

これらの報告を検討したところ, 駆虫に際して成虫駆除ばかりでなく虫卵の産生抑制, 卵の仔虫形成阻害が認められること (Brown *et al.*, 1961), *in vitro* での完全な回虫卵分裂阻止濃度は 1 ppm 以下であろうという推定 (Egerton, 1961) などが注目された.

以上の理由からこの薬剤を用いて回虫卵殺卵効果試験を行なったところ, 著しい殺卵効果を認めたので報告する.

なお, 著者は第 1 報の考察において次の如き内容の殺

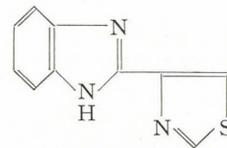
卵効果判定実験方法を提唱した.

1) 便宜的に冬期, 春秋, 夏期の気温を代表する 5°C, 15°C, 25°C の作用温度の設定, 2) 従来の 7 日, 14 日に代わる実験日数短縮を目的とした 3~4 日, 7 日の作用日数の設定, 3) 殺卵効果を増減せしめる因子としての pH を検討するための緩衝液中殺卵試験, 4) 作用期間延長の可能性を調べるために尿尿中における薬剤の残存効果, などがそれである. 従つて本報においては上記の条件を満足せしめるように努めて実験を行なつてみた.

実験材料及び方法

1. 使用薬剤

殺卵剤として用いた薬剤は Thiabendazole (2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, Merck Sharp & Dohme 社製) でその構造は第 1 図の通りである. 純末は白色で分子量



C₁₀H₇N₃S

2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole

第 1 図 Thiabendazole の構造式

201.3 であり, m. p. は 298~299°C, 水に殆んど不溶でアルコール類, エステル類に僅かに溶け, dimethyl formamide (和光純薬) を溶媒とすれば完全に溶解する. 固形のままでも溶液としても安定な化合物である. 従つて非水溶性純末は dimethyl formamide にとかしたのち水で稀釈した.

2. 薬剤の投入方法

薬剤は溶媒にとかしたのち水を加えて中間濃度水溶液

とし、その一定量をメヂウムに加えて所定の濃度にした。対照は溶媒の最高混入量と同量の溶媒のみを加えたもの、あるいは水を加えたものを置いた。作用濃度の表示は1,000,000倍稀釈を1ppmとし、これを基準にして各稀釈濃度をppmで表現し、便宜的に稀釈倍率を併記した。引用論文の作用濃度もこれに準じた。

3. 回虫卵

東京都芝浦屠場で採取した新鮮な豚雌回虫の子宮末端部4cm内の受精卵で、氷室に保存し使用時に尿尿中に混入して虫卵含有尿尿液を作った。メヂウムが水、緩衝液、尿などの場合は、豚胆汁によつて処理した虫卵(中山, 1958)を使用した。

4. メヂウム

主として水及び尿尿をメヂウムとしたが、尿尿は1:5の比に混合してガーゼ1枚で濾過した。上記各メヂウムの量は50mlで、容器は高さ7.5cm、直径4cmのガラス管瓶を用い、容器の口はパラフィン紙で覆い輪ゴムで止めた。緩衝液による実験のみ40mlである。

実験に際しては虫卵含有メヂウムに薬剤を混入して充分攪拌し、所定の温度にした恒温槽内に置き、作用期間中に特別な振盪は行なわなかつた。

5. 効果判定

薬剤の効果判定は作用を受けた回虫卵の生死判定によつて行なつた。即ち所定の作用日数に達した尿尿メヂウムを、Beckman pH meterでpHを測定し、全量を300ml入り尿コップに移して水道水を満したのち攪拌し30分以上静置する。次で上清を捨て再び水を加える操作を3回繰返して得た沈渣を遠心沈澱し、これを素焼皿にのせて少量の水を添加したシャーレ内に入れて30°Cの恒温槽で培養した。水をメヂウムとした場合の培養は同様

の操作をして得た虫卵を少量の水と共に管瓶内で培養した。培養後1週、2週、4週目に虫卵の一部をとり、3倍稀釈アンチホルミン1滴を加えて蛋白膜を除去し、その100コ以上について観察を行なつた。最終的な虫卵の生死判定は培養4週後の虫卵内容の観察により、仔虫期卵のみを生存卵とし、その他の単細胞異常卵(泡形成、収縮、転位、透明化、崩壊、顆粒化など)及び異常発育卵(初期分裂異常、桑実期・蝌蚪期異常、仔虫期異常)などは死卵と見做した。殺卵効果の判定及び比較は主として仔虫期卵形成率(百分率)によつたが、必要な場合は各種異常卵百分率も参考にした。

実験成績

1. 水中における Thiabendazole の殺卵効果

作用濃度は6.25ppm, 3.12ppm, 1.56ppm, 0.78ppm, 0.39ppm, 及び0.19ppmの2倍稀釈系列(160,000倍から5,120,000倍)で、これに中間濃度3種(5.46ppm, 3.91ppm, 2.34ppm)を挿入し、25°Cで7日作用を行なつた(作用時pH6.4)。

第1表に示すように6.25ppmから0.78ppmの範囲において虫卵の正常な発育は完全に阻止され、仔虫期卵形成は認められない。0.39ppm及び0.19ppmでは62%, 87%, 対照では97%の仔虫期卵形成率であつた。

以上の結果を異常卵の出現率からみると、仔虫期卵の認められない7例においては、作用濃度の低下にともなつて異常分裂像を示す発育卵が増加している。すなわち仔虫期卵形成率0%の場合の殺卵効果の比較が可能である。

2. 緩衝液中における Thiabendazole の殺卵効果

殺卵剤が尿尿中の寄生虫卵を殺滅するためには、尿尿

第1表 水中の蛔虫卵に対する Thiabendazole の殺卵効果

作用 条件	Thiabendazole 濃度 ppm (稀釈倍率)	仔 虫 期	単細胞変性		異 常 発 育	
			強 度	軽 度	初 期	桑 実
7 日 25°C	6.25 (160,000)	0	30	0	67	3
	5.46* (183,000)	0	28	0	70	2
	3.91* (256,000)	0	21	0	77	2
	3.12 (320,000)	0	17	0	80	3
	2.34* (427,000)	0	13	0	85	2
	1.56 (640,000)	0	6	0	90	4
	0.78 (1,280,000)	0**	0	0	21	79
	0.39 (2,560,000)	62	0	0	1	37
	0.19 (5,120,000)	87	0	0	1	12
	対照 (溶媒添加)	97	0	0	0	3

* 同時に2倍稀釈系列以外も行なつた。

** これは2~5%となる可能性を考察で述べた(第2表参照)

第2表 各種 pH 緩衝液中の蛔虫卵に対する Thiabendazole の殺卵効果
(McIlvain 液, 25°C, 7日作用)

pH (開始時—終了時)	Thiabendazole 濃度						対 照		
	1.56 ppm			0.78 ppm			緩衝液+溶媒		
	仔虫期	単変細胞性	異発常育	仔虫期	単変細胞性	異発常育	仔虫期	単変細胞性	異発常育
3 (3.20—3.15)	96	0	4	98	0	2	98	0	2
4 (4.25—4.50)	2	0	98	96	0	4	98	0	2
5 (5.20—5.80)	0	15	85	2	6	92	96	1	3
6 (6.42—6.70)	0	15	85	3	4	93	96	0	4
7 (7.20—7.56)	0	15	85	5	4	91	98	0	2
8 (8.25—8.20)	0	11	89	3	2	95	98	0	2
対照 (7.00—7.83)	0	7	93	8	0	92	96	0	4

メヂウムの pH 範囲において殺卵効果を発揮することが必要である。そこで McIlvain 緩衝液(緩衝液 10 ml, 薬剤溶液 30 ml) 中で pH 3~8 における Thiabendazole の殺卵効果を調べた。その作用濃度は 1.56 ppm と 0.78 ppm で 25°C, 7日作用を行なった。

実験結果は第2表に示したが、pH 3のメヂウム中では両濃度とも全く殺卵効果が認められず、仔虫期卵形成率は 96~98% である。pH 4では 1.56 ppm で 2%, 0.78 ppm で 96% であり、両者に大きな差が認められた。ところが pH 5~8の範囲では 1.56 ppm における

仔虫期卵形成率はすべて 0%, 0.78 ppm においては 2~5% で、メヂウムの pH 範囲が 5~8 であれば Thiabendazole の殺卵効果はメヂウム pH の変動に関係なく全く等しいことが明らかとなった。以上の結果はアルカリ性である尿尿中の寄生虫卵に対する殺卵剤として使用可能であることを推定せしめる。なお上記の結果を水溶液中の成績と比較すると、1.56 ppm では両実験成績とも仔虫期卵形成率 0% で再現性が認められたが、0.78 ppm では水溶液中では 0%, 今回の pH 5~8の範囲では 2~5% であつた。この点については考察において

第3表 尿尿中蛔虫卵に対する Thiabendazole の殺卵効果

作用温度	Thiabendazole 濃度 ppm (稀釈倍率)		3 日 作 用						7 日 作 用			
			仔虫期	単細胞変性		異常発育		仔虫期	単細胞変性		異常発育	
				強度	軽度	初期	桑実		強度	軽度	初期	桑実
5°C	800	(1,250)	0	33	3	63	1	0	39	7	54	0
	400	(2,500)	0	37	4	59	0	0	21	6	73	0
	200	(5,000)	4	6	1	58	31	0	19	1	77	3
	100	(10,000)	47	4	1	15	33	18	6	0	53	23
	50	(20,000)	84	9	1	2	4	66	14	0	12	8
	25	(40,000)	91	5	0	1	3	80	15	0	5	0
	対照	(溶媒添加)	97	1	1	0	1	99	1	0	0	0
対照	(水添加)	93	3	0	3	1	94	4	0	2	0	
15°C	100	(10,000)	0	25	0	75	0	0	21	6	73	0
	50	(20,000)	2	13	5	73	7	0	19	4	77	0
	25	(40,000)	10	13	1	47	29	0	23	2	74	1
	12.5	(80,000)	80	4	1	6	9	8	13	1	61	17
	6.25	(160,000)	93	3	0	2	2	64	8	0	13	15
	対照	(溶媒添加)	97	2	1	0	0	96	4	0	0	0
対照	(水添加)	96	2	1	0	1	97	3	0	0	0	
25°C	6.25	(160,000)	0	12	1	82	5	0	19	4	77	0
	3.12	(320,000)	40	1	0	28	31	0	21	4	75	0
	1.56	(640,000)	94	2	0	1	3	11	8	0	52	29
	0.78	(1,280,000)	99	0	0	1	0	89	0	0	3	8
	0.39	(2,560,000)	98	0	0	1	1	96	0	0	0	4
	対照	(溶媒添加)	99	0	0	1	0	100	0	0	0	0
対照	(水添加)	100	0	0	0	0	99	1	0	0	0	

述べる。

3. 尿尿中における Thiabendazole の殺卵効果

尿尿中回虫卵に対する殺卵効果を各種温度条件下で検討した。冬期温度として5°C, 春秋の温度として15°C, 夏期温度として25°C(恒温槽内変動はいずれも±0.5°C)を設定した。作用濃度は低温度に伴う効果の減少に対応して低温度になるに従い高濃度を用いた。作用日数は3日及び7日である。結果は第3表に示した。

a) 作用温度 5°C

作用濃度は800 ppm, 400 ppm, 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm の6段階(1,250倍から40,000倍)とした。

3日作用における仔虫期卵形成率は800 ppmと400 ppmでは0%, 200 ppmでは4%, 100 ppmでは47%で, 50 ppm以下では対照と差がない(作用時 pH 9.01~9.03)。

7日作用では800 ppmから200 ppmまで0%で, 100 ppmで18%, 50 ppmで66%, 25 ppmでは80%であった(作用時 pH 8.95~9.09)。

b) 作用温度 15°C

作用濃度は100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12.5 ppm, 6.25 ppm(10,000倍から160,000倍)とした。

3日作用では100 ppmのみ仔虫期卵形成率0%, 50 ppmと25 ppmではそれぞれ2%, 10%, 12.5 ppmと6.25 ppmでは対照と差がない(作用時 pH 8.63~8.67)。

7日作用では100~25 ppmにおいて仔虫期卵形成率0%, 12.5 ppmでは8%, 6.25 ppmでは64%であった(作用時 pH 8.70~8.73)。

c) 作用温度 25°C

作用濃度は6.25 ppm, 3.12 ppm, 1.56 ppm, 0.78 ppm, 0.39 ppm(160,000倍から2,560,000倍)とした。

3日作用では6.25 ppmのみ仔虫期卵形成率0%で,

3.12 ppmでは40%であった。1.56 ppm以下では対照と差がない(作用時 pH 8.52~8.55)。

7日作用では6.25 ppmと3.12 ppmが仔虫期卵形成率0%, 1.56 ppmでは11%であり, 0.78 ppm以下では対照と差がない(作用時 pH 8.63~8.67)。

以上の結果を総合すると, 作用温度を一定にして作用日数を3日から7日に延長した場合, 作用濃度を前者の半分にしてほぼ同様の効果が得られる。即ち仔虫期卵形成率0%のところで見ると5°Cでは400 ppmから200 ppmへ, 15°Cではほぼ50 ppmから25 ppmへ, 25°Cでは6.25 ppmから3.12 ppmに最小有効濃度(実験した濃度において仔虫期卵0%となる最小濃度)が移動する。また作用日数を一定にして温度の変化にともなう最小有効濃度を求めると, 3日作用では5°Cでは400 ppm, 15°Cではほぼ50 ppm, 25°Cでは6.25 ppmであり, 7日作用では上記の1/2量の200 ppm, 25 ppm, 3.12 ppmとなる。即ち作用温度10°Cの上昇により作用濃度は前者の1/8(稀釈倍率にして3段階下)で同様の効果が得られている。

4. 薬剤作用後の蛋白膜除去による殺卵効果の変動

上記の実験に関連して, 回虫卵蛋白膜に付着した薬剤が培養前の水洗によっても除去されず, 培養期間中も殺卵効果を発揮するか否かを検討した。作用期間中の pH は8.95~9.01である。

第4表に示すように, 作用直後に蛋白膜を除去して培養したものは, これを除去しない対照に比較してほとんど殺卵効果に差が認められない。これを別の面から考えると, もし虫卵に付着した薬剤が効果を持続するならば, 作用日数に関係なく作用濃度のみ規定された或る一定の効果を示すことになる。上記の作用日数別の殺卵効果が異なることから, 作用直後の水洗で沈渣から薬剤は除去されたものと考えられる。

第4表 Thiabendazole 作用直後の蛔虫卵蛋白膜除去と殺卵効果の関係

Thiabendazole 濃度 ppm (稀釈倍率)	蛋白膜除去蛔虫卵					蛋白膜保有蛔虫卵				
	仔虫期	単細胞変性		異常発育		仔虫期	単細胞変性		異常発育	
		強度	軽度	初期	桑実		強度	軽度	初期	桑実
50 (20,000)	0	39	0	61	0	0	35	7	58	0
25 (40,000)	0	32	0	68	0	0	40	0	60	0
12.5 (80,000)	23	6	1	38	32	20	17	0	32	31
6.25 (160,000)	86	0	0	0	14	92	0	0	8	0
3.12 (320,000)	100	0	0	0	0	99	0	1	0	0
1.56 (640,000)	98	2	0	0	0	98	0	2	0	0
対照 (溶媒添加)	96	4	0	0	0	99	0	1	0	0

尿尿メヂウム, 作用温度 25°C, 作用日数 1 日

5. 尿尿中に保存された Thiabendazole の殺卵効果
殺卵剤が尿尿中に投入されて殺卵効果を発揮する場合
ある一定期間有効に作用したのち分解されるものと、か
なり長期間にわたって殺卵効果を保持するものとがあると
推定される。そこで予め尿尿中に Thiabendazole を加え
ておき、保存期間を0週、2週、4週、8週として保存
後に同温度で3日作用による回虫卵殺卵効果を調べた
(保存及び作用時 pH は上記の順に 8.89~8.90, 8.99~
9.00, 8.98~9.01, 8.88~9.03 であった)。保存温度と
作用温度は 25°C、作用濃度は 12.5 ppm とした。実験は
3本同一のものをおき対照は1本とした。対照は薬剤の
代わりに水を加えたものである。

結果は第5表に示した。保存期間0週(薬剤投入直後
に回虫卵を加えたもの)を標準にすると、その観察結果
は培養4週後において仔虫期卵形成率0%、単細胞異常
卵20%、異常発育卵80%であった。保存各週について
みると、保存2週で前期の順に0%、24%、76%、4週
では0%、24%、76%、8週では0%、31%、69%で
あつて、保存0~8週の間にはほとんど殺卵効果に差が
認められない。薬剤を加えない対照の仔虫期卵形成率は
92~97%であつた。

第5表 尿尿中に保存した Thiabendazole の蛔
虫卵殺卵効果 (Thiabendazole 濃度は
12.5 ppm, 25°C 保存)

対 象	作 用 日 数	保 存 期 間 (週)	仔 虫 期	単細胞変性		異常発育	
				強 度	軽 度	初 期	桑 実
実 験 群	3日	0	0	19	1	80	0
		2	0	23	1	76	0
		4	0	21	3	76	0
		8	0	28	3	69	0
対 照 群	3日	0	97	0	0	3	0
		2	93	1	5	1	0
		4	92	1	6	1	0
		8	92	3	2	1	2

各保存期間後に蛔虫卵を投入し3日間作用を行なつ
た。実験群の数字は同一条件3例の平均値である。

考 察

1) 水中における殺卵効果について

Thiabendazole の水中における殺卵効果は 25°C、7日
作用で実験したが、これに近似した条件における他のい
わゆる殺卵剤(回虫卵に対する呼吸阻害剤も含む)の効
果と比較した。200 ppm (5,000倍)以下の作用濃度で

第6表 水中の蛔虫卵に対する各種殺卵剤の効果比較(有効濃度 200 ppm 以下)

薬	剤	作 用 温 度	作 用 日 数	有効濃度(仔虫期卵 形成率5%以下) ppm (稀釈倍率)	報 告 者
phenylthiocyanate		28°C	20	10* (100,000)	宮田(1958)
thiocyanodimethylaniline		28°C	20	20* (50,000)	
4-(4-methylphenylazo) phenol		28°C	20	25 (40,000)	林ら(1962)
4-(4-bromophenylazo) phenol		28°C	20	25 (40,000)	
4-(4-chlorophenylazo) phenol		28°C	20	25 (40,000)	国井(1958)
tolyliothiocyanate		28°C	7	14 (70,000)	
phenylisothiocyanate		28°C	7	25 (40,000)	柳沢(1958)
benzylisothiocyanate		28°C	7	33 (30,000)	
butylisothiocyanate		28°C	7	50 (20,000)	寺尾(1957)
allylisothiocyanate		28°C	7	50** (20,000)	
allylisothiocyanate		30°C	7	100 (10,000)	加納(1958)
sodium azide		30°C	7	67 (15,000)	
methyl iodide		15°C	7	50*** (20,000)	宮田(1958)
ethyl iodide		15°C	7	100*** (10,000)	
dimethylbromide		15°C	7	100*** (10,000)	宮田(1958)
1-4-dithiocyanobenzene		18~20°C	7	100 (10,000)	
4-thiocyananiline		18~20°C	7	200 (5,000)	宮田(1958)
phenylisothiocyanate		18~20°C	7	200 (5,000)	
sodium monomethyldithiocarbamate		28°C	20	200 (5,000)	宮田(1958)
methylthiocyanate		28°C	20	200 (5,000)	

* 尿尿中 28°C、14日作用の有効濃度 500 ppm (2,000倍)

** 尿尿中 28°C、7日作用の有効濃度 1,000 ppm (1,000倍) 以上

*** 尿尿中 15°C、7日作用の有効濃度 500 ppm (2,000倍)

なお作用日数20日の例はいずれも20日作用直後の虫卵を観察した結果である。

有効(仔虫期卵形成率5%以下)なものを第6表に示す。

これを総合すると20~30°Cの作用温度において蛔虫卵を対象にした場合、20日作用のphenylthiocyanateが10ppm(100,000倍)、7日作用のtolyl芥子油が14ppm(70,000倍)で仔虫期卵形成を認めない以外は、概ね100~25ppm(10,000~40,000倍)が水中における有効濃度である。今回行なったThiabendazoleは1.56ppm(640,000倍)まで仔虫期卵形成を認めず註、前記のphenylthiocyanate及びtolyl芥子油にくらべても、なおかなり高い殺卵効果を示した。

2) 尿尿中における殺卵効果について

まず尿尿中における殺卵効果を、第6表に挙げた薬剤で水中と尿尿中で実験しているものについて調べた。phenylthiocyanateとthiocyanodimethylanilineは28°C3~14日作用の尿尿中においては500ppm(2,000倍)で仔虫期卵を認めないとされており、尿尿中の効果は水中の場合にくらべて1/50または1/25に低下する(宮田, 1959b)。allylisothiocyanateは28°C, 7日作用で見ると200ppm(5,000倍)でも80%の仔虫期卵形成率であり(国井, 1958a)、また小宮ら(1956)は同条件では1,000ppm(1,000倍)ではじめて有効と述べているから、allylisothiocyanateも尿尿中ではその効果は約1/20に低下する。methyl iodide, ethyl iodide, dimethyl bromideについては、寺尾(1958)が同時に尿尿中で実験し、同一作用条件では500ppm(2,000倍)ではじめて有効となると述べており、その効果は1/5~1/10に低下することになる。

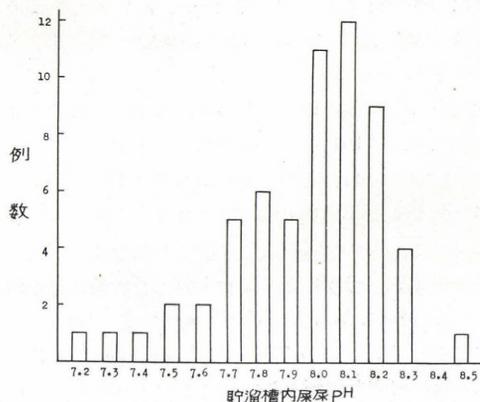
上記の点を参考にしてThiabendazoleの水中と尿尿中の殺卵効果を比較すると、25°C, 7日作用で水中では1.56ppmで有効であったものが、尿尿中でも3.12ppmでなお有効で、尿尿の存在があつても急激な殺卵効果の低下はない。

尿尿中における殺卵効果の減少は殺卵剤の性質により規定されるのであろうが、主な原因は尿尿それ自身とそのpHの2点であろう。第1の尿尿それ自身については尿尿のもっている乳化剤としての性質から乳化剤過剰が殺卵効果を減少させるとの推定によりphenylthiocyanateの不活性化を説明したり(宮田, 1959)、尿中アンモニアとallyl芥子油との結合による効果減少(小宮ら, 1958;

註) 異常発育卵出現様式の項で述べるように、実験結果では0.78ppmで仔虫期卵形成が認められなかったが理論的に1.56ppmを7日作用における最小有効濃度とする。

国井, 1958b)などが推論されているのみで適確な説明は少ない。今回のThiabendazoleについては尿尿中でも殺卵効果の著しい減少がなかつたので尿尿の存在についての検討は行なわなかつた。

第2の点はメヂウムpHで、Thiabendazoleに関してはpH5~8の範囲では効果に差がないことを確かめてあるので、少なくともpHの点から考えれば水中と尿尿中では差がないのは当然である。今回の結果の示す通り尿尿中においては水中の2倍の濃度で等しい効果を発揮し、著しい差はない。尿尿のpHを実際に農家の便所及び貯溜槽60カ所について調査してみると、第2図のよ



第2図 農家便所及び屋内貯溜槽内尿尿のpH分布(東京都檜原村60戸、昭和38年8月30日採取、Beckman pH meter測定)

うにpH7.15~8.47の範囲にあり、Thiabendazoleが実際上でも使用可能なことを示唆する。

なお今回の試験においてメヂウムpHが極めて酸性側にあるときに殺卵効果の減少が見られた。即ちpH3では1.56ppm, 0.78ppmの2種類ではともに96~98%の仔虫期卵形成率であるが、pH4ではそれが2%, 98%と変動し、pH5~8ではそれぞれ0%, 2~8%でほぼ均一である。

このようなpHによる殺卵効果の変動について、柳沢(1958a)はNaN₃の回虫卵に対する発育阻害をみたときに、有効濃度であるべき1/10Mでも水溶液自身がpH10であるため無効(仔虫期卵形成率85%)になり、同一濃度を緩衝液でpH9以下にすると有効(仔虫期卵形成率0~3%)になると述べている。allyl芥子油の場合も微量のアンモニア添加によるpH調整で不活化され、同一濃度でもpH6.0~7.8では仔虫期卵形成率0%, pH

8.2~8.6 では70~80%であつて極めて大きな差を生ずるという(国井, 1958a). これらの原因は恐らく pH による薬剤の解離の差に基づく現象と推定される.

3) 作用温度と作用日数による殺卵効果の変動について

Thiabendazole の屎尿中実験で同一濃度の3日作用と7日作用を比較すると, 7日作用において3日作用と同一の効果を得るには半分の濃度で十分なことを認めた. 一方の作用温度別の効果は著しく変動し, 5°C, 15°C, 25°C の10°C 間隔では最小有効濃度は3日作用ではそれぞれ400 ppm, 50 ppm, 6.25 ppm と低下し, 7日作用では200 ppm, 25 ppm, 3.12 ppm と低下する. 温度10°C の上昇によりそれぞれ1/8の濃度で同一の効果が期待できた.

今回のように温度10°C 上昇または下降による殺卵効果の増大または減少をみた試験は極めて少ないようであり, また殺卵効果を比較するのにさまざまな仔虫期卵形成率を有する中間濃度で比較するなど, 正確な温度効果の検討は乏しい. 今回のように最小有効濃度(仔虫期卵形成率0%)を指標として温度10°C の変動による殺卵効果をみたものは柳沢(1958b)のみである. 即ち allyl 芥子油を用いて10°C の変動による殺卵効果を仔虫期卵形成率0%の濃度を指標としてみており, 800 ppm(10°C) 400 ppm(20°C), 200 ppm(30°C) とそれぞれ1/2の濃度で同一の効果も得ている. 従つて温度20°C 上昇では作用効果は4倍に増加したことになる. 国井(1958a)はややこれに近い条件で温度効果をみている. 即ち10°C から28°C へほぼ20°C 上昇で, 仔虫期卵形成率0%の濃度は allyl 芥子油は200 ppm から40 ppm へ, tolyl 芥子油では200 ppm から20 ppm になつたとしており, allyl 芥子油における20°C 上昇による4倍の効果増大は前記柳沢(1958b)と一致する. ここで注目されるのは tolyl 芥子油が20°C 上昇で10倍の効果増大があつた点で, その殺卵効果が各種芥子油及び他の殺卵剤にくらべて最高である点とともに特異な差を示す.

今回試みた Thiabendazole は温度10°C 上昇では8倍, 20°C 上昇では64倍の効果増大を認めたので, 上記 tolyl 芥子油の場合よりさらに殺卵効果に与える温度の影響が著しい. このような作用温度の上昇による殺卵効果の増大は温度上昇による薬剤の活性化と同時に, 作用をうける回虫卵(単細胞卵)の生理的な内容変化がともなつていると想像されるが, この点についての検証は行なわなかつた.

小宮ら(1956)は温度, 時間, 振盪, メヂウム容量の作用条件のうち, 静置と振盪に差がなく, 容量50 ml と500 ml で同一の結果が得られると結論するとともに, 「殺卵効果に対する因子としては作用時間よりもむしろ作用温度の方が遙かに大きな因子である」と述べているが, Thiabendazole はこの傾向が極めて著しく認められた例であろう.

4) 異常発育卵の出現様式及び殺卵効果の再現性について

Thiabendazole の殺卵効果の成績をみると, 他の殺卵剤にくらべて異常発育卵の出現率が著しく高いことが分る. 異常発育卵の記載は初期分裂異常卵と桑実期異常卵にしたが, 桑実期異常卵の中には初期桑実期異常と後期桑実期異常及び初期蝌蚪期異常が何れも変性像のため充分区別されずに含まれている. 但し著者の観察の限りでは大部分が初期及び後期桑実期異常卵であると考えられたので便宜的に桑実期異常卵とした. なお明瞭な蝌蚪期異常卵は極めて少なくまれに5%以下に認められたので, これも桑実期異常卵の中に含めた.

さきに第3表に屎尿中回虫卵殺卵効果を示したが, 3種の作用温度と2種の作用日数の組合せによる6種類の実験成績で次の特徴が認められた. それは異常発育卵のうち桑実期異常卵が最も高率に現われてくる濃度において, 初めて仔虫期卵が認められることである. これをまとめたのが第7表で, 同時に水中殺卵実験と蛋白膜除去実験の結果も引用した. 桑実期異常卵が30%前後に出現する例は初めて仔虫期卵が出現する濃度以外では認められず, 少数の例外を除いては0~15%の範囲にある.

この現象が Thiabendazole の殺卵実験において一般的に認められることを前提にすると, 二三の例外があるので検討した. 第1の例外は第1表の水中実験成績で桑実期異常卵数の最高は0.78 ppm にあるが, この濃度では仔虫期卵が出現していない. しかし上述の原則が認められるならば, その出現の可能性があると考えられた. そこで第2表の緩衝液中実験をみると0.78 ppm の濃度では pH 5~8 では例外なく2~8%の仔虫期卵が出現している. 両実験が同一条件で行なわれたことから考えて, 桑実期異常卵が最高値であることから理論的に推定された仔虫期卵の出現の可能性が, 他の実験成績から検証されたことになる. 水中実験の0.78 ppm における桑実期異常卵百分率が79%であるのは異常な現象で, 恐らく仔虫期卵に達する可能性のあるものが何らかの原因で発育停止し死滅したものと思われる.

第7表 Thiabendazole の蛔虫卵殺卵実験における各種変性卵とくに桑実期異常卵の出現傾向

メ ヂ ウ ム	作 用 温 度	作 用 日 数	最小有効濃度における虫卵百分率					ばじめて仔虫期卵の出現する濃度における虫卵百分率				
			作用濃度 (ppm)	仔虫期	異常發育		単細胞変性	作用濃度 (ppm)	仔虫期	異常發育		単細胞変性
尿	5°C	3	400	0	0	59	41	200	4	31	58	7
		7	200	0	3	77	20	100	18	23	53	6
	15°C	3	50	2*	7	73	18	25	10	29	47	14
		7	25	0	1	74	25	12.5	8	17	61	14
尿	25°C	3	6.25	0	5	82	13	3.12	40	31	28	1
		7	3.12	0	0	75	25	1.56	11	29	52	8
	25°C	1***	25	0	0	68	32	12.5	23	32	38	7
		1	25	0	0	60	40	12.5	20	31	32	17
水	25°C	7	1.56	0	4	90	6	0.78	0**	79	21	0

*, ** の説明は考察で行なった。*** は蛋白膜除去実験とその対照

第2の例外は尿尿中15°Cの3日作用例で、桑実期異常卵の最高は25ppmにあり、その仔虫期卵形成率は10%である。ところが表によれば50ppmにおいても2%の仔虫期卵形成率が認められる。この場合は第1の例とは逆に、「15°C、3日作用では濃度50ppmでは仔虫期卵形成率0%の可能性がある」ことになる。このような実験誤差は当然あり得ることと思われる。

第3の例外は尿尿中5°C、3日作用例で、200ppmと100ppmに31%、33%とほぼ等しい桑実期異常卵がある。この両者のうち仔虫期卵が初めて出現するのは200ppmであり、従つて100ppmが例外となる。そこで100ppmの例を培養途中の2週の観察結果でみると約80%の仔虫期卵形成率で、これが培養4週では47%となっている。この原因は既に著者が指摘したように(久津見, 1955)、中間程度の殺卵効果(仔虫期卵形成率40~60%)を得るような濃度では殺卵効果に異なつた値が出易く、それは殺卵剤の作用を受けた虫卵が培養期間中の材料の部分的な湿度、酸素供給などの微少な差によつて發育状態に差を生じたためと考えられる。従つて100ppmにおける成績の乱れは作用濃度が中間的な殺卵効果であつたこと、及び培養皿上からの虫卵サンプルの採取による誤差ではないかと推定される。別の機会にこれを検討する予定である。

5) 各種異常發育卵の出現の意義とその取扱いについて

Thiabendazoleの各種条件下における実験で異常發育卵が出現するが、その量的な取扱いについては前章で述べたので、ここではその質的な面を検討した。まず異常發育卵が高率に出現する現象は、Thiabendazoleがかな

りの低濃度で有効であることによるもので、芥子油においても高率に現われるのと同一の理由であろう。他の殺卵剤がその効果を發揮するかなり高濃度の場合、及びそれよりは低濃度であるが芥子油やThiabendazoleとしては比較的高濃度の場合には、ともに回虫卵は分裂發育を阻止されて単細胞のまま死滅する。ところが今回見られたようなかなり低濃度でも有効な場合は一般に単細胞卵の分裂を阻止することは不完全で、ある程度の發育を許容せざるを得ないようである。従つて濃度の低下にともなう異常發育卵の増加が起り、とくに仔虫期卵の出現する濃度においては、より發育の進んだ多細胞異常卵(今回は桑実期異常卵)が最高値に達するのである。

いかなる作用機序によつてこの現象が起こるかは現在のところ不明であるが、これを殺卵効果の判定に利用することは意義があると考へて分類記載したが、實際上その意義が認められた。即ち仔虫期卵形成率0%の有効濃度範囲内でも、各種異常發育卵百分率、単細胞異常卵百分率は概ね作用濃度に反比例、および比例しており、これらを利用すれば仔虫期卵形成率のみをもつて検討するよりも、より詳細な殺卵効果を表現することが可能で、殺卵効果の比較、再現性の検討に効果があつた。

かつて柳沢(1958b)は殺卵効果判定には仔虫期卵数によるほか、A種変性卵(単細胞変性卵のうち強度変性)、B種変性卵(A種以外の単細胞変性卵)、C種変性卵(多細胞変性卵)の分類を提唱し、芥子油、二硫化炭素の実験でその出現様式を詳細に検討した。しかし多細胞変性卵(C種)については一括して報告するととどめており、C種多細胞変性卵は發育時期や変性程度によつて更に分類することが必要であろうと示唆した。

著者は今回の実験において異常発育卵の出現する場合の殺卵効果の判定には、多細胞変性卵を少なくとも初期分裂異常卵、桑実期異常卵に分類表示することが、より詳細な効果判定上必要であることを実証した。

要 約

腸管寄生虫の感染予防対策の一つとして寄生虫卵含有尿尿の無害化が検討されてきており、有効な寄生虫卵殺滅剤がいくつか報告されている。著者は第1報(久津見, 1963)において殺菌剤として有効な NaPCP を寄生虫卵殺滅の目的に使用することを試み、塩酸による酸性化尿尿、又は小財(1960)により実用化されている尿酸酸化剤過燐酸石灰による酸性化尿尿中においては、或る程度の殺卵効果を発揮することを報告した。

今回は家畜寄生線虫類に著効を示す駆虫剤 Thiabendazole について、水中及び尿尿中回虫卵殺卵効果を検討した。その結果、水中、尿尿中のいづれにおいても従来のいわゆる殺卵剤にくらべると遙かに低濃度で回虫卵の分裂発育を阻止し、優れた寄生虫卵殺卵剤であることを見出した。以下はその結果の要約である。

1) 水中における Thiabendazole の殺卵効果は 25°C, 7日作用の場合、作用濃度 6.25 ppm (稀釈倍率として 160,000 倍, 以下同様) から 2 倍稀釈で 1.56 ppm (640,000 倍) まで完全に仔虫形成を阻止し、全て単細胞異常卵と異常発育卵であつた。0.78 ppm (1,280,000 倍) から 0.19 ppm (5,120,000 倍) では若干の仔虫期卵形成を認められた。

2) 殺卵効果はメヂウム pH によつて影響を受けるので、各種 pH の緩衝液中で殺卵効果を検討した。その結果、メヂウム pH が 5~8 の範囲にあれば全く等しい殺卵効果が発揮されることが認められた。またこのことによつて尿尿中寄生虫卵殺滅剤としての必要条件であるアルカリ域での有効性も認められた。

3) 尿尿中における Thiabendazole の殺卵効果を 5°C, 15°C, 25°C の各温度における 3日及び 7日作用で検討した。完全に有効な濃度(仔虫期卵形成率 0%)を指標としてみると、5°C では 3日 で 400 ppm (2,500 倍), 7日 で 200 ppm (5,000 倍), 15°C では 3日 で 50 ppm (20,000 倍), 7日 で 25 ppm (40,000 倍), 25°C では 3日 で 6.25 ppm (160,000 倍), 7日 で 3.12 ppm (320,000 倍) であつた。

4) 尿尿中に保存された Thiabendazole (濃度 12.5 ppm) の殺卵効果の残存性を、0~8 週保存後に加えられ

た回虫卵に対する殺卵効果によつて検討したところ、保存 8 週後の殺卵効果は保存前と殆んど変りがなかつた。

5) 殺卵効果の判定に際し、はじめて仔虫期卵の認められる濃度において桑実期異常卵が高率に出現するので、その出現傾向と取扱いについて考察した。

終りに御指導、御校閲を賜つた寄生虫部長小宮義孝博士、および柳沢十四男博士に深く感謝の意を表する。

本論文の一部は第 22 回日本寄生虫学会 東日本支部大会(昭和 37 年 10 月)、第 32 回日本寄生虫学会総会(昭和 38 年 4 月)において発表した。

参 考 文 献

- 1) Ames, A.E., Cheney, J.M. & Rubin, R. (1963) The efficacy of Thiabendazole and Bephenium hydroxynaphthoate against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in experimentally infected calves. *Am. J. Vet. Res.*, 24, 295-298.
- 2) Baker, N.F. & Douglas, J.R. (1962): Critical trials with Thiabendazole as an anthelmintic in the gastrointestinal tract of cattle and sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 23, 1219-1223.
- 3) Brown, H. D. *et al.* (1961): Antiparasitic drugs. IV. 2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *Am. J. Chem. Soc.*, 83, 1764-1765.
- 4) Cairns, G. C. (1961): The efficiency of Thiabendazole (MK 360) as an anthelmintic in sheep. *New Zealand Vet. J.*, 9, 147-152.
- 5) Campbell, W. C. & Cuckler, A. C. (1961): Effect of Thiabendazole upon experimental trichinosis in swine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 110(1), 124-128.
- 6) Campbell, W. C. & Cuckler, A. C. (1962): Thiabendazole treatment of the invasive phase of experimental trichinosis in swine. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 56(4), 500-505.
- 7) Drudge, J. H. & Szanto, J. (1963): Controlled test of the anthelmintic activity of Thiabendazole and an organic phosphate (CI 38,023) in lambs. *Am. J. Vet. Res.*, 24, 337-342.
- 8) Dunsmore, J. D. (1962): Anthelmintic activity of Thiabendazole against mature and immature *Ostertagia* spp. in sheep. *Aust. Vet. J.*, 38, 412-413.
- 9) Egerton, J. R. (1961): The effect of Thiabendazole upon *Ascaris* & *Stephanurus* infections. *J. Parasit.*, 47(4), 37.
- 10) Gardiner, M. R. & Craig, J. (1961): Drugs for worm control. I. Sheep drenching trials

- with MK 360. *J. Agr. W. Aust.*, 2, 737-746.
- 11) Gordon, H.M. (1961): Thiabendazole, a highly effective anthelmintic for sheep. *Nature*, 191, 1409-1410.
 - 12) 林栄一ら (1962): 犬鉤虫卵及び豚蛔虫卵に対する azophenol 系化合物の殺卵効果について. 第22回寄生虫学会東日本支部大会記事, 19-20.
 - 13) Hebden, S. P. (1961): The anthelmintic activity of Thiabendazole (MK 360). *Aust. Vet. J.*, 37, 264-269.
 - 14) 加納宏一郎 (1958): 殺卵剤に関する研究. V. テオシアノベンゼン系化合物とクロロベンゼン系化合物の殺卵作用及び其の化学構造と殺卵作用との関係に関する考察. *岐阜医大紀要*, 6 (2), 224-230.
 - 15) 小宮義孝 (1955): 寄生虫卵殺滅剤研究の最近の展開. *臨床消化器病学*, 3(11), 609-615.
 - 16) 小宮義孝ら (1956): 所謂殺卵剤(二硫化炭素・亜硝酸曹達・芥子油・ネオヂクロン)の各種作用条件に於ける尿中蛔虫卵殺滅試験に就て. *日本公衆衛生雑誌*, 3(11), 532-538.
 - 17) 小財勳 (1960): 殺卵剤としての亜硝酸曹達の再評価. (1)尿中メザウム酸性化に用うる過燐酸石灰について. *寄生虫誌*, 9(2), 202-210.
 - 18) 国井喜章 (1958a): 芥子油の殺卵作用に関する研究. (1)蛔虫卵に対する殺卵作用. *寄生虫誌*, 7 (5), 523-528.
 - 19) 国井喜章 (1958b): 芥子油の殺卵作用に関する研究. (2)尿の貯溜と芥子油の殺卵作用. *寄生虫誌* 7(6), 609-612.
 - 20) 久津見晴彦 (1955): 低温におけるネオヂクロン及び二硫化炭素の蛔虫卵殺滅試験とその効果判定について. *寄生虫誌*, 4(4), 337-342.
 - 21) 久津見晴彦 (1963): 寄生虫卵殺滅剤に関する研究. (1)蛔虫卵に対する NaPCP の殺卵効果ならびに NaPCP に対する紫外線照射の影響について. *寄生虫誌*, 12(6), 485-496.
 - 22) 宮田幸治 (1958): 殺卵剤に関する研究. 第1報. dithiocarbamate および thiocyanate の殺卵効果について. *日本衛生学雑誌*, 13(2), 208-215.
 - 23) 宮田幸治 (1959a): 殺卵剤に関する研究. 第3報 各種 thiocyanate 系化合物の殺卵効果の比較的考察. *日本衛生学雑誌*, 14(7), 865-869.
 - 24) 宮田幸治 (1959b): 殺卵剤に関する研究. 第4報 thiocyanate の尿中における殺卵効果について. *日本衛生学雑誌*, 14(8), 927-929.
 - 25) 宮田幸治 (1959c): 殺卵剤に関する研究. 第5報 尿中の殺卵効果阻害因子について. *日本衛生学雑誌*, 14(8), 930-932.
 - 26) 中山クニ子 (1958): 豚蛔虫卵蛋白膜を糞便中の人蛔虫卵蛋白膜に近似した形態とするための処理法について. *寄生虫誌*, 7(4), 385-387.
 - 27) 寺尾宏一郎 (1957): 殺卵剤の研究. (1)水中の鉤虫卵及び蛔虫卵に対する諸種薬剤の殺卵作用. *寄生虫誌*, 6(6), 526-530.
 - 28) 寺尾宏一郎 (1958): 殺卵剤の研究. (2)尿中の鉤虫卵及び蛔虫卵に対する諸種薬剤の殺卵作用. *寄生虫誌*, 7(1), 1-6.
 - 29) 柳沢十四男 (1958a): 蛔虫卵変性に関する研究. (2)シアン及びアザイドに依る蛔虫卵の変性. *寄生虫誌*, 7(2), 160-166.
 - 30) 柳沢十四男 (1958b): 蛔虫卵変性に関する研究. (3)芥子油及び二硫化炭素による各種処理条件に於ける変性蛔虫卵の出現様式. *寄生虫誌*, 7(4), 338-342.

STUDIES ON THE OVICIDES AGAINST HELMINTHS EGGS *IN VITRO*
II. THE OVICIDAL ACTIVITY OF THIABENDAZOLE AGAINST
ASCARIS EGGS IN WATER AND NIGHTSOIL

HARUHIKO KUTSUMI

(*Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo*)

Thiabendazole (2-(4'-thiazolyl)-benzimidazole, C₁₀H₇N₃S) has been reported to have a marked anthelmintic activity for a variety of gastrointestinal parasites of livestock and to interfere with the migrating larval stage of ascarid and kidney worm in swine (Brown *et al.*, 1961).

Since there was a need for an ovicide with a high degree of efficacy, the ovicidal activity of Thiabendazole on *Ascaris* eggs was examined. Data obtained from this study revealed that Thiabendazole was promising new ovicide against *Ascaris* eggs in water and nightsoil as well.

1) No larval formation was observed in 6.25 and 1.56 ppm concentration range of Thiabendazole at 25°C in 7-day exposure in water.

2) The ovicidal activity of Thiabendazole was observed equally in all pH ranging from 5 to 8 in the buffered solution.

3) Thiabendazole inhibited the larval formation of *Ascaris* eggs in artificial alkaline nightsoil (feces : urine = 1 : 5) at the concentrations of 400 ppm at 5°C, 50 ppm at 15°C and 6.25 ppm at 25°C in 3-day exposure and 200 ppm at 5°C, 25 ppm at 15°C and 3.12 ppm at 25°C in 7-day exposure.

4) The ovicidal activity of Thiabendazole stored in artificial nightsoil at 25°C for 8 weeks was similar to that of non-stored control.

5) A high percentage of abnormally developed eggs was observed at a certain concentration of the dilution series and the discussion was made on their occurrence.