

ウェステルマン肺吸虫に対する isothiocyanates および bithionol の殺滅効果

佐 渡 正 四 郎 浜 島 房 則

九州大学医学部寄生虫学教室 (主任 宮崎一郎教授)

(1967年4月18日受領)

線虫類に対する殺虫あるいは殺卵作用に関する実験報告はすでに多数にのぼっているが、吸虫類に関しては少ない。それも、多くは *in vivo* での報告で、*in vitro* ではほとんどない現状である。

横川ら (1961) は大平肺吸虫 *Paragonimus ohirai* Miyazaki, 1939 および肝絛虫 *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 のミトコンドリアに対する化学療法剤 bithionol の酵素化学的作用機構について研究し、山口ら (1961) は肝吸虫 *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) の成虫に対して 53 種の薬剤の殺虫効果を測定した。高木・篠藤 (1962) は肝吸虫成虫に対する化学療法剤沃化ジチアザニンの殺虫作用を組織化学的に研究した。

著者らは初めてウェステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) の成虫、脱囊メタセルカリアおよび子宮卵に対して、線虫類殺卵に有効な allyl-isothiocyanate (以下 allyl-NCS と略記する) および phenyl-isothiocyanate (以下 phenyl-NCS と略記する) と bithionol (2,2'-thiobis (4,6-dichlorophenol)) の殺虫殺卵効果を *in vitro* で観察、比較したので、ここに報告する。

材料および方法

1. 材料

成虫は、モクズガニから得たウェステルマン肺吸虫メタセルカリアをイヌに経口投与し、3 および 6 カ月後にその肺からとり出し、リンゲル液 (ペニシリン、ストレプトマイシンを含む) で洗滌した。メタセルカリアは、人工胃液および腸液にて脱囊させ、子宮卵は、24時間薬剤処理後の成虫から得た。

2. 薬剤濃度

Allyl-NCS は 1 : 1,000 ($100 \times 10^{-4}M$)、phenyl-NCS

は 1 : 1,000 ($74 \times 10^{-4}M$) の濃度とし、これらは水に難溶であるので、同量の polyethylene glycol で乳化した。bithionol, soluble はモル濃度 $10^{-4}M$ (0.04 : 1,000) とし、飼育液としてペニシリンおよびストレプトマイシンを含むリンゲル液を用いた。

3. 薬剤処理法

成虫 および 幼虫 の場合は、各実験群ごとに処理液 5 ml を入れた試験管 10 本に、それぞれ 1 匹ずつの虫体を投入し、27°C に保った。

子宮卵の場合は、成虫のまま 24 時間薬剤で処理した。

4. 運動および殺虫殺卵検査

成虫 および 幼虫 に対しては、試験管を振って運動の有無を調べ、48 時間観察した後、虫体の白変をもって死滅と判定した。

子宮卵は、27°C で 20 日間水道水中に培養し、その発育状態を観察した。

結果および考察

1. 成虫に対する殺滅性

経口投与後 3 カ月の成虫は、Table 1 のとおり phenyl-NCS によって 6 時間で全滅し、allyl-NCS および bithionol では 12 時間で全滅した。各薬剤の濃度を考慮すればその殺虫力は bithionol > phenyl-NCS > allyl-NCS の順となり、そのモル濃度をもってすればその差はさらに増大すると考えられる。

経口投与後 6 カ月の成虫は、Table 2 のとおり phenyl-NCS および bithionol によって 24 時間で全滅し、allyl-NCS では 36 時間で全滅した。薬剤の殺虫性順位が経口投与後 3 カ月の成虫と異なるように見えるが、各薬剤の濃度およびモル濃度をもって考察すれば全く同様で、bithionol と isothiocyanates との差はさらに増大

Table 1 Effect of isothiocyanates and bithionol on adults of *Paragonimus westermani* obtained at 3 months after infection

Time of treatment	Number of adults				
	Control	Allyl-NCS	Phenyl-NCS	Control	Bithionol
hr					
0	m10	m10	m10	m10	m10
1	m10	um10	um10	m10	um10
3	m10	um10	um10	m10	um10
6	m10	um10	d 10	m10	um10
12	m10	d 10	—	m10	d 10
24	m10	—	—	m10	—
36	m10	—	—	m10	—
48	m10	—	—	m10	—

Note : m-moving, um-unmoving, d-dead

Table 2 Effect of isothiocyanates and bithionol on adults of *Paragonimus westermani* obtained at 6 months after infection

Time of treatment	Number of adults				
	Control	Allyl-NCS	Phenyl-NCS	Control	Bithionol
hr					
0	m10	m10	m10	m10	m10
1	m10	um10	um10	m10	um10
3	m10	um10	um10	m10	um10
6	m10	um10	um10	m10	um10
12	m10	um10	um10	m10	um10
24	m10	um10	d 10	m10	d 10
36	m10	d 10	—	m10	—
48	m10	—	—	m10	—

Abbreviations are the same as in Table 1

したと考えられる。

経口投与後3および6カ月の成虫の間には、ただ虫体の大きさが異なり、従って後者は前者の約4倍の抵抗を示したのみで、薬剤の作用機構は全く相違ないものと考えられる。

2. メタセルカリアに対する殺滅性

メタセルカリアは、Table 3 のとおり bithionol およ

び phenyl-NCS によって3時間で全滅し、allyl-NCS では6時間で全滅した。メタセルカリアに対する薬剤の殺虫性順位は前述した成虫の場合と全く同様であり、ただその抵抗が経口投与後3カ月の成虫の1/2~1/4であった。

Yokogawa *et al.* (1961) および横川ら (1961) はウエステルマン肺吸虫の脱囊幼虫に対して *in vitro* で

Table 3 Effect of isothiocyanates and bithionol on excysted metacercariae of *Paragonimus westermani*

Time of treatment	Number of excysted metacercariae				
	Control	Allyl-NCS	Phenyl-NCS	Control	Bithionol
hr					
0	m10	m10	m10	m10	m10
1	m10	um10	um10	m10	um10
3	m10	um10	d 10	m10	d 10
6	m10	d 10	—	m10	—
12	m10	—	—	m10	—

Abbreviations are the same as in Table 1

bithionol の LD₅₀ は 140 万倍 (0.71 γ /ml) と報告しているが、著者らが本幼虫に対して 0.04 : 1,000 (40 γ /ml) の濃度で 3 時間内に全滅を見たのと、大差がないものと思われる。

3. 24 時間薬剤処理した成虫の子宮卵の発育

Table 4 および Table 5 に示すとおり、子宮卵は isothiocyanates 処理では何れもほとんど発育の進行を見なかったが、bithionol 処理では経口投与後 3 カ月のものは発育の進行がやや見られ、経口投与後 6 カ月のものは抵抗性がさらに強く、ミラシジウムを形成する卵も見られ、1%ではあるが脱殻し完全に発育したものが見

られた。即ち、成虫または幼虫に対しては有効であった bithionol に対して、子宮卵は他の薬剤に比較して抵抗することを知った。

また、これらの子宮卵の形態が処理薬剤の種類によって異なっており、allyl-NCS 処理のものは卵内容の溶解崩壊が顕著で、phenyl-NCS 処理のものがこれに次ぎ、bithionol 処理のものにはそれが全くなく、全卵が変形した発育中絶卵であった。これは蛔虫卵と同様の現象であって、本虫卵は蛔虫卵のように蛋白質膜や厚い卵殻がなく薬剤浸入が容易なために、蛔虫卵よりもその傾向が顕著に現われたものと考えられる。また、佐渡 (1961) が

Table 4 Development of eggs collected from uteri of adult *Paragonimus westermani* treated with medicines during 24 hours at 3 months after infection

Egg status	Percentage of eggs				
	Control	Allyl-NCS	Phenyl-NCS	Control	Bithionol
G	1	100	100	2	96
E	23	0	0	15	4
M	4	0	0	13	0
H	72	0	0	70	0

Note: G-granulated eggs
E-early stage eggs of development
M-miracidia forming eggs
H-hatched eggs

Table 5 Development of eggs collected from uteri of adult *Paragonimus westermani* treated with medicines during 24 hours at 6 months after infection

Egg status	Percentage of eggs				
	Control	Allyl-NCS	Phenyl-NCS	Control	Bithionol
G	1	98	98	3	5
E	17	2	2	8	67
M	7	0	0	20	27
H	75	0	0	69	1

Abbreviations are the same as in Table 4

Table 6 Organic and inorganic characters of medicines

Medicine	Molecular construction	Organic character*	Inorganic character*	O. c.
				I. c.
Allyl-NCS	CH ₂ :CH·CH ₂ -N:C:S	135	92	1.5
Phenyl-NCS	C ₆ H ₅ -N:C:S	210	90	2.3
Bithionol	(C ₆ H ₂ (OH)Cl ₂) ₂ S	440	390	1.1
B., soluble	(C ₆ H ₂ (ONa)Cl ₂) ₂ S	440	1,390	0.49

* Fujita (1953)

述べているように、内容崩壊は類脂体の溶解による物理的殺卵であり、無変化あるいは変形発育中絶は酵素傷害もしくは蛋白傷害などによる化学的殺卵であると考えられる。

これらの薬剤は、藤田 (1953) によれば、その化学構造から Table 6 のような有機性および無機性を有する。即ち phenyl-NCS は allyl-NCS よりも有機性がまさっており、従って類脂体親和性がすぐれている。ところがそれらの分子の大きさは、前者が大きく後者が小さいので、卵殻を通過する力は後者の方がまさっていると考えられる。従って後者の方が、容易に卵内に侵入し類脂体溶解を来し、卵内細胞崩壊を著明に惹起したと解釈できる。他方、蛔虫卵においてこれらの isothiocyanates で物理的殺卵を見なかったのは (佐渡, 1961), 卵殻が厚く堅固であって、これらの薬剤さえも容易に侵入しないため、致死限界の濃度と時間では侵入した少量の薬剤による化学的殺卵のみが見られたものと推察する。また本子宮卵においても、さらに短時間処理もしくは低濃度で処理して殺卵すれば、純粋な化学的殺卵が見られるものと推察される。なお本実験からは isothiocyanates の最小有効量は推定できなかった。

Bithionol 分子は phenyl 基を 2 個有し、その大きさが上述の isothiocyanates より大きく卵殻浸透性がさらに低い殺卵性が時間的に劣るものと考えられ、また、有機性/無機性比から類脂体に対する親和性も低いため、物理的殺卵が見られないものと考えられる。それでもなお殺卵効果があるのは、その分子内に殺卵有効基-S-および多数の-Clを有するためと考えられる。

成虫ならびに幼虫に対して bithionol が有効なことも、それが分子内にこれら殺卵有効基を多く保有する上に、成虫ならびに幼虫は栄養摂取を盛んに行なうため虫卵よりさらに bithionol などの大きい分子も容易に吸収され、充分にその効果を發揮できるためと考えられる。また、成虫および幼虫においては虫卵より活発な呼吸ならびに解糖代謝系を、bithionol がより低濃度で阻害する (横川ら, 1961; 村越ら, 1962; 横川, 1964; 浜島, 1966) ことと併せ考えると、bithionol が成虫および幼虫に対して、虫卵より強力な殺滅性を示す理由が明らかになる。

総括および結語

イヌに経口投与後 3 および 6 カ月のウエステルマン肺吸虫成虫、およびモクズガニから得た脱囊させたそのメタセルカリアに対する allyl- および phenyl-isothio-

cyanates, ならびに bithionol の殺虫性、および 24 時間それらの薬剤で処理した成虫の子宮卵の発育状況を観察した。

本殺滅実験では、成虫に対しては bithionol が最も強力で、次いで phenyl- および allyl-isothiocyanate であった。即ち bithionol は $10^{-4}M$ (0.04 : 1,000) 濃度で用いた結果、経口投与後 3 カ月の成虫は 12 時間で、経口投与後 6 カ月のものは 24 時間で全滅した。phenyl-isothiocyanate は 1 : 1,000 の濃度で用い、成虫はそれぞれ 6 および 24 時間で、また allyl-isothiocyanate の場合は同じく 12 および 36 時間で全滅した。

脱囊メタセルカリアは経口投与 3 カ月後の成虫の 1/2 ~ 1/4 の抵抗を示し、各薬剤に対する抵抗性は成虫と同様で、それぞれ 3, 3 および 6 時間で全滅した。

子宮卵は成虫の 24 時間処理によってほとんど全滅していたが、各薬剤に対する抵抗性は成虫およびメタセルカリアと異なり、isothiocyanates に対する方が bithionol に対するよりも弱かった。即ち、isothiocyanates 処理の子宮卵はほとんど発育しなかったのに反し、bithionol 処理の子宮卵は経口投与後 3 カ月のものは幾分発育したが完全には発育できず、経口投与 6 カ月後のものはかなり発育が進行して、完全に発育後、脱殻した幼虫が 1% に認められた。

これらの結果から、bithionol は成虫と幼虫に対して強力な殺虫効果を示し、一方、isothiocyanates は殺卵性が強いことが認められた。

本研究の機会を与えられた宮崎一郎教授ならびに本稿を校閲された同教授および藤田穆薬学博士に感謝の意を捧げます。

文 献

- 1) 藤田穆(1953): 系統的有機定性分析. 61-84, 共立出版, 東京.
- 2) 浜島房則(1966): 肺吸虫の解糖および呼吸代謝に対する bithionol の作用. 寄生虫誌, 15, 331.
- 3) 村越善衛・川上節子・新村宗敏(1962): Bithionol の作用機構について (I). 日本薬理学誌, 58, 110.
- 4) 佐渡正四郎(1961): 寄生虫殺卵剤に関する研究. 日本公衛誌, 8, 101-109.
- 5) 高木一孝・篠藤満亮(1962): 肝吸虫症の治療に関する研究 XVI. 沃化ジチアゼニンおよび沃化ジチアゼニン様物質による肝吸虫体の変化 (in vitro). 寄生虫誌, 11, 273-274.
- 6) 山口富雄・峯田春敏・上原清史・篠藤満亮(1961):

- Dithiazanine iodide (スミレ錠) による肝吸虫症の治療 I. 体外飼育成虫に対する殺虫効果(肝吸虫 7). 内科の領域, 9, 258-263.
- 7) 横川宗雄(1964): 肺吸虫症の診断と治療(その 2). 胸部疾患, 8, 572-583.
- 8) 横川宗雄・村越善衛・新村宗敏・川上節子・川又秀子(1961): 肺吸虫および肝蛭に対する bithionol の作用機構について. 寄生虫誌, 10, 484-485.
- 9) Yokogawa, M., Yoshimura, H., Sano, M., Okura, T., Tsuji, M., Takizawa, A., Harada, Y. and Kihata, M. (1961): Chemotherapy of paragonimiasis with bithionol I. Experimental chemotherapy on the animals infected with *Paragonimus westermani* or *P. ohirai*. Jap. J. Parasit., 10, 302-316.

Abstract

EFFECTS OF ISOTHIOCYANATES AND BITHIONOL ON *PARAGONIMUS WESTERMANI* (KERBERT, 1878) *IN VITRO*

SHOSHIRO SAWATARI & FUSANORI HAMAJIMA
 (Department of Parasitology, Faculty of Medicine,
 Kyushu University, Fukuoka, Japan)

For fundamental studies of prevention and medical treatment of paragonimiasis, the effects of allyl-isothiocyanate (allyl-NCS), phenyl-isothiocyanate (phenyl-NCS) and bithionol (2,2'-thiobis (4, 6-dichlorophenol on)) adults, excysted metacercariae and uterine eggs of *Paragonimus westermani* were examined in Ringer's solution at 27°C. The concentration of isothiocyanates and bithionol used were 1:1,000 and 0.04:1,000 respectively. The adults were obtained from the lungs of dogs which were sacrificed 3 and 6 months after infection with metacercariae. The excysted metacercariae of *P. westermani* were isolated from naturally infected crabs, *Eriocheir japonicus*.

The eggs were collected from resected uteri of the adults treated with above-mentioned medicines during 24 hours. In this experiment, isothiocyanates and bithionol were proved to be effective on destruction of adults and metacercariae of *P. westermani* (Tables 1, 2 and 3). In addition, isothiocyanates were found to be more effective as ovicide than bithionol (Tables 4 and 5).