

^3H -1, 4-bis-trichloromethylbenzol の寄生肝吸虫に 対する作用機序解明に関するマイクロオート ラジオグラフィー的研究

古 沢 明

千葉大学医学部寄生虫学教室 (主任 横川宗雄教授)

(1969年12月22日 受領)

緒 言

1,4-bis-trichloromethylbenzol は Lämmler (1960) により槍型吸虫 (*Dicrocoelium dendriticum*) および肝蛭 (*Fasciola hepatica*) に対して、きわめて有効であることがはじめて明らかにされ、ついで横川ら (1965, 1966, 1967) により肝吸虫症 (clonorchiasis sinensis) にも著効のあることが明らかにされた。

しかしながら 1,4-bis-trichloromethylbenzol の肝吸虫虫体への作用機序については従来まったく研究されておらず、その点の解明が待たれていた。著者は 1,4-bis-trichloromethylbenzol の肝吸虫に対する作用機序の概略を明らかにする目的を以つて本剤をラジオアイソトープ ^3H を以つて標識し、実験的に肝吸虫を感染せしめたラットに投与し、本剤の宿主から寄生虫体への移行過程および、さらに虫体内における分布動態を追求する一連の実験を行なつて来た。そのうち標識本剤のラット体内の分布については既に、横川ら (1968) により解明され報告された。

今回は特に本剤が、肝吸虫の幼若期虫体に対して無効である (小山, 1967) 点を解明することに重点をおいて、幼若期より成熟期に至る各発育期の虫体内における標識本剤のとりこみ分布について比較考察を加えてみた。

またさらに進んで駆虫薬が宿主をとおり、寄生体へ移行して効果を示す一連の機構の一端を解明するいとぐちを本実験からつかみとるように努めてみた。

その結果、著者は本実験により 1,4-bis-trichloromethylbenzol の寄生虫体への摂取径路、虫体内における本

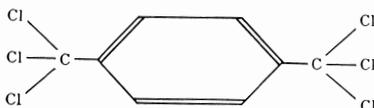


Fig. 1 Chemical structure of 1,4-bis-trichloromethylbenzol.

薬剤の分布動態の経時的消長、生殖器破壊の機序の一部解明、幼若期虫体への本剤の無効の理由、薬剤投与量と虫体の薬剤摂取量の関係を推察し得たので以下に報告する。

実験材料

使用薬剤

使用薬剤は 1,4-bis-trichloromethylbenzol をラジオアイソトープ ^3H で標識したものをを用いた。1,4-bis-trichloromethylbenzol は Fig. 1 に示すような構造式をもち、白色、無味無臭の粉末であり、エーテル、メチルクロロライド、石油エーテル、アセトン、クロロフォルムなどの有機溶媒、特にエーテルに最もよく溶解するが、水には不溶である。融点は $111^{\circ}\sim 113^{\circ}\text{C}$ である。

実験にはドイツ、ヘキスト社製の Hetol® の名称で市販されているものの純粋品を用いた。純粋 Hetol は約 500 mg ずつ第一化学薬品に送り Wilzbach 法によりトリチウムガスをを用いて 150 Ci-days の照射を行ない標識した。この標識 1,4-bis-trichloromethylbenzol は遊離の不安定な ^3H を多く含んでいるため再結晶操作により精製した。すなわち溶媒として石油エーテル、アセトン、クロロフォルム、メタノールの各特級試薬をさらに再蒸留して精製したものをを用い予備実験を行なつた結果、熱メタノールがもつともよい成績をあげたので、蒸留メタノールによる再結晶操作を行なつた。

再結晶に際しては操作のたび毎に試料をとりのけ、液体シンチレーションカウンターを用いて比放射能を測定し、比放射能のもつとも安定したところで操作を打ち切つた。再結晶操作は平均 3~4 回で充分であつた。精製試料の回収率は 60~65% で実験に供した精製試薬の比放射能は試薬毎に異なる数値を示しているため、実験の項でそれぞれ記すこととした。

以上のようにして得た試薬は非標識純粋試料とともに Kieselgel G 4; 30 g に純水 60 ml の割で作製した薄層

クロマトグラフィー (厚さ0.25 mm) に展開し単一スポットを得、化学的純度を確認した (溶媒; クロロホルム 45 ml: メタノール 105 ml, 発色剤 I₂ ガス) またスポット以外の部分をかきとつて、液体シンチレーションカウンターで測定しスポット以外の部分に放射能のないことを確認し、放射化学的純度を確認した。

肝吸虫感染動物

実験に用いた肝吸虫メタセルカリアは韓国 NIH の金東燦氏の御好意により送られた、モツゴ (*Pseudorasbora parva*) から得た。これらの魚は採取後、直ちに空輸され、到着後すぐ研究室に持ち帰り人工消化法によりメタセルカリアを分離採集した。すなわち4~5匹ずつ鉢で細切し 300 ml 入りビーカーに入れ、人工消化液 (塩酸 0.7 g, ペプシン 0.2 g, 純水 100 ml の割合) を加えてホモジナイザーで約2分間磨砕し (2,500rpm), その後約3時間, 37°C の孵卵器に放置し, その後, 水を加えて攪拌し上澄みをすて去る操作を数回くり返したのち, その沈渣を実体双眼顕微鏡下でみながら, メタセルカリアを収集した。収集したメタセルカリアは顕微鏡下でその生存を充分確かめたのち30コ宛, ラットにピペットを用い経口的に感染せしめた。実験には体重 100~130 g の健康ラットを用いた。

実験方法

実験 I : まず宿主より寄生肝吸虫体内への本剤のとりこみ後虫体内各臓器への移行分布動態の経時的推移および本剤の成熟虫体に対する作用機序の詳細を解明する目的で、肝吸虫感染後8週を経た平均体重 300 g の雄のラット7匹を準備し、標識本剤 10mg に非標識本剤 20mg をキャリアーとして加えた計30mg, すなわち 100mg/kg を経口投与し、投与後3, 6, 12, 24時間, 2, 4, 7日後にそれぞれ放血死させ剖検, 胆道より虫体を摘出した。摘出した虫体は生理的食塩水中で充分洗ったのち, カルノア液で固定, 型のごとくパラフィン包埋, 虫体の連続切片 (厚さ 4 μ) を作成, ミクロオートラジオグラフ用感光乳剤 NR-M 2 (小西写真工業) を用い Dipping 法によるミクロオートラジオグラフを作製した。露出時間は14日間とし, 冷暗所に密封静置したのち, コニドール X で5分間現象, ラピッドフィクサーで4分間定着, 水洗20分後, ただちにヘマトキシリン染色をほどこした。³H から放射された β 線は乳剤に感光し黒点 (グレイン) を生じ, その存在を知り得る。

各ミクロオートラジオグラフはアイピースマイクロメーター (方眼 7/7°) (オリンパス光学社) を装備して 400

倍 (10×40) で検鏡測定したが, ³H の虫体臓器別分布密度を, アイピースマイクロメーターのメッシュあたりの銀粒子数 (以下「グレイン数」と称する) を以て測定した。なおメッシュ1辺の長さは標本の 0.025mm に相当するので, 標本1メッシュの面積は $6.25 \times 10^{-4} \text{mm}^2$ である。数値はバラツキを防ぐため同一臓器につき, 10枚の異なるミクロオートラジオグラフからおのおの1メッシュずつ測定し, その総計をとつた。したがって数値を10で除すれば1メッシュあたりのグレインの平均値を求め得る訳である。

なお測定にあたって, 標本によるグレインの数値の誤差を防ぐため, バックグラウンドをおのおの正確に計測し, カウントした数値から差し引き少しでも正しい値を得られるよう努めた。なお本実験に使用した標識薬剤の比放射能活性は 246 μCi/mg であった。

実験 II : 次いで感染肝吸虫の幼若期虫体に対する 1, 4-bis-trichloromethylbenzol の作用機序の詳細を知るため, 感染後1, 2, 3, 4週後のラット各8匹ずつの4群総計32匹を用意し, 各群2匹ずつに標識本剤をそれぞれ 100mg/kg, 200 mg/kg, 400mg/kg, 800mg/kg ずつ経口投与した。

すべての動物は薬剤投与後4日後に剖検し虫体を摘出し, 実験 I と同じくミクロオートラジオグラフを作製した。ただし露出時間は14日とし, レンドールで5分間現象後, レンフィックスで15分間定着, 水洗20分ののちハイデンハイン, ヘマトキシリン単染色をほどこした。

以下グレインの計測方法は実験 I とまったく同一の方法を用いた。なお本実験に用いた標識薬剤の比放射能活性は 32.1 μCi/mg であった。

実験結果

実験 I : ³H-1, 4-bis-trichloromethylbenzol の虫体内各臓器別分布の測定にあたっては, 次の器官, 組織を対象としてえらび検鏡計測した。すなわち口吸盤, 腹吸盤, 腸管壁, 子宮, 卵巣, 受精囊, 睪丸, 輸精管, 卵黄腺, および虫体の体肉である。このうち子宮, 卵巣, 受精囊, 睪丸, 輸精管, 卵黄腺についてはそれぞれの臓器の内部におけるグレインの分布と臓器の周辺部におけるグレインの分布とにつき個別に測定を行なった。また腸管壁については腸の内容物に含まれるグレインは除外し, 必らず腸管壁を経て体内へとりこまれている像のみを有意のものとして計測した。体肉については, 子宮, 卵巣, 受精囊を含む虫体前半部と睪丸を含む虫体後半部とにわけて計測を試みた。

Table 1 Distribution* of ^3H -1,4-bis-trichloromethylbenzol in various organs of *Clonorchis sinensis* in rats

Organs	Hours or days after the administration of the drug						
	3 hours	6 hours	12 hours	24 hours	2 days	4 days	7 days
Oral sucker	—	8	—	—	3	2	—
Ventral sucker	12	12	13	2	10	6	—
Wall of intestine	8	16	28	6	8	7	4
Uterus i	0	3	1	1	0	4	1
s	4	17	60	71	20	27	13
Ovary i	3	5	10	3	0	4	5
s	12	15	66	116	124	147	61
Seminal receptacle i	3	6	9	1	10	10	5
s	7	11	32	69	56	111	6
Testis i	3	2	6	0	4	0	14
s	3	43	68	56	119	257	72
Vas deferens i	0	2	6	1	6	4	2
s	8	26	97	86	89	314	189
Vitelline glands i	6	5	1	17	6	10	3
s	6	21	14	74	81	32	21
anterior part of the body	8	17	24	31	11	9	14
Parenchyma posterior part of the body	7	29	14	43	26	39	11

* Grains were counted in 10 parts of each sectioned tissue.
(1 part: $6.25 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ of the tissue)

i: Grains, inside of the organs.

s: Grains, around the organs.

なお体肉の示す計測値は虫体内におけるグレインの分布の計測値の標準値として分布密度の多寡を検討する際の基準となりうるものと考えられる。

以上虫体内各臓器別にマイクロオートラジオグラフ標本 $6.25 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ あたりのグレイン数をそれぞれ10コの標本につき計測合計した数値を Table 1 に示した。

以下各臓器別に計測結果を述べる。

1) 体肉: 標識本剤投与後3時間にして、既に虫体内にグレインが現われていることが理解される。体肉内分布は6時間後、12時間後と順次に増加して行き、投与24時間後にその分布密度は最高となるが、以後2日、4日と日数の進むにつれて漸減して行く。グレインの体肉内における分布はすべて一様であり、位置的偏在はまったく認められなかった。ただし臓器の周辺部においては特異な分布を示すがそれについては各臓器の項で述べることにする。

以上の点を除くとグレインの体内における分布は均等であると結論された。

なお前体部と後体部とにおいてはその数値に多少の差があるが有意の差は認められなかった。

2) 口吸盤、腹吸盤: この両者におけるグレインの分布はほぼ体肉におけるグレインの分布密度と一致してお

り、有意の変動差は見出し得なかったが、一般に口吸盤におけるグレインの分布は少なかつた。

3) 腸管壁: 腸管壁におけるグレインの分布は投与後3時間後に既に見られ6時間後、12時間後と急増するが、投与12時間後を境として、とりこみの量は急激な減少を示した。

4) 子宮: 子宮内部へのグレインの分布は全期間をとおしてまったく認められなかった。しかしながら子宮の周辺部には投与6時間後より急激に増加し、投与12時間後から、24時間後には最高値を示した。その後は分布は減り、2日後から7日後の間には著じるしい変動はみられなかった。

なお子宮周囲における分布状況は一様でなく、子宮の起始部に集中する傾向がみられた。また虫卵内へのグレインのとりこみ像はまったく認められなかった。

5) 卵巣: 卵巣内部のグレインの分布は子宮と同様全期間をとおして、まったく認められなかった。しかるに卵巣周囲のグレインの分布は特異な像を示した。すなわち投与12時間後、既にグレイン数は66を示し、グレインは卵巣周囲への集中の傾向を示し、24時間後にはグレイン数は116とさらに倍増し、投与4日後にグレイン数は最大値147を示した。投与7日後にはグレイン数61と激

減したものの、この数値は体肉全般の分布が7日後には11~14のグレイン数を示しているのに比較して、なおかつ高いグレインの集中度を示すものといえよう。このようにグレインが卵巣内部に入りこむことなく周囲に濃密に集中するという事実は興味深い所見であった。

6) 受精嚢：卵巣におけるとほぼ同じようなパターンを示した。すなわち受精嚢内部のグレインの分布像は、まったくといってよいほど見られなかったが、周辺へのグレインの集中は投与12時間後にはグレイン数32を示し、その後順次増加し、投与4日後にはグレイン数111という最大値を示した。投与7日後の標本では周囲のグレインは、ほとんど認められなくなったことは卵巣の場合とやや異なる点であった。

7) 睪丸：卵巣におけるとおなじように、きわめて特異な分布像を示した。すなわち睪丸内部へのグレインの分布はまったくみられなかったが、その周辺への集中像は、早くも投与6時間後にみられ、その後急激に増加し、投与2日後にはグレイン数は119、投与4日後には257を示した。したがって顕微鏡所見では睪丸が密集したグレインにより、まったくとり囲まれてしまうという異様な像が認められた。この密集の度合いは卵巣における場合より著るしいものであり、1,4-bis-trichloromethylbenzolの雌性生殖器官より雄性生殖器官への更に強い親和性を明らかに示したものと考えられる。

8) 輸精管：卵巣、受精嚢、睪丸と同じく輸精管内部へのグレインの分布像はまったく認めることができなかった。しかしその周辺には、睪丸の場合とはまったく同じように投与6時間後より顕著なグレインの集中像がみられ、投与12時間後にはグレイン数は97、投与4日後には、じつに314と本実験における最高値を示した。そのため顕微鏡所見では輸精管は、その周辺のグレインの密集のためあたかも2条の黒線のごとく認められた。この事実は睪丸の場合におけると同じく標識薬剤の雄性生殖器官へのより強い親和性を明示する所見である。なお輸精管は投与7日後もグレイン数は189という高い数値を示したことは特異な点であった。

9) 卵黄腺：一般的に云つて他の生殖器官とはほぼ同じような型の分布を示したといえる。すなわち卵黄腺組織内部へのとりこみ像はまったくみられず、周辺への集中度も著るしいものではなかったが、それでも投与1日後にはグレイン数74、2日後には81を示した。しかしながら投与4日後にはグレイン数は32と減少し、卵巣、睪丸などの生殖器官が投与4日後に分布の最高値を示したのとは異なっていた。むしろ体肉全般の分布と同一の消

長を示すもののようであった。

実験Ⅱ：1,4-bis-trichloromethylbenzolの寄生肝吸虫の成熟度別および投与量別による虫体内臓器分布を調べる目的で、前述のごとく、肝吸虫感染後1週、2週、3週および4週後の、4群のラット（各群8匹ずつ）それぞれ2匹ずつに標識本剤100 mg/kg、200 mg/kg、400 mg/kg、800 mg/kgを投与した。すなわち計32匹のラットにつき実験を行なった。

剖検の時期は上述の実験Ⅰの結果から、本剤投与4日後にグレインの卵巣、子宮、睪丸、輸精管、受精嚢、それぞれの周辺への集中が最大値を示すことが判明したため、各群とも薬剤投与4日後とした。虫体内各臓器別のグレインの分布密度測定は実験Ⅰとまったく同様の手順で行なった。

1. 感染後1週間虫体内の分布：

本群は感染後1週間のラットに体重1 kgあたり100 mg、200 mg、400 mg、および800 mgの標識本剤を投与、4日後に剖検したものである。得られたマイクロオートラジオグラフについて計測したグレイン数をTable 2aに示した。まず全般的にみて結論できることは標識薬剤のとりこみ方が、成熟虫体の場合に比較して非常に少ないことである。

100 mg/kg投与群では体肉全般のグレイン数は前体部7、後体部4となつてゐるが、この事実は、この数値が10カ所で計測した総和であることを考えあわせると標本によつては $6.25 \times 10^{-4} \text{ mm}^2$ のメッシュの中にグレインが皆無の個所もあるということで、グレインの密度がきわめて低いことを示している。

1) 体肉：100 mg/kg投与群ではグレイン分布は前体部7、後体部4と最小値を示し、200 mg/kg投与群では前体部11、後体部10、400 mg/kg投与群では前体部15、後体部18、800 mg/kg投与群では前体部17、後体部19と投与量の増加とともに、とりこみ量もある程度の増加がみられたが、その増加率はそれほど著明とはいえない。なお体肉全般の分布は臓器周辺を除くとおおむね同様であり、偏よつた分布を示す像は見出されなかった。また体表皮下にグレインが集中する像はまったく見出されなかった。

2) 口吸盤、腹吸盤：100~800 mg/kg投与群の何れにおいてもグレインの口吸盤、腹吸盤における分布には有意の差は認められず、その分布密度はいずれも体肉のそれよりも、さらに低かつた。

3) 腸管壁：100 mg/kg~800 mg/kgのいずれの投与群においてもほとんど同じ低い数値を示しており、腸管

Table 2 Distribution* of ^3H -1, 4-bis-trichloromethylbenzol in various organs of *Clonorchis sinensis* in ratsTable 2a immature worms,
1 week after infection

Organs	Dose of drug orally given to infected rats			
	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg
Oral sucker	—	10	—	4
Ventral sucker	3	7	4	6
Wall of intestine	8	9	4	8
Uterus i	6	6	4	8
s	12	21	14	13
Ovary i	2	7	3	3
s	8	10	22	15
Seminal receptacle i	1	1	1	3
s	4	5	14	14
Testis i	3	2	2	10
s	15	12	17	18
Vas deferens	4	5	8	6
Vitelline glands i	8	4	7	10
s	5	9	19	15
anterior part of the body	7	11	15	17
Parenchyma posterior part of the body	4	10	18	19

Table 2b immature worms,
2 weeks after infection

Organs	Dose of drug orally given to infected rats			
	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg
Oral sucker	4	2	6	6
Ventral sucker	4	4	6	15
Wall of intestine	9	8	6	8
Uterus i	3	2	5	6
s	15	53	15	27
Ovary i	2	4	7	2
s	6	8	17	27
Seminal receptacle i	2	3	1	4
s	11	14	11	11
Testis i	2	2	3	4
s	11	9	25	35
Vas deferens	15	18	7	15
Vitelline glands i	4	4	8	11
s	7	12	12	18
anterior part of the body	8	14	10	23
Parenchyma posterior part of the body	9	16	14	24

Table 2c liver flukes, 3 weeks after infection

Organs	Dose of drug orally given to infected rats			
	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg
Oral sucker	4	—	8	6
Ventral sucker	4	6	4	8
Wall of intestine	6	15	16	18
Uterus i	4	7	5	15
s	17	24	31	39
Ovary i	3	7	4	6
s	10	22	27	24
Seminal receptacle i	3	13	3	2
s	20	21	19	18
Testis i	7	9	6	8
s	30	45	45	71
Vas deferens	54	141	140	152
Vitelline glands i	7	11	6	11
s	15	20	19	38
anterior part of the body	17	23	21	31
Parenchyma posterior part of the body	18	24	26	28

Table 2d liver flukes, 4 weeks after infection

Organs	Dose of drug orally given to infected rats			
	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg	800 mg/kg
Oral sucker	2	—	4	—
Ventral sucker	3	8	2	10
Wall of intestine	7	5	8	11
Uterus i	0	3	2	18
s	13	21	20	48
Ovary i	3	9	4	4
s	14	24	39	42
Seminal receptacle i	2	4	2	1
s	14	16	18	24
Testis i	7	2	4	4
s	38	32	51	62
Vas deferens	102	195	167	190
Vitelline glands i	4	7	5	11
s	20	18	17	35
anterior part of the body	21	21	25	38
Parenchyma posterior part of the body	25	25	29	39

* Grains were counted in 10 parts of each sectioned tissue.
(part : $6.25 \times 10^{-4} \text{mm}^2$ of the tissue)

i : Grains, inside of the organs

s : Grains, around the organs

壁からの吸収が投与量には必ずしも比例していないことが明らかになった。

4) 子宮：幼若虫体のため子宮の発育は充分ではないが、一応計測した結果を示した。子宮内部へのとりこみは投与量に関係なく何れもグレイン数は4～8と低く、ほとんど皆無と判断された。しかし子宮の周辺部のグレイン数は100mg/kg～800 mg/kg の投与量には比例せず、いずれも低いが12～21を示し、これでも子宮内部へのとりこみ量と比較すれば明らかに有意の差が認められた。

しかしながら体肉全般におけるグレイン数と比較した場合、100mg/kg 投与群で12、200mg/kg 投与群で21とそれぞれ体肉全般の分布を7～11上まわる数値を示しているが400 mg/kg 投与群、800 mg/kg 投与群ではそれぞれ14、13とむしろ体肉全般の分布と同じ、あるいはむしろ下まわっていて、特にグレインの集中像と判定し得るような像は認められなかった。

5) 卵巣：卵巣は既にある程度完成していたが、グレインの卵巣内部の分布と、周囲への分布とは明らかに有意の差が認められた。しかも卵巣内部の分布はグレイン数2、7、3、3、と子宮内部よりも少なく、200mg/kg 投与群の7を除くとグレインはまったく見られなかったといえる。

一方卵巣周囲のグレインの分布は100mg/kg 投与群でグレイン数8、200mg/kg 投与群でグレイン数10と体肉全般における分布とまったく一致していた。400 mg/kg 投与群がグレイン数22を示したが、800mg/kg 投与群では15で体肉における分布とほぼ一致しており、特徴あるグレインの集中像は感染後1週間虫体群では、薬剤投与量の多少にかかわらず見出せなかった。

6) 受精嚢：受精嚢内部のグレインの分布は1、1、1、3と最も少なかった。受精嚢周囲のグレインの分布も100 mg/kg 投与群、200 mg/kg 投与群ではそれぞれ4、5と体肉全般のグレインの分布を下まわり、400 mg/kg 投与群、800 mg/kg 投与群ではじめて14、14とほぼ体肉全般のグレインの分布と等しい数値を示した。

7) 睪丸：睪丸内部における分布はグレイン数3、2、2、10でこれほとんど内部へのグレインの分布はなかったといえる。一方睪丸周囲のグレイン数は15、12、17、18と少ないながらも、明らかに睪丸内部とは有意の差が認められなかった。しかしながら、このグレイン数は成熟虫体の場合に見られる如き特徴ある「睪丸周囲への集中像」とはいいたいがたい。

8) 輸精管：輸精管周囲のグレイン分布は4、5、8、6とほとんど認められず、成熟虫体では、まず輸精管に

グレインが集中する事実からみると、いちぢるしく異なる点であった。

9) 卵黄腺：卵黄腺内部におけるグレイン分布はそれぞれ8、4、7、10、一方卵黄腺周囲のグレイン分布は5、9、19、15で100mg/kg、200mg/kg 投与群では両者間に差がみられなかったが、400mg/kg、800mg/kg 投与群では両者間に差が認められた。

2. 感染後2週間虫体内の分布

本群は肝吸虫感染後2週目のラットに100mg/kg、200 mg/kg、400 mg/kg、800 mg/kg の標識本剤を投与し、4日後に剖検したものである。グレイン数はTable 2bに示した。前述した、感染後1週間虫体のそれと比べて同じようにグレインの分布のし方の少ないことが確かめられた。

1) 体肉：100mg/kg 投与群では8、9、200 mg/kg 投与群、400mg/kg 投与群はグレイン数はやや増加して14、16および10、14であったが、800 mg/kg 投与群では23、24とさらに軽度ながら増加がみられた。分布のパターンは感染後1週間虫体と同じように均等に分布していた。

2) 口吸盤、腹吸盤：薬剤投与量別に見ると4、2、6、6および4、4、6、15で特に有意の差は認められなかった。これらの数値は体肉全般のグレイン数よりも少ないが、この結果は全例において共通しており、口吸盤、腹吸盤と体肉組織との構造上の差異に基づくものと推定された。

3) 腸管壁：薬剤投与量別に示すとグレイン数は9、8、6、8でやはり薬剤投与量による有意の差は認められなかった。

4) 子宮：子宮はやや発育を示していたが、子宮内部のグレインの分布はそれぞれ3、2、5、6とほとんどとりこみは皆無に近い状態であった。一方子宮周囲のグレイン分布は15、53、15、27であった。200 mg/kg 投与群のみ53と他とはかけはなれて大きい数値を示したが特に意味がある所見とは考えられなかった。というのは元来子宮周囲におけるグレインの分布は均等ではなく、その起始部に多く集まるという傾向があり、計測に当たってはその点を充分注意したが、切片標本の関係でたまたま上述の数値が出てしまったものと思われる。従って子宮周囲におけるグレインの分布は薬剤投与量には特に比例しているとはいえない。

5) 卵巣：卵巣内部のグレインの分布は投与量別にみると2、4、7、2でグレイン数はまったく皆無に等しかった。一方卵巣周囲のグレインの分布は6、8、17、

27と投与量の増加とともにグレインのとりこみが多少増加していることが認められたが、それ程著明とはいえない。

6) 受精囊：受精囊内部のグレイン分布はそれぞれ2, 3, 1, 4とほとんどグレインは認められなかった。受精囊周囲へのグレインの分布は11, 14, 11, 11で投与量には関係なく、体肉全般のグレイン分布とほぼ等しい数値を示していた。

7) 睪丸：睪丸内部のグレインの分布は2, 2, 3, 4でまったく認められなかったが、睪丸周囲のグレイン分布は11, 9, 25, 35で400mg/kg, 800mg/kg投与群における数値はやや高く、グレインが睪丸周囲に集中する傾向がうかがわれた。このことは感染後1週間虫体群において、まったくグレインの集中像が認められなかったことと考えあわせると、やや集中度が増して来ているといえる。

8) 輸精管：輸精管周囲のグレイン数はそれぞれ15, 18, 7, 15を示し、感染後1週間虫体と同様に特徴あるグレインの集中像は認められなかった。また投与量による、とりこみの差は見出されなかった。

9) 卵黄腺：卵黄腺内部のグレインの分布は投与量別にみると4, 4, 8, 11, 周囲のグレイン分布は7, 12, 12, 18で両者間に有意の差は認められなかった。ただ³Hのとりこみ量は薬剤投与量に応じて、両者ともやや増加しているといえるが著明なものではなかった。

3. 感染後3週間虫体内の分布

本群は感染後3週間経過したラットに薬剤を投与した群である。計測したグレインの数値はTable 2cに示した。全般的にいつて、グレインの分布は感染後1週間虫体および2週間虫体に比し、著じるしく増加していることが明らかに認められた。虫体そのものもほとんど成熟に近く、そのことと関連して興味ある所見であった。

1) 体肉：100 mg/kg投与群ではグレイン数は17, 18, 200mg/kg投与群では23, 24, 400 mg/kg投与群では21, 26, 800 mg/kg投与群では31, 28と投与量別に見ると、それ程著じるしい増加は認められないが、感染後2週間虫体のグレイン数に比べると著明なグレインの分布の増加が認められた。

2) 口吸盤、腹吸盤：感染後1週間虫体、2週間虫体と同じく、グレインの分布は少なかった。

3) 腸管壁：グレインの分布はそれぞれ6, 15, 16, 18であり高いものではなく、また投与量による差も見出し難かった。

4) 子宮：子宮内部のグレイン分布は4, 7, 5, 15

で800 mg/kg投与群の15はやや多すぎると思われた。一方子宮周囲への³Hの分布は17, 24, 31, 39とグレイン数も増加を示しているが、これは体肉全般のグレイン分布に比し、やや多いといえる程度であった。

5) 卵巣：卵巣内部のグレイン分布はそれぞれ3, 7, 4, 6でほとんど見出し得なかつたが、卵巣周囲のグレイン分布は10, 22, 27, 24で体肉全般のグレイン数とほぼ同じ傾向を示した。

6) 受精囊：受精囊内部におけるグレイン数はそれぞれ3, 13, 3, 2で200mg/kg投与群でやや多すぎる数値を示した他は皆無に近い分布状態であった。受精囊周囲のグレイン数は20, 21, 19, 18で薬剤投与量とは関係なく、ほぼ同じような数値を示した。

7) 睪丸：睪丸内部のグレイン分布は7, 9, 6, 8でグレインはほとんど見出しなかつたが、睪丸周囲のグレイン数は30, 45, 45, 71とかなり高い集中度を示した。このような現象は感染後1週間虫体および2週間虫体においては認められなかつた所見であった。特に800mg/kg投与群においては、とりこみ量はやや高かつた。

8) 輸精管：睪丸周囲においてグレイン集中度の高いことが認められたが、輸精管周囲ではグレイン数は54, 141, 140, 152と睪丸におけるよりも更に高い密度を示した。しかしながら、このように濃密なグレインの集中にもかかわらず輸精管内部へのグレインの侵入像はまったく認められなかつたのは興味深い。

9) 卵黄腺：卵黄腺内部におけるグレイン分布はそれぞれ7, 11, 6, 11, 卵黄腺周囲への分布は15, 20, 19, 38で記すべき所見は認められなかつた。

4. 感染後4週間虫体内の分布

本群は肝吸虫感染後4週間のラットに標識薬剤を投与し、投与4日後に剖検した群である。計測したグレイン数はTable 2dに示した。

全般的にいつてグレイン数が著じるしく高く、グレインの分布量が幼若虫体に比しはるかに多いことを示していた。またグレインの分布そのものが多かつたのみならず、グレインの虫体内における分布様式もこれまでの感染後1, 2, 3週間虫体内のそれに比べてきわめて特異で、実験Iで示された如く、成熟期虫体内におけるグレインの動態とまったく一致する分布様式を示した。

以上の事実は標識薬剤の虫体内への摂取およびその後の分布が、その虫体の成熟度に特異の関係のあることを示しているものと考えられた。

1) 体肉：体肉内におけるグレイン分布は100mg/kg投与群21, 25, 200 mg/kg投与群21, 25, 400 mg/kg投

与群25, 29, 800 mg/kg 投与群38, 39で感染後3週間虫体におけるより、いずれも高い分布量を示していた。しかしながら投与量のちがひによる分布量の差はほとんど見出されなかつた。

2) 口吸盤、腹吸盤：口吸盤はグレインはまったく分布していなかつた。また腹吸盤においてはグレイン数は3, 8, 2, 10であり同じく分布量は低かつた。

3) 腸管壁：グレイン数はそれぞれ7, 5, 8, 11であり、感染後1, 2, 3週間虫体と比べ差はみられなかつた。

4) 子宮：子宮は既に成熟していたが、子宮内部へのグレイン分布はそれぞれ0, 3, 2, 18で800mg/kg 投与群を除きグレインは皆無に近かつた。一方子宮周囲のグレイン分布は13, 21, 20, 48で感染後3週間虫体のそれと比較してもほぼ同じような数値であつた。ただ800 mg/kg 投与群のみが著じるしいグレイン分布の増加を示していた。

5) 卵巣：卵巣内部へのグレイン分布は3, 9, 4, 4でいずれもほとんどグレインは見出せない状態であつた。卵巣周囲のグレインの分布は14, 24, 39, 42であり、感染後1～3週間虫体に比較してはるかに大量のグレインの集中が見出された。またグレイン分布量は薬剤投与量の増加とともにやや増加の傾向を示していた。

6) 受精囊：受精囊内部におけるグレイン分布は2, 4, 2, 1でまったくといってよい程認められなかつた。受精囊周囲のグレイン数は14, 16, 18, 24で体肉全般におけるグレイン密度と比較すると多いとはいえなかつた。

7) 睪丸：睪丸内部のグレイン分布は2, 4, 2, 1でまったく認められなかつた。睪丸周囲のグレインの分布は38, 32, 51, 62でこれは感染後3週間虫体のそれとほぼ同じ量の分布であつた。睪丸組織は内部へのグレインの侵入像はまったく見出されないにもかかわらず、周囲はグレインで濃密にとりかこまれ特異な様相を呈していた。

8) 輸精管：輸精管周囲のグレインの分布は102, 195, 167, 190で感染後3週間虫体群のそれを著じるしく上まわるものであつた。睪丸におけるグレインが感染後3週間虫体群とほぼ同じかやや上まわる程度であつたのと考えあわせると興味深い。

9) 卵黄腺：卵黄腺内部のグレイン分布は4, 7, 5, 11でほとんど見出されなかつたが、一方周囲におけるグレインの分布は20, 18, 17, 35でほぼ体肉全般におけるグレイン分布と同じであり、卵巣におけると同じ分布様式を示したことが注目された。

考 察

肝吸虫症の治療にすぐれた効果を示し、かつ毒性の低い1, 4-bis-trichloromethylbenzol が出現するまで、肝吸虫症の治療の目的で多くの薬剤が使われてきたが、その効果の点、および副作用の点で安心して投与できる薬剤はなかつた。すなわちこれまで肝吸虫症治療の目的で、塩酸エメチン、ゲンチアナバイオレット、アンチモン剤、磷酸クロロキン、サルファ剤、ヘキサクロロフェン、ジチアザニンアイオダイド、ピチオノール、ピチンSなどが試みられたがいずれも、副作用の点、あるいは効果の点から満足すべき成績は得られていない。

1960年 Lämmler は1, 4-bis-trichloromethylbenzol が槍形吸虫、肝蛭に対して著効のあることをはじめて明らかにしたが、その後 Enigk & Düwel (1960) Ugryumov (1962) Vodrązka (1963) Plotnikov *et al.* (1965) らが肝蛭について、Festisov (1964) が槍形吸虫について追試を試みている。またネコ肝吸虫 (*Opisthorchis felineus*) に対して Lämmler (1964) Plotnikov (1964) Drozdov (1965) らが本剤を使用して良好な成績をおさめた。

横川ら (1965) は1, 4-bis-trichloromethylbenzol をラット、犬を用いた動物肝吸虫症に用いて、すぐれた治療成績を得、充分副作用の点を検討した上、人肝吸虫症患者に本剤を投与し、8名中7名の完全治癒という成績をあげ (1966)、さらに集団治療にも適用して (1966) きわめて良好な成績を得ている。

人肝吸虫症への本剤の適用は、本邦のみならず中国、タイなどにおいても追試され (Chung *et al.* (1965), Liu *et al.* (1965), Cho *et al.* (1966)) 同じく良好な結果が得られている。

また横川ら (1967) はウエステルマン肺吸虫 (*Paragonimus westermani*)、大平肺吸虫 (*Paragonimus ohirai*) にも1, 4-bis-trichloromethylbenzol を試用し、ウエステルマン肺吸虫では1日量200mg/kg および300 mg/kg 連続5日投与できわめて良好な成績を得ている。

また佐野、横川 (1968) は横川吸虫 (*Metagonimus yokogawai*) に本剤を試用、200 mg/kg 2日投与にてカマラ、アンピルハール、ピチンに次ぐ良好な成績を得ている。

以上のごとく1, 4-bis-trichloromethylbenzol は住血吸虫以外の吸虫類にすぐれた治療効果を示すことが明らかにされたが、一方本剤の虫体に対する作用機転に関しては、いまだ、明らかにされていない。著者はこの点を

Table 3 Radioactivity ^3H -1,4-bis-trichloromethylbenzol in various organs of the rats (dpm/mg)

After the administration	Liver	Kindney	Heart muscle	Spleen	Lung	Cerebrum
1.5 hours	146	90	62	26	281	45
3 hours	242	181	195	71	219	143
6 hours	247	158	116	37	144	63
12 hours	144	136	165	52	175	27
24 hours	82	37	63	82	196	29
2 days	17	20	13	13	21	38
4 days	26	54	25	17	67	31
7 days	15	22	12	18	18	40

解明すべく本剤をラジオアイソトープ ^3H でラベルし肝吸虫寄生実験動物に投与することにより、宿主および寄生虫体内におけるラジオアイソトープの動きを追跡する一連のトレーサー実験を行なってきた。

以上のトレーサー実験においては虫体内各臓器におけるラジオアイソトープ ^3H の存在を示すグレインの数の経時的消長を以て、 ^3H -1,4-bis-trichloromethylbenzol の分布、動態を推察する方法がとられた。ここで注意しなければならない点は、グレインの存在はあくまでも ^3H の存在を示しているのであつて、この中には生体内で標識化合物から遊離した ^3H も当然含まれており、宇宙線によりかぶりおよびマイクロオートラジオグラフ作製の過程において生じたかぶりは計測の段階で上述の如く大部分を除外したものの、やはりある程度の誤差はまぬかれない。しかしながらこれらグレインの動態が ^3H -1,4-bis-trichloromethylbenzol の動きと一定の関連を有し、消長していることは標識本剤を用いた一連のトレーサー実験および本剤による治療実験の結果からも推測されることであり、従つてグレインの分布状態を追跡観察することはきわめて意味の深いことと考えられる。

これらの実験により、1,4-bis-trichloromethylbenzol の虫体への作用機序の大部分が解明され、従来の治療実験の結果が実験的に裏付けられたと考えられるので以下に今回の実験の結果をもとに考察を加えてみたい。なお ^3H -1,4-bis-trichloromethylbenzol の宿主体内における動態分布については横川ら (1967) により既に報告された。また槍形吸虫に対する標識本剤のとりこみ実験については古沢・横川 (1969) により同じく報告されたことをつけ加えておく。

1. ^3H -1,4-bis-trichloromethylbenzol の宿主から寄生虫体への移行について

標識本剤の宿主体内における動態については、既に横

川ら (1967) が報告しているが、その要点は次のとおりである。

1) 被験動物の血清中における比放射能活性は薬剤投与直後より急激に増加し、投与4時間後にピークに達するが、以後は急激に減少し、投与24時間後にはほとんど認められなくなる。尿中への比放射能活性の出現は血清中のそれよりはやや遅れて投与4～6時間後に最高値を示し以後急速に消失する。要するに ^3H -1,4-bis-trichloromethylbenzol は生体内へ摂取後は24時間以内に急速に排泄されるということが推察される。

2) ミクロオートラジオグラフィ法により宿主各臓器におけるグレイン分布を観察すると肝臓、腎臓を除いては血清中における比放射能活性の動きとほぼ同一の消長を示していた。ただ実質臓器である肝臓、腎臓のみは比較的長時間、すなわち肝臓では投与2日後、腎臓は投与24時間後までグレインが残存することが認められた。

著者はこの点をさらに確認するため、追加実験として宿主各臓器における ^3H -1,4-bis-trichloromethylbenzol の比放射能活性の時間的推移を血清、尿において行なつたと同一の方法で液体シンチレーションカウンターにより追求してみた。

その結果は Table 3 に示した如く、やはり肝臓、腎臓においては血清、尿に比較してかなり長く比放射能活性が認められた。以上の結果から (1) 1,4-bis-trichloromethylbenzol は生体内摂取後、血中濃度が急激に増加し投与3～6時間をピークとして投与24時間以内に速やかに排泄される。しかし肝臓内では比較的排泄は緩慢であり投与1～2日後まで比放射能活性が残存する。(2) 薬剤は経時的に肝静脈→グリソン鞘→肝細胞→胆管と移行しており、本剤は胆汁中に排泄され、胆管内の肝吸虫体内にとりこまれる。(3) 薬剤は1回に大量投与するより連続投与(現在 100 mg/kg 連続5日投与がひろく行な

われている(横川ら1966))の方が効果があることなどがいえると思われた。また本実験より予防的に本剤投与を行なつても無効であること(小山1967)も証明し得た。なお排泄が速やかであるということは本剤の実質臓器への蓄積が少なく、そのため毒性、副作用の点で有利であるともいえよう(稲垣ら(1966), 織田ら(1966), 横川ら(1967))。

2. 成熟虫体における ^3H -1, 4-bis-trichloromethylbenzolの経時的消長について

まず虫体内への薬剤の摂取経路であるが、実験Iのマイクロオートラジオグラフの示すように、標識薬剤は経口的に摂取されることが推測され、さらにこの標識薬剤は腸管壁より体肉にとりこまれ時間の経過とともに雌雄生殖器官、特に雄性生殖器官の周囲に集中することが明らかにされた。すなわちまず輸精管の周囲にグレインの集中がはじまり、ややおくれで睾丸、卵巣、子宮、受精嚢の周囲にグレインが集中する像が明らかに認められた。このグレインの集中のピークは薬剤投与後、子宮、受精嚢では1日後であり、輸精管、卵巣、睾丸では4日後であつた。

虫体の生殖器官、特に雄性生殖器官のグレインの集中は、きわめて特異なものであるが、本剤の虫体へのおよぼす作用として小山(1967)は虫体後半部、殊に睾丸、卵巣および、その附属器が著明に侵され、主として睾丸、卵巣の高度の変性、融解、これにつづく子宮起始部の破壊による産卵機能の減退または停止を挙げたが、実験Iのマイクロオートラジオグラフの結果はすべて小山の指摘した点を十分に裏付けるものであつた。

すなわち薬剤が選択的に生殖器の周囲に密集することにより生殖器はその代謝機構に重大な阻害を受け、そのために生殖器の破壊が起るものと考えられた。

実験Iの過程では ^3H -1, 4-bis-trichloromethylbenzolの投与による生殖器を破壊された変性虫体が多数得られたので、そのマイクロオートラジオグラフを作製して示したが(Photo. 6)睾丸は萎縮し、内部の構造はまったく崩壊しており、薬剤投与7日後ではあつたがグレインはなお周囲に存在していた。

しかしながらここで注意しなければならないことは ^3H の生殖器内部への侵入像はまったく認められなかつたという点である。このことは薬剤はあくまで生殖器の周囲にとどまり、間接的に作用をおよぼすのであつて、生殖器内部への直接作用はないのではないかと想像される。もしこの推察が正しいとすれば、薬剤の作用が不十分であつた場合、一時的に虫卵の産生停止をみるのみで

一定期間後再び虫卵の産生がはじまるという再発の機転を説明し得る根拠となり得るように思われた。

なぜ薬剤の生殖器官内部への侵入像が認められないかという理由は明らかではないが、おそらく肝吸虫の生殖器の周囲を構成する被膜の組織学的構造によるものではないかと推定される。古沢・横川(1969)の槍形吸虫における同様の実験では薬剤は睾丸内へ侵入していた事実が明らかにされている。

また肝吸虫を用いた本実験および槍形吸虫を用いた実験においても、共に放射性物質の虫卵内へのとりこみ像はまったく認められなかつた。ところが佐藤ら(1963)はピチオノール(ピチン)をラジオアイソトープ ^{35}S で標識しウエステルマン肺吸虫に投与したところ、マイクロオートラジオグラフでは、肺吸虫子宮内の虫卵に「黒化像」を認め、ピチンの虫卵内への侵入を認めたといつていることに比べても興味深い結果である。

なお肝吸虫虫体における標識本剤の比放射能活性の経時的消長についても、液体シンチレーションカウンターを用いて測定を行なつたが、その結果はTable 4に示した如く、投与1.5時間後には放射性物質はまだ虫体にはほとんど証明されず、投与3時間から6時間後にかけてそのとりこみ量は増加し、ピークを示すが、以後は急激に減少することなく漸減の傾向をたどつていくことが確かめられた。すなわち標識本剤は虫体内に摂取後は速やかに排泄されることなく、その間に虫体内生殖器官にその薬剤作用をおよぼすことが推測された。

Table 4 Radioactivity of ^3H -1, 4-bis-trichloromethylbenzol in *Clonorchis sinensis* in rats

After the administration	dpm/mg
1.5 hours	3
3 hours	21
6 hours	17
12 hours	20
24 hours	14
2 days	9
4 days	18
7 days	8

3. 幼若期虫体における ^3H -1, 4-bis-trichloromethylbenzolの分布について

1, 4-bis-trichloromethylbenzolを用いた幼若期肝吸虫に対する治療において、感染1週日虫体では400~800 mg/kgの投与を要し、感染2週日虫体では400 mg/kgを要し、感染3週日虫体では200 mg/kgを治療に要し

ているが、成熟期に達した4週日虫体では100mg/kgの投与で完全治癒が得られるという実験結果が小山(1967)により明らかにされているが、何故幼若期虫体が成熟虫体より薬剤に対して強い抵抗力をもつのかという問題はきわめて興味深いものがある。

この問題に対しさまざまな推量となされているが、実際にこの問題を解決するため前述の実験IIを行なつてみた。実験IIで虫体の感染後治療までの日数を1, 2, 3, 4週間と定めたのは虫体が感染後3週間で成熟虫体に達するので幼若期から成熟期までの段階を連続的にとらえることができるということの他に先の小山(1967)の治療実験を裏付けするという意図もあつた。

実験の結果から判明したことは1,4-bis-trichloromethylbenzolが幼若期虫体にはまったくといってよいほどとりこまれないという事実であつた。このことはTable 2a & bから明らかであるが、薬剤のとりこみの絶対量が少ないというだけでなく未成熟な生殖器官あるいは、生殖器の原基の周囲にはグレインの集中像は全然認められなかつた。(Photos. 7, 8, 9, 10, 11) すなわち本薬剤のとりこみに関し、成熟虫体と幼若期虫体とを比較した場合、そのとりこみは量的および質的に相違があり、以上の事実が本剤の幼若期虫体に対し効果が低いことの理由であると考えられる。

以上の事情を明確に理解するためTable 2a, b, c & dの数値を総計して表に示した(Table 5)。もちろんグレ

Table 5 The relation between the grade of maturation of the worm and uptake dose of the compound.

Dose administrated	Flukes 1 week after infection	2 ws	3 ws	4 ws
100 mg/kg	91	112	219	291
200 mg/kg	129	173	388	390
400 mg/kg	152	153	380	397
800 mg/kg	166	236	475	537

Grains were counted in 160 parts of various organs of the worm.

(1 part: $6 \times 25^{-4} \text{mm}^2$ of the sectioned tissue)

インを体内各臓器別に計測したものの和であり、虫体内におけるグレインの総和ではないから必ずしも正確なものとはいえないが、およその傾向はつかめると考えた。

このデータから感染後1週間虫体、2週間虫体と3週間虫体、4週間虫体との間で薬剤のとりこみに明らかに有意の差があることが推測される。吉村・蔡(1965)によればラット体内で肝吸虫が成熟期に達するのは20日前

後であると述べており、このことから虫体内への薬剤のとりこみ量および分布状態の差は虫体の成熟度すなわち発育段階の代謝機能の差によるものと考えられる。

次に薬剤投与量と虫体の薬剤摂取量との相関関係を追求するため、各時期虫体に100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kgの投与を行ない、投与量と摂取量の関係を求めたがTable 2a, b, c & d, 5から明らかになように投与量の増大とともに摂取量も多少は増加するが、その間には正比例の関係は認められなかつた。すなわち一定限度以上の投与量に対しては、虫体の薬剤摂取量は増加していないので、治療効果をあげるため、投与量を一定程度以上増加することはあまり意味がないと考えられる。

結 論

1,4-bis-trichloromethylbenzolの寄生肝吸虫に対する作用機序を解明する目的をもつて、本剤をラジオアイソトープ ^3H で標識し、肝吸虫を実験的に感染せしめたラットに投与、経時的に剖検し、得られた虫体につきマイクロオートラジオグラフを作製した。また幼若期虫体の本剤のとりこみを知るため、および本剤の投与量による摂取率の差異を知る目的で肝吸虫感染後1週間、2週間、3週間、4週間のラットにそれぞれ標識本剤100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kgを投与、4日後に剖検、得られた虫体につきマイクロオートラジオグラフを作製した。

得られたマイクロオートラジオグラフにつきラジオアイソトープ ^3H の分布を観察計測した。その結果次のような事実を推察し得た。

1. 薬剤は虫体に経口的に摂取されることが推測された。
2. 摂取された薬剤は腸管より吸収された後、生殖器官である子宮、卵巣、睪丸、輸精管、受精囊の周囲に集中密集する。特に雄性生殖器官である睪丸、輸精管においてそれが著明である。しかしこれら生殖器官内部への侵入像はまったく認められない。
3. 薬剤の虫体への作用は上記による生殖器への選択的、親和的集中により、生殖器の代謝機構を阻害し、生殖器を破壊する点にあると推察されるが、その作用はあくまでも間接的作用であり、生殖器内部へ侵入して直接作用するのではないと考えられる。
4. 感染後1週間虫体、2週間虫体には薬剤はほとんどとりこまれない。
5. 感染後3週間虫体、4週間虫体では薬剤のとりこ

みは急激に多くなり、しかも虫体内における薬剤の行動様式は成熟虫体のそれと同じ型を示すようになる。

6. 投与量を増大しても、虫体への摂取量は一定限度以上は増加せず、従がつて投与量に正比例はしない。

7. ゆえに一度に大量を投与するより、少量を連続投与する方が虫体への摂取量を増加せしめ得る。

稿を終わるに臨み終始御懇篤なる御指導・御校閲を賜わった恩師横川宗雄教授に深謝致します。また本研究に関し御示唆を頂いた信州大学医学部寄生虫学教室小山博誉博士、種々御教示賜わった教室の吉村裕之助教授はじめ教室員各位、技術上の御指導を賜わった科学技術庁放射線医学総合研究所養成訓練部、飯田博美部長はじめ養成訓練部の先生方に感謝する次第です。

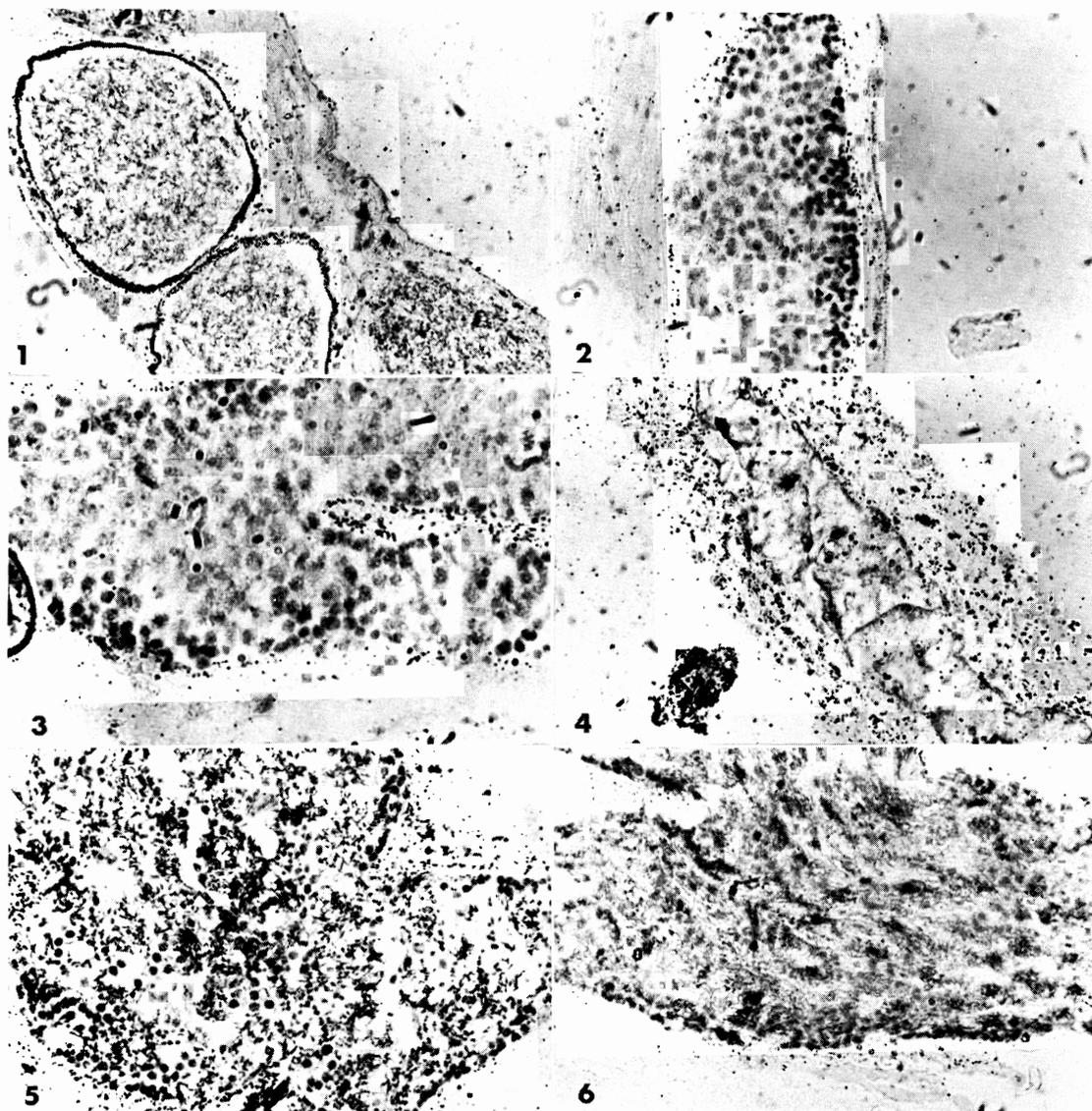
文 献

- 1) Cho, K. M., Kim, C. H., Ahn, Y. K. and Soh, C. T. (1966) : Experimental studies of 1, 4-bis-trichloromethylbenzol on the infection of *Clonorchis sinensis* (I) The Korean J. of Parasit., 4, 11-20.
- 2) Cho, M. M., Cho, K. M., and Soh, C. T. (1966) : The use of Hetol on the infection of *Clonorchis sinensis*. The Korean J. of Parasit., 4, 21-31.
- 3) Chung, H. L., Hsü, C. P., Ts'ao, W. C., K'ö, H. Y., Kuo, C. H., Hsü, H. C., Li, P. S., Cheng, S., Chang, H. Y., Yuan, C. T. and Chang, Y. C. (1965) : Hexachloroparaxylole in treatment of clonorchiasis sinensis in animals and man. Chinese Med. J. Peking 84, 23-247.
- 4) Chung, H. L., K'ö, H. Y., Ts'ao, W. C. and Hsü, C. P. (1965) : Hexachloroparaxylole as a new specific remedy for curing paragonimiasis in cats and man. A preliminary Report Chinese Med. J. Peking 84, 756-759.
- 5) Drozdov, V. N. (1965) : First experience using Hexachloroparaxylole (Chloxyle) for treatment of opisthorchiasis in children. Med. Parasit. & Parasitic Dis. Moscow 34, 414-416.
- 6) Enigk, K. und D. Düwel (1960) : Die Behandlung der Fasciolose beim Rind mit Hetol. Dtsch. tierärztl. Wschr. 67, 535-539.
- 7) Fetisov, V. I. (1964) : Trials of hexachloroparaxylole, Hetol and Hetolin in dicrocoeliosis. Veterinariya 41, 47-48.
- 8) Fetisov, V. I. (1964) : Hexachloroparaxylole, an effective anthelmintic for Dicrocoelium infection in sheep. Veterinariya 41, 61-62.
- 9) 古沢明・横川宗雄 (1969) : ^3H -1, 4-bis-trichloromethylbenzol の楡形吸虫体内分布。寄生虫誌,

18, 618-623.

- 10) 稲臣成一・作本台五郎・板野一男・伊藤義博・木原彊・近藤洋一・横山治之・岡本担・水落理・木村道也 (1966) : Hetol による肝吸虫症治療成績。第22回西日本大会記事。寄生虫誌, 15, 559.
- 11) 小山博誉 (1967) : 肝吸虫症の実験的治療。特に 1, 4-bis-trichloromethylbenzol の肝吸虫幼虫に対する効果について。寄生虫誌, 16, 344-368.
- 12) Lämmler, G. (1960) : Chemotherapeutische Untersuchungen mit Hetol, einem neuen hochwirksamen Leberegelmittel. Dtsch. tierärztl. Wschr., 67, 408-413.
- 13) Lämmler, G. und Hohorst W. (1964) : Studien zur experimentellen Chemotherapie der Opisthorchiasis. Proc. 1st. Intern. Congr. of Parasitology, Rom. II 891.
- 14) Liu, J., Wang, C. N., Tseng, F. J., Fan, K. C., Tu, C. C., Chang, T. F., Sun, K. J., Chin, C. M., Cheng, S. and Tu, S. F. (1965) : Hexachloroparaxylole in the treatment of clonorchiasis sinensis. Chinese Med. J. Peking 84, 8-16.
- 15) 織田卓立郎・野守正司・津田頼彦・劉美恵・副島恵治・白橋浄・加藤明道・筒井博雄・田中端久・横林親教・山本輝慶・高尾善則 (1966) : Hetol による肝吸虫症の治療。第19回南日本支部大会記事。寄生虫誌, 15, 576.
- 16) Plotnikov, N. N., Ozeretskorskaya, N. N., Karnaukhov, V. K., Zalnova, N. S., Faibusovich, G. M., Mukhva, G. I. and Altekseeva, M. I. (1964) : Specific therapy of human opisthorchis with hexachloroparaxylole. Med. Parasit. & Parasitic Dis. Moscow 33, 676-681.
- 17) Plotnikov, N. N., Karnaukhov, V. K., Zalnova, N. S., Alekseeva, M. I., Borisov, I. A. and Stromskaya, T. F., (1965) : Treatment of human fascioliasis with Chloxyle (Hexachloroparaxylole) Med. Parasit. & Parasitic Dis. Moscow 34, 725-729.
- 18) 佐野基人・横川宗雄 (1968) : 腸管寄生吸虫類に関する研究。5. 横川吸虫の各種動物における感染実験と治療実験。第37回日本寄生虫学会大会記事。寄生虫誌, 17, 300.
- 19) 佐藤八郎・尾辻義人・浜田己則・国東孝・二宮国秋 (1963) : 肺吸虫症の治療に関する研究。第32回日本寄生虫学会記事。寄生虫誌, 12, 347.
- 20) Ugryumov, P. S. and Uspenskaya, I. N., (1962) : A new anthelmintic against fascioliasis : hexachloroparaxylole. Proc. Conf. All-Union Soc. Helminth., Moscow I 186-187.
- 21) Vodrazka, J. (1963) : Critical tests of Hetol for treatment of fascioliasis in sheep. Proc. 17th World Vet. Congr. Hanover. I. 245-246.
- 22) 吉村裕之・荒木国興・蔡昭雄 (1965) : 肝吸虫の

- 生理. (1) 肝吸虫のラット体内における発育について. 寄生虫誌, 14, 437-444.
- 23) 横川宗雄・小山博誉・吉村裕之・蔡昭雄(1965): 肝吸虫の実験的治療 (1). 1, 4-bis-trichloromethylbenzol (Hetol) の動物肝吸虫症に対する治療効果. 寄生虫誌, 14, 232-242.
- 24) 横川宗雄・辻守康・小山博誉・分島整・小津茂弘・荻野淑郎(1966): 1, 4-bis-trichloromethylbenzol (Hetol) による肝吸虫症の治療. 診療, 19, 1580-1585.
- 25) 横川宗雄・辻守康・荒木国興・野本智行・松本道也・湖山聖道・吉場朗・福地創太郎・平塚任・北村元仕(1966): 肝吸虫症の新しい治療剤. 1, 4-bis-trichloromethylbenzol による臨床治療成績, 肝吸虫症の治療に関する研究. (第2報) 内科, 18, 138-142.
- 26) 横川宗雄・小山博誉・小津茂弘・会田忠次郎・荻野淑郎・津村大八(1967): 肝吸虫の 1, 4-bis-trichloromethylbenzol (Hetol) による集団治療 (II). 寄生虫誌, 15, 552.
- 27) 横川宗雄・小山博誉・荒木国興・小島莊明・小津茂弘・会田忠次郎・荻野淑郎・津村大八(1967): 肝吸虫症の治療, Hetol による肝吸虫症集団治療の遠隔成績 (II). 第36回日本寄生虫学会総会記事. 寄生虫誌, 16, 255.
- 28) 横川宗雄・吉村裕之・小山博誉・古沢明・吉田哲夫(1967): Hetol の毒性試験. 第36回日本寄生虫学会総会記事. 寄生虫誌, 16, 255.
- 29) 横川宗雄・吉村裕之・荒木国興・吉田哲夫・古沢明(1967): 1, 4-bis-trichloromethylbenzol (Hetol) による肺吸虫症の実験的治療. 第36回日本寄生虫学会大会記事. 寄生虫誌, 16, 253.
- 30) 横川宗雄・小山博誉・古沢明(1968): ^3H -1, 4-bis-trichloromethylbenzol のラット体内および寄生肝吸虫体内における分布のマイクロオートラジオグラフィ的研究. 寄生虫誌, 17, 121-127.



Explanation of Microautoradiographs

(Grains show a presence of the compound)

- Photo 1. Vas deferens of the fluke ($\times 400$, 6 hours after administration). Grains surrounded densely but no grains were seen inside of the vas deferens.
- Photo 2. Ovary ($\times 400$, 6 hours). Grains were already found around the ovary.
- Photo 3. Ovary ($\times 600$, 4 days). Grains were densely seen around the ovary.
- Photo 4. Testis ($\times 400$, 6 hours). Grains surrounded the testis densely.
- Photo 5. Testis ($\times 400$, 4 days). Grains accumulated about the testis.
- Photo 6. Testis ($\times 400$, 7 days). Some grains were seen yet, the inside of testis was destroyed.

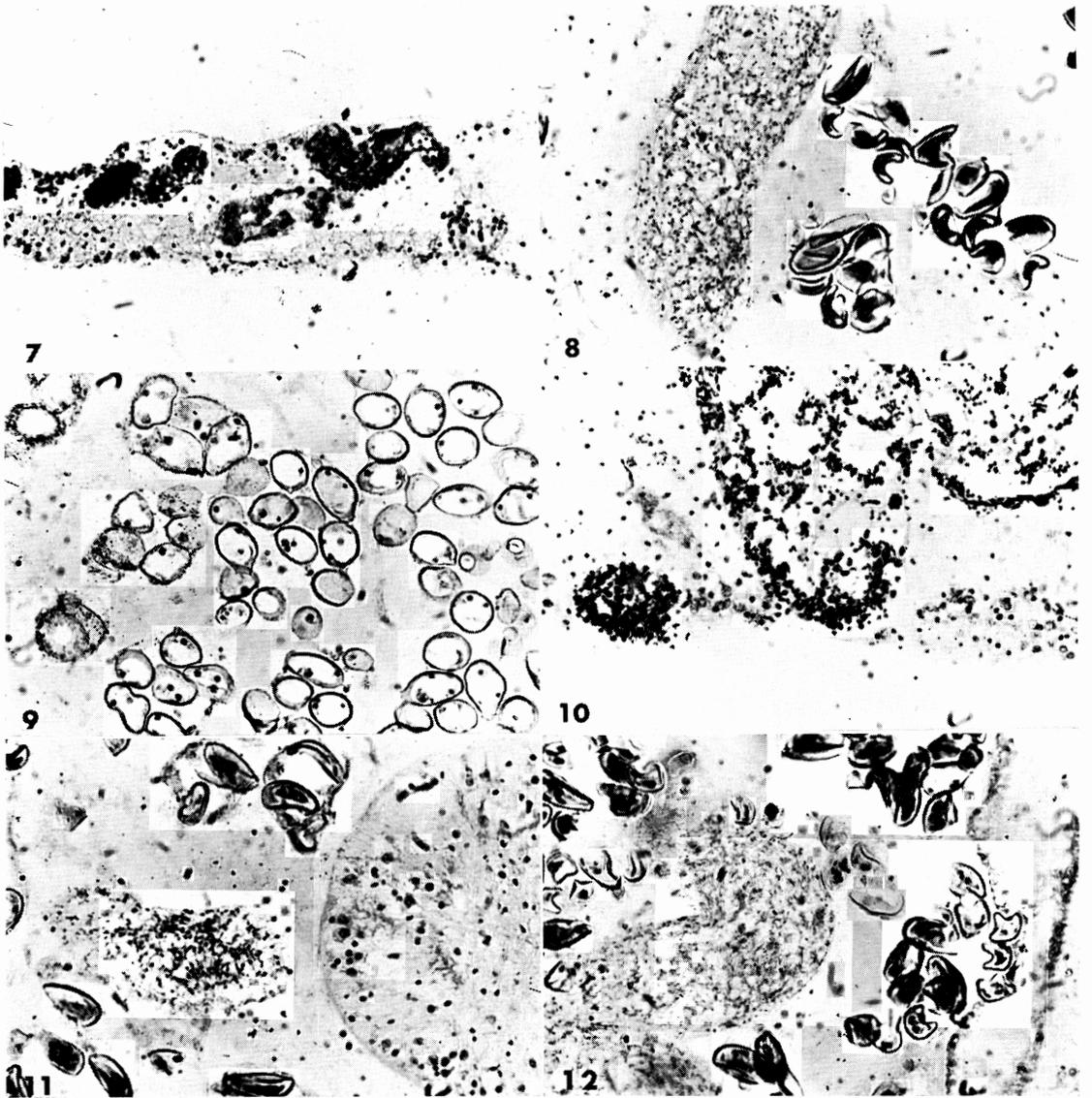


Photo 7. Testis ($\times 400$, 4 days, administrated 1 week after infection given 100 mg/kg). No grains were seen in the picture.

Photo 8. Vas deferens ($\times 400$, 4 days, 2 weeks, 200 mg/kg). Grains were scarcely found.

Photo 9. Uterus ($\times 400$, 4 days, 2 weeks, 100 mg/kg). Some grains were seen but no grains were found in the egg of the fluke.

Photo 10. Testis ($\times 400$, 4 days, 2 weeks, 200 mg/kg). Grains were scarcely found around the testis.

Photo 11. Vas deferens, Uterus and Ventral sucker ($\times 400$, 4 days, 4 weeks) Some grains were found.

Photo 12. Vas deferens ($\times 400$, 4 days, 4 weeks, 200 mg/kg). Grains accumulated about the duct in the same way as mature worms.

Abstract

MICROAUTORADIOGRAPHIC STUDY ON UPTAKE OF ^3H -1,
4-BIS-TRICHLOROMETHYLBENZOL INTO LIVER FLUKE
CLONORCHIS SINENSIS IN RATS

AKIRA FURUSAWA

(Department of Parasitology, School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan)

1,4-bis-trichloromethylbenzol (Hetol) has been reported as the effective compound for *Clonorchis sinensis* by Yokogawa *et al.* (1965, 1966, 1967). Microautoradiographic studies were carried out to make clear the mechanism of the killing effect of the compound against various developmental stages of *Clonorchis sinensis* in rats.

In the first experiment, the compound labeled with tritium (^3H) were orally given to 7 rats at eight weeks after infection with *Clonorchis sinensis*. The rats were autopsied one by one at 3, 6, 12, 24 hours, 2, 4 and 7 days after the administration of the labeled compound, and the distribution of the radioisotope in the worm recovered was pursued periodically by microautoradiography.

In the second experiment, 4 groups of rats consisting of 8 rats each were infected with *Clonorchis sinensis* at 1, 2, 3 and 4 weeks before the administration of the drug, respectively, and the labeled drug was given at 1, 2, 3 and 4 weeks after infection, respectively.

The various doses of the labeled compound such as 100, 200, 400 and 800 mg/kg were given to two rats each of the groups and autopsied 4 days after the administration for microautoradiographic examination.

The results obtained were as follows.

(1) The labeled compound (^3H) was distributed through intestinal wall into parenchyma of the worm and mostly concentrated around the reproductive organs, especially testes and vas deferens at 4 days after the administration, but none of radioisotope was found inside tissue of these organs.

From the above mentioned results, it was considered that effect of the drug against *Clonorchis sinensis* was possibly attributed to the destructive action for the tissues of the reproductive organs of the mature worm.

(2) The radioisotope was scarcely detected in the immature worms of 1 or 2 weeks age which were a large dose of the compound such as 800 mg/kg. This result may well explain why the compound, 1, 4-bis-trichloromethylbenzol was ineffective for the early stage of infection.