

日本住血吸虫症に関する実験的研究

第 III 報 マウスによる抗住血吸虫剤の スクリーニングテスト

松 田 肇 田 中 寛 佐 々 学
(東京大学医科学研究所寄生虫研究部)

(昭和47年7月31日 受領)

まえがき

人体寄生の住血吸虫には、日本住血吸虫 *Schistosoma japonicum*、マンソン住血吸虫 *S. mansoni* およびビルハルツ住血吸虫 *S. haematobium* の3種があるが、これらの住血吸虫症は寄生虫性疾患のうちで最も重大なもの1つである。ところがその治療に関しては、多くの努力がなされているにもかかわらず、動物実験で有効な薬剤も毒性や人体に対する副作用のために広く人の治療に利用できるものは限られていて、いまだ理想的な治療剤は見出されていない。

一方、1918年の tartar emetic の治療面への導入から1962年に至る抗住血吸虫剤開発研究の発展過程を Standen (1963) が綜説し、最近では Pellegrino and Katz (1969) がマンソン住血吸虫での最近の実験治療方法を論じ、実際に人体に応用されている数種の化合物の効力を述べている。これらによると、その治療剤の開発は、そのほとんどが実験室内で生活史の維持が容易なマンソン住血吸虫で行われている (Kikuth and Gönner 1948, Schubert 1948ab, Standen 1953a, 1955, Pellerino *et al.* 1962, Pellegrino and Faria 1965, Monteiro *et al.* 1968, Elslager 1970)。

また実験的に日本住血吸虫を動物に感染せしめての薬剤試験にも、少数の報告がある (Bang and Hairston 1946, Vogel and Minning 1948, 横川等(1969)。しかし実験室内で大量のミヤイリガイ *Oncomelania* を増殖させ、高率に感染した貝を得ることは困難であつたため、本種を用いた薬剤検定はマンソン住血吸虫での検定よりはるかに遅れをみせている。

また住血吸虫の種間の病原性の差異などにより、同一薬剤に対してもそれぞれ治療率に相違があり、日本住血

吸虫が全ての抗住血吸虫剤に対して最も抵抗性が強いことが知られている。それ故、本種を用いた治療剤の開発をする必要性があると考えられる。

本研究は、日本住血吸虫感染での薬剤スクリーニングの第1段階としての簡単な検定方法と、薬剤の効力をより詳細に検討する方法を開発するために行われ、この目的のためにミヤイリガイ *O. nosophora* の実験室内飼育の研究が行われ (松田1969, 松田1971, Tanaka *et al.* 1971)、又貝に対する感染方法 (松田ら1970) も検討された。この結果多数の高率に感染した貝およびマウスが得られ、マンソン住血吸虫と同程度の水準で薬剤検定を行い得るに至つたので、その研究経過のあらましを報告する。

材料及び方法

山梨産ミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* の採集貝並びに室内飼育貝に日本住血吸虫のミラシジウムを実験的に感染させ、主としてマウスを用いて室内維持を行った。

ミヤイリガイへの感染：感染マウスの腸管からトリプシン液で虫卵を分離した (横川, 佐野1966)。すなわち感染7~9週後のマウス腸管を取り、内容物を除去後ハサミで細切したのち腸管と等量のトリプシン液を加え、金属製ホモジナイザー (日本精機 K.K. 製) で4分間回転したのち、37°C の温水中で2時間半振盪した。その後ガーゼ2枚で濾過し、濾液を2,000r.p.m 3分で遠心沈澱し、沈澱の虫卵を0.85%生理的食塩水で5回同様に遠心沈澱した。分離した虫卵は最終的に0.2%食塩水で1回洗滌し、0.2%食塩水の入った Erlenmayer フラスコに入れ、型のごとくミラシジウムを孵化させた。感染方法は0.2%の食塩水が入った直径11cm のシャーレ中にミ

ヤイリガイ200を入れ、充分貝体部が殻から露出した時に1,000隻のミラシジウムを投入し、サランネットと時計皿で蓋をして25°Cの室内で一晩放置した。感染貝はシャーレに濾紙を2枚敷き、週3回水と粉末飼料を与えて25°Cの飼育室内で15週以上飼育した。この感染方法での感染率は通常80%以上であった(松田ら1970)。

マウスへの感染：感染貝を0.2%食塩水1滴を落したスライドガラス2枚で圧平したのち、ピンセットで貝体部を解剖し、セルカリアを毛細管ピペットで小型シャーレへ移した。数個の感染貝から同様にセルカリアを集め、0.2%食塩水で稀釈したのち、セルカリア数として50~60隻を注射器で生後4~5週齢のDDD系雄性マウスの皮下に注入して感染させた。

薬剤：使用した薬剤は、tartar emetic, stibnal, stibophen, thiabendazole, bithionol, Mel W, diethyl-carbamazine, niridazole, 有機燐系殺虫剤として dichlorvos (DDVP), trichlorphon (Dipterex), naled (Dibrom), Diazinon, fenitrothion (Sumithion) Abate, Malathion, fenthion (Baytex) で、その他の薬剤として96検体を使用した。

被検薬剤のうち、水溶性薬剤は滅菌蒸留水で、難溶性薬剤は10% Cremophor ELで懸濁後原則としてLD₅₀の1/4量を1日1回腹腔内に4日間連続投与を行った。有機燐系殺虫剤は難溶性のものは、所定量を純エタノール1mlで溶解後、蒸留水を加え10mlとして経口的に投与した。薬剤投与は感染後7週目から開始した。

虫体の分布：治療後に肝門脈系内の虫体の分布を観察した。肝門脈系は主として肝臓内、門脈及び腸間膜静脈の部位に分けた。マウスを頸椎脱臼で致死させたのち、胸部及び腹部壁を開放し、前腸間膜静脈の基部から肝臓までの門脈内寄生虫体を摘出した。肝臓内に部分的に入っている虫体は門脈に含んだ。肝臓内の虫体は、肝臓を摘出後2枚の厚ガラス板で圧平して実体顕微鏡下で虫体を観察した。又腸管をシャーレに摘出して前腸間膜静脈までの腸間膜静脈内の虫体を同様に観察した。各部からの摘出虫体は、シャーレ内の生理食塩水中に入れ、単性・両性・生・死の状態を観察し、又虫体の分布はStanden (1953b) に従い雌虫によって記録した。

卵期分類：治療後のマウス腸管壁内の卵期分類(Oogram)を観察した。Vogel (1942)が日本住血吸虫卵の各発育段階を始めて観察し、その後Pellegrino *et al.* (1962), Pellegrino & Faria (1965)がマンソン住血吸虫感染マウスで、卵期分類による薬剤スクリーニングテスト並びに治療後の薬剤効果の検討を行っている。本実験

ではこれらの方法により、まず小腸中部を3箇所各1cm摘出し、生理食塩水中で内容物を除去後、濾紙で水分をとり、スライドガラスとカバーガラス(24×32mm)で強く圧平して顕微鏡下で観察した。各切片中の虫卵を100倍の拡大で100個ずつ計300個を数え、その中で未熟、成熟、顆粒化及び石灰化卵の4段階に分類した。

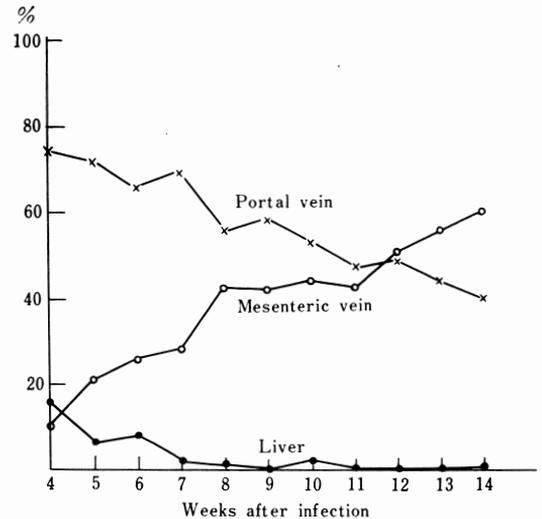
成 績

1. 感染後の雌虫体の分布と卵期分類の変動

マウスへの薬剤の投与及び効果判定時期を決定するために、門脈系静脈中の雌虫体の分布と小腸壁内の卵期分類を経時的に観察した。

雌虫体の分布は、感染後4~14週まで毎週各10匹のマウスを剖検して平均した成績を図1に示した。肝臓、門脈、腸間膜静脈叢中の全雌虫に対する各部位の雌虫の割

Fig. 1 The time course of distribution of female *Schistosoma japonicum* in mice; Average of 10 mice



合から虫体の分布を示した。肝臓内の雌虫は感染後4週目では15.8%であったが、7週では2.0%となり、11週以後は0%であった。門脈内には4週目に73.7%と最も多く、以後しだいに減少し、14週目には40.0%であった。腸間膜静脈内は4週で10.5%と少く、以後増加を続け14週には60.0%であった。この観察期間内では、虫体は肝臓から腸間膜静脈叢へ移行する傾向を示した。

腸管壁内の卵期分類は、感染後5~12週の間、毎週2匹のマウスを剖検し、虫卵の状態を4期に分類して観察した。この4者の割合の経時的变化を図2に示したが、感染後5週目では未熟卵率が100%であったが、毎週減

Fig. 2 Successive change of oogram in intestine after infection. Average in 2 mice per week.

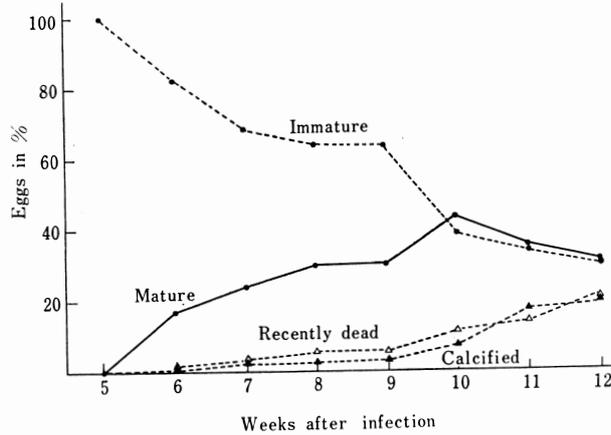
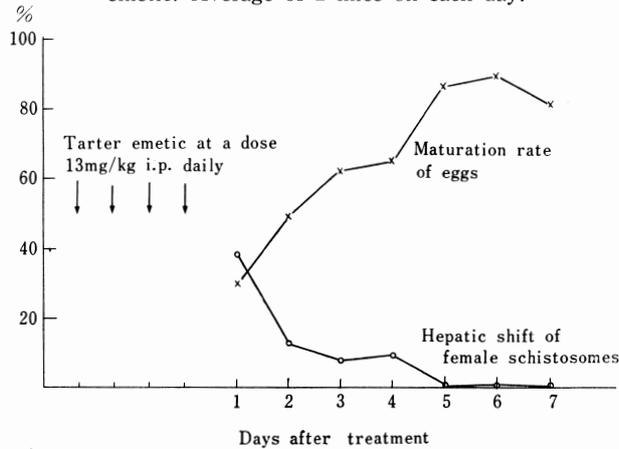


Fig. 3 Change of hepatic shift of females and the maturation rate in oogram of the small intestine after treatment with tartar emetic. Average of 2 mice on each day.



少して12週には29.8%に至った。成熟卵は6週目から出現し、次第に増加して12週では30.3%となった。顆粒化及び石灰化卵は6週目からわずかに出現し、徐々に増加して12週後には前者が20.5%、後者が19.5%に至った。

以上のように、雌虫体の分布並びに卵期分類は、観察期間中常に変化をみせたが、薬剤の効果判定を行う為の最も安定した状態、すなわち感染7週以後10週迄の雌虫が肝臓内から消失し、主として門脈及び腸間膜静脈叢中に分布している時期には、卵期分類においても変化が少なかった。従って薬剤の投与開始時期は感染7週以後に行えば効率良く判定し得ると思われた。

2. 治療後の雌虫体の分布と卵期分類の変動

治療後の雌虫体の分布と卵期分類の変化は、マンソン

住血吸虫感染において薬剤の効果判定の基準として利用されてきた。Standen(1953b)は、門脈系静脈内の雌虫の分布。特に肝臓内への虫体の移行により判定し、Pellegriano *et al.*(1962)は、卵期分類として特に全生存卵中の成熟卵率をその指標として用いている。

この両者の判定方法を日本住血吸虫感染マウスで試みた。感染後7週目から14匹以上のマウスに tartar emetic 13mg/kg を4日間腹腔内投与を行い、治療後1日目から7日間、毎日2匹のマウスを剖検した。図3に示したように投薬終了後第1日目の全雌虫に対する肝臓内へ移行した雌虫の割合(肝移行率)は、38.5%であったが、2日目には12.5%に減少し、5日目以後は0%になり完全に雌虫は元の寄生部位に復帰した。腸管壁内の成熟卵率

Table 1 The change of hepatic shift of females and oogram in small intestine in mice after the termination of the treatment with niridazole at a dose of 150 mg/Kg daily for 4 days

Days after treatment	Mouse no.	Hepatic shift (%)	Oogram in intestine (%)			
			Immat.	Mat.	R. dead	Calcif.
1	1	40	97.0	0	1.1	1.9
	2	100	85.0	1.3	9.4	4.3
2	3	100	76.7	0	22.4	0.9
	4	100	64.4	0	33.6	2.0
3	5	100	31.9	0	60.6	7.5
	6	100	2.1	0	88.5	9.4
4	7	100	13.5	0	50.5	36.0
	8	100	26.6	0	50.6	22.8
5	9	100	0	0	87.0	13.0
	10	100	0	2.4	67.2	30.4
6	11	100	0	0	64.7	35.3
	12	100	0	0	41.8	58.2
7	13	100	1.0	1.4	77.6	20.0
	14	100	0	1.1	79.7	19.2

は、投薬終了1日目では30.0%であつたが、6日目まで徐々に増加して80~90%にも達した。

niridazole での治療は上述の tartar emetic での結果とは明らかに異つた成績を示した。14匹以上のマウスに150mg/kg を4日間腹腔内に投与後、毎日各2匹を剖検した。表1に示したように全雌虫は2日目に肝臓内へ移行し、7日目まで門脈および腸間膜静脈内への復帰は認められなかつた。卵期分類では、成熟卵率の増加は認められず、未熟卵率は1日目に85~97%を示したが、次第に減少し、5日目以後には全く消失して産卵が行われていないことが推測された。これらの変化と一致して、顆粒化卵と石灰化卵率は日毎に増加し、特に顆粒化卵の増加が顕著であつた。この結果から niridazole により肝臓内へ移行した虫体は、もとの寄生部位にはもどれず、産卵および未熟卵の成熟卵への発育の停止を来し、成熟卵を殺滅する作用を有することが判明した。この niridazole の作用は、従来アンチモン剤中最も有効とされてきた tartar emetic とは全く異つた作用を示し、この効力の差は投薬終了後5日目から明らかに認められた。

投薬後第1日目の雌虫の肝移行は、抗住血吸虫剤にとつて必須条件であり、薬剤のスクリーニングにより少しでも有効な薬剤を求めるには治療後早期に観察し、肝移行を調べればよく、また従来有効とされているものと比較するには治療後7日目に肝移行の回復の有無と腸管の卵期分類を比較する方法が良いと思われる。

3. 薬剤のスクリーニング

この方法を用いて、すでに知られている数種の駆虫剤のスクリーニングを試みた(第2表)。感染マウスの腹腔内に LD₅₀ を基準としてその 1/4 量を1日1回4日間投薬し、肝臓、門脈、腸間膜静脈叢中の雌虫の分布を投薬終了1日後に剖検して観察した。雌虫の肝移行は対照と比較して thiabendazole, bithionol, diethylcarbamazine および Mel W の薬剤では有意な差は認められなかつた。また tartar emetic, stibophen, niridazole および stibnal において肝移行が認められ、特に前三者がその大量投与で著明であつた。虫体の死亡率は niridazole で33%と多く、tartar emetic 8%, stibophen 7%とそれぞれ認められた。これらの比較から従来使用されてきた抗住血吸虫剤は、投薬後1日目で雌虫の肝移行が認められ、その他の駆虫剤では全く認められないことから、この方法はスクリーニングの第1段階として有効であつた。

有機燐系殺虫剤のうち8種類と niridazole を表3に示したように、各薬剤の最大耐過量を各群3匹のマウスに4日間経口的に投与し、投薬終了1日後の生存マウス内の雌虫の分布を調べた。肝移行を認めた薬剤は、dichlorvos, trichlorphon, dibrom 及び diazinon で、一方 fenthothion, abate, malathion および fenthion は認められなかつた。後4者の薬剤はマウスの死亡がみられるほどの大量投与にもかかわらず無効であつた。Diazinon は肝移行は認められたがその毒性が強く実際的ではない。前三者の薬剤はこのスクリーニングで有効であ

Table 2 Distribution of females of *S. japonicum* within the hepatic portal system in mice on the next day of termination of the intraperitoneal drug administration for 4 days

Drugs	Daily dose mg/Kg	No. of mice	Dist. of females (%)			Death rate of worms (%)
			Liver	P.vein	M-vein	
tartar emetic	13	10	10	50	40	0
	25	10	100	0	0	8
stibophen	12.5	7	41	51	8	0
	50	5	100	0	0	7
niridazole	150	6	100	0	0	33
Stibnal	10	7	24	55	20	0
thiabendazole	250	10	2	42	56	0
bithionol	83.5	9	0	50	50	0
diethylcarbazine	121.3	5	0	75	25	0
Mel W	67.5	7	2	61	37	0
Control	—	10	1	55	44	0

Table 3 Test of compounds including organophosphorus insecticides and niridazole in mice treated for 4 consecutive days and sacrificed on the next day of the last administration

Compound	Dose mg/Kg/day	Distrib. of females%		
		Liver	P-vein	M-vein
dichlorvos (DDVP)	20	52.6	5.3	42.1
		60.0	4.0	36.0
trichlorphon (dipterex)	100	46.4	14.3	39.3
		4.3	34.8	60.9
dibrom	50	72.2	11.1	16.7
		69.0	10.3	20.7
		46.7	33.3	20.0
diazinon	5	31.8	45.5	22.7
fenthothion (Sumithion)	100	5.0	35.0	60.0
abate	100	0	100	0
malathion	100	0	100	0
fenthion (Baytex)	10	0	25.0	75.0
niridazole	100	100	0	0
		100	0	0
		100	0	0
		100	0	0
		100	0	0
other 96 samples		not effective		

ると認められた。

スクリーニングテストでは、有効でない薬剤の投与により雌虫は肝臓内へ移行を示さないで、肝臓内の雌虫の検査のみで簡単に薬効を判定し得る。また肝臓内に少数でも虫体を認められた際には、門脈系静脈内の分布を

調べることによりさらに詳細に検討出来る。

上述の方法で田辺製薬由来の89検体と、日本化薬由来の薬剤7検体を検定したが、全て無効であった。

4. 有効な薬剤の効力の比較

上述した方法で有効であった薬剤の効力を比較するために、治療7日後に雌虫の肝移行の回復の有無と、腸管壁内卵期分類の両者で検討した。

その成績は表4、5および6に示したように、実際に住血吸虫症の治療に広く用いられている tartar emetic, niridazole および著者らのスクリーニングテストにより見出された dibrom の3者を選び、その各薬剤の最大耐過量から倍数稀釈して4日間連続投与を行い、投与後7日目にマウスを剖検して判定した。

tartar emetic を腹腔内に投与した群は、表4に示したように、20mg/kg の群で雌虫の肝移行は11.1~60.0%と顕著であった。しかし10mg/kg およびそれ以下の投与では肝移行はほとんど認められず、虫体の回復が認められた。卵期分類では、20mg/kg, 10mg/kg 投与で未熟卵が特に少く、産卵の阻害が認められた。成熟卵率もこの群に増加が認められ、特に10mg/kg で顕著であった。死滅卵も大量投与群に多くみられた。

niridazole の投与による雌虫の分布と卵期分類の変化は表5に示すように、虫体および虫卵の両者に直接的な作用が認められた。150mg/kg 投与では、虫体の肝移行率は100%と全く回復が認められず、産卵もほとんど停止した。成熟卵も極めてわずかに存在するのみで、そのほとんどが石灰化卵であった。この種の反応は tartar emetic の20mg/kg 投与でも全く認められなかつた。100mg/kg では肝移行も高率に認められ、産卵の規制と顆粒化及び

Table 4 Distribution of female schistosome and oogram in the intestine in mice 7 days after the termination of treatment with tartar emetic at different doses for 4 consecutive days

Tartar emetic mg/Kg/day	Mouse no.	Dist. of females %			Oogram %			
		Liver	P-vein	M-vein	Immat.	Mat.	R. dead	Calcif.
20 mg	1	60	40	0	24.8	27.7	40.0	6.8
	2	28.6	28.6	42.8	7.3	21.3	52.7	18.7
	3	11.1	66.7	22.2	10.7	43.2	38.8	7.3
	4	22.2	22.2	55.6	23.8	61.9	6.5	7.8
	5	46.1	15.4	38.5	23.8	50.0	6.2	20.0
10 mg	1	0	30.8	69.2	6.3	45.4	28.3	20.0
	2	0	33.3	66.7	11.7	54.5	23.4	10.4
	3	0	13.3	86.7	4.0	77.0	15.0	4.0
	4	11.1	33.3	55.6	19.7	77.0	0.3	3.0
	5	0	25.0	75.0	17.6	75.9	1.0	5.5
5 mg	1	0	33.3	66.7	30.3	22.0	41.4	6.3
	2	0	50.0	50.0	28.7	50.7	20.3	0.3
	3	0	18.8	72.2	22.1	42.5	26.5	8.9
	4	0	44.4	55.6	49.6	38.7	4.7	7.0
	5	0	20.0	80.0	34.3	38.7	11.3	15.7
2.5 mg	1	0	18.2	81.8	58.7	27.3	13.3	0.7
	2	0	41.7	58.3	30.6	56.8	11.3	1.3
	3	0	37.5	62.5	72.3	20.7	4.3	2.7
	4	0	25.0	75.0	47.1	33.8	7.7	11.4
	5	0	57.1	42.9	69.0	16.0	8.0	7.0

石灰化卵の増加が認められた。50mg/kg では虫体の肝移行は全くみられなかったが、産卵の低下と成熟卵および死滅卵の増加がみられた。niridazole の100mg/kg 投与群の肝移行と50mg/kg の卵期分類は、tartar emetic の20mg/kg 群にほぼ相当した反応であった。

dibrom を経口投与した結果を表6に示したが、上記2薬剤より顕著な効力は認められなかった。50mg/kg の投与にもかかわらず肝移行の回復が認められた。50mg/kg および20mg/kg 投与で産卵の抑制と成熟卵および死滅卵の増加が認められた。しかし dibrom に関しては、対照群の値と比較してマウス間の個体差がかなり認められ、投与量による薬剤の効果が明らかではなかった。dibrom の50mg/kg 投与による虫体に対する作用は、tartar emetic の20mg/kg 群よりも劣り、卵期分類については10mg/kg 群に類似した作用が認められた。

以上の成績のように、各薬剤の作用の比較を雌虫の分布と腸管壁内分類の両者で検討することが出来た。

考 察

この研究は、日本住血吸虫感染マウスでの薬剤検定方法を確立するために行われたが、これはミヤイリガイの室内飼育と、これらに高い感染率でミラシジウムを感染させ得たことによる。貝の飼育方法は、成貝を素焼鉢の湿潤した土面上で飼育し、粉末飼料を与えた(松田1969)。この条件下で、山梨産のミヤイリガイは、1カ月間に1雌当り平均45.6個の稚貝を産生した(松田1971, Tanaka 1971)。稚貝は土を底に敷いた水槽中へ移し、水を通気して藁及び濾紙を餌として与えた。この中で殻長0.5mm の稚貝は、2カ月間で5mm 以上の成貝に成長した(松田1969)。

また感染マウスの腸管を消化して得た比較的純粋な虫卵からは、活発な運動性を有するミラシジウムが孵化し、0.2%食塩水中で貝と接触させる方法により(松田等1970)、多数の感染率の高い貝を得た。

マウスを用いた抗住血吸虫剤スクリーニングテスト

Table 5 Distribution of female schistosome and oogram in the intestine in mice 7 days after the termination of treatment with Niridazole at different doses for 4 consecutive days.

Niridazole mg/Kg		Dist. of females %			Oogram in intestine (%)			
		Liver	P-vein	M-vein	Immat.	Mat.	R. dead	Calcif.
150	1	100	0	0	4.2	1.6	15.1	79.0
	2	100	0	0	12.6	1.1	1.3	85.0
	3	100	0	0	4.4	0	0.9	94.7
100	1	100	0	0	6.0	28.3	30.7	35.0
	2	50	25	25	18.1	34.8	25.4	21.7
	3	77.8	11.1	11.1	16.3	26.0	37.7	20.0
	4	87.5	12.5	0	2.7	27.0	37.3	33.0
50	1	0	12.5	87.5	13.0	29.0	32.0	26.0
	2	0	20.7	79.3	24.3	52.4	16.0	7.3
	3	0	33.3	66.7	22.7	47.0	19.0	11.3
	4	0	18.5	81.5	7.7	71.6	9.0	11.7
	5	0	40.0	60.0	12.3	60.0	12.7	15.0
25	1	0	25.7	74.3	21.3	60.0	7.7	11.0
	2	0	44.4	55.6	35.3	53.0	8.0	3.7
	3	0	22.2	77.8	35.3	56.4	3.3	5.0
	4	0	71.4	28.6	70.1	22.1	4.6	3.2
	5	0	40.0	60.0	61.7	28.3	9.6	0.4
Control	1	0	40.0	60.0	67.8	23.3	4.8	4.1
	2	0	60.0	40.0	68.4	26.5	1.3	3.8
	3	0	33.3	66.7	67.7	22.6	4.3	5.4
	4	0	60.0	40.0	64.2	31.1	1.8	2.9
	5	0	66.7	33.3	69.1	21.5	1.7	7.7

は、これまで主としてマンソン住血吸虫を用いて行われてきた。薬剤の効果判定方法も多数報告され、糞便内虫卵数の減少、治療によるマウスの延命効果、門脈系静脈中の虫体の肝臓内移行、虫体感染数の減少或は卵期分類の変化など数多くみられる。これらの判定基準のうち日本住血吸虫に対して簡単で、しかも容易に判定し得る方法として、虫体の分布と卵期分類の両者を選定した。日本住血吸虫感染マウスの門脈系静脈内寄生成虫の分布は、肝臓内では感染7週後に最少に達し、これは Standen (1953a) がマンソン住血吸虫感染マウスで報告した成績と同じ時期であった。感染マウスの死亡率は8週以後から増加するため、7週目から薬剤の投与を開始した。治療後、肝臓内に虫体が認められない場合には、その薬剤は無効と判定し、それ以後の詳細な分布の検査は行わなかった。しかし薬剤の投与開始後5日目に雌虫体の肝移行状態を観察することは、その薬剤の効果判定方

法として有効であった。

Pellegrino *et al.* (1962) は、薬剤スクリーニングの基準として、第1期末熟卵の減少で判定する方法を推奨したが、これはスクリーニングの初期の段階としては、虫体の肝移行で判定するよりもかなり複雑で、しかも日本住血吸虫のように産卵数の多い場合には適当でないと思われる。

虫卵の発育過程の観察は、最初 Vogel (1942) が日本住血吸虫卵で行い、Bang & Hariston (1946) が治療後の虫卵の発育状態の変化を観察した。これらの知見により卵期分類 (Oogram) が発展し、Pellegrino *et al.* (1962), Pellegrino & Faria (1965), Cancado *et al.* (1965) が実際にマンソン住血吸虫での薬剤検定に応用した。

卵期分類の変化、すなわち第1期末熟卵の減少と成熟卵率の増加は、薬剤効果判定の基準として有効であると

Table 6 Distribution of female schistosome and oogram in the intestine in mice 7 days after the termination of treatment with Dibrom at different doses for 4 consecutive days

Dibrom mg/Kg/day	Mouse no.	Dist. of females %			Ooogram (%)			
		Liver	P-vein	M-vein	Immat.	Mat.	R. dead	Calcif.
50 mg	1	0	0	100	13.3	80.4	6.3	0
	2	0	50	50	26.3	56.7	10.0	7
	3	14.3	14.3	71.4	32.3	33.0	31.0	3.7
	4	25.0	25.0	50.0	24.0	46.0	20.0	10.0
	5	0	0	100	75.3	8.0	7.0	9.7
25 mg	1	0	22.2	77.8	29.0	58.0	4.7	8.3
	2	0	87.5	12.5	23.3	17.7	36.7	22.3
	3	0	16.7	83.3	55.0	34.0	8.0	3.0
	4	0	64.7	35.3				
	5	0	33.3	66.7	69.0	21.0	6.7	3.3
12.5 mg	1	0	66.7	33.3	38.0	27.7	20.0	14.3
	2	0	100	0	38.7	50.6	10.0	0.7
	3	0	50	50	64.0	16.0	15.3	4.7
	4	6.7	53.3	40.0	56.0	38.7	2.3	3.0
	5	0	28.6	71.4	64.4	27.3	4.0	4.3
Control	1	0	40.0	60.0	67.8	23.3	4.8	4.1
	2	0	60.0	40.0	68.4	26.5	1.3	3.8
	3	0	33.3	66.7	67.7	22.6	4.3	5.4
	4	0	60.0	40.0	64.2	31.1	1.8	2.9
	5	0	66.7	33.3	69.1	21.5	1.7	7.7

報告され、死滅卵率の増加は今まで未熟卵の減少或は産卵の停止の結果とみなされていた。しかし、Monteiro *et al.* (1968) が niridazole が直接虫卵を殺滅すると報じて以来、死滅卵率が効果判定に有用となつた。従つて本研究では腸管壁内虫卵を、未熟、成熟、顆粒化および石灰化卵の4期に分類して産卵の停止、成熟および死滅率の増加を表わした。

虫体の肝移行と卵期分類の変化は、広く人体の治療に用いられている薬剤と同程度に効力があれば、治療終了7日後までその変化が存続し、この卵期分類の変化はその薬剤の作用機序或は薬効の度合を評価し得るし、薬剤の効果判定基準としてかなり鋭敏な反応であると思われる。以上の結果から、新しい化合物或はすでに薬効の認められている数種の薬剤をこのスクリーニング方式で試み、有機燐系殺虫剤のうち特に dichlorvos, trichlorphon および dibrom にその活性を認めた。前2者の薬剤は Cerf *et al.* (1962), Talaat *et al.* (1966) および Hass (1969) がその有効性を報じているが、dibrom について

は今回の研究で新しくその活性を見出した。

まとめ

日本住血吸虫感染マウスでの抗住血吸虫剤スクリーニングテストの効果判定方法の基準化を試みた。この目的で実験室内で飼育繁殖したミヤイリガイに日本住血吸虫を感染させ、80%以上の高率に感染した貝を多数得ることが可能になつた。感染マウスの門脈系静脈中の雌虫体の分布と腸管壁内卵期分類の経時的変化の観察により、肝臓内から虫体の移動した時期および卵期分類の型が比較的安定した時期の感染後7週目から投薬を開始した。薬剤は原則として $1/4$ LD₅₀ を1日1回4日腹腔内投与で行つた。治療終了1日後の雌虫体の肝移行率で薬剤の効力を判定する方法は、簡単でしかも感受性が高く、スクリーニングの第1段階として有効であつた。この方法で8種類の駆虫剤のうち、tartar emetic, stibophen および niridazole が抗住血吸虫作用を示した。また有機燐系殺虫剤8検体およびその他の化合物96検体のう

ち、dichlorvos, trichlorphon, dibrom および diazinon にその活性を認めた。抗住血吸虫作用の程度或は有効な薬剤の作用機構の解析は、薬剤投与終了7日後に雌虫体の肝移行の回復の有無と腸管壁内卵期分類の変化でさらに詳細に検討出来た。3種類の有効であつた薬剤の効力を比較したところ、niridazole が最も強い作用を示し、tartar emetic および dibrom がこれに続いた。niridazole は虫体および虫卵に直接的な殺滅作用を示し、dibrom の効力は tartar emetic より劣つた。

稿を終わるに臨み、諸種の御教示を戴いた当研究部の小林準三博士および御協力を得た寄生虫部の各位に感謝します。また薬剤の提供を受けた千葉大医学部寄生虫学教室、予研寄生虫部、米国ファイザー社、田辺製薬K.K. 万有製薬K.K. および日本特殊農薬製造K.K. に謝意を表します。

文 献

- 1) Bang, F. B. and Hairston, N. G. (1946) : Studies on schistosomiasis IV. Chemotherapy of experimental schistosomiasis japonica. Am. J. Hyg., 44, 348-366.
- 2) Cancado, J. R., Cunha, A. S., Carvalho, D. G. and Cambraia, J. N. S. (1965) : Evaluation of the treatment of human *Schistosoma mansoni* infection by the quantitative oogram technique. Bull. WHO., 33, 557-566.
- 3) Cerf, J., Lebrun, A. and Dierichx, J. (1962) : A new approach to helminthiasis control : The use of an organophosphorous compound. Am. J. Trop. Med. Hyg., 11, 514-517.
- 4) Elslager, E. F. (1970) : Schistosomiasis chemotherapy-Progress at a snail's pace. Twelfth National Medical Chemistry Symposium of the American Chemical Society, Washington.
- 5) Hass, D. K. (1969) : Organophosphorus compounds and parasite chemotherapy. Working paper presented to the meeting of the US-Japan Cooperative Medical Science Program.
- 6) 松田肇 (1969) : 日本住血吸虫症に関する実験的研究, 第I報, ミヤイリガイの実験室における飼育繁殖方法について, 寄生虫誌, 18, 523-529.
- 7) 松田肇・橋口淳一・佐々学 (1970) : 日本住血吸虫の感染に対するミヤイリイの感受性とセルカリア形成, 寄生虫誌, 19, 359.
- 8) 松田肇 (1971) : 日本住血吸虫症に関する実験的研究, 第II報, 中間宿主ミヤイリガイの稚貝産生条件とその諸種の累代飼育成績, 寄生虫誌, 20, 481-489.
- 9) Monteiro, W., Pellegrino, J. and Henriques da Silva, M. L. (1968) : Unusual oogram pattern in mice after niridazole treatment. J. Parasit., 54, 175.
- 10) Kikuth, W. and Gönner, R. (1948) : Experimental studies on the therapy of schistosomiasis. Ann. Trop. Med. Parasit., 42, 256-267.
- 11) Pellegrino, J. and Faria, J. (1965) : The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. Am. J. Trop. Med. Hyg., 14, 363-369.
- 12) Pellegrino, J. and Katz, N. (1969) : Laboratory evaluation of antischistosomal agents. Ann. N. Y. Acad. Sci., 160, 429-460.
- 13) Pellegrino, J., Oliveira, G. A., Farita, J. and Cunha, A. S. (1962) : New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 11, 201-215.
- 14) Schubert, M. (1948a) : Conditions for drug testing in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Am. J. Trop. Med., 28, 121-136.
- 15) Schubert, M. (1948b) : Screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Am. J. Trop. Med., 28, 137-156.
- 16) Standen, O. D. (1953a) : Experimental schistosomiasis. III. Chemotherapy and mode of drug action. Ann. Trop. Med. Parasit., 47, 26-43.
- 17) Standen, O. D. (1953b) : The relationship of sex in *Schistosoma mansoni* to migration within the hepatic portal system of experimentally infected mice. Ann. Trop. Med. Parasit., 47, 139-145.
- 18) Standen, O. D. (1955) : The treatment of experimental schistosomiasis in mice: sexual maturity and drug response. Ann. Trop. Med. Parasit., 49, 183-192.
- 19) Standen, O. D. (1963) : Chemotherapy of helminthic infections. In experimental chemotherapy. R. J. Schnitzer & F. Hawking, Eds. I: 741-756, Academic Press Inc. New York, N. Y.
- 20) Talaat, S. M., Amin, N. and El-Masry, B. (1966) : A comparative study of Dipterex and tartar emetic in the treatment of urinary schistosomiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 60, 579-584.
- 21) Tanaka, H., Matsuda, H., Nihei, N. and Sasa, M. (1971) : Basic studies for screening tests of drugs against *Schistosoma japonicum*. J. Trop. Med., 11, 37.
- 22) Vogel, H. (1942) : Über Entwicklung, Lebensdauer und Tod der Eier von *Bilharzia ja-*

- ponica* im Wirtsgewe. Deutsche Tropenmedizinische Zeitschrift., 46, 57-69.
- 23) Vogel, H. and Minning, W. (1948) : The action of Miracil in *Schistosoma japonicum* infection in laboratory animals. Ann. Trop. Med. Parasit., 42, 268-270.
- 24) 横川宗雄・佐野基人(1966) : 日本住血吸虫症の免疫血清学的診断法に関する研究(2) Circumval Precipitation Test (COPT) に使用する感染マウス臓器内虫卵の分離集卵法について, 寄生虫誌, 15, 394-398.
- 25) 横川宗雄・佐野基人・小島荘明(1969) : Hycan-thone による日本住血吸虫症の実験的治療について, 寄生虫誌, 18, 416.

Abstract

EXPERIMENTAL STUDIES ON SCHISTOSOMIASIS JAPONICA III. THE SCREENING TEST OF DRUGS AGAINST *SCHISTOSOMA JAPONICUM* IN MOUSE

HAJIME MATSUDA, HIROSHI TANAKA and MANABU SASA
(Department of Parasitology, the Institute of Medical Science,
the University of Tokyo)

A series of investigations have been carried out in our laboratory since 1968 for standardizing efficient methods of screening the drugs effective in the treatment of mice experimentally infected with *Schistosoma japonicum*. As reported in the previous papers of the authors, successful methods were developed for the mass-breeding of the snail intermediate host, *Oncomelania nosophora*, and for the mass-production of the infected snails in the laboratory. Colonies of the snails with infection rates of over 80% have been produced regularly for this purpose. Studies have been made also on the pattern of distribution of the adult worms in the portal system and on the changes in the oogram patterns in connection with the course of infection. As the results, it has been shown that the drug administration can be initiated during the seventh week after which these patterns become stabilized.

Over one hundred compounds have been tested already for the efficacy against the adult worms and the eggs. As the rule, the compounds were administered intraperitoneally at doses from one fourth of LD₅₀ to the largest tolerable dose, daily for 4 consecutive days. In evaluating the efficacy, the following methods were employed; (1) the hepatic shift of the worms at examinations by autopsy on the day of completion of the drug administration; (2) the changes in oogram of the intestinal wall at examinations made one week after completion of the treatments; (3) the death of adult worms. The first method was found to be most sensitive.

Of 8 known anthelmintics tested, anti-schistosomal activity was shown in tartar emetic, stibophen, stibnal and niridazole, but not in thiabendazole, bithionol, diethylcarbamazine and Mel W. Among them, the most effective was niridazole, which killed most adults and eggs at sufficient doses. Eight organophosphorus insecticides were tested also with the above methods, of which some effects were seen in dichlorvos, trichlorphon, dibrom and diazinon, but not in fenitrothion, fenthion, abate and malathion. No efficacy was demonstrated in the rest 96 compounds so far tested.