

特別掲載

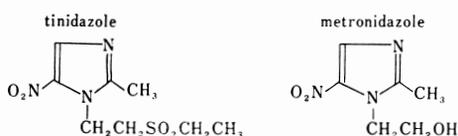
培養およびラット腔感染腔トリコモナスに対する tinidazole の作用について

浅見 敬三 三浦左千夫 竹内 勤
真宅 篤

(慶応義塾大学医学部寄生虫学教室)

(昭和47年10月31日 受領)

Metronidazole の出現 (Cosar *et al.* 1959) は、それまで再発を反覆し難治の疾患とされていた腔トリコモナス症の治療に大きな変革を与えたものと言える。副作用の少ない経口剤で、しかも著しく強い抗トリコモナス力というこの薬剤の特質が、180種類にも及んだ過去の抗トリコモナス剤 (Trussell 1947) とは比較にならぬほど優れたものであることはよく知られているが、その後アムバ赤痢 (Powell *et al.* 1966), ランブル鞭毛虫症 (Scheider *et al.* 1961) メジナ虫症 (Antoni *et al.* 1970) などの寄生虫病にも有効であることが判明するにいたって本剤の広域性が注目をひき、metronidazole と同じく nitroimidazole 系統のより一層強力な作用をもつ薬剤の開発が進められてきたが、今般 tinidazole が発表された。両者の構造を示すと次の如くである。



本論文はこの tinidazole の抗腔トリコモナス力を *in vitro* および *in vivo* で検討した実験の成績である。

材料ならびに方法

薬剤: tinidazole は Pfizer 社により合成された nitroimidazole 誘導体で化学名は Ethyl [2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl) ethyl] sulfon である。nitroimidazole に sulfon 基を結合させた点に特長があり、また脂肪親和性が高いことは同系統の薬剤中特異な点といえる。

本剤は比較的水に難溶性であるので、使用時には粉末を先ず一定量の DMSO (Dimethyl sulfoxide) に溶解

させ、ついでこれを蒸留水で希釈して所要の最終濃度液となるように調整して培地への添加あるいはラットへの経口投与を行なった。

トリコモナス株: 人腔から分離し、年余にわたりチステインブイオン血清培地 (浅見1952) で継代培養した陳旧株3株、人腔より分離の後継代20代以内の新鮮株16株、イタリアで分離されメトロニダゾールに対して特に感受性が高いとされている株1株の計20株を使用した。陳旧株と新鮮株の区別を行つた理由は、metronidazole に対して陳旧株は感受性が増強するという報告 (De Carneri 1966, Honigberg 1966) が見られるからである。

これらの株は全てペニシリンとストレプトマイシンを含む上記の培地で完全に無菌的に培養されており、屢々チオグリコロート培地を用いて無菌性の確認が行われている。

実験に使用する際には、培養約36時間後の最高虫体数を示す培地から採つた虫体を滅菌生理食塩水にて3回遠沈洗滌し、得られた虫体懸濁液中の虫体数を血球算定板で算定し、一定数の虫体を用いた。

in vitro 実験: 培養腔トリコモナスに対する本剤の最小増殖阻止濃度 (MIC) および最小殺虫濃度 (MCC) を求めた。

MIC を求める実験

下記の如くチステインブイオン血清培地 (浅見1952) に一定濃度の薬剤と虫体懸濁液とを加えて培養した。

基礎培地	4.0ml
人血清	0.4ml
薬剤溶液	0.5ml
虫体懸濁液	0.1ml

虫体接種後37°C のフラン器に収め、攪拌した培地液について24時間毎に虫体数を算定した。尚、培地攪拌に

よる酸素分散が虫体の増殖に及ぼす悪影響を考慮して同一培養を反覆して虫体数の算定に用いることは避けた。

予め行った実験により MIC は $1.0\mu\text{g/ml}$ 以下にあることが判明したので、最終濃度 $0.13\sim 1.0\mu\text{g/ml}$ について本実験を行った。

対照培養としては、薬剤を含まないが DMSO を実験群中の最高濃度と同一濃度に加えたものを採り、24時間毎の虫体数を算定して実験培養でのそれと比較した。

MIC の判定は、24時間毎の虫体数算定により接種時虫体数の2倍以上を示した場合を増殖とし、増殖の見られた最大濃度と、増殖の見られなかつた最小濃度との濃度区間に MIC があるとした。

MCC を求める実験

MIC 実験と同様な培地に薬剤を $4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25\mu\text{g/ml}$ に加え、一定数の虫体を接種して 37°C のフラン器に収めた。培養後 3, 6, 12, 24, 48時間に培地底部よりピペットにて培養液 0.1ml を採り、薬剤を含まぬ培地に接種して72時間培養し、虫体増殖の有無を顕微鏡で観察した。

対照培養として薬剤を含まぬ培養を採つたが、この場合は他培地に移植するまでも無く虫体の増殖が確認された。また対照培養での虫体の増殖は48時間以後には停止して虫体は死滅に向うので、実験群での薬剤接触時間も48時間以内とした。

MIC の決定は、薬剤濃度と接触時間との二つの因子の組合せによつて行われた。

in vivo 実験：ラットの膣における実験膣トリコモナス感染に対して本薬剤を経口投与して治療実験を行った。このラットの実験膣トリコモナス感染の安定性や人の膣トリコモナス症との病理組織学的な類似性についてはすでに星合 (1961) によつて報じられており、また抗膣トリコモナス剤の治療実験に適していることは metronidazole での実験 (Asami 1963) によつて確められている。

性成熟雌ラットに対して Cavier and Mossion の原法の改良法 (中村1972) に従つて去勢、エストラジオール投与、培養膣トリコモナスの接種を行つて感染ラットを作つた。膣内容の鏡検により感染の安定が確認されたラットに対して所定濃度の薬剤溶液を経胃的に毎日1回連続5日間投与した。

最終投与日の4日後から連続3日膣内容を白金耳にて採り、チステインブイオン血清培地に接種して虫体増殖の有無を72時間後まで観察して治療の判定を行った。

また一部の実験では薬剤投与後隔日に少量の膣内容を採取し、培養を行つて虫体消失の状況を観察した。

対照薬剤：

in vitro および *in vivo* の実験を通じ、metronidazole (Flagyl) を実験群と全く同様の方法で使用し、tinidazole との効果の比較を行なつた。

実験成績

in vitro での MIC：

用いられた膣トリコモナスの20株全ては、tinidazole と metronidazole の両薬剤の $0.13\sim 1.0\mu\text{g/ml}$ 濃度で増殖を阻止された。それぞれの薬剤のこれらの株に対する MIC の分布を表1に示した。感受性の最高最低株間では MIC において tinidazole で4倍、metronidazole で3倍の差はあつたが、大部分の株は両薬剤の $0.25\sim 0.75\mu\text{g/ml}$ で増殖が阻止された。この結果から、MIC については 両薬剤間に差の無いことが判明した。

表1 培養膣トリコモナス株20株に対する tinidazole および metronidazole の MIC の分布

薬剤濃度 (mcg/ml)	tinidazole			metronidazole		
	陳旧株	新鮮株	イタリア株	陳旧株	新鮮株	イタリア株
1.0—0.75		2				
0.75—0.5	2	8		1	9	
0.5—0.25	1	6		2	7	
0.25—0.13			1			1
0.13—						

表中の数字は増殖阻止の認められた培養株の数を示す。

また陳旧株と新鮮株とにおいて特に薬剤感受性が異ると判断される結果は得られなかつた。metronidazole に対し感受性が高いとされているイタリア株は、tinidazole に対しても、もつとも高い感受性を示しはしたが普通の株のそれとの差は著明なものでは無かつた。この株は培養による増殖速度が遅いために48時間以内での虫体数算定では往々増殖が阻止されているような結果となるので、72時間までの虫体数算定によつてえられた結果を表に示した。

in vitro での MCC：

MCC を求める実験は二通りに行なわれた。先ず9株の膣トリコモナスを用いて、両薬剤の $0.25, 1.0, 4.0\mu\text{g/ml}$ 濃度に3, 6, 12, 24, 48時間接触せしめたのち虫体の生死を判定した。その結果は表2に示した如くであ

表 2 培養腫トリコモナス株 9 株での tinidazole と metronidazole の最小殺虫濃度 (MCC) — 実験 1

接触時間	tinidazole (mcg/ml)			metronidazole (mcg/ml)		
	0.25	1.0	4.0	0.25	1.0	4.0
3 時間	0	0	5	0	0	5
6 時間	0	0	9	0	0	9
12 時間	0	0	9	0	3	9
24 時間	0	7	9	0	7	9
48 時間	0	9	9	0	7	9

表中の数字は死滅した株数を示す。

る。両薬剤とも 0.25 μ g/ml では 48 時間接触後もトリコモナスの何れの株にも殺虫的には作用せず、また試みた濃度の上限である 4.0 μ g/ml では 6 時間の接触で全株が死滅した。1.0 μ g/ml では、metronidazole の場合 9 株中 3 株が 12 時間接触で、7 株が 24 時間接触で殺滅されたが 48 時間接触によってもなお 2 株は生存を続けた。一方 tinidazole 1.0 μ g/ml の場合 12 時間接触では殺滅された株はなかったが、24 時間では 7 株、48 時間では 9 株の全てが殺滅された。この結果は、殺虫的に作用する薬剤濃度の下限付近においては、metronidazole の方が tinidazole よりも速効的ではあるが接触時間の延長と殺虫力の増加とは一致せず、他方 tinidazole では遅効的ではあつても接触時間に伴って殺虫効果が増加して完全に殺虫的に作用することを示している。

また、上の実験とは異なる 10 株を用いて tinidazole の 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 μ g/ml と接触せしめた実験においても、1.0 および 2.0 μ g/ml 48 時間の接触によつてほぼ完全に殺虫的な効果が期待しうることが示された (表 3)。

表 3 tinidazole の腫トリコモナスに対する最小殺虫濃度 (MCC) — 実験 2

接触時間	薬剤濃度 (mcg/ml)			
	0.25	0.5	1.0	2.0
3 時間	0	0	0	0
6 時間	0	0	0	0
12 時間	0	0	2	5
24 時間	0	0	5	9
48 時間	0	3	9	10

表中の数字は用いた 10 株の培養株中の死滅株数を示す。

in vivo での実験的治療効果:

tinidazole および metronidazole を腫トリコモナス感

染ラットに 1 日量 5, 10, 15, 20, 30 mg/kg 連続 5 日間投与して、腫からの虫体の消失を観察した。併しながら 5 mg/kg 投与では殆んど治療は認められず、また 20 mg/kg 以上の投与によつても著しい治療効果の上昇は見られなかつたので、実験は 10 mg/kg および 15 mg/kg に集中して行われた。その結果を示したのが表 4 である。

表 4 ラットの実験腫トリコモナス症に対する tinidazole と metronidazole の治療効果

用量 (mg/kg/day)	tinidazole		metronidazole	
	実験ラット数	治癒ラット数 (%)	実験ラット数	治癒ラット数 (%)
10	39	22(56.4)	42	22(52.4)
15	40	34(85.0)	37	27(72.9)

両薬剤とも上記の量を連続 5 日間経口投与

10 mg/kg 宛 5 日投与の場合、tinidazole では 39 匹のラットの 22 匹 (56.4%)、metronidazole では 47 匹中 22 匹 (52.4%) に虫体の消失が認められ、前者にやや高い治療効果を思惟させたが、両者に差は見られなかつた。15 mg/kg 宛 5 日投与の場合、tinidazole で 40 匹中 34 匹 (85.0%)、metronidazole で 37 匹中 27 匹 (72.9%) に虫体の消失が認められ、前者においてより高い効果が示された。

1 日量 15 mg/kg の tinidazole をラットに 3, 5, 7 日間それぞれ連続投与して治療効果の比較を行つた成績では、3 日投与群で $\frac{5}{8}$ 、5 日投与で $\frac{9}{10}$ 、7 日投与群で $\frac{22}{25}$ に治癒が認められ、3 日投与では充分な効果が無いが、5 日あるいは 7 日では共に 80% を超す高い効果をあげることが判明した。

tinidazole と metronidazole をラットに投与したのち虫体の消失する状況を追跡した実験の結果が表 5 であ

表 5 tinidazole および metronidazole 15 mg/kg 5 日投与によるラット腫からの虫体消失状況

薬 剤	実験ラット数	投薬開始後の日数							
		1	3	5	7	9	11	13	15
tinidazole	10	7	7	3	2	1	1	1	1
metronidazole	10	7	4	2	3	3	3	3	3

表中の数字は虫体陽性のラット数を示す。

る。両薬剤の 1 日量 15 mg/kg を連続 5 日間それぞれ 10 匹宛のラットに投与し、投薬翌日から隔日に腫内容の培養によつて虫体の有無を観察した。投薬後虫体の消失し

たラットの出現は metronidazole の方が速やかで、3日目にすでに半数以上のラットで虫体は証明されなくなったにも拘らずその後の虫体消失は左程著明ではなく、投薬終了後に虫体の再出現した1匹を含め2週後の判定では3匹のラットに虫体が残存した。一方 tinidazole の場合3日目では7匹のラットで虫体が証明されたにも拘らず日数の経過とともに治癒ラットが増え、投薬終了後の7日目、9日目にもなお虫体の消失するラットが見られ、最終的には唯1匹のラットで虫体が証明されたにすぎない。この結果は tinidazole の殺虫作用が metronidazole のそれに比べてより速効性、持続性であり、殺虫効果としてはより高いことを示していると解釈されよう。

なお、試みた用量の範囲では、ラットに両薬剤の副作用によると思われる病的所見は認められなかった。

考 察

ニトロ基と結合した芳香族化合物には抗病原体性を持つものが多くある (Miller *et al.* 1969)。metronidazole に酷似した構造の鶏コクシジウム症あるいはヒストモナス症治療予防剤はすでに市販されており、衆知の如く metronidazole はトリコモナス類、ランブル鞭毛虫、赤痢アメーバに強力に作用する。また同系統のクロラムフェニコールやニトロフランは抗菌性が強く、住血吸虫症治療剤のニリダゾールはアメーバ赤痢にも有効である。このように、この系統の薬剤は抗原虫性のみならず抗菌、抗蠕虫性とその作用の広域性が注目される。

tinidazole の抗病原体性に関する発表は、いまだ僅に2編にすぎないが (Howes *et al.* 1969, Miller *et al.* 1969)、それらによると *Trichomonas foetus*, *T. vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Eimeria tenella*, *Histomonas meleagridis* には *in vitro* あるいは *in vivo* で強く作用するが *Trypanosoma* および *Plasmodium* には作用せず、また抗菌性も乏しいようである。つまり本剤は消化器や腔の寄生原虫類に対して広域的に作用するものということが出来よう。以上のような作用範囲の点でも本剤は metronidazole と類似しているとしてよい。

metronidazole と tinidazole の抗原虫力の比較について Howes *et al.* (1969) は、*T. foetus* と *T. vaginalis* に対する *in vitro* の MCC では後者は前者の4倍も強いが、MIC では略々同じレベルであるとして、またマウス腹腔への *T. foetus* 感染を用いての *in vivo* の最小有効濃度では、metronidazole の100mg/kg に比べ

tinidazole は12.5mg/kg で著しい差があるとしている。Howes (1969) らの研究は、用いた虫体株、培地、MIC、MCC 判定基準などで著者らの方法と異っており、特に *in vivo* のそれでは実験系が全く相違している為に、彼等の成績を我々のそれと単純に比較することに問題はあがあるが、MIC に於て両薬剤に差が無く、MCC では tinidazole の方が優つているという結論は我々の得た成績と一致する。彼らの *T. vaginalis* に対する MIC を、我々の実験で用いたと同じく24~48時間培養の結果を採ると、metronidazole で2.5 μ g/ml、tinidazole で1.25 μ g/ml となり、我々の実験株中のもつとも感受性の低いものよりも更に高い数値となつている。この相違の主因は判定方法にあらう。我々の成績では用いた20株の MIC は、感受性に差はあつても何れも0.13~1.0 μ g/ml の範囲にあり、両薬剤間に違いは見られない。又、metronidazole に対するこの感受性は、著者の1人 (Asami 1963) が約10年前に本実験と殆んど同一の方法で測定した感受性と同じであることから、用いられた MIC 検定の方法の再現性がうかがわれる。一方 MCC については、*T. vaginalis* に対する両薬剤の作用メカニズムの相違を思わせる成績が得られている。metronidazole は tinidazole に比べて速効的ではあるが作用に限界があり、他方 tinidazole ではやや速効的ではあつても時間の経過とともに効果の増強が生じ、結果としては metronidazole よりも強力に殺虫的である。この *in vivo* での MCC に見られた両薬剤の作用の相違は、*in vivo* の実験治療にも現われるようである。1日量15mg/kg 5日の投与で tinidazole 群に metronidazole 群よりもより高い治療効果が見られたが、薬剤投与後の虫体の消失状況を分析すると、metronidazole 群においてより速かに治癒ラットが出現するが、時間の経過に伴つた治療効果の増強は乏しく、tinidazole はこれと反対に遅く効果が発現するが、投薬終了後にまでも虫体の消失が継続して最終的にはより高い治癒率が得られるという特徴を有している。

ラットの腔に成立した実験的腔トリコモナス症がヒトの腔トリコモナス症と病態的に類似していることは先に述べたが、治療薬に対する態度においても両者はほぼ似ている。メトロニダゾールを用いた実験で、ヒトに用いられる10mg/kg の2倍量の20mg/kg でラットの腔トリコモナス症に満足すべき治療成績をあげることが知られているが (Asami 1963)、今回の実験において、より少量の15mg/kg 投与で tinidazole は metronidazole よりも高い治療効果をあげることが出来た。metronidazole

によるトリコモナス膣炎治療成績に関する報告は枚挙していとまがないが、それらを通覧すると90%以上の治癒率であり、この数字は感染症治療剤の効果としてはおそらく期待しうる最高のもと考えてよいであろう。今回の実験から、tinidazole は metronidazole よりも、*in vitro*, *in vivo* でより強力な殺虫作用を持つことが判明したが、この事実は、本剤をヒトに応用した場合、より少ない用量で metronidazole と同様な著しく高い治療効果をあげうることを期待させるものと言えよう。

結 論

nitroimidazole の誘導体 tinidazole の膣トリコモナスに対する作用を *in vitro* と *in vivo* で検討し、metronidazole のそれと比較した。

in vitro の MIC は0.13~1.0 μ g/ml の範囲にあり、両薬剤の間に差は認められなかった。*in vitro* の MCC は1.0 μ g/ml 48時間の薬剤接触では tinidazole の方が metronidazole よりも強力であった。両者の作用の比較に於て tinidazole は遅効性であるが、より持続的に作用した。

ラットの膣における実験膣トリコモナス症に対し、両薬剤を15mg/kg 5日間連続経口投与した結果、tinidazole で85.0%、metronidazole で72.9%の治癒率が得られた。両薬剤の *in vivo* における殺虫作用も、*in vitro* におけると同様の相違を示し、tinidazole では投薬期間経過後にも虫体の消失が見られた。

文 献

- 1) Antoni, J., H. V. Srinivas., K. R. Krishnarthy and B. R. Jahagirdar (1970) : Metronidazole in dracunculiasis; A preliminary report Am. J. Trop. Med. Hyg., 19, 821-822.
- 2) 浅見敬三 (1952) : 膣トリコモナスの細菌を伴わない培養, 臨床婦産科 6, 36-37.
- 3) Asami, K. (1963) : Effects of metronidazole on *Trichomonas vaginalis* in culture and in an experimental host. Am. J. Trop. Med. Hyg., 12, 535-538.
- 4) Cosar, C., Julou, S. and Bonazet, M. (1959) : Activité de l' (hydroxy-2 éthyl)-1-méthyl-2-nitro-5 imidazole vis-a-vis des infections expérimentales a *T. vaginalis* Ann. Inst. Pasteur, 96, 238-241.
- 5) De Carneri, I. (1966) : Variation of the sensitivity of a strain of *T. vaginalis* to metronidazole after culturing in the presence or absence of the drug. Proc. 1st Intern. Cong. Parasit., 1. 366.
- 6) Honigberg, B. M. and Livingstone, M. C. (1966) : In vitro sensitivity of *T. vaginalis* to metronidazole. Proc. 1st Intern. Cong. Parasitology 1. 365.
- 7) Howers, H. L., Lynch, J. E. and Kivlin, J. L. (1969) : Tinidazole, a new antiprotozoal agent: Effect on *Trichomonas* and other protozoa Antimicrobiol agents and Chemotherapy, 261-266.
- 8) 星合孟 (1961) : ラットの膣における実験的膣トリコモナス症の研究, 慶応医学, 38, 435-442.
- 9) Miller, M. W., Howes, H. L. and English, A. R. (1969) : Tinidazole, a potent new antiprotozoal agent Antimicrob. Chemoth., 257-260.
- 10) 中村宣夫 (1971) : ラットの実験的膣トリコモナス症に関する研究, 特に感染成立の要因の検討 寄生虫誌, 20, 439-455.
- 11) Powell, S. J., MacLeod, I., Wilmost, A. J. and Elsdon-Dew, R. (1966) : Metronidazole in amebic dysentery and amebic liver abscess Lancet, Dec. 17, 1329-1331.
- 12) Scheider, J. (1961) : Traitement de la giardiase (lamblia) par le métronidazole Bull. Soc. Path. Exot., 54, 84-95.
- 13) Trussell, R. E. (1947) : *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis C C Thomas, Springfield, U. S. A.

Abstract

EFFECTS OF TINIDAZOLE, A NEW TRICHOMONACIDE, ON *TRICHOMONAS*
VAGINALIS IN VITRO AND IN THE VAGINA OF
EXPERIMENTALLY INFECTED RAT

KEIZO ASAMI, SACHIO MIURA, TSUTOMU TAKEUCHI
and ATSUSHI SHINTAKU

(Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo)

Studies on antitrichomonal activities of tinidazole, ethyl [2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl) ethyl] sulfone, were conducted with the cultured *T. vaginalis* and the organism infected in the vagina of rat. The results obtained were compared with those of metronidazole examined simultaneously under the same experimental conditions.

Four strains of *T. vaginalis* which have been cultivated serially more than 100 subcultures, and sixteen strains of the organism which were newly isolated from patients and maintained in culture less than 20 transfers, were used throughout the experiments *in vitro*. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the drug against 20 strains of the trichomonad ranged from 0.13 to 1.0 mcg per ml, and most of the strains, 17 out of 20 strains, were inhibited their multiplication at the concentration of 0.25 to 0.75 mcg per ml. MIC of tinidazole was almost the same as that of metronidazole. No significant difference was recognized between sensitivity of new and old strains.

Exposure to tinidazole at the concentration of 1.0 mcg per ml for 24 hours killed 7 out of 9 strains of the trichomonad, furthermore exposure to the same concentration for 48 hours killed all strains tested. Tinidazole seemed to be more potent than metronidazole in the cidal activity showing longer persistency of the effect than metronidazole.

Sexually matured rats, which were castrated and implanted 15 mg of estradiole pellets subcutaneously, were inoculated with cultured *T. vaginalis* into the vaginae. After the infection was established, the drugs were given orally one time in a day for five consecutive days. Presence or absence of the organisms was examined by inoculating the vaginal secretions into culture medium three times during 4 to 6 days after termination of the treatment. Administration of 10 mg per kg of tinidazole showed eradication of the organism from the vaginae in 56.4%, and the effect of metronidazole in the same dosage was almost similar. Tinidazole in dosage of 15 mg per kg was more effective than metronidazole in the same dosage showing disappearance of the organism in 85.0% and 72.9% respectively. As in the experiments *in vitro*, the cidal effect of tinidazole *in vivo* also lasted longer than that of metronidazole; disappearance of the organism from the vagina was recognized even 4 days after termination of the treatment.