

特別掲載

Tinidazole の *in vitro*, *in vivo* 抗 trichomonas 効果

尾崎文雄 古谷正人 土肥美代子

(徳島大学医学部寄生虫学教室)

(昭和47年10月25日 受領)

Trichomonas vaginalis が Hoehne (1916) によつて膣炎の原因となることが報告されて以来、これに対する治療薬の研究開発が見られるようになった。近年特に抗生物質ならびに化学合成物質の開発にも影響され、その罹患率は比較的減少の傾向を示してはいるが、原虫性疾患としてまた性病感染様式の特性上いまだ相当数の男女に感染が認められている。

今回われわれは新しく開発された tinidazole について、*Trichomonas foetus* および *T. vaginalis* に対する効果を *in vitro*, *in vivo* の両面にわたつて、市販の metronidazole と比較検討した。

材料および方法

1. 材料

1・1 trichomonas

T. foetus は乾株を、*T. vaginalis* は 4F 株および慶応義塾大学医学部寄生虫学教室ならびに順天堂大学医学部産科婦人科学教室より分与を受けた新分離株 9 株を使用した。

1・2 培地

T. foetus には F-bouillon (pH 7.0) を、*T. vaginalis* には SYS (pH 6.0) を用いた。

1・3 実験動物

徳島実験動物研究所より入手の ddY 系マウスの主として雌 (体重 18.5~24.5g) を使用した。

1・4 薬剤

tinidazole (台糖ファイザー株式会社) は化学名 ethyl-[2-(2-methyl-5-nitro-1-imidazolyl) ethyl] sulfone のクリーム色ないし淡黄色の結晶性粉末で、高い脂肪親和性を有している。

2. 効果判定法

2・1 *in vitro*

a. 最小殺虫濃度を知るため、検体濃度 50 μ g/ml を起点とした倍数希釈 10 段階を添加した培地に 48 時間培養後

の原虫発育状態を観察した。

b. 上の発育阻止点を中心に、培養後毎 6 時間 48 時間に至る発育曲線を求めた。

c. 新分離株について a の方法により最小殺虫濃度を測定し、在来株と比較した。

d. 薬剤添加培地に 37 代継代した *T. vaginalis* 4F 株を用いて、b の方法により薬剤耐性を検討した。

2・2 *in vivo*

マウスには *T. foetus* は (1.7~2.3) $\times 10^7$ コを、*T. vaginalis* は (2.8~3.3) $\times 10^7$ コをそれぞれ腹腔内に接種して実験に供した。薬剤は 1% methyl cellulose にけんだくして、その 0.1ml をマウスに経口投与した。

a. *T. foetus* に対しては感染 24 時間後から 1 日 1 回 3 日間または 7 日間薬剤を連続経口投与して、致死感染を指標に投薬開始後 21 日間観察し、さらに耐過生残マウスは腹水を採取して F-bouillon に培養し、生原虫の有無を調べた。

b. *T. vaginalis* に対しては 3 日間連続投与したものを感染 4, 12 日後または 4, 6, 8 日後に、あるいは 7 日間連続投与したものを感染 7, 10, 13 日後に観察して判定した。さらに総量 70mg/kg について分割用量を変えて連続投与して、感染 4, 7, 10 日後に判定した。*T. vaginalis* はマウスに対する病原性が弱く 100% 感染死せしめ得ないので、観察・判定に際しては、腹水を採取して SYS 培地に 48 時間培養の上生原虫の有無を調査した。

成績

1. *in vitro*

実験に先立ち、両薬剤の両種原虫に対する最小殺虫濃度を測定する目的で、(7~10) $\times 10^4$ /ml の原虫を接種した培地に 50 μ g/ml (最終濃度) を起点として倍数希釈 10 段階を添加し、37°C 48 時間培養後判定を行なった。その結果両薬剤の両種原虫に対する最小殺虫濃度はほぼ同

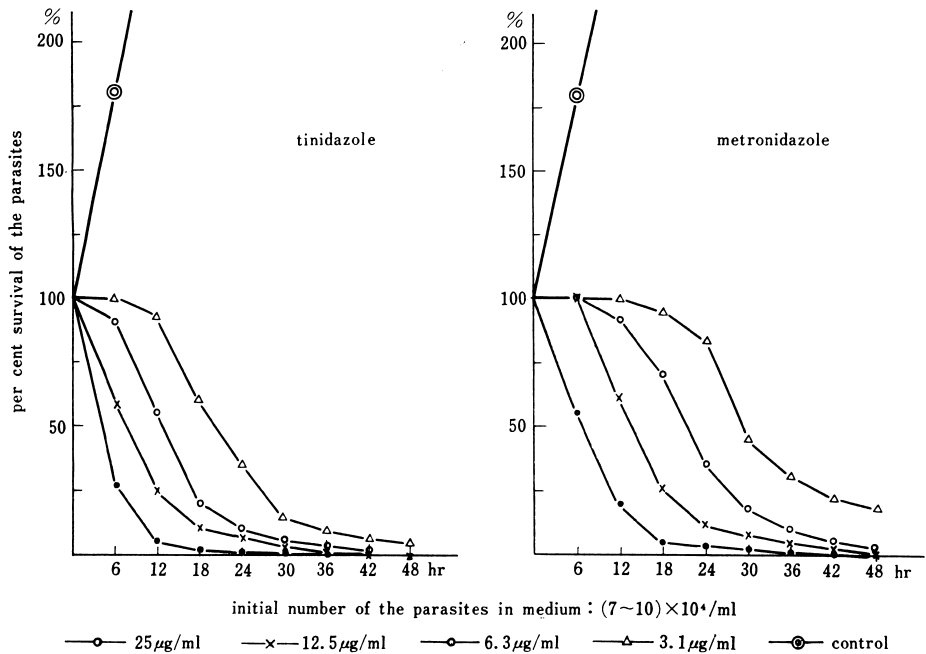


Fig. 1 Per cent survival of *Trichomonas foetus* in F-bouillon containing 3 per cent of bovine serum in the presence of tinidazole and metronidazole

一レベルにあつた。その範囲は $6.3 \sim 3.2 \mu\text{g/ml}$ であるが、*T. foetus* に対しては tinidazole が、*T. vaginalis* に対しては metronidazole がやや効果が強いように思われた。このことは次の実験の発育曲線にも明らかに表われている。

Fig. 1, 2 は薬剤効力を原虫の生存率によつて表わしたもので、両薬剤が兩種原虫に対しかなり異なつた態度を示している。*T. foetus* では薬剤添加当初から発育阻止効果が表われ、低濃度 ($6.3, 3.1 \mu\text{g/ml}$) でも初期増殖は少なく、横ばいの状態からやがて減少して行く (Fig. 1)。*T. vaginalis* においてはかなり高濃度でも添加当初には原虫の分裂増殖が続き、その後減少の方向に向かう (Fig. 2)。以上から両薬剤とも *T. foetus* に対しての方が効果の発現がすみやかであり、このことは顕微鏡観察においても同様に認められ、低濃度の場合もかなり早期に原虫の運動が停止する。

発育曲線から両薬剤の効力を比較すると、*T. foetus* に対しては tinidazole が metronidazole の約 2 倍であり、*T. vaginalis* に対しては metronidazole がややま

さるようと思われるが、両者ほぼ同一レベルにある。

以上は在来の長期培養株であるので、新分離株について薬剤効果を検討した結果、分裂増殖の速度がやや遅かつたが、両薬剤の効果は在来株と類似しており、最小殺虫濃度は $6.3 \sim 1.6 \mu\text{g/ml}$ であつた。

薬剤耐性に関しては $0.4 \mu\text{g/ml}$ 添加培地に 37 代継代した 4F 株で実験を行ない、Fig. 2 に示した発育曲線と同一傾向を示し、耐性は認められなかつた。

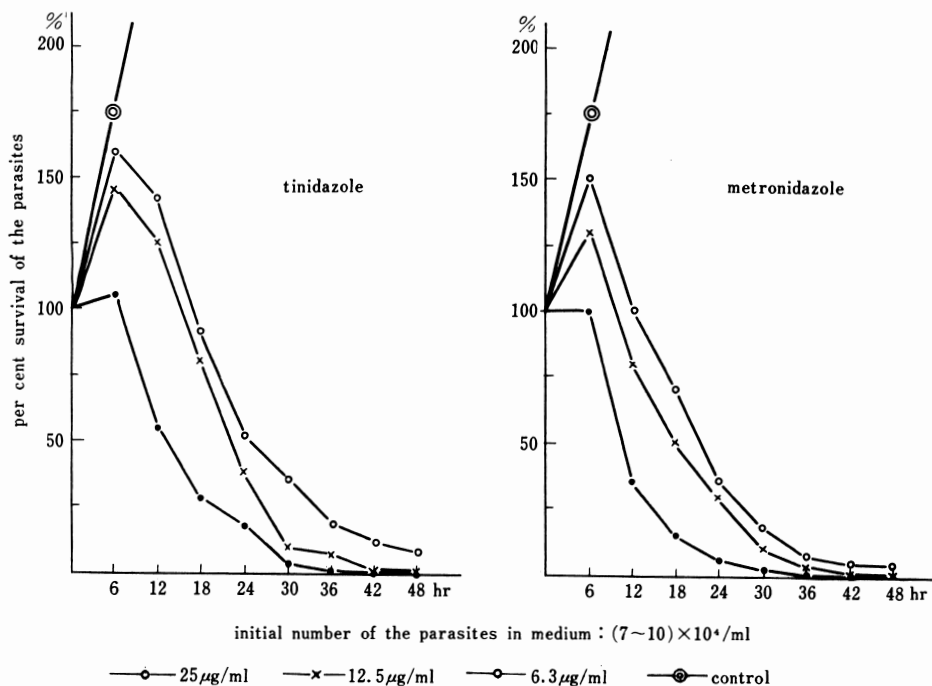
2. *in vivo*

2.1 *T. foetus*

両薬剤を 3 日間マウスに種々の投与量で連続投与した実験の結果から、tinidazole は *T. foetus* のマウスに対する実験的腹腔内感染においてすぐれた効力を示し、その原虫清掃力は metronidazole の場合の 4 倍に相当した。すなわち最小清浄量は前者が 25mg/kg 、後者が 100mg/kg であつた。

両薬剤の等量を 3 日間マウスに連続投与した結果 Fig. 3 のように tinidazole は 25mg/kg で 93% の清浄効果を發揮したのに反し、metronidazole ではマウスの耐過生

Fig. 2 Per cent survival of *Trichomonas vaginalis* in SYS containing 3 per cent of bovine serum in the presence of tinidazole and metronidazole



存率は30%にすぎず、かつその約半数は腹水中に原虫を認め、最終清浄率は15%にとどまった。15mg/kgでは前者は生存率76%、清浄率40%であったが、後者では対照群と同一生存曲線を描き無効であった。

1回の投与量を減らし投与日数を7日間に延長した実験において、tinidazoleでは生存率、清浄率とも前実験に及ばず、metronidazoleではほぼ同様であった。すなわち tinidazole 10mg/kgが清浄率31%で最もよく、tinidazole 5mg/kg、metronidazole 10mg/kgはいずれも生存率、清浄率ともほぼ17%、metronidazole 5mg/kgは清浄率15%で、生存曲線は対照群と同一線上にあった。

2.2 *T. vaginalis*

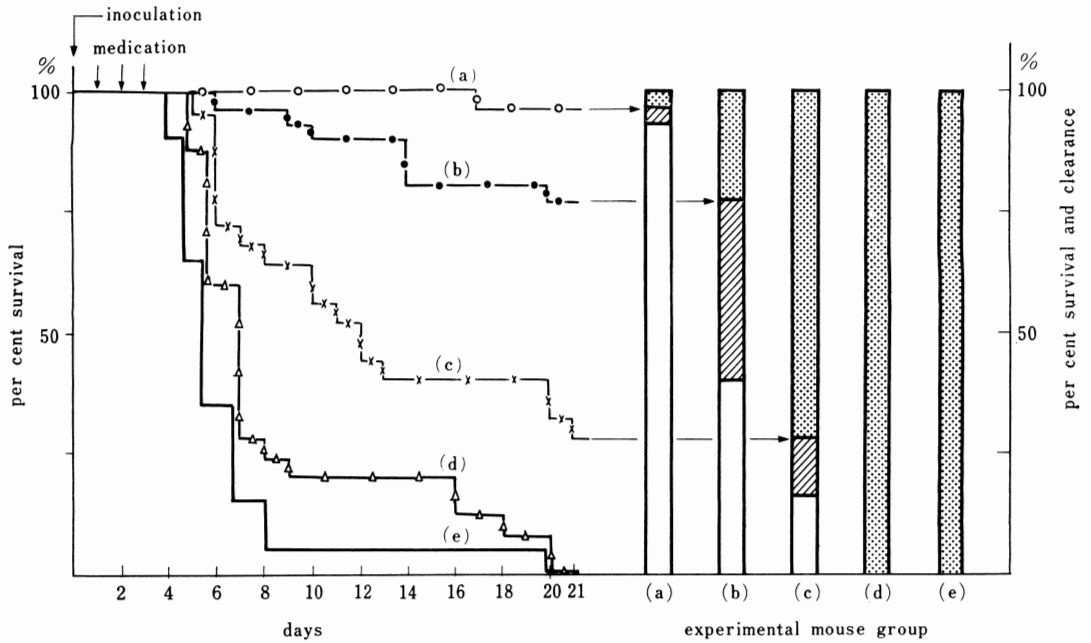
T. vaginalis 腹腔内感染マウスは対照群においても約20%以上の致死感染は望めないため、3日間連続投薬後一定の時期に腹水を採取し、培養によって効力の判定を行なった (Table 1)。原虫接種4日後 (薬剤投与終了の翌日) における tinidazole および metronidazole の最小有効濃度はそれぞれ50および150mg/kgで、前者は後者の約3倍の効力といえる。しかし原虫接種12日後で

はさらに低濃度でも100%近い清浄効果が tinidazole で認められたので、投薬量の減量と観察期間の短縮を試みた。

その結果 (Table 2)、tinidazole 15mg/kgは原虫接種6日後 (投薬終了3日後) ごろ効果が出始め、接種8日後には100%の清浄率を示した。tinidazole 10mg/kg および metronidazole 15、10mg/kgでは42%にすぎず、かつ対照群も6、8日後に28%の清浄率すなわち自然治癒が見られた。さらに投薬期間を7日間に延長して見たが、tinidazoleでやや効力が表われた程度であった。

投薬量と投薬期間との相関的な問題を解明する目的で総量70mg/kgを異なつた分割方法で投与したところ (Table 3)、tinidazoleの15mg/kg 2日+10mg/kg 4日および20mg/kg 1日+10mg/kg 5日投与群では原虫接種4、7、10日後にほぼ同一の清浄率を示したのに対し、10mg/kg 7日投与群では対照群と大差なく、metronidazoleの15mg/kg 2日+10mg/kg 4日および10mg/kg 7日群は対照と選ぶところがなかった。

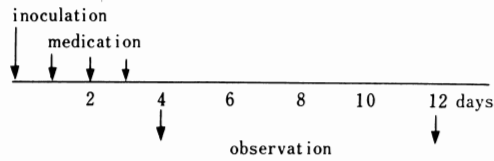
Fig. 3 Therapeutic activity of tinidazole and metronidazole against *Trichomonas foetus* in mice



(a) : tinidazole 25mg/kg (b) : tinidazole 15mg/kg (c) : metronidazole 25mg/kg
 (d) : metronidazole 15mg/kg (e) : control

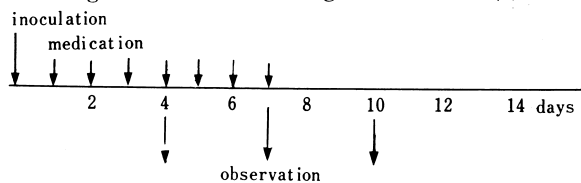
▨ : death ▩ : survival (not cleared) □ : survival (cleared)

Table 1 Therapeutic activity of tinidazole and metronidazole against *Trichomonas vaginalis* in mice (1)



drug	daily oral dose (mg/kg)	No. of mice	mice cleared/mice infected (%)	
			4 study day	12
tinidazole	75	12	3/3(100)	9/9(100)
	50	12	3/3(100)	9/9(100)
	25	12	2/3(67)	8/9(89)
	12.5	6	0/3(0)	2/3(67)
	6.3	6	0/3(0)	0/3(0)
metronidazole	150	12	3/3(100)	9/9(100)
	100	12	3/3(100)	6/9(67)
	50	12	0/3(0)	5/9(56)
control		4	0/2(0)	0/2(0)

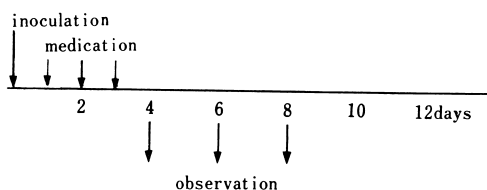
mouse : 23.5~24.5 g (♀) of body weight
 inoculum : 2.8×10^7

Table 2 Therapeutic activity of tinidazole and metronidazole against *Trichomonas vaginalis* in mice (2)

drug	daily oral dose (mg/kg)	No. of mice	mice cleared/mice infected (%)		
			study days		
			4	6	8
tinidazole	15	21	1/7(14)	5/7(71)	7/7(100)
	10	21	1/7(14)	3/7(42)	3/7(42)
metronidazole	15	21	3/7(42)	3/7(42)	3/7(42)
	10	21	3/7(42)	3/7(42)	3/7(42)
control		21	0/7(0)	2/7(28)	2/7(28)

mouse: 22.4~23.6 g (♀) of body weight

inoculum: 2.6×10^7

Table 3 Therapeutic activity of tinidazole and metronidazole against *Trichomonas vaginalis* in mice (3)

drug	daily oral dose (mg/kg)	No. of mice	mice cleared/mice infected (%)		
			study day		
			4	7	10
tinidazole	10×7	60	0/20(0)	3/21(14)	4/19(21)
	15×2+10×4	60	8/20(40)	6/19(32)	8/21(38)
	20×1+10×5	60	7/20(35)	6/20(30)	6/20(30)
metronidazole	10×7	60	1/20(5)	3/23(13)	3/17(18)
	15×2+10×4	60	1/20(5)	2/20(10)	4/20(20)
control		60	2/20(10)	2/20(10)	3/20(15)

mouse: 18.5~21.0 g (♀) of body weight

inoculum: 3.3×10^7

考 察

抗原虫薬としての tinidazole の薬物的特性は Miller *et al.* (1969) によつて報告されているが, Howes *et al.* (1969) の tinidazole の抗 trichomonas 効果実験によれば, *T. foetus* の24時間培養に対する最小発育阻止濃度および最小殺虫濃度はそれぞれ2.5および5 $\mu\text{g/ml}$ であり, *T. vaginalis* に対してはそれぞれ1.25および

2.5 $\mu\text{g/ml}$ である. また薬剤添加当初は metronidazole よりも殺虫効果が強いと述べている.

われわれの実験からは, 48時間培養で *T. foetus*, *T. vaginalis* とも最小殺虫濃度は6.3~3.2 $\mu\text{g/ml}$ で, *T. vaginalis* に関しては Howes *et al.* の成績よりやや悪いようであるが, 原虫の株によつて6.3~1.6 $\mu\text{g/ml}$ の範囲に分散したので大差ないものと考える. ただ両薬剤

とも両種原虫に対して発育曲線上効力に遅速の差が表われており、両原虫の代謝面における相違を思わせる興味ある問題であり、この方向からの追究を進める所存である。

De Carneri (1964), Mc Loughlin (1967) は metronidazole が trichomonas に耐性を生ぜしめることを報告しているが、Nicol (1966) は臨床的実験の立場から耐性は存在しなかつたと述べている。今回の実験では tinidazole, metronidazole のいずれにも耐性はまったく認められなかつた。

Howes *et al.* は *T. foetus* に対して *in vivo* で tinidazole の 12.5mg/kg は metronidazole 100mg/kg に匹敵し約 8 倍強力であるとしているが、われわれの成績では最小清浄濃度が tinidazole 25mg/kg, metronidazole 100mg/kg で、前者の力価は後者の 4 倍であつた。*T. vaginalis* に対する最小清浄濃度についての 3 日間連続投与実験から原虫接種 4 日後では、tinidazole は 50mg/kg/day が最も有効であつたが、感染 8~12 日後の成績では 15mg/kg/day もじゅうぶん有効であつた。metronidazole と比較すると *T. foetus* の場合同様約 4 倍効力が強かつた。

T. vaginalis に対するこの効果は Fig. 2 の *in vitro* における結果と逆であり、*T. foetus* に対しても *in vivo* の方が metronidazole より優位にあつたことと合わせ考えれば、宿主体内での吸収、脂肪親和性、溶解および排泄が tinidazole においてより有利な状態にあるものと思われるが、同じく nitroimidazole 誘導体としての化学構造上の側鎖における差異からのじゅうぶんな説明は今後の問題であらう。Pfizer 社の報告 (1970) および最近の台糖ファイザー株式会社の実験成績からも、吸収に関しては両者に薬効上影響を与えるほどの違いはないと考えられ、血中および尿中からの消失率、溶解度ならびに 2 次分解物質に関する有意な差が存在する可能性も示唆している。metronidazole にあつては実験日の経過に伴う効力の変化が目立たず、いわば当初の効力が一定期間持続している姿であるのに反して、tinidazole では *in vivo* の効力が日を追つて増強する傾向が強い点もこれらのことに関連しているものと考えられる。

投与方法に関して行なつた実験から、tinidazole では初期投与量の大小が治療効果に重要な影響を与えることが判明した。すなわち *T. foetus* に対する実験において、15mg/kg 3 日間投与の方が 10mg/kg 7 日間投与よりも清浄効果が大きかつた結果から投薬総量を増すことよりも当初 2~3 日間の投与量を増すことの方が有利で

あり、このことは *T. vaginalis* に関しても同様であつた。この点は初期の比較的大量投与が腹腔内原虫の増殖を抑制することにより發揮されるものと推測され、metronidazole に見られない tinidazole の特性と考えられ、trichomonas 本来の局所感染に対しても妥当性を有するものではなからうかと考える。

結 語

tinidazole の抗 trichomonas 効果を *Trichomonas foetus* および *Trichomonas vaginalis* について *in vivo*, *in vivo* で metronidazole と比較検討した。

1. tinidazole の両種原虫に対する *in vitro* 48 時間培養についての最小殺虫濃度は 6.3~3.2 $\mu\text{g/ml}$ であつた。
2. 培養初期には *T. foetus* に対し tinidazole は metronidazole の 2 倍の効力があり、*T. vaginalis* に対しては両者同程度であつた。
3. *in vivo* (マウス腹腔内接種) において、tinidazole の両種原虫に対する最小清浄濃度は metronidazole の約 $\frac{1}{4}$ であつた。
4. tinidazole にあつては初期 (2~3 日) に比較的大量を投与することが治療効果に好影響をもたらした。

文 献

- 1) De Carneri, I. (1964) : Variation of the sensitivity of a strain of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole after culturing in the presence or absence of the drug. Proc. 1. int. Congr. Parasitol., Rome, Vol. 1, Pergamon, Oxford, 366-367.
- 2) Howes, H. L., Jr., Lynch, J. E. and Kivlin, J. L. (1969) : Tinidazole, a new antiprotozoal agent : Effect on *Trichomonas* and other protozoa. Antimicrob. Agents Chemother. 261-266.
- 3) Mc Loughlin, D. K. (1967) : Drug tolerance by *Trichomonas foetus*. J. Parasitol., 53, 646-648.
- 4) Nicol, C. S. (1966) : *Trichomonas vaginalis* resistance. Lancet, 1, 1100-1101.
- 5) Miller, M. W., Howers, H. L. and English, A. R. (1969) : Tinidazole, a potent new antiprotozoal agent. Antimicrob. Agents Chemother., 257-260.
- 6) Tailor, J. A., Jr., Migliardi, J. R. and von Witteneu, M. S. (1969) : Tinidazole and metronidazole pharmacokinetics in man and mouse. Antimicrob. Agents Chemother., 267-270.
- 7) 台糖ファイザー株式会社 (1970) : Tinidazole 参考資料 (基礎編 I), 台糖ファイザー株式会社, 東京, 35 頁.

Abstract

IN VITRO AND IN VIVO STUDIES ON ANTITRICHOMONAL
ACTIVITY OF TINIDAZOLE

HUMIO OSAKI, MASATO FURUYA and MIYOKO DOI
(Department of Parasitology, School of Medicine,
Tokushima University, Tokushima, Japan)

Comparative evaluations of the antitrichomonal activity of tinidazole and metronidazole against both *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus* were performed.

The minimal cidal concentration of tinidazole against *T. vaginalis* and *T. foetus* in 48-hour cultures ranged from 3.2 to 6.3 $\mu\text{g/ml}$. Tinidazole was two times more potent than metronidazole against *T. foetus* in initial culture stages. However, no noticeable differences in the activity of the two drugs against *T. vaginalis* were detectable.

The minimal cidal concentration of tinidazole by oral route against trichomonads in mice infected with *T. vaginalis* or *T. foetus* was a quarter of that of metronidazole.

A relatively higher dose of tinidazole in initial therapeutic days was found to be appreciable in mice infected with the trichomonads, however, it was not the case with metronidazole.

Both drugs were well tolerated in these studies at the level administered orally.