

小形条虫 *Hymenolepis nana* に及ぼす

硫酸パロモマイシンの影響

今井 壯 一 野 口 一 雄 佐々木 康 夫
佐伯 英 治 樋 山 正 士 石 井 俊 雄

(昭和56年5月25日 受領)

Key words: *Hymenolepis nana*, paromomycin sulfate, Aminosidine, SEM

緒 言

硫酸パロモマイシンは、アミノグリコシド系抗生剤として広い抗菌スペクトルをもつ一方、*Taenia* 属条虫に対する駆虫効果をもつことも知られている (Ulivelli, 1963; Waitz *et al.*, 1966; Garin *et al.*, 1966). しかし、*Hymenolepis* 属条虫、すなわち小形条虫 *H. nana* と縮小条虫 *H. diminuta* の人体感染例における駆除については、ある程度の駆虫効果を認めたとする Salem and El-Allaf (1969), Wittner and Tanowitz (1971) の報告、およびほとんど駆虫効果がなかつたとする Botero (1970) の報告があり、本剤の *Hymenolepis* 属条虫に対する駆虫効果は未だ確認されていない。

著者らは、*in vitro* で維持した小形条虫に各濃度の硫酸パロモマイシンを添加し、その有効濃度を測定すると共に、虫体の運動性および形態に及ぼす影響を観察したので、ここにその成績を報告する。

材料および方法

1. 虫体の採取

当教室において、コンベンショナル dd 系マウスを用いて維持継代を行なっている自然感染マウス由来の小形条虫卵を糞便より浮遊法により集め、これを4週令 SPF-ddY マウス (静岡県実験動物農協) に1頭あたり1,000個ずつ経口投与した。感染後17日目に虫卵の排泄数がほぼ一定したことを確認したのち殺処分して解剖し、虫体を得た。

2. 維持培養液

最適維持培養液を得るための予備実験として、ハンク

ス液、イーグル液、組織培養液 NCTC 109, No. 199 を常法通りに調製し、これらを5ml ずつ小型滅菌プラスチックシャーレに分注して1シャーレあたり5隻の小形条虫を加え、20C, 27C および37C で培養した。

3. 薬剤濃度の検討

硫酸パロモマイシン (アミノサイジン: 協和醸酵工業) を、1%, 10⁻¹%, 10⁻²%, 10⁻³%, 10⁻⁴%, 10⁻⁵% の6段階の濃度となるよう維持培養液に加えたものをそれぞれ2シャーレずつ作成した。それぞれのシャーレに無傷の小形条虫を4~6隻ずつ加えて37C で維持培養し、4~24時間目まで経時的に虫体の運動性および形態変化を観察した。

4. 運動性の判定

マウスの解剖時、すなわち回収時と全く同様の活発な運動を示すものを卍、左右方向に比較的活発に運動するものを卍、わずかに運動がみられるものを十、運動の全くみられないものを一として判定を行なった。

5. 形態変化の観察

培養各時期に採取した虫体は、光学顕微鏡および走査電子顕微鏡的観察に供した。光顕的観察のためには、ブアン液で圧平固定後、明ばんカルミン染色を常法に従って行ない、また走査電顕的観察のためには、虫体を1%グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液) および Párducz のオスミウム-昇汞固定液 (Párducz, 1967) で重固定したのち、エタノール脱水、臨界点乾燥、金スパッタを行ない、日立一明石 MSM-2型走査電顕で観察した。

成 績

1. 維持培養液の検討

各種維持培養液中の小形条虫の運動性を Fig. 1 に示

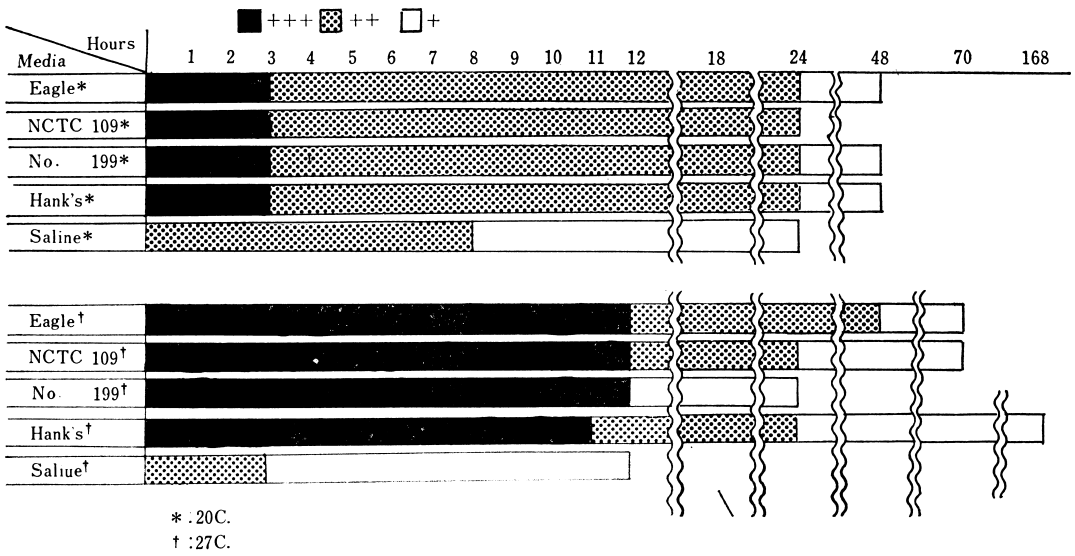


Fig. 1 Motility of *H. nana* in various media for maintenance.

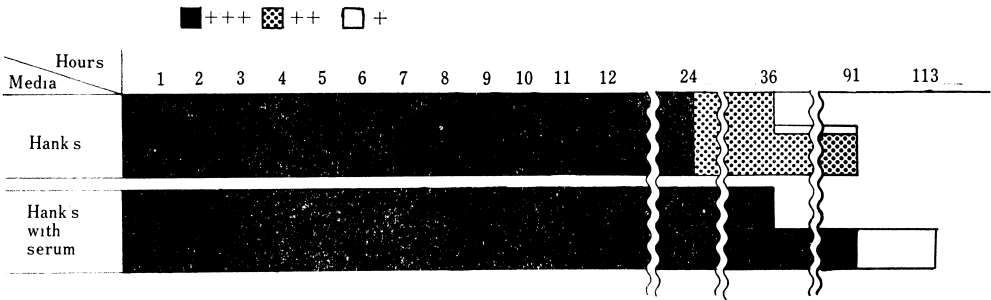


Fig. 2 Motility of *H. nana* in Hank's solution with and without 10% calf serum.

した。20C 培養時では、生理食塩水を除くいずれの培養液でも3時間目まで活発な運動性が保たれたが、以後運動性は低下した。一方、27C 培養時では、生理食塩水を除くいずれの培養液とも小形条虫は11時間目まで活発な運動がみられ、その後運動性は弱まったが、ハンクス液では168時間目まで運動性が保たれた。この結果より、培養液をハンクス液とし、さらに20Cより27Cでの培養時に良好な成績が得られたことから、次に培養温度を37Cに上げ、また10%仔牛血清添加の有効性の有無について検討した。

その結果、Fig. 2に示すように、活発な運動性を示す時間が延長し、仔牛血清添加ハンクス液では36時間以上、血清無添加ハンクス液においても24時間目まで虫体の活発な運動性が保たれた。

以上の結果から、以後の試験では培養液組成から生ず

る要因を可及的に少なくするため、血清無添加ハンクス液を用い、培養温度を37Cとして、硫酸パロモイシンを所定の濃度に添加し、検討を行なった。

2. 小形条虫の運動性に及ぼす硫酸パロモイシンの影響

各濃度の硫酸パロモイシン存在下における小形条虫の運動性を Fig. 3に示した。すなわち、硫酸パロモイシン1%添加群では、4時間目以降活発に運動するものは無く、12時間後には虫体は全て死滅した。10⁻¹%濃度以下では、硫酸パロモイシンの濃度が低くなるにつれて虫体の運動性は長時間保たれ、10⁻³%濃度以下では硫酸パロモイシン無添加対照とほぼ同様の運動性を保持した。

3. 小形条虫の形態に及ぼす硫酸パロモイシンの影響

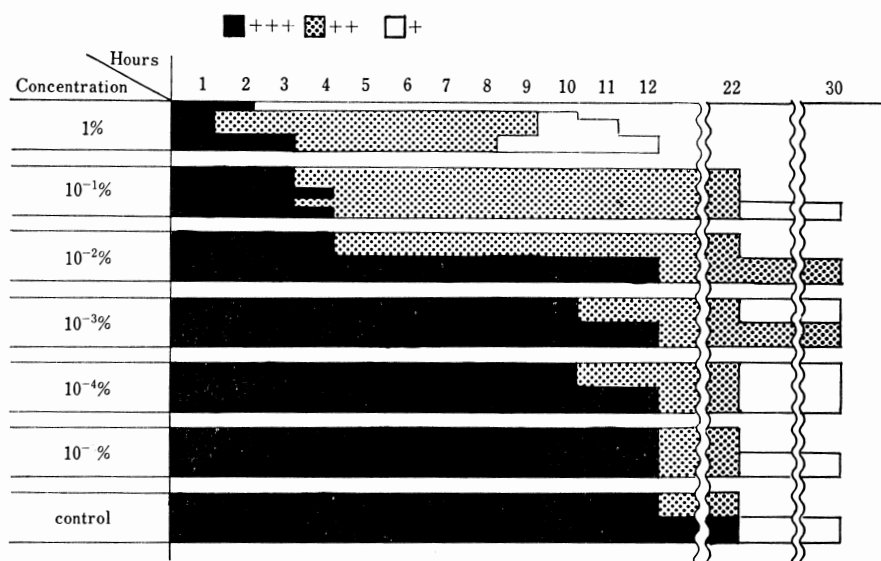


Fig. 3 Effects of paromomycin sulfate to motility of *H. nana*.

次に、新たに硫酸パロモマイシンを1%および0.1%濃度となるように添加したハンクス液を調製し、これに新鮮虫体を加え、3、6、9、12時間経過時に虫体を固定し、顕微鏡用圧平染色標本および走査電顕用標本を作成して形態の観察を行なった。

それらの結果を Figs. 4~14に示した。

対照虫体においては、培養を通して形態変化はみられず、頭部は直線状に伸び、その後方には明瞭な体節がみられた。また頭節には吻、鉤、吸盤などの諸器官が明瞭に観察された (Figs. 4, 10)。

これに対して、1%硫酸パロモマイシン添加時においては、3時間後および6時間後では対照との間の形態学的差異はほとんど認められなかったが、9時間後には1隻の頭節部に著しい変化がみられた。Fig. 5はその圧平染色標本を示したものであるが、頭部付近は萎縮、屈曲により3部位に分かれ、極度に萎縮した部位では、虫体組織が崩壊、薄化していた。しかし、頭節の吻、鉤、吸盤は残存していた。また別の1隻では頭節部に著しい変化は認められなかったが、頭節から約4mmの部位に20体節以上にわたる著しい萎縮がみられた (Fig. 6)。

12時間経過時では、8隻中6隻の頭節部とそれに続く未成熟体節部に著しい変化がみられた。Figs. 7~9にそれらの圧平染色標本像、Figs. 11, 12に走査電顕像を示した。いずれも頭部に著しい萎縮と屈曲を示し、数個の塊状物として観察された。なお、体節が30節以上にわたって萎縮した個体もみられた。また9時間経過時と同

様、いずれの虫体も頭節の吻、および吸盤は残存していたが、それらの位置関係は変化していた (Fig. 11)。

さらに、Fig. 13は対照虫体の頭部、Fig. 14は1%硫酸パロモマイシン添加12時間後の虫体の頭部の走査電顕像を示したものである。対照虫体では、体表に多数のmicrotrichesが配列されていたが、硫酸パロモマイシンの添加により、microtrichesはゆがみ、不明瞭となり、体表の破壊が進んでいる像が観察された。

一方、0.1%硫酸パロモマイシン添加時では、12時間経過後も対照虫体との間に形態学的差異はみられず、走査電顕像における体表構造にも変化は認められなかった。

考 察

硫酸パロモマイシン投与によつて排出された条虫の状態について、Barret-Conner (1975)は半ば破壊された状態で排出されるとし、大島 (1976)も、ピチオノールまたはニコロサマイドでは広節裂頭条虫は頭節を含め完全な状態で排出されるのに対し、本剤では頭節を確認することはできなかつたと述べている。これに対して、石田ら (1975)は、広節裂頭条虫感染の患者にパロモマイシンを投与したところ、投与後10時間以内に排出された虫体は活発な運動性を示し、肉眼的な形態変化は認められなかつたと報告している。今回の実験において、小形条虫を硫酸パロモマイシン1%濃度の培養液中で9~12時間培養後、虫体の運動性の低下と頭部~頭部の著しい

形態学的変性を観察したが、このことは、Barret-Conner (1975), 大島 (1976) が駆虫に際して頭節の確認ができなかつたことと関連しているものと思われる。

硫酸パロモマイシンの条虫体に対する作用機序について、Garin *et al.* (1971) は、本剤が虫体表層の角皮下の基底膜を破壊し、これにより宿主消化液が虫体内に侵入して虫体を消化すると推定し、影井ら (1981) は、人体より本剤によつて駆虫された広節裂頭条虫および無鉤条虫の組織学的観察を行なつて、特に頸部における体表の microtriches の消失、外皮の薄化、消失、基底膜の破壊を観察している。また枯草菌 *Bacillus subtilis* を用いた虫体周囲の発育阻止試験により、虫体前部において硫酸パロモマイシンの強い吸着をみたところから、本剤はまず虫体内にとりこまれたのち、外表、外皮、基底膜に作用することを示唆した。同様の microbioassay は金沢 (1971, 1977) によつても行なわれ、虫体における高濃度の吸着がみられており、本剤が抗神経作用をもつことから、本剤は特に神経中枢のある虫体の頸部に作用し、急性毒性をあらわすことにより駆虫効果を発揮すると推定している。

今回得られた結果は、金沢 (1971, 1977), 影井ら (1981) が述べているように、本剤が特に頭部および頸部に作用することを裏づけたが、今回の実験においては培養液に消化酵素を含まないため、虫体にあらわれた変化は Garin *et al.* (1971) の言うように、宿主の消化酵素によるものではなく、本剤が虫体に対して直接破壊的な影響を与えたものと考えられる。

なお、Becker *et al.* (1980, 1981) は、小形条虫を含む5種の条虫に対するプラジカンテルの作用を *in vitro* で試験し、頭節および頸部の萎縮と、特に頸部の体表における多数の水胞状突出物の形成をみているが、今回の試験ではそのような突出物は全く観察されなかつた。

硫酸パロモマイシンは、ヒトの小形条虫症 (Botero, 1970) および小形条虫感染マウス (Waitz *et al.*, 1966) に対してほとんど駆虫効果がないと報告されているが、今回の試験から少なくとも高濃度の硫酸パロモマイシン存在下では、小形条虫を殺滅する効果のあることが示唆された。

要 約

マウスより得た小形条虫 *Hymenolepis nana* を 37°C のハンクス液中で維持し、これに 1~10⁻⁵ % となるよう硫酸パロモマイシン (アミノサイジン) を加えて、小形

条虫の運動性および形態に及ぼす影響を観察した。その結果、1% 添加群では4時間目以降活発に運動するものは無く、12時間後には死滅した。10⁻⁸ % 濃度以下では対照とほぼ同様の運動性が保持された。硫酸パロモマイシン 1% 添加群では、9~12時間後に、特に頭部~頸部を中心とした虫体の著しい萎縮と屈曲がみられ、また走査電顕的観察では、体表に存在する microtriches のゆがみ、崩壊が認められた。しかし、0.1% 濃度では、虫体の形態学的変化は認められなかつた。このことから、硫酸パロモマイシンは、少なくとも高濃度存在下で、小形条虫の、特に頭部~頸部の体表に作用し、虫体を殺滅する効果のあることが示された。

謝 辞

稿を終るにあたり、貴重な御助言を頂いた昭和大学医学部岡本謙一教授、ならびに硫酸パロモマイシン (アミノサイジン) を分与して頂いた協和醸酵工業株式会社に深謝する。

文 献

- 1) Barret-Conner, E. (1975) : Recent advances in the treatment of common intestinal helminths. *Am. J. Gastroenterology*, 63, 105-116.
- 2) Becker, B., Mehlhorn, H., Andrews, P. and Thomas, H. (1980) : Scanning and transmission electron microscope studies on the efficacy of praziquantel on *Hymenolepis nana* (Cestoda) in vitro. *Z. Parasitenkd.*, 61, 121-133.
- 3) Becker, B., Mehlhorn, H., Andrews, P. and Thomas, H. (1981) : Ultrastructural investigations on the effect of Praziquantel on the tegument of five species of cestodes. *Z. Parasitenkd.*, 64, 257-269.
- 4) Botero, D. R. (1970) : Paromomycin as effective treatment of *Taenia* infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19, 234-237.
- 5) Garin, J. P., Despeignes, J. and Sirot, N. (1966) : Le sulfate de paromomucine antibiotique ectif sur les protozoaires du tube digestif se revele aussi un bom taenicide. *Lyon Med.*, 215, 979-992.
- 6) Garin, J. P., Despeignes, J. and Vincent, G. (1971) : Effect of our antibiotics of the oligosaccharide group on *Taenia saginata*. *Lyon Med.*, 225, 123-129.
- 7) 石田和人・鈴木俊雄・谷 重和・大森康正・石郷岡清基・照井良彦 (1975) : 秋田県における広節裂頭条虫感染例の追加と paromomycin によ

- る駆虫について. 秋田県農村医学会誌, 21, 16-20.
- 8) 影井 昇・林 滋生・加藤桂子・升 秀夫(1981): Aminosalicylic acid の作用機序に関する組織学的検討. 寄生虫誌, 30(増), 122.
- 9) 金沢 裕(1971): パロモマイシンによる条虫駆除の1例およびその作用機序に対する1観察. Jpn. J. Antibiot., 24, 143-145.
- 10) 金沢 裕(1977): パロモマイシンによる条虫駆除の1例およびその作用機序に対する1観察. 続報. 特に Aminosalicylic acid について. Jpn. J. Antibiot., 30, 182-184.
- 11) 大島智夫(1976): 広節裂頭条虫症の生物学, 疫学および治療. 最近長野県に急増した症例による観察. 信州医誌, 24, 191-204.
- 12) Párducz, B. (1967): Ciliary movement and coordination in ciliates. Int. Rev. Cytol., 21, 91-128.
- 13) Salem, H. H. and El-Allaf, G. (1969): Treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* infections with paromomycin. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 63, 833-836.
- 14) Olivelli, A. (1963): Terapia antibiotica della teniasi (Primifavorevoli risultati del trattamento con paromomicina). Riv. Clin. Pediatrica, 72, 371-383.
- 15) Waitz, J. A. McClay, P. and Thompson, P. E. (1966): Effects of paromomycin on tapeworms of mice, rats and cats. J. Parasitol., 52, 830-831.
- 16) Wittner, M. and Tanowitz, H. B. (1971): Paromomycin therapy of human cestodiasis with special reference to hymenolepiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 20, 433-435.

Explanation of Plates

- Figs. 4-9 Light micrographs of *Hymenolepis nana* stained with alum-carmin.
- Fig. 4 Untreated individual. Scolex with rostellum (R) and suckers (S) are shown. $\times 610$.
- Fig. 5 Anterior part treated for 9h with 1% paromomycin sulfate. Scolex and immature segments distinctly bend and contract. $\times 280$.
- Fig. 6 Mature segments at about 4mm from anterior end of same individual of Fig. 5. These segments also contract. $\times 610$.
- Figs. 7-9 Anterior parts treated for 12h with 1% paromomycin sulfate. Scolex and immature segments contract as well as those in Fig. 5. In Fig. 8, contraction is extended toward mature segments. Fig. 9 shows higher magnification of Fig. 8, indicating collapsed surface of scolex and neck region. Fig. 7. $\times 500$. Fig. 8. $\times 380$. Fig. 9. $\times 1,100$.
- Figs. 10-14 Scanning electron micrographs of *H. nana*.
- Fig. 10 Scolex of untreated individual. Rostellum (R) and suckers (S) are clearly shown. $\times 1,020$.
- Fig. 11 Scolex and neck region treated for 12h with 1% paromomycin sulfate. Distinct bending and contraction are noticed. $\times 640$.
- Fig. 12 Higher magnification of scolex. Rostellum (R) and sucker (S) are preserved. $\times 1,200$.
- Fig. 13 Surface of the scolex of untreated individual. Microtriches are observed. $\times 4,800$.
- Fig. 14 Surface of the scolex of an individual treated for 12h with 1% paromomycin sulfate. Fusion and collapse of microtriches are distinct. $\times 4,800$.

Abstract

LIGHT AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPICAL EXAMINATION
ON THE EFFECTS OF PAROMOMYCIN SULFATE TO
HYMENOLEPIS NANA (CESTODA) *IN VITRO*

SOICHI IMAI, KAZUO NOGUCHI, YASUO SASAKI, HIDEHARU SAEKI,
MASASHI HIYAMA AND TOSHIO ISHII

(Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical
College, Musashino-shi, Tokyo 180, Japan)

Effects of paromomycin sulfate to the motility and morphology of the dwarf tapeworm, *Hymenolepis nana*, were studied by means of light and scanning electron microscopy after *in vitro* exposure to the drug. The tapeworms were maintained in Hank's solution containing 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , and 10^{-5} % (W/V) of paromomycin sulfate at 37°C. A remarkable decrease of motility was observed after treatment for 4 h with 1%. All the tapeworms treated with 1% were destroyed after 12 h. In the concentrations below 10^{-3} %, the motility of tapeworms was preserved as well as in the control.

The remarkable contraction and bending confined almost to the scolex and neck region of the tapeworms were noticed after treatment for 9-12 h with 1%. In scanning electron microscopy, the fusion and collapse of microtriches were distinct. The incubation in a medium containing 0.1% paromomycin sulfate, however, resulted no morphological change of the tapeworms.

As a result, it is indicated that paromomycin sulfate affects to the motility and body surface, especially scolex and neck region, of *Hymenolepis nana* at least in high concentration, and functions as anthelmintic.

