

## 寄生蠕虫症の化学療法に関する研究 XXXV.

### マンソン裂頭条虫プレロセルコイドの 自動運動に対する各種駆虫薬の作用

寺田 護 記野秀人 施 維修 佐野基人

(平成元年10月17日掲載決定)

#### 要 約

マンソン裂頭条虫のプレロセルコイドの *in vitro* での自動運動に対する各種駆虫薬の作用を検討した。①肉眼的観察法で検討したところ、条虫類と吸虫類に有効とされる駆虫薬のうち幾つかが抑制的な作用を示した。その作用力や最大効果発現までに要する時間からみると、niclosamide や bithionol, praziquantel に注目すべき作用がみられた。②これらの駆虫薬は、アイソトニック・トランスデューサー法でも著明な作用を示した。③作用の持続性(不可逆性)を検討したところ、niclosamide の  $3 \times 10^{-5}$  M を60分間作用させた場合に不可逆的な作用がみられた。従って、ヒト患者やマンソン裂頭条虫プレロセルコイド感染マウスで、従来 *in vivo* 効果が認められていない現象は、駆虫薬が本来虫体に対する作用を欠くためではなく、これまでの投与条件では効果を発現し得ないことが明らかとなった。

**Key words:** *Spirometra erinacei*, plerocercoid, motility, anthelmintics

#### 緒 言

マンソン孤虫症 (*Sparganosis mansoni*) は、現在まで我が国でかなりの症例があるが(影井, 1989), 有効で安全な治療薬が見出されていない組織寄生蠕虫症の典型例の1つである。このような血管・組織寄生蠕虫症については、駆虫薬の *in vivo* 効果の発現の機序は極めて複雑なため、有効で安全な治療法の確立のためには、ヒト患者に代わるモデル実験動物系を用いた詳細な研究が必要となる(寺田, 1989)。ところが、マンソン孤虫症については、マウスを実験的宿主とする *in vivo* 実験系があるが(Maki and Yanagisawa, 1983, 1989), 現在のところ、動物実験およびヒト臨床のいずれにおいても、*in vivo* 効果の確認された駆虫薬はない。

そこで、マンソン孤虫症において駆虫薬の *in vivo* 効果が認められない理由を明らかにし、有効な *in vivo* 効果を導く手がかりを得るため、本研究では、プレロセルコイドの *in vitro* での自動運動に対する各種駆虫薬の作用についての幾つかの観察を行なった。

#### 材料および方法

##### 1. 材 料

マンソン裂頭条虫 (*Spirometra erinacei*) のプレロセルコイドは当大学周辺で捕獲したヤマカガシ (*Rhab-*

*dophis tigrinus*) とシマヘビ (*Elaphe quadrivirgata*) から摘出し、ddY 系マウスで継代した虫体を実験に供した。

##### 2. 方 法

プレロセルコイドの自動運動に対する駆虫薬の作用は佐野ら(1981)の2種類の *in vitro* 実験法を併用して検討した。

まず駆虫薬の長時間にわたる作用を肉眼的観察法で検討した。メディウムとして馬血清(10%), ペニシリンG カリウム(100 unit/ml), 硫酸ストレプトマイシン(100  $\mu$ g/ml) 添加 Earle's 液を用い、観察は35°Cで24時間まで行なった。駆虫薬の効果は、虫体の頭節、体前部および尾端部の収縮運動のそれぞれを1.0(正常ないし無影響), 0.5(中等度の抑制)および0.0(完全麻痺)の如く数量化し、虫体全体として正常ないし無影響の場合を3.0, 完全麻痺を0.0として評価した。

次に駆虫薬の起こす短時間作用をアイソトニック・トランスデューサー法で検討した。メディウムとして Earle's 液を用い、35°Cで30~40分間の観察を行なった。本虫体は特に脆弱なため、虫体を二重にしてマグナス管に懸垂し、負荷条件は0.2gとした。

##### 3. 被検駆虫薬

被検駆虫薬およびその他の主な試薬の入手先は以下の如くである。Avermectin B<sub>1a</sub>(Merck), pyrantel tartrate(台糖ファイザー), mebendazole(Janssen pharmaceuticals N. V.), hexylresorcinol(和光), aminosidine

sulfate (協和発酵), niclosamide (Bayer), bithionol (田辺), phenylene-1,4-diisothiocyanate (Jonit, Hoechst), 1,4-bis (trichloromethyl) benzene (Hetol, Hoechst), chloroquine diphosphate (Bayer), hycantone methanesulfonate (Sterling-Winthrop), sodium antimonyl tartrate (万有), 4-isothiocyano-4'-nitrodiphenylamine (CGP-4540, 故 Dr. E. Bueding 博士), praziquantel (Bayer), 馬血清 (M.A.Bioproducts), ペニシリンGカリウム (明治), 硫酸ストレプトマイシン (明治)。

各駆虫薬は0.9% NaCl, ethanolないし dimethylsulfoxide (DMSO)に溶解し, 実験液に添加した。なお有機溶媒については, それ自体が虫体の自動運動に影響を与えない濃度, すなわち最終濃度が0.5%以下となるように加えた。

## 結 果

### 1. マンソン裂頭条虫プレロセルコイドの自動運動に対する各種駆虫薬の影響

#### (1) 肉眼的観察法による検討

Table 1に今回検討した各種駆虫薬についての結果を一括表示した。本実験で用いたプレロセルコイド数は,

niclosamide および bithionol の場合は1濃度につき6~9虫体, その他の駆虫薬については1濃度につき4~5虫体とした。

0.5%のethanolないしDMSO添加の対照群虫体は24時間後まで正常な自動運動を示した。

Niclosamide は虫体の自動運動に対し弛緩性麻痺作用を示し, その作用力と最大効果発現までに要する時間はともに濃度とよく対応していた。すなわち $3 \times 10^{-7}$ Mから作用がみられ,  $3 \times 10^{-6}$ Mで完全麻痺を生じた。作用発現時間は $3 \times 10^{-7}$ Mで6~12時間であり,  $3 \times 10^{-4}$ Mでは30分であった (Fig. 1)。 $3 \times 10^{-5}$ Mおよび $3 \times 10^{-4}$ Mでは, 3時間後から虫体の融解が認められ8時間で著明となった。Photo. 1には $3 \times 10^{-5}$ Mに3時間作用後の虫体を示してある。

Bithionolの場合,  $3 \times 10^{-6}$ Mから作用がみられ,  $3 \times 10^{-4}$ Mで完全な弛緩性麻痺作用を示した。また作用発現時間は $3 \times 10^{-6}$ Mではほぼ6時間で,  $3 \times 10^{-4}$ Mでは1時間であった (Fig. 1, Photo. 1)。

PraziquantelとJonitも自動運動に対して同様の抑制的作用を示した。すなわちpraziquantelの $10^{-6}$ Mで6時間でかなりの運動抑制が, また $10^{-5}$ Mでは1時間後から完

Table 1 Effects of various anthelmintics on the motility of plerocercoids of *Spirometra erinacei* by the visual observation method

Anthelmintics	Solvent of stock solution	Final concentration (M)
I. Effective		
Niclosamide	ethanol	$3 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-4}$
Bithionol	ethanol	$3 \times 10^{-6} \sim 10^{-4}$
Praziquantel	ethanol	$10^{-6} \sim 10^{-4}$
Phenylene-1,4-diisothiocyanate (Jonit)	ethanol	$5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4}$
II. Ineffective		
Avermectin B <sub>1a</sub>	0.9% NaCl*	$3.6 \times 10^{-9} \sim 3.6 \times 10^{-6}$
Pyrantel tartrate	0.9% NaCl	$10^{-6} \sim 10^{-5}$
Hexylresorcinol	ethanol	$10^{-5} \sim 10^{-4}$
Mebendazole	DMSO	$10^{-5} \sim 10^{-4}$
Aminosidine sulfate	0.9% NaCl	$2.5 \times 10^{-6} \sim 2.5 \times 10^{-3} \ddagger$
1,4-Bis(trichloromethyl)-benzene (Hetol)	ethanol	$3 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-4}$
Chloroquine diphosphate	0.9% NaCl	$2 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-4}$
Hycantone methanesulfonate	0.9% NaCl	$10^{-5} \sim 10^{-4}$
Sodium antimonyl tartrate	0.9% NaCl	$10^{-5} \sim 10^{-4}$
4-Isouthiocyano-4'-nitrodiphenylamine (CGP-4540)	DMSO	$10^{-5} \sim 10^{-4}$

\*: A 1:100 solution ( $7.2 \times 10^{-4}$  M) with 0.9% NaCl of the original stock avermectin B<sub>1a</sub> dissolved in propylene glycol was used for the experiment.

‡: g/ml

Little effect was observed on the motility of control worms treated with 0.5% ethanol or 0.5% DMSO throughout the experimental period of 24 hr.

niclosamide の場合,  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  で作用直後から自動運動の抑制傾向とわずかな弛緩が, また  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  では約 20 分で著明な弛緩性麻痺がみられた。これらの作用は不可逆的であり, 30 分間の洗浄によっても回復しなかった。同様の効果は bithionol の  $10^{-4} \sim 3 \times 10^{-4} \text{M}$  でもみられたが, この場合には作用は可逆的であった。Praziquantel の場合,  $10^{-6} \text{M}$  で作用直後から自動運動の抑制と弛緩が, また  $10^{-5} \text{M}$  では 5 分以内に完全な弛緩性麻痺を生じた。しかし, 作用は可逆的であった。

## 2. Niclosamide および bithionol の作用持続性に関する検討

本実験は肉眼的観察法で行ない, 1 群 4 ~ 5 虫体を用いて観察した。

Niclosamide と bithionol について  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  および  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  の薬液に虫体を 5, 15 ないし 60 分間浸漬後, 虫体を駆虫薬を含まないメディウム (以下, 正常メディウムと略) で十分に洗浄, その後の正常メディウム中での回復の程度を 24 時間にわたって観察した (Fig. 3)。

0.5% ethanol 添加メディウムに 60 分間浸漬後, 正常メ

ディウムに移した対照群虫体は 24 時間後まで正常な自動運動を示した。

Niclosamide の  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  の場合, 60 分間の浸漬で虫体の自動運動はかなり抑制されたが, 正常メディウム中に移すと時間の経過とともに回復, 3 時間ではほぼ回復した。一方,  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  の場合には, 5 分間の浸漬で作用はみられず, 15 分間の浸漬では自動運動のわずかな抑制がみられた。しかし, これらの場合には, 正常メディウム中に移しても回復はみられず, むしろ時間の経過とともに, 逆に作用の増強がみられた。また, 60 分間の浸漬では完全な弛緩性麻痺がみられ, 24 時間後でも全く回復はみられなかった。

Bithionol の場合には,  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  および  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  のいずれについても, 60 分間の浸漬で虫体の自動運動の抑制がみられた。しかし, 正常メディウム中に移すと, 時間の経過とともに回復,  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  で 2 時間, また  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  では 24 時間以内に完全な回復がみられた。

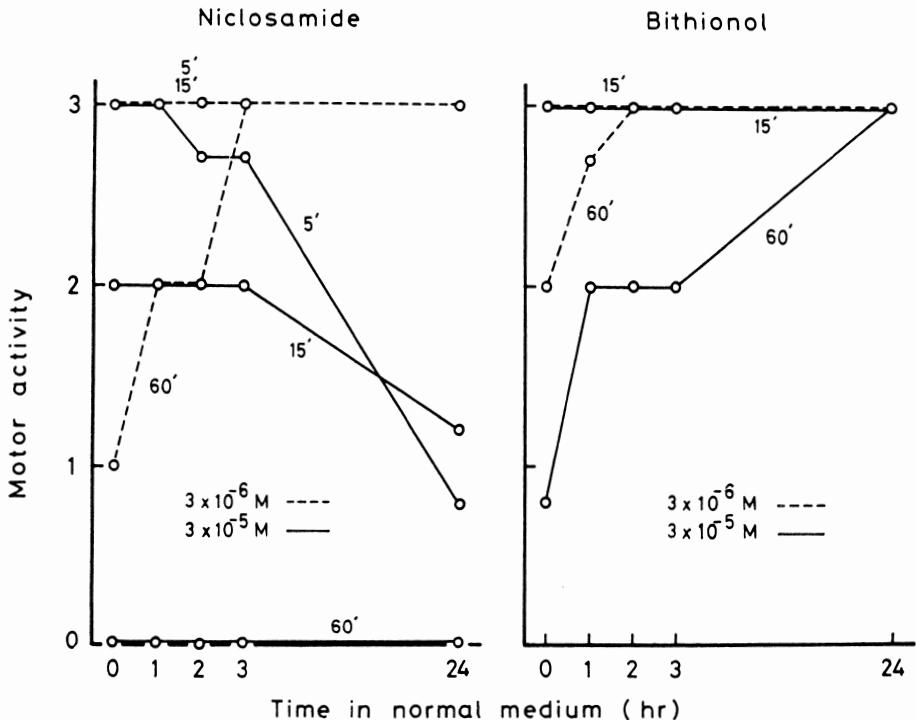


Fig. 3. Recovery in the motility of plerocercoids of *Spirometra erinacei* pretreated with niclosamide or bithionol by the visual observation method. Worms were treated with niclosamide or bithionol at  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  or  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  for 5, 15 or 60 min. Then, they were washed and kept in Earle's solution without the drugs (normal solution) for 24 hr. Little effect was observed on the motility of control worms pretreated with 0.5% ethanol for 60 min, throughout the experimental period of 24 hr after washing and keeping in the normal solution. Values are expressed as mean for 4 to 5 worms.

## 考 察

マンソン孤虫症はグルメブームとか自然食嗜好，民間療法に関連した寄生虫症として増加しつつあるように思われる。我が国における本症症例については，最近，影井（1989）により詳細な分析がなされている。例えば寄生部位についてみると，虫体は全身の各種臓器組織から発見されている。胸部・腹部・大腿部などの皮下に結節ないし腫瘤を形成している場合が多いが，頭蓋内や眼部，陰囊からの発見例もかなりある。

その治療法としては，現在のところ，外科的摘出によることが多いが，これは虫体が体表部に寄生している場合に限られる。従って虫体の発見や摘出が困難な場合には駆虫薬による化学療法も必要となる。しかし，これまでのところ，有効で安全な化学療法は確立されていない。動物実験ではMaki and Yanagisawa（1989）がマウスを実験的宿主とする系を用いて，bithionol や mebendazole, aminosidine などの作用を検討している。しかし，100mg/kgというヒト臨床量をはるかに越える投与量を経口で隔日100回，経皮で25日連続投与しても，全く無効であった。臨床的な研究においても同様である。すなわち虫体の寄生局所に procaine を注射する試みや novarsenobenzole の静注法が報告されているが，効果は期待できない（Cornel, 1933；向井ら，1981）。また，芽殖孤虫（*Sparganium proliferum*）の患者では，mebendazole の40mg/kg/日の4ヶ月間ないし praziquantel の40mg/kg/日の6分服の2週間の経口投与が行われ無効であった（Torres *et al.*, 1981）。

本研究の *in vitro* での結果では，条虫類に対して有効とされる駆虫薬のうち mebendazole や aminosidine は，マンソン裂頭条虫のプレロセルコイドの自動運動に対して無効であった。一方，幾つかの抗条虫薬は抑制的な作用を示し，その作用力や最大効果発現までに要する時間からみると，niclosamide や bithionol, praziquantel に注目すべき作用がみられた。従って，ヒト患者やマンソン裂頭条虫プレロセルコイド感染マウスで *in vivo* 効果が認められない現象に対して2つの可能性が考えられる。第一は，mebendazole や aminosidine の場合の如く *in vivo* で用いられた駆虫薬が，*in vitro* でも無効であり，本来この虫体に対して作用を欠く可能性である。

第二は，今回の *in vitro* 実験で作用を示した駆虫薬の如く，プレロセルコイドに対する作用を有しているのに，これまでの投与条件では *in vivo* 効果を発現し得なかった可能性である。

後者の可能性が実験的に確認できた今，マンソン孤虫症の治療法研究は次の段階，すなわち駆虫薬の *in vivo* 効果を引き出すための条件の探索に方向を絞ることになる。

まず，*in vivo* で有効性を発現するための駆虫薬側の条件が問題となる。マンソン孤虫症の如き組織寄生蠕虫症の場合，*in vivo* 効果を発現するためには，いずれの投与ルートによるにせよ，とにかく駆虫薬が虫体の寄生している組織領域に分布しなければならぬ。そしてその駆虫薬が虫体に対し特異的に作用する必要があり，しかもその作用は持続的ないし不可逆的でなければならない（寺田，1989）。そこで本研究では，*in vitro* 作用の見出された駆虫薬がプレロセルコイドに対して，そのような不可逆的作用を示すものか否か，たまたもしも示すとすれば，どの程度の濃度の駆虫薬に何時間くらい虫体を浸漬する必要があるかを検討してみた。その結果，肉眼的観察法では，niclosamide の  $3 \times 10^{-5}$  M に5ないし15分間浸漬し，未だ虫体にほとんど作用が生じない前に正常メディウムに移しても回復はみられず，逆に作用の増強がみられた。また60分間浸漬の場合には不可逆的な作用が生じ，24時間後でも全く回復は見られなかった。従って，この駆虫薬の虫体作用点への結合ないし作用は不可逆的であることが示唆された。一方，アイソトニック・トランスデューサー法でもこの駆虫薬の  $3 \times 10^{-5}$  M の20分間の浸漬で生じた弛緩性麻痺は不可逆的であった。ところが niclosamide 自体は，当初から専ら腸管寄生の条虫類に対して用いられており，組織寄生の条虫類に対する *in vivo* 効果の有無は全く未知である。しかも，特に非経口投与の場合には毒性の問題も考えなければならない（Vanden Bossche *et al.*, 1985）。しかし，ここでは  $3 \times 10^{-5}$  M の1時間程度の *in vitro* 処理で，実際にマンソン孤虫を不可逆的麻痺ないし死に致らしめ得る駆虫薬の存在を確認できたことの意義を強調すべきだろう。

また，マンソン孤虫症が組織寄生蠕虫症である点からすると，もしもそのような寄生蠕虫症に既に用いられている駆虫薬でこの虫体に対する不可逆的麻痺が認められれば更に有望となる。しかし，今回のアイソトニック・トランスデューサー法では，bithionol の  $3 \times 10^{-4}$  M ないし praziquantel の  $10^{-5}$  M に約10分間浸漬した場合の弛緩性麻痺作用は可逆的であった。そこで駆虫薬側からの研究としては，niclosamide の場合のような不可逆的作用を *in vivo* でも生じ得る駆虫薬の探索やそれらを高濃度に虫体の寄生部位へ分布させ得る投与法の研究などが重要となる。

つぎに，Maki and Yanagisawa（1989）の *in vivo* 実験では高濃度の駆虫薬の長期間の経皮投与でも無効であった。従って，特に本症の場合には，仮に高い血中濃度が得られても，虫体の寄生状態の特異性から駆虫薬が虫体に到達できず効果を発現しえない可能性も考えられる。すると，*in vivo* におけるプレロセルコイドの寄生状態と宿主の体液動態との関係の解明が極めて重大なテーマとなる。プレロセルコイドは宿主の組織内で生存し運動しながら

宿主に病害を与える。しかもマウスを宿主とした実験的感染で明らかな如く、虫体は宿主組織内でかなりの速度で成長する。このことは虫体が、現実に宿主側の体液との間で栄養成分や老廃物の授受を行なっていることを示している訳である。従って、宿主と虫体間における体液ないし物質の動態が明らかになれば、従来の経口的ないし経皮的なルートで投与された『駆虫薬という物質』が、なぜそのような物質授受の過程に入り込めず虫体に作用できなかったかの根拠も分ってくるだろう。そして駆虫薬の *in vivo* 効果を発現させ得る投薬法などについての手がかりも得られるのではなかろうか。

#### 文 献

- 1) Cornet, E. (1933): Essai de traitement de la sparganose retrobulbaire. Bull. Med. Chir. Indo-Chine, 11, 452-455.
- 2) 影井 昇 (1989) : 幼裂頭条虫症—マンソン裂頭条虫並びに芽殖孤虫の感染—。最新医学, 44, 877-883.
- 3) Maki, J. and Yanagisawa, T. (1983): A comparison of the effects of flubendazole and thiabendazole on the larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Trichinella spiralis*, *Diphyllobothrium erinacei* and *Hymenolepis nana* in mice. Parasitology 87, 525-531.
- 4) Maki, J. and Yanagisawa, T. (1989): Studies on effects of paromomycin sulfate, bithionol, mebendazole and flubendazole in the treatment of mice infected with plerocercoids of *Diphyllobothrium erinacei*. Jpn. J. Trop. Med. Hyg., 17, 237-241.
- 5) 向井秀樹・斎藤隆三・伊藤洋一 (1981) : マンソン孤虫症。皮膚病診療, 3, 219-222.
- 6) 佐野基人・寺田 護・石井 明・記野秀人 (1981) : 寄生虫症の化学療法に関する研究 I。 *In vitro* 実験法の検討ならびに広東住血線虫に対する avermectin B<sub>1a</sub> の弛緩性麻痺作用について。寄生虫誌, 30, 305-314.
- 7) 寺田 護 (1989) : 寄生蠕虫症治療剤への神経薬理学的アプローチ。感染・炎症・免疫, 19, 97-110.
- 8) Torres, J. R., Noya, O. O., Noya, B. A., Mouliniere, R. and Martinez, E. (1981): Treatment of proliferative sparganosis with mebendazole and praziquantel. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75, 846-847.
- 9) Vanden Bossche, H., Thienpont, D. and Janssens, P. G. (1985): Chemotherapy of gastrointestinal helminths. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York and Tokyo.

[Jpn. J. Parasitol., Vol. 39, No. 1, 000-000, February, 1990]

#### Abstract

### STUDIES ON CHEMOTHERAPY OF PARASITIC HELMINTHS (XXXV). EFFECTS OF VARIOUS ANTHELMINTICS ON THE MOTILITY OF PLEROCERCOIDS OF *SPIROMETRA ERINACEI*

MAMORU TERADA, HIDETO KINO, WEI-SHIU SHIH AND MOTOHITO SANO

(Department of Parasitology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-31, Japan)

Effects of various anthelmintics on the motility of plerocercoids of *Spirometra erinacei* were examined *in vitro*. ① Using the visual observation method, some anthelmintics such as niclosamide, bithionol and praziquantel were shown to inhibit the motility effectively. ② Remarkable effects with these drugs were also observed by the isotonic transducer method. ③ Recovery of paralyzed worms with these drugs was examined, and it was found that only the paralyzing effect of niclosamide was irreversible. From these results, it is suggested that such anthelmintics as niclosamide, bithionol and praziquantel are effective *in vitro* in themselves but their *in vivo* effects can not be elicited by traditional ways of treatment.