

論文目録

岐阜大学

報告番号	乙第 100 / 号	氏名	後藤千寿
主論文			
		シソ (<i>Perilla frutescens</i>) とショウガ (<i>Zingiber officinale</i>) 成分の抗幼線虫作用について	1冊
		平成7年7月発行 岐阜大医紀 43(4) : 498~508	
参考論文			
1)		アニサキス症のある予防法の試み 殺虫効果のある食品のスクリーニング	1冊
		昭和63年12月発行 感染症学雑誌 62(12) : 1152~1156	
2)		Lethal efficacy of leaf extract from <i>Perilla frutescens</i> (traditional Chinese medicine) or perillaldehyde on <i>Anisakis</i> larvae <i>in vitro</i>	1冊
		平成2年4月発行 Jpn. J. Parasitol. 39(2) : 220~225	
3)		Lethal efficacy of extract from <i>Zingiber officinale</i> (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in <i>Anisakis</i> larvae <i>in vitro</i>	1冊
		平成2年11月発行 Parasitol. Res. 76 : 653~656	
4)		Hydrocortisone sodium succinate (サクシゾン) にアレルギー反応を示した気管支喘息の1例	1冊
		平成4年7月発行 岐阜大医紀 40(4) : 617~621	
5)		Ultrastructural study of <i>Trichinella spiralis</i> with emphasis on adult male reproductive organs	1冊
		平成6年12月発行 Journal of Helminthology 68 : 353~358	
6)		Ultrastructural study of <i>Trichinella spiralis</i> with emphasis on adult female reproductive organs	1冊
		平成7年発行予定 Journal of Helminthology 69 : 掲載予定	

②

主論文

岐阜大学医学部紀要

第 43 卷 4 号 別刷

平成 7 年 7 月

シソ (*Perilla frutescens*) と
ショウガ (*Zingiber officinale*) 成分の
抗幼線虫作用について

後藤千寿, 粕谷志郎, 高橋優三

岐阜大学医学部寄生虫学講座 (主任 高橋優三教授)

Lethal Efficacy of Components from *Perilla frutescens* or *Zingiber officinale*
on Larval Nematode

Chitoshi GOTO, Shiro KASUYA and Yuzo TAKAHASHI

Department of Parasitology, Gifu University School of Medicine
(Director : Prof. Y. TAKAHASHI)

Reprinted from
ACTA SCHOLAE MEDICINALIS UNIVERSITATIS IN GIFU
Vol. 43 No.4 July 1995

シソ (*Perilla frutescens*) と ショウガ (*Zingiber officinale*) 成分の 抗幼線虫作用について

後藤千寿, 粕谷志郎, 高橋優三

岐阜大学医学部寄生虫学講座 (主任 高橋優三教授)

Lethal Efficacy of Components from *Perilla frutescens* or *Zingiber officinale* on Larval Nematode

Chitoshi GOTO, Shiro KASUYA and Yuzo TAKAHASHI

Department of Parasitology, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. Y. TAKAHASHI)

We identified the effective components of perilla leaves and ginger rhizomes on *Anisakis* larvae. And the affected *Anisakis* larvae were studied by electron microscopy. Then, the effective components were applied to control *Toxocara canis* larva *in vitro* or *in vivo*.

Methanol extracts from perilla (*Perilla frutescens*) leaves were fractionated after treating with HCl at pH 3, then with NaHCO₃ at pH 10 (fraction 1). Perillaldehyde was detected in this fraction by gas chromatography. A dose dependent lethal efficacy against *Anisakis* larvae was observed only in the fraction 1 but not in other fractions. Authentic perillaldehyde could kill *Anisakis* larvae at a minimum effective dose of 125 µg/ml. Based on these results, it was suggested that perillaldehyde is the most important active component for killing *Anisakis* larvae among extracts of *P. frutescens*.

Methanol extracts from ginger (*Zingiber officinale*) rhizomes were fractionated after treating with HCl at pH 3, then with NaHCO₃ at pH 10, and with NaOH at pH 13 (fraction 1). [6]-shogaol was detected by high performance liquid chromatography and was the most prevalent component in the fraction. A dose-dependent lethal efficacy against *Anisakis* larvae was observed only in the fraction. Authentic [6]-shogaol could kill *Anisakis* larvae at a minimal effective dose of 62.5 µg/ml.

Electron microscopical examination of the parasite treated with extract from *P. frutescens* or perillaldehyde elucidated spherical organelle-free cytoplasm bodies limited by the normal plasma membrane and basal lamina in the haemolymph. Also, with the extract of *Z. officinale* or [6]-shogaol, light and electron microscopical examinations revealed disturbances of cuticle and protuberance of muscle cells.

Perillaldehyde and [6]-shogaol killed *Toxocara canis* at a minimal effective dose of 25 µg/ml and lower than 12.5 µg/ml, respectively, *in vitro*. Furthermore, subcutaneous administration of perillaldehyde (30 mg/kg body weight) or [6]-shogaol (15 mg/kg body weight) significantly reduced the number of migrated larvae into the brain in infected mice.

The present study identified heretofore unknown property of perillaldehyde and [6]-shogaol: an antinematodal efficacy against *Anisakis* larva or *Toxocara canis* larva.

Acta Sch Med Univ Gifu 43: 498-508 (1995)

Key words: perillaldehyde, [6]-shogaol, *Anisakis*, *Toxocara canis*, antinematodal drug

緒 言

わが国で、駆虫剤として臨床的に使用できる薬剤は、蟯虫、蛔虫、鉤虫に有効な広域駆虫剤としてのバキ酸ピランテル、鞭虫症にも有効なメベンダゾール、吸虫類の治療薬ピチノール、条虫類、吸虫類に有効なプロジカニテル、糞線虫症、旋毛虫症に使用されるチアベンダゾール、抗フメリア剤のジエチルカルバマジンなど10数

種類程しかない。これらの薬剤に抵抗性を示す寄生虫症は治療に困難をともなう。なかでも、幼虫移行症を引き起こすアニサキス幼虫、犬蛔虫幼虫などは、感染のチャンスも多く医療上の重大な問題となっている。

アニサキス症は、アニサキス幼虫が寄生しているサバ、スルメイカ、スケトウダラなどの海産魚介類を生食することにより、発症する。アニサキス症は、臨床概念としては新しく、臨床疾患としてあげられたのは、1960年、

Van Thielらの報告¹⁾以来である。最近、胃アニサキス症は、内視鏡の普及に伴い開腹手術に至る例が、ほとんどなくなった²⁾と思われるが、腸アニサキス症は、依然、開腹手術後に発見される症例³⁾が多い。

また、犬蛔虫症は、感染性のある幼虫包蔵卵を経口摂取することで発症する。感染の好発年齢は、仔犬との接触機会の多く、土いじりをする幼・小児であることが知られている⁴⁾。しかし、近年、大人の症例も多く報告⁵⁾⁶⁾され、また、伊藤らは、新しい感染経路として、鶏肝や牛肝の生食により発症したと考えられる内蔵幼虫移行症例を報告⁷⁾している。今後、さらに犬蛔虫感染症が身近な感染症となる可能性があり、これらの幼虫移行症に対する有効な薬剤を見出す研究は極めて重要となっている。

日本では、魚を生で食べる習慣があり、古来よりアニサキス症に対して、何らかの対処がなされてきた可能性は高いと思われる。そこで、我々は、刺身と供に食する食品13品目(アオジソ、ワサビ、ショウガ、ニンニク、ネギ、パセリ、ダイコン、キャベツ、ホウレンソウ、ミツイシコンブ、トウガラシ、チャ、エタノール)の抽出物を用いてアニサキス幼虫への殺虫作用を調べた。この中でもアオジソ、ショウガに強い殺虫効果が認められた事を報告⁸⁾した。

今回は、これら食品の中でアオジソ、ショウガに注目し、これらをpHによる解離性を利用して成分をフラクションに分け、その主成分を同定すると同時に、これらの殺虫機構を解析するために、形態学的検討も行った。さらに、同成分の犬蛔虫幼虫に対する殺虫効果を調べ、マウスの感染モデルを用い、治療実験も試みた。

材料と方法

1) 幼線虫の採取

(1) アニサキス幼虫

Anisakis simplex の第III期幼虫を採取するために、スケトウダラ(岐阜市内で購入)の内臓を人工胃液であるペプシン液(塩酸7ml, ペプシン1g/l)にて37°C, 3~4時間消化した。消化液中より、活発に動いている幼虫を採取した。採取したアニサキス幼虫は、生理食塩水で数回洗浄し、未消化の内臓破片等を完全に除去した。

(2) 犬蛔虫幼虫

犬蛔虫幼虫は、以下の方法によって採取した。すなわち、生後数カ月以内の幼犬の腸管より犬蛔虫雌成虫を採取し、虫体を正中切開し、子宮を回収した。この子宮を適量の蒸留水とともにミキサーにかけ、1分間粉碎し、犬蛔虫卵の浮遊液を得た。これをWilliamsとSoulsbyの方法⁹⁾によって処理、培養して幼虫包蔵卵とした。幼虫包蔵卵は1N硫酸に浮遊させ4°Cで保存し、2~3週に1回の割合で通気した。

2) アオジソ (*Perilla frutescens*) の抽出成分

(1) 抽出成分の分離

アオジソの葉を、水洗、凍結乾燥して、それをメタノールの中に入れ3日間室温で攪拌し、メタノールで抽出

された成分を以下のごとく解離性を利用してエーテル抽出し、得られたエーテルフラクションについて検討した。

具体的には、アオジソの葉を食品用洗剤(花王)にて洗い、水洗し、さらに蒸留水にて洗い、余分な水分を拭き取った後、自立製作所製の凍結乾燥機で凍結乾燥した。乾燥した葉1.5gに200mlのメタノールを入れ3日間室温で攪拌しながら抽出した。Rotary evaporaterでメタノールを蒸発させ、残渣をエーテルで溶かし、分液漏斗を用いて、pH3の塩酸水溶液で洗った。エーテル層はさらに重曹水溶液(pH10)で洗い、残ったエーテル層をフラクション1とした。重曹水溶液は3N塩酸を用いてpH3としてエーテルを用いて抽出し、得られたエーテル層をフラクション2とした。また、最初の塩酸水溶液は水酸化ナトリウム水溶液でpH12としエーテルで抽出した。このエーテル層をフラクション3とした(FIG. 1)。得られた各フラクションについて、エーテルを蒸発させ、残渣に1mlのエタノールを加え完全に溶かした。

(2) 分離したフラクションの殺虫効果

得られたエタノール溶液から50µlを取り、2倍希釈系列を作製した。作製した各エタノール溶液を0.02ml取り生理食塩水1.98mlを加えて2mlとし、セラムチューブ(Greiner, Solingen, W-Germany)に分注し、活発に運動しているアニサキス幼虫を各チューブに8~12匹分配し、24時間37°Cで培養した。対照として、1%エタノール生理食塩水を用い同様に培養して、アニサキス幼虫への効果を検定した。

(3) 効果の判定

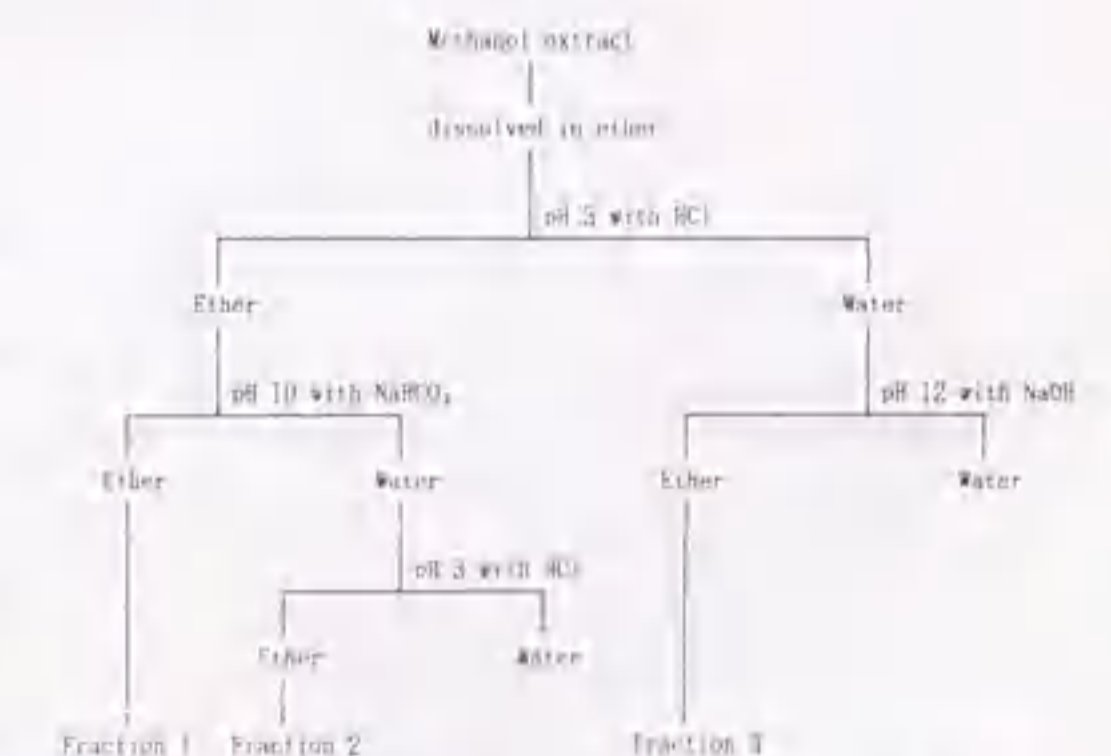


FIG. 1 Fractionation method of methanol extraction from leaves of *Perilla frutescens*.

For fractionation, 1.5g of freeze dried leaves were extracted with 200ml of methanol for 3 days at room temperature (25°C). Methanol extract was dried using a rotary evaporater, then redissolved in ether (150ml). Substances in ether were mixed with 3N HCl to pH3, then shaken in a separatory funnel. Both ether and water fractions were further fractionated as shown.

効果の判定に対しては、自発運動の消失、停止の2段階にした。すなわち、動きのないと見られたアニサキス幼虫を生理食塩水に入れたシャーレに取り出し、ピンセットで刺激を加えながら室温3分間観察し動きがなければ自発運動の停止とした。動きがあれば元の実験系に戻した。さらに、4~5時間放置し、自発運動を認めなければ運動消失(死亡)とした。

(4) perillaldehydeの含有量の測定

また、各フラクションからのエタノール溶液からperillaldehydeの含有量を測定した。

アオジソの各フラクションのperillaldehyde含有量は、ガスクロマトグラフで定量した。条件として、分離管は、PEG-6000 chromosorb 17% (30-60 mesh) で処理したステンレス製で、長さ3m、内径3mm、注入温度は、250°C、分離管の温度、170°C、キャリアーガスは、窒素、流速、0.8 kg/cm²、検出器は、水素炎イオン化検出器(FID)を用いた。

3) ショウガ (*Zingiber officinale*) の抽出成分

(1) 抽出成分の分離

ショウガも、水洗、凍結乾燥して、それをメタノールの中に入れて3日間室温で攪拌し、メタノールで抽出された成分を溶解性を利用してエーテル抽出し、得られたエーテルフラクションについて、検討した。

具体的には、ショウガの根茎を食品用洗剤にて洗い、水洗し、さらに蒸留水にて洗い、余分な水分を拭き取った後、凍結乾燥した。乾燥した根茎2.5gに200mlのメタノールを入れ3日間室温で攪拌しながら抽出した。ショウガを、前述のアオジソと同様にエーテル抽出したが、1つ異なるのは、ショウガ成分の中性物質とフェノール性物質とを分ける過程を加えた事である。具体的には、フラクション1をさらに水酸化ナトリウム水溶液(pH13)で洗った。得られたエーテル層をフラクション1とし、回収した水層は、3N塩酸でpH3とし、エーテル抽出を行った。このエーテル層をフラクション2とした。そのため、FIG. 2に示す様にショウガのフラクション3は、アオジソのフラクション2に相当し、アオジソの番号より1つづつずれている。

得られた各フラクションは、エーテルを蒸発させ、残渣に1mlのエタノールを加え完全に溶かした。

(2) 分離したフラクションの殺虫効果

得られたエタノール溶液から50 μ lを取り、2倍希釈系列を作製した。作製した各エタノール溶液を0.02ml取り生理食塩水1.98mlを加えて2mlとし、セラムチューブに分注し、活発に運動しているアニサキス幼虫を各チューブに8~12匹分配した。前述のアオジソと同様に培養して、アニサキス幼虫への効果を測定した。

(3) [6]-shogaolの含有量の測定

また、各フラクションからのエタノール溶液から[6]-shogaolの含有量を測定した。

ショウガの各フラクションの[6]-shogaol含有量は、次の様に定量した。まず、薄層クロマトグラフで、[6]-

shogaolの含まれている部分を採取した。条件は、薄層板は、Merck Silicagel 60 F254を使用し、展開距離を12cm、展開溶媒は、クロロホルム:アセトン=15:2の溶液を用いた。そして、薄層クロマトグラフで、粗精製した成分を高速液体クロマトグラフを用いてさらに分離し、[6]-shogaolの定量を行った。条件は、分離管は、TSK ODS-80Tmを用いて、移動層は、ショウ酸:蒸留水:アセトン=0.3g:1700ml:1300mlの溶液を、分離管の温度は、室温、流量は、1.0ml/min., 検出は、波長225nmの吸光度を用いた。

4) アニサキス幼虫への殺虫効果

(1) 実験方法

Perillaldehyde(半井化学薬品製)と[6]-shogaol(株式会社ツムラより供与)(FIG. 3)は、それぞれ、250, 125, 62.5, 31.25 μ g/mlになるように生理食塩水に溶

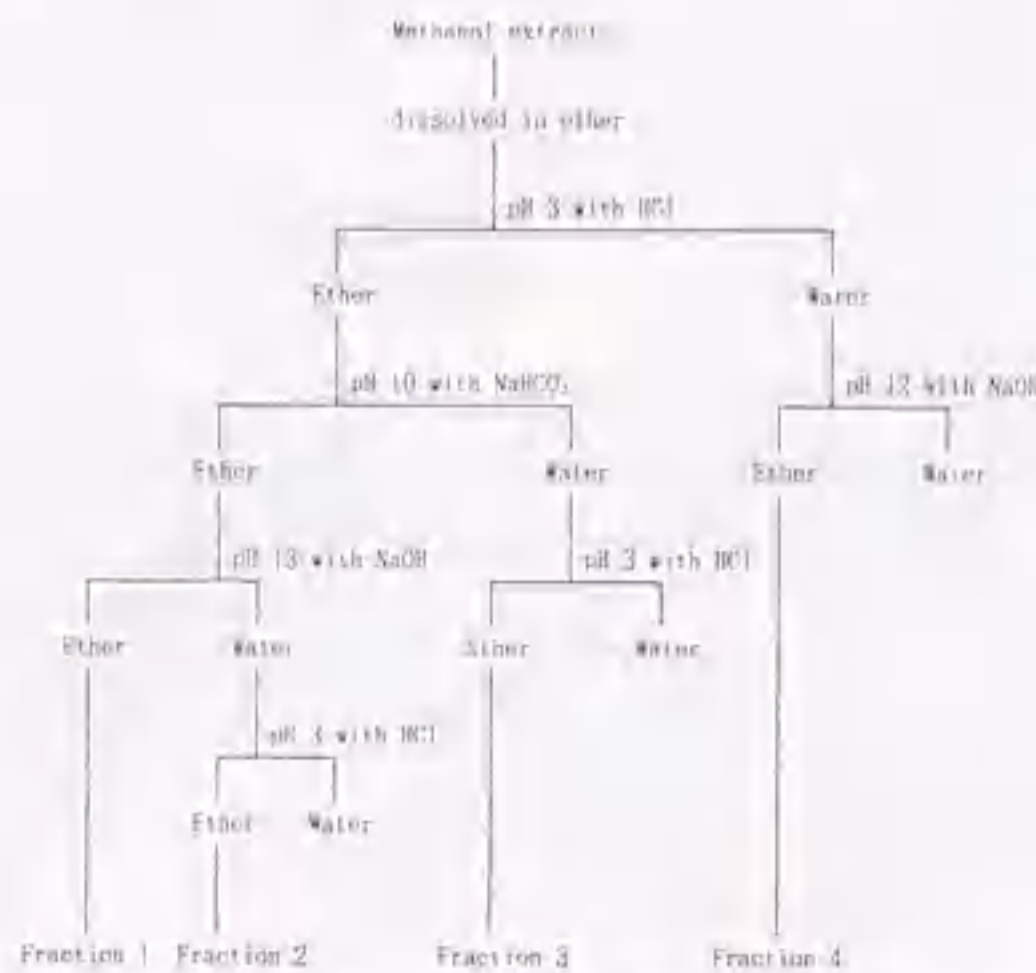


FIG. 2 Fractionation method of methanol extraction from rhizomes of *Zingiber officinale*. For fractionation, 2.5g of freeze dried rhizomes were extracted with 200ml of methanol for 3 days at room temperature. Methanol extract was dried using a rotary evaporator, then redissolved in ether (150 ml). Substances in ether were mixed with 3N HCl to pH3, then shaken in a separatory funnel. Both ether and water fractions were further fractionated as shown.

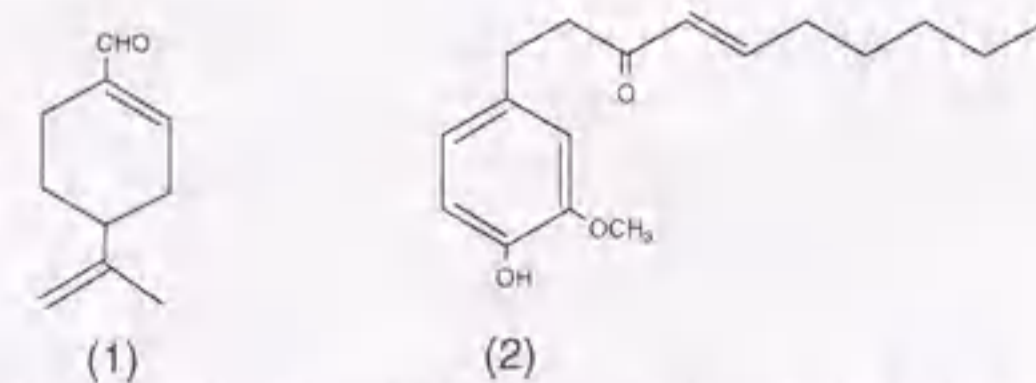


FIG. 3 (1): chemical structure of perillaldehyde¹⁰⁾. (2): chemical structure of [6]-shogaol¹⁰⁾.

解した。具体的には、perillaldehydeと[6]-shogaolをそれぞれ、エタノールで溶かし、25mg/mlの濃度になるよう調製し、そのエタノール溶液を基本に2倍希釈系列を作製した。作製した各エタノール溶液を用いて前述の2)の(2)の方法と同様にアニサキス幼虫の殺虫効果を調べた。対照として、1%エタノール生理食塩水を用い同様に培養して、アニサキス幼虫への効果を測定した。また、抗線虫薬で知られるバコピランテル(ファイザー製薬株より供与)も同様の希釈系列にて殺虫効果を観察した。

(2) 組織変化の観察

また、運動消失した虫体の組織変化を観察するために組織標本の作製を下記の方法で行った。

Perillaldehydeと[6]-shogaolは、エタノールに溶かし、上記と同様に生理食塩水に入れ、それぞれ、250 μ g/ml, 125 μ g/mlと62.5 μ g/ml, 31.25 μ g/mlの濃度になるように調製した。その生理食塩水溶液にアニサキス幼虫を5~6匹入れ37°Cにて24時間培養した。培養した虫体をカルノフスキー液で固定し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、PBS緩衝1%オスニウム酸で1時間固定し、エタノール系列で脱水、エポキシ樹脂で包埋した。包埋した虫体の切片を作製し、トルイジンブルーで染色し光学顕微鏡で観察し、また、電子顕微鏡用に超薄切片を作製し、ウラン・鉛の二重染色を施し観察した。

また、アオジソの葉、ショウガの根茎は、食品用洗剤にて洗い、水洗してさらに蒸留水にて洗い、余分な水分を拭き取った後、家庭用のおろし金ですり潰し、ガーゼで絞り液性成分を得た。得られたアオジソ、ショウガの液性成分を生理食塩水にて希釈し、10%, 20%の濃度になるように調製した。その中にアニサキス幼虫を5~6匹入れ37°Cにて24時間培養した。培養した虫体は、上記と同様な方法で虫体の組織変化を形態的に観察した。

5) 犬蛔虫幼虫(第II期幼虫)への殺虫効果

犬蛔虫幼虫包蔵卵100個に対して生理食塩水10mlで混和し、直径2mmのガラス玉100個入れた広口の試験管内に入れ、ガラス棒を上下させ物理的に幼虫を脱殻させた。得られた幼虫を生理食塩水で、数回洗浄し、2000rpm2分間で沈澱させ、ペールマン氏法を改良した装置¹¹⁾により、卵殻或は死んでいる幼虫を除去し、生きている脱殻幼虫のみ回収した。

Perillaldehydeと[6]-shogaolを、dimethylsulfoxid(DMSO)に溶かし、それぞれ、200mg/mlの濃度になるように調製した。その溶液を基本にして2倍希釈系列を作製し実験に用いた。作製した各DMSO溶液を2 μ l取り生理食塩水2mlに加え、濃度は、それぞれ、200, 100, 50, 25, 12.5 μ g/mlとなるように作製した。作製した各DMSO溶液をセラムチューブに入れ、その中に脱殻幼虫100匹前後を入れ、24時間37°Cで培養した。これを2000rpm2分間で沈澱し、沈澱の中の犬蛔虫幼虫(第II期幼虫)の致死率を光学顕微鏡下で調べた。幼虫が30秒間動きが認められないものを運動消失(死亡)とした。

コントロールは、0.1%のDMSO生理食塩水溶液を用い

て同様に処理し、犬蛔虫幼虫への殺虫効果の検定に用いた。

6) 犬蛔虫症の実験治療

(1) 感染方法

犬蛔虫の感染実験には、DBA/2マウス種の4~5週齢を用いた。感染方法は、犬蛔虫幼虫包蔵卵約500個をソラデを用いてマウスの胃内に注入した。

(2) 治療方法

Perillaldehydeまたは[6]-shogaolを、Tween 80に溶解して2%濃度にし、0.45 μ mのポアサイズのフィルターを通し、無菌化した。犬蛔虫幼虫感染後4日目から、そのperillaldehydeまたは[6]-shogaolの2% Tween 80溶液を、それぞれ、マウス体重に対して15mg/kg, 30mg/kgおよび15mg/kg, 7.5mg/kgの用量を1日1回14日間皮下注射を行った。

(3) 判定

感染後21日目に、マウスから脳と筋肉(腹部と大腿部から採取)それぞれ1gずつ取り出し、ペプシン液で消化した。この溶液を2000rpm2分間で遠沈し、沈澱の中の犬蛔虫幼虫(第III期幼虫)の数を、光学顕微鏡で数えた。

対照群は、無菌化した Tween 80を治療に用いた perillaldehydeまたは[6]-shogaolの2% Tween 80溶液と同じ用量を皮下注射し、同様に処理し効果判定の検定に用いた。

結 果

1) アニサキス幼虫に対するアオジソの各フラクションの殺虫効果と殺虫成分の含有量

アオジソ抽出物の各フラクションは、フラクション1のみに殺虫効果が見られ、フラクション2に若干の自発運動停止効果が見られる。他のフラクションでは、自発運動停止効果は認められない。フラクション1の1%生理食塩水溶液において、アニサキス幼虫は、完全に死亡し、0.5%の濃度まで殺虫効果が認められた。また、0.125%の濃度まで用量依存的に運動停止効果が認められる(TABLE 1)。

アオジソ抽出物の各フラクションのperillaldehydeは、フラクション1に大部分存在した。Perillaldehydeの含有量は、フラクション1では、7.3mg/ml、フラクション2では、0.1mg/mlであり、フラクション3では、検出ができなかった(TABLE 2)。

2) アニサキス幼虫に対するショウガ抽出物の各フラクションの殺虫効果と殺虫成分の含有量

ショウガ抽出物の各フラクションにおいても、フラクション1のみに殺虫効果が認められた。フラクション1の1%生理食塩水溶液で完全にアニサキス幼虫は死亡し、0.25%の濃度まで用量依存的に殺虫効果が認められる。幼虫の自発運動の停止は、0.5%の濃度以上で100%であり、0.25%の濃度でも、63.3%であった。フラクション2の1%の濃度においても6.7%の自発運動停止が認められる。他のフラクションでは、抗アニサキス作用は認め

TABLE 1 Lethal efficacy of each fraction of *P. frutescens* on *Anisakis* larvae *in vitro*

Fraction	Concentration of each fraction			
	1%	0.5%	0.25%	0.125%
1	100 (100)	64.6 (100)	0 (65.2)	0 (14.3)
2	0 (25.0)	0 (0)	ND	ND
3	0 (0)	ND	ND	ND

Worms were incubated with fraction 1, 2 or 3 at 37°C for 24h. Each fraction was dissolved and diluted with ethanol then added to saline at a concentration of 1% (v/v). A control experiment with ethanol resulted in no lethal effect. The number represents the percentage of dead worms, and the number in () represents the percentage of loss of spontaneous movement. ND; not done

TABLE 2 Concentration of perillaldehyde in each fraction

Fraction	Concentrations (mg/ml) ¹⁾
	perillaldehyde
1	7.3
2	0.1
3	not detected

¹⁾ Dried leaves (1.5g) were extracted, fractionated then dissolved in 1ml of ethanol.

られない (TABLE 3).

ショウガ抽出物の各フラクションの [6]-shogaol は、ほとんどフラクション1に存在した。[6]-shogaol含有量は、フラクション1では、0.510 mg/ml、フラクション2では、0.007 mg/ml、フラクション3では、0.006 mg/mlであり、フラクション4では、検出ができなかった (TABLE 4)。

3) アニサキス幼虫に対する perillaldehyde と [6]-shogaol の殺虫効果

Perillaldehydeを250 µg/ml から2倍希釈系列し15.6 µg/ml まで5種類の濃度で実験を行った。15.6 µg/ml の濃度では、アニサキス幼虫の自発運動の停止効果を全く示さなかった。125 µg/ml 以上の濃度では、100%の致死率があり、31.25 µg/ml、62.5 µg/ml の濃度においては、濃度依存的な効果が認められた。また、[6]-shogaolも同様の濃度で実験を行った。[6]-shogaolも15.6 µg/ml の濃度では、アニサキス幼虫の運動停止効果は認められなかった。しかし、62.5 µg/ml 以上の濃度では、100%の致死率を示した。そして、31.25 µg/ml の濃度でも、

TABLE 3 Lethal efficacy of each fraction of *Z. officinale* on *Anisakis* larvae *in vitro*

Fraction	Concentration of each fraction		
	1%	0.5%	0.25%
1	100±0 (100±0)	69.4±19.5 (100±0)	7.4±7.4 (63.3±20.3)
2	0±0 (6.7±6.7)	ND	ND
3	0±0 (0±0)	ND	ND
4	0±0 (0±0)	ND	ND

Worms were incubated with fraction 1, 2, 3 or 4 at 37°C for 24h. Each fraction was dissolved and diluted with ethanol then added to saline at a concentration of 1% (v/v). The number represents the percentage of dead worms, and the number in () represents the percentage of loss of spontaneous movement. The data represent the mean ± SE of 3 different experiments. ND; not done

TABLE 4 Concentrations of [6]-shogaol in each fraction

Fraction	Concentrations (mg/ml) ¹⁾
	[6]-shogaol
1	0.510±0.0085
2	0.007±0.004
3	0.006±0.002
4	trace

¹⁾ Dried rhizomes (2.5g) were extracted, fractionated then dissolved in 1ml of ethanol. Mean ± SE of 3 different experiments

7.2%の致死率が認められた。一方、抗線虫薬であるバモ酸ピランテルは、1 mg/ml の濃度にしてもアニサキス幼虫を死に至らしめなかった (TABLE 5)。

Perillaldehyde 125 µg/ml または [6]-shogaol 62.5 µg/ml の最小致死濃度におけるアニサキス幼虫の致死率の経時的変化を観察した。Perillaldehyde 125 µg/ml 溶液では、24時間以内に100%幼虫を死に至らしめる。8時間以内に9.5%の幼虫に死が見られ、16時間以内には、46.3%の致死率が見られる。自発運動の停止は、4時間以内に49.9%の幼虫に見られ、8時間以内には91.1%、16時間以内には、100%の幼虫に見られる (FIG. 4)。また、[6]-shogaol 62.5 µg/ml 溶液では、16時間以内にすべての幼虫が死亡した。そして、4時間以内に9.3%、8時間以内には62.7%の致死率が見られ、自発運動の停止は、4時間以内に89.6%の幼虫に見られた (FIG. 5)。

また、形態の変化を観察したら、perillaldehyde 250 µg/ml

TABLE 5 Lethal efficacy of authentic compounds on *Anisakis* larvae

Compound	Dose (µg/ml)					
	1000	250	125	62.5	31.25	15.6
perillaldehyde	ND	100±0 (100±0)	100±0 (100±0)	42.5±29.7 (65.1±13.7)	27.0±20.3 (35.3±16.0)	0±0 (0±0)
[6]-shogaol	ND	100±0 (100±0)	100±0 (100±0)	100±0 (100±0)	7.2±7.2 (85.0±15.0)	0±0 (0±0)
pyrantel pamoate	0±0 (45.8±4.2)	ND	ND	ND	ND	ND

The number represents the percentage of dead worms, and the number in () represents the percentage of loss of spontaneous movement. The data represent the mean ± SE of 3 different experiments. ND; not done

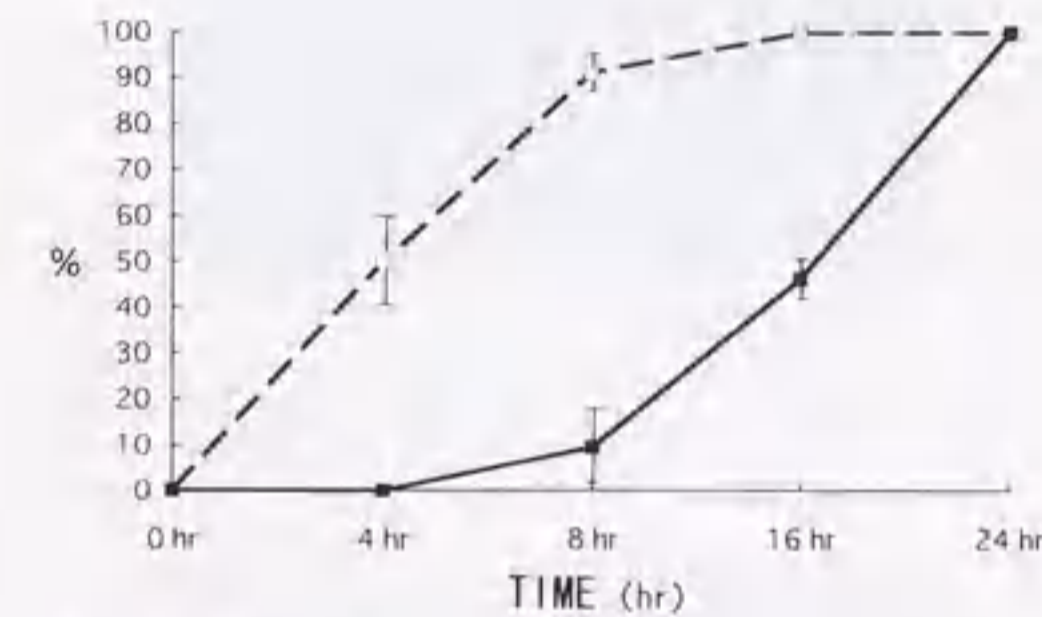


FIG. 4 Time course of loss of spontaneous movements (□) and destruction (■) of *Anisakis* larvae by perillaldehyde (125 µg/ml). Mean ± SE of 3 experiments

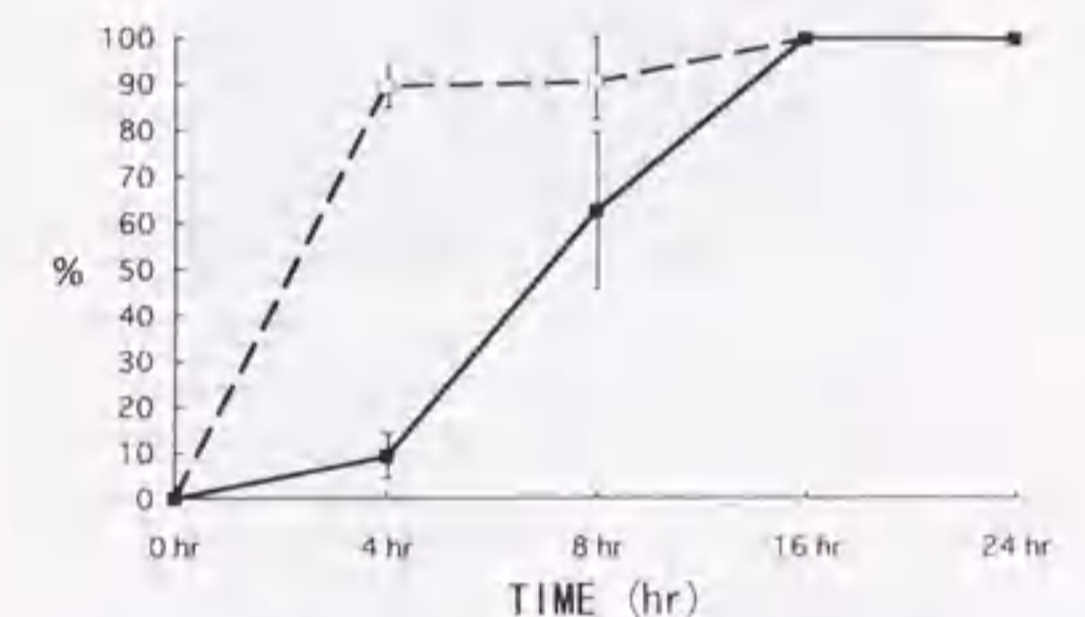


FIG. 5 Time course of loss of spontaneous movements (□) and destruction (■) of *Anisakis* larvae by [6]-shogaol (62.5 µg/ml). Mean ± SE of 3 experiments

ml または125 µg/ml の濃度の溶液および10または20% アオジソ生理食塩水溶液では、アニサキス幼虫のクチクラに変化が見られなかったが、レネット細胞が存在する幼虫前方の偽体腔に細胞成分が小円形を呈し遊離しているのが多数観察された (FIG. 6, 7)。そして連続切片での観察によりその細胞切片は、筋肉細胞や側索や消化器細胞とは形態的につながっていない。また、その細胞成分は、細胞膜および基底膜によって囲われている (FIG. 8, 9)。

[6]-shogaol 62.5 µg/ml または31.25 µg/ml の濃度の溶液および20%ショウガ生理食塩水溶液で処理すると、幼虫の肛門側を覆うクチクラに変化が見られ、クチクラの第二層が異常に厚みを帯び一部分でクチクラ層が突出しているのが多数観察される (FIG. 10, 11)。また、[6]-shogaol 31.25 µg/ml の濃度の溶液では、ヘモリンフが存在する偽体腔に、体壁が異常に膨張した部分が観察された (FIG. 12, 13)。

4) 犬蛔虫幼虫への殺虫効果

Perillaldehyde または [6]-shogaol をそれぞれを200 µg/ml から2倍希釈系列希釈し12.5 µg/ml まで5種類の濃度で実験を行った。Perillaldehyde は、25 µg/ml 以上で、[6]-shogaol は、12.5 µg/ml の濃度でも犬蛔虫

幼虫を完全に死亡せしめた (TABLE 6)。

5) 犬蛔虫症治療効果

Perillaldehyde 30 mg/kg または [6]-shogaol 15 mg/kg の投与量において、マウスの脳への幼虫移行数に对照と比べ有意の差が生じた。Perillaldehyde の投与群においては、15 mg/kg の投与では对照と比べ有意の差はなかったが、30 mg/kg の投与では、脳へ移行する幼虫数に对照と比べ危険率0.01の有意の差が認められた。また、[6]-shogaol の投与群では、7.5 mg/kg の投与では对照と比べ有意の差が認められなかったが、15 mg/kg の濃度では、脳へ移行する幼虫数に危険率0.005の有意の差が認められた。この実験においては、両薬剤とも本実験での使用濃度では、筋へ移行する幼虫数に対して对照との間に有意の差が認められなかった (TABLE 7)。

考 察

シソは、蘇葉(ソウウ)と呼ばれ漢方製剤に使われている。その薬理作用は、鎮静作用¹²⁾、抗アレルギー作用¹³⁾、殺菌作用¹⁴⁾、抗真菌作用¹⁵⁾などで、古来、魚介類の中毒症に水煎服すると記されている¹⁶⁾。しかし、そこで言う魚介類の中毒症が、アニサキスに起因するものか、アレルギー性なのか、細菌によるものかは明確ではない。シソ



FIG. 6 Microscopical observation ($\times 50$) of an *Anisakis* larva that was incubated with 20% perilla leaves for 24h. Note the presence of some spherical cell fragments (arrow) in the haemolymph.



FIG. 7 Microscopical observation ($\times 200$) of an *Anisakis* larva that was incubated with 10% perilla leaves for 24h. Note the presence of some spherical cell fragments (arrow) in the haemolymph.

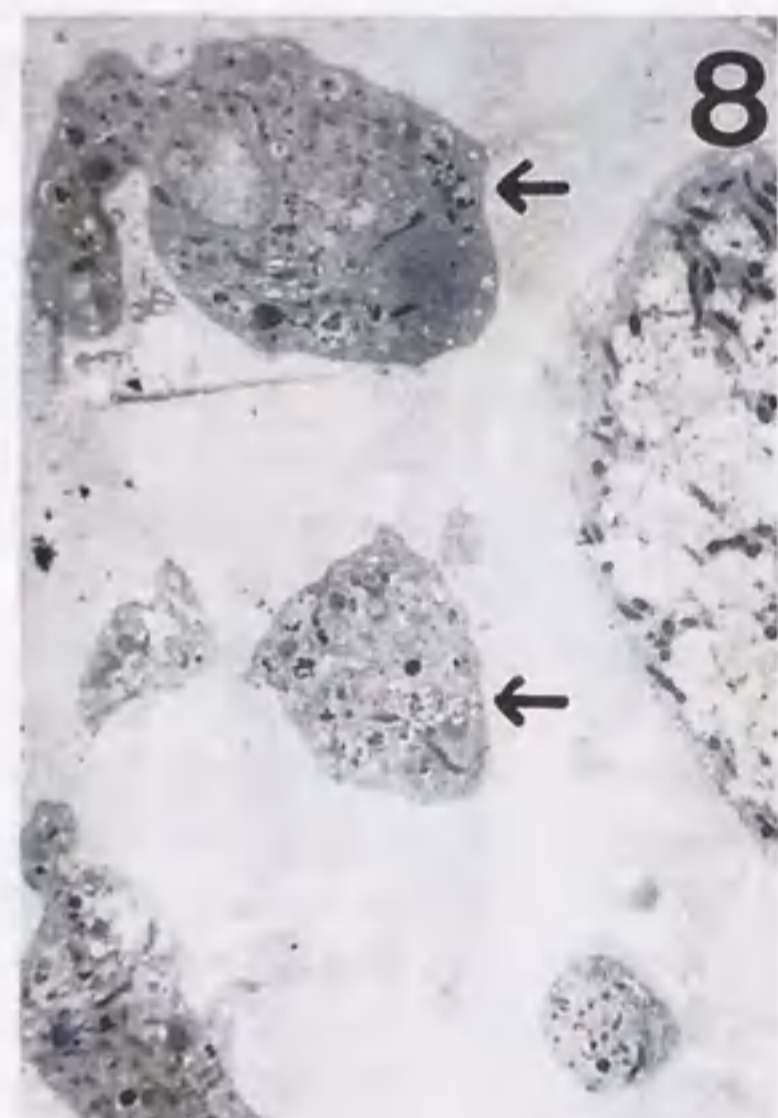


FIG. 8 Electron microscopical examination of an *Anisakis* larva that was incubated with 10% perilla leaves for 24h. Note the cell fragment is composed of organelle-free cytoplasm, normal plasma membrane and basal lamina (arrow). Magnification: $\times 2700$

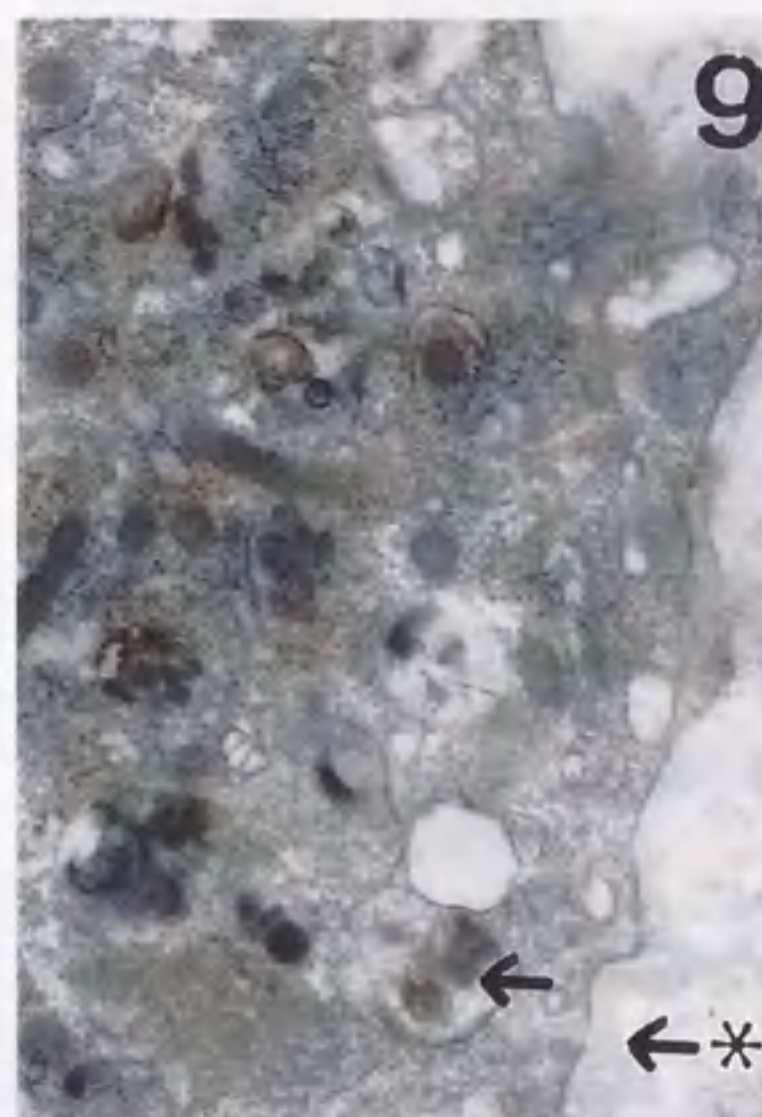


FIG. 9 Electron microscopical examination of an *Anisakis* larva that was incubated with 10% perilla leaves for 24h. Note the secondary lysosome (arrow) in the cytoplasm and the basal lamina surrounding the cell fragments (arrow *). Magnification: $\times 15750$



FIG. 10 Microscopical observation ($\times 20$) of an *Anisakis* larva that was incubated with $62.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ [6]-shogaol for 24h. Note the disturbances of cuticle (arrow).

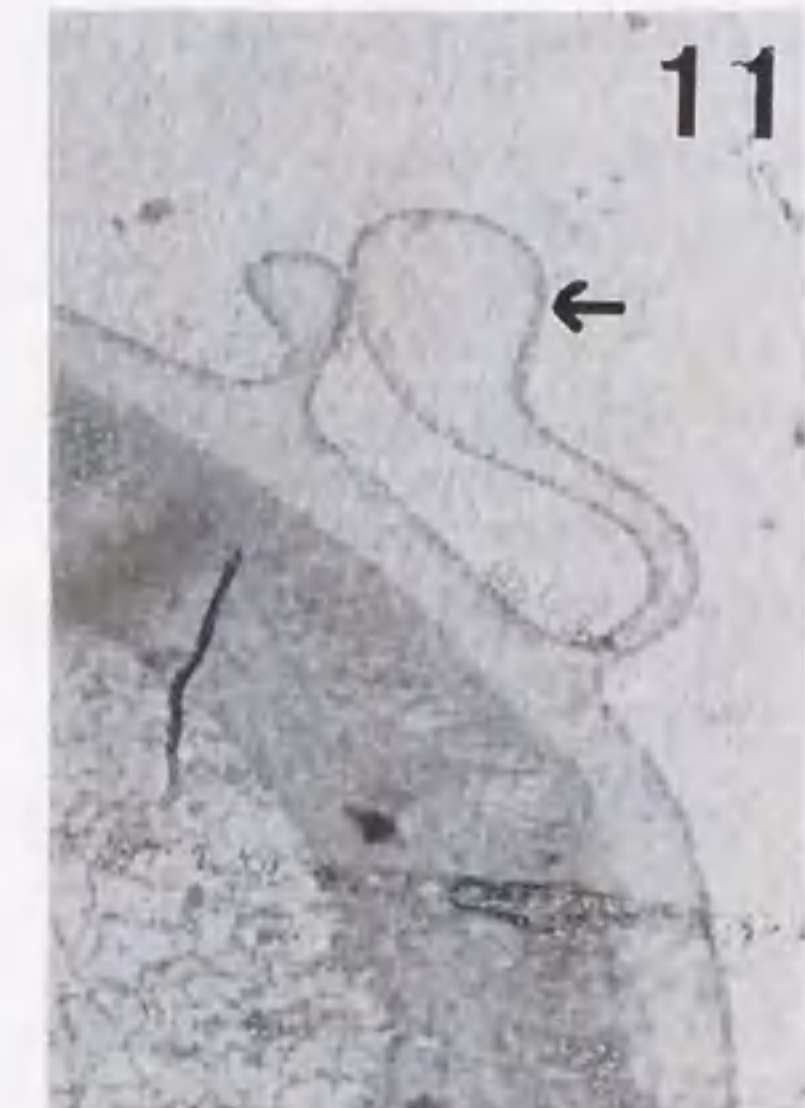


FIG. 11 Microscopical observation ($\times 50$) of an *Anisakis* larva that was incubated with 20% ginger rhizomes for 16h. Note the disturbances of cuticle (arrow).

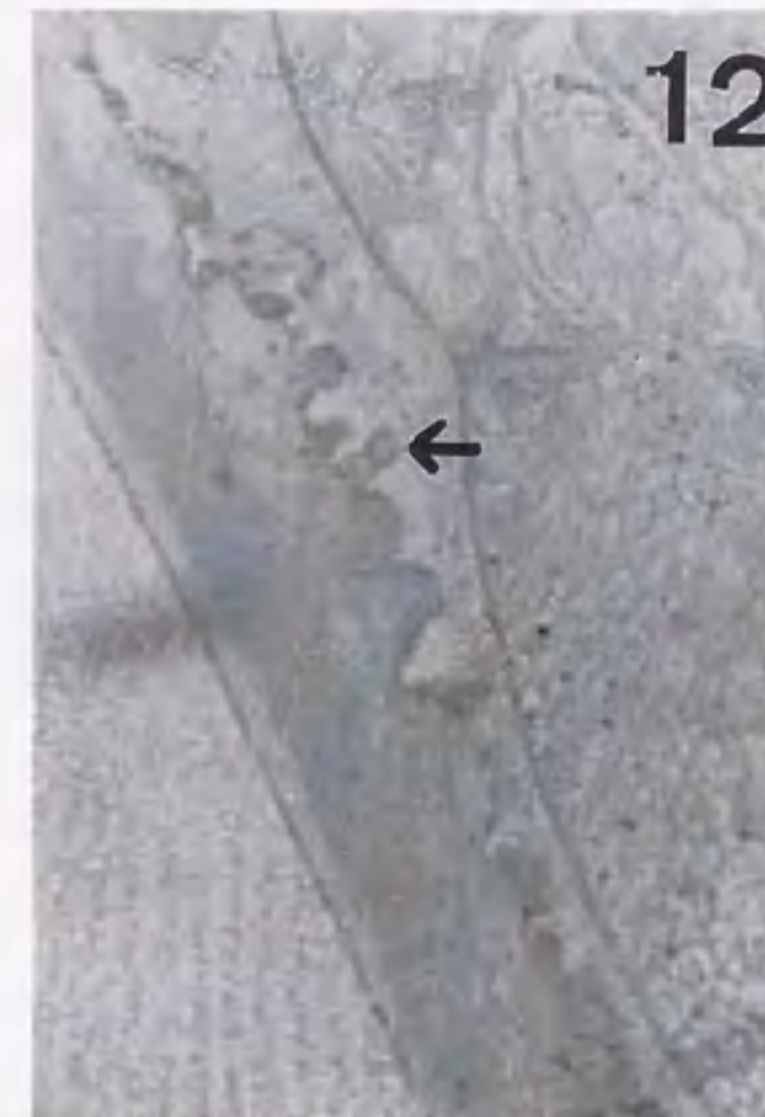


FIG. 12 Microscopical observation ($\times 50$) of an *Anisakis* larva that was incubated with $31.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ [6]-shogaol for 16h. Note the protuberance of a muscle cell (arrow).

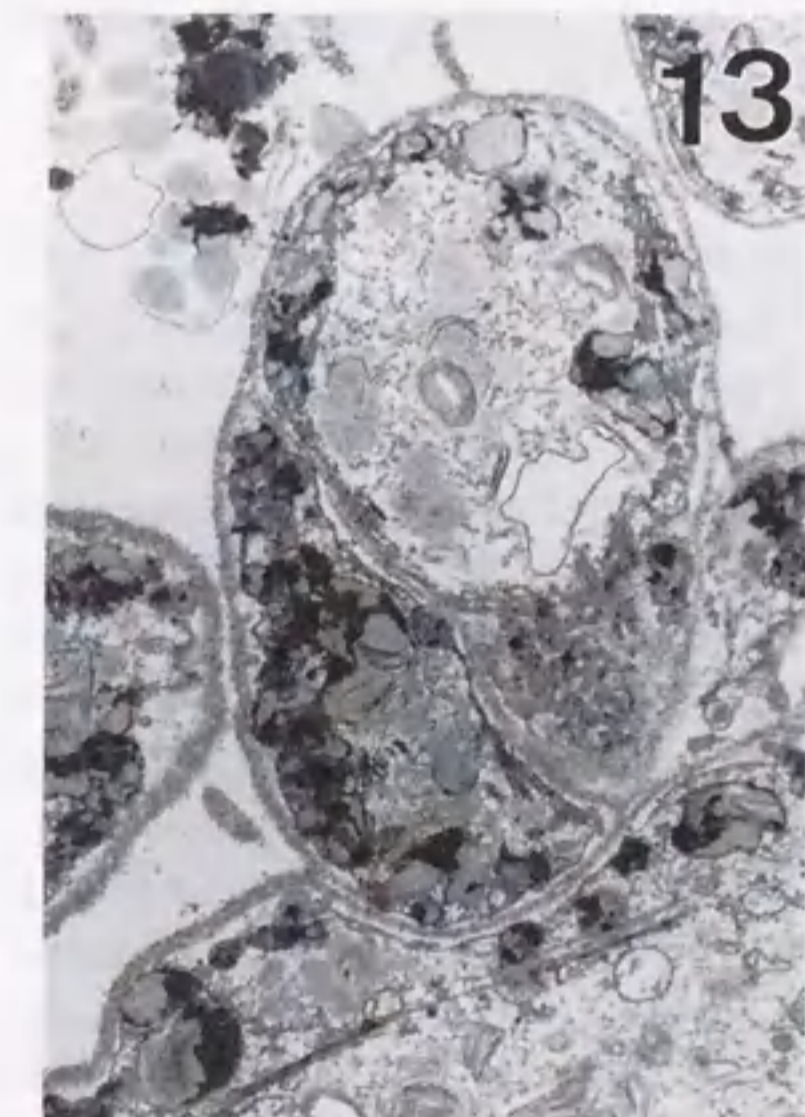


FIG. 13 Electron microscopical examination of an *Anisakis* larva that were incubated with $31.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ [6]-shogaol for 16h. Note the presence of protuberance of a muscle cell. Magnification: $\times 4050$

ソの抽出物には、精油成分 perillaldehyde など多くの成分が含まれている¹⁷⁾。その精油成分の含有量は、シソよりアオジソに多く含まれており¹⁸⁾、また、アオジソは料理の薬味として特に魚介類と共に多用されている。今回、精油成分を多く含むアオジソについて検討し、知られて

いない薬理作用としての抗線虫作用を確認し、追加できた。

アオジソ抽出物成分をpHによる解離性を利用して分離したところ、中性物質あるいは、フェノール性物質の多く含まれるフラクション1に、アニサキス幼虫の殺虫作

TABLE 6 Lethal efficacy of authentic compounds on *Toxocara canis* in vitro

Compound	Dose ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
	200	100	50	25	12.5
perillaldehyde	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	55.5 \pm 3.3
[6]-shogaol	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 0

The number represents the percentage of dead worms. The date represent the mean \pm SE of 3 experiments. Control is 52.3 \pm 4.4%.

TABLE 7 Lethal efficacy of authentic compounds on *Toxocara canis* with subcutaneous injection in mouse

Compound	Dose (mg/kg)		
	30mg/kg	15mg/kg	7.5mg/kg
perillaldehyde			
brain	2.3 \pm 0.9 ¹⁾ (12.0 \pm 2.1)	11.8 \pm 0.7 (14.0 \pm 5.7)	ND
muscle	0.3 \pm 0.3 (1.8 \pm 0.8)	2.3 \pm 0.8 (1.3 \pm 0.5)	ND
[6]-shogaol			
brain	ND	2.0 \pm 0.4 ²⁾ (12.0 \pm 2.1)	17.0 \pm 4.5 (14.0 \pm 5.7)
muscle	ND	1.3 \pm 0.6 (1.8 \pm 0.8)	3.3 \pm 0.9 (1.3 \pm 0.5)

The number represents the number of *Toxocara canis* larvae, and the number in () represents the number of *Toxocara canis* larvae in control. The date represent the mean \pm SE of 3 experiments. ND; not done

¹⁾; P<0.01

²⁾; P<0.005

用が認められた (TABLE 1)。このフラクションは、他のフラクションより perillaldehyde を多量に含み、その濃度は、7.3 mg/mL であった (TABLE 2)。最小致死濃度に当たるフラクション 1 の 1% 溶液における perillaldehyde の濃度は、73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる。一方、純品の perillaldehyde を用いたアニサキス幼虫の最小致死濃度は、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では、42.5% の致死率しか示さなかった (TABLE 5)。このことから、アオシソの殺虫能を perillaldehyde のみでは説明できない。未知の成分の関与も否定できない。

Perillaldehyde は、マウスでヘキソバルビタールの睡眠延長作用、ネコの喉頭の反射の抑制作用、カエル坐骨神経繊維の活動電位の抑制作用などの神経系に対する薬理作用¹⁷⁾が知られている。今回、パモ酸ピランテルなどの抗線虫薬に抵抗性を示す内臓移動性の幼線虫に対しても抗線虫作用が確認できたことより、線虫の神経系への作用に興味を持たれる。

ショウガも、古くから漢方薬の一剤として使われており、生姜 (ショウキョウ)、乾生姜 (カンショウキョウ)、乾姜 (カンキョウ) と呼ばれている。ショウガは、鎮痛、去痰、鎮咳、解熱などの作用があり、また、消化管内における食物や水の停滞などの治療に用いられる¹⁸⁾。ショウガの薬効成分は、よく調べられており、essential oil¹⁹⁾、zingiberol¹⁹⁾、zingiberone¹⁹⁾、zingiberene¹⁹⁾、そして、辛味成分の [6]-gingerol¹⁹⁾、[6]-shogaol²⁰⁾ などに関する

報告が多い。今までの報告では、これらの成分に抗線虫作用の記述はなかった。ショウガ抽出物成分も、pH による解離性を利用した分画では、中性物質が多く含まれるフラクション 1 に殺虫作用が認められた (TABLE 3)。このフラクションの中には、[6]-shogaol が 0.51 mg/mL 含まれている (TABLE 4)。最小致死濃度に当たるフラクション 1 の 1% 溶液における [6]-shogaol の濃度は、5.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる。一方、純品の [6]-shogaol を用いたアニサキス幼虫の最小致死濃度は、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度では、その殺虫効果は完全に消失する。したがって、ショウガのアニサキス幼虫殺虫能を [6]-shogaol で説明するには、はるかに量的に及ばない。この点に関してはずで、フラクション 1 の中に殺虫効果を示す [6]-gingerol が、10.84 mg/mL 存在し、[6]-shogaol と [6]-gingerol とともにこれらの濃度ではアニサキス幼虫を完全に殺虫せしめないが、両成分の相乗作用により、完全にアニサキス幼虫を殺虫することを証明した²¹⁾。[6]-shogaol は、ショウガを長期保存すると gingerol 類から、生成する人工産物といわれている²²⁾。[6]-shogaol は [6]-gingerol に比べ殺虫作用も強く²¹⁾、毒性が少ない²³⁾。さらに、[6]-gingerol には、変異原性があるとの報告²⁴⁾があり、[6]-shogaol が抗線虫剤としてより有望であると考え、次のステップから [6]-shogaol を選んだ。

Perillaldehyde (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と [6]-shogaol (62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) はともに、8 時間程度でアニサキス幼虫の自発運動

を消失させるが、殺虫までには、24 時間を要した (FIG. 4, 5)。こうした運動消失、死亡の機序を理解するために虫体の病理的变化を観察した。

アオシソ抽出物または perillaldehyde 溶液では、ヘモリンフが存在する偽体腔に小円形を呈している細胞成分が多数存在している (FIG. 6, 7)。通常、偽体腔には細胞成分は存在しない。また、細胞成分の大きさは、約 8 μm 程度であり、その細胞質の超微形態像は良く保持されて、変性像は見られていない。この遊離細胞片は、細胞膜および基底膜によって囲まれ、その基底膜は、側索の細胞の基底膜と同様の形態を示している。細胞質の中には、2 次性のライソゾームが多くみられ、活発な消化をしていると推察される (FIG. 8, 9)。また、この細胞は、体壁から分かれたと言うよりもむしろ側索の細胞又は、レネット細胞から分かれたものであろうと思われる。

一般に細胞が軽度の障害を受けた時、変性したタンパクなどはライソゾームで消化後除去される事が知られている。細胞が重い障害を受けた場合、ネクローシスやアポトーシスにより細胞は死滅する。その中間の障害の場合、変性した細胞内器を細胞膜が取り囲んだまま放出される事が明らかにされている²⁵⁾⁻²⁷⁾。今回観察された遊離の細胞片も障害を受け、修復不能となった小器官が細胞質から放出されたものと思われる。しかしながら、今回の観察のように基底膜を伴った細胞膜が細胞内小器官と共に放出される報告は過去になく、この意味できわめて特異な現象であると言える。アオシソ抽出物または perillaldehyde が、アニサキス幼虫に対して急激な細胞死に至らしめる事なく、穏やかな組織障害物質として作用するものと思われる。この事より、自発運動停止が早い時間より起こり、不可逆的な運動停止に進行するものと推察される。一方、神経系への作用を示唆する形態的变化は確認できなかった。

また、ショウガ抽出液または [6]-shogaol 溶液では、虫体の後部にクチャラの変化がみられる (FIG. 10, 11)。クチャラは、外部からの攻撃から、身を守り、虫体の恒常性を保つために必要である。[6]-shogaol が、直接、クチャラに浸透するとは考え難く、肛門から消化管内に入り、虫体内から作用したものと考えられる²¹⁾。また、[6]-shogaol 31, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の溶液で、筋肉細胞の一部が体腔に向かって異常に突出している像が観察されたが、その細胞質の超微形態像は良く保存されている (FIG. 12, 13)。これらの形態変化から、ショウガ抽出物または [6]-shogaol は、徐々にアニサキス幼虫を死に至らしめるのであろうと推察される。

Perillaldehyde と [6]-shogaol の *in vitro* での殺幼線虫作用は、犬蛔虫幼虫に対しても認められた (TABLE 6)。犬蛔虫症はアニサキス症同様決定的な治療薬を欠く幼線虫移行症であり、両成分による治療薬は大きな意義があるものと思われる。犬蛔虫幼虫包蔵卵をマウスに経口感染させた場合、2 日目から肝臓に、4 日目から筋、脳から検出される²⁸⁾。それゆえに、今回の実験では、組織

への移行性が良い DBA/2 マウス²⁹⁾ に犬蛔虫包蔵卵を経口投与し、感染が成立したと思われる 3 日目から、perillaldehyde または [6]-shogaol を皮下投与した。Perillaldehyde 30 mg/kg と [6]-shogaol 15 mg/kg とともに犬蛔虫幼虫の脳への移行を著明に阻止した (TABLE 7)。このことより、[6]-shogaol は、perillaldehyde に比べ低濃度での治療効果が期待された。しかし、完全に犬蛔虫幼虫の脳への移行を阻止出来なかったことは、投与量の問題と同時に、blood-brain barrier の通過の問題もあり、今後の課題と言える。また、perillaldehyde または [6]-shogaol を経口投与で同様の実験を行ったところ、perillaldehyde 125 mg/kg または [6]-shogaol 60 mg/kg の投与量において犬蛔虫幼虫の脳への移行を著明に阻止した (未発表データ)。したがって、犬蛔虫症の経口投与による治療も有望と考えられた。現在、犬蛔虫症の治療は、フィテリル治療剤であるジエチルカルバマジンの経口投与や抗線虫薬のメベンダゾール等の投与が試みられているが、治療効果には疑問も多い。一方、マウスの経口投与で、perillaldehyde の LD₅₀ 値は、1 g/kg 以上³⁰⁾、[6]-shogaol の LD₅₀ 値は、687 mg/kg²³⁾ と毒性も少なく、両薬剤は、今後、抗幼線虫治療剤として注目されるものと思われる。

結 語

アオシソ抽出物とショウガ抽出物の抗線虫作用を検討した結果、以下の結論を得た。

1. アオシソまたはショウガ抽出物を pH による解離性を利用して分離したところ、両剤とも中性物質の多く含まれるフラクションにアニサキス幼虫への殺虫効果が見られた。
2. アニサキス幼虫の殺虫作用は、主に、アオシソでは perillaldehyde、ショウガでは [6]-shogaol である。その最小致死濃度は、perillaldehyde では 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、[6]-shogaol では 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。
3. Perillaldehyde のアニサキス幼虫に対する初期の形態的变化は、ヘモリンフが存在する偽体腔に遊離細胞片を放出する事であり、[6]-shogaol では、クチャラの突起形成である。
4. *in vitro* における犬蛔虫幼虫への殺虫濃度は、perillaldehyde では 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、[6]-shogaol は 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でも完全に死にせしめた。
5. マウスに対する犬蛔虫感染実験では、perillaldehyde 30 mg/kg または [6]-shogaol 15 mg/kg の皮下投与において、マウスの脳への幼虫移行数を対照と比べ有意に減少させた。

本論文の要旨は、日本薬学会第 109 年会および第 50 回日本寄生虫学会西日本支部大会において発表した。

文 献

- 1) Van Thiel PH, Kuipers FC, Roskam RT: A

- nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop Geogr Med* 2, 97-113 (1960)
- 2) 下郷卓弥, 南洋二, 白石アンナ, 山田 健, 春日井貴雄, 辻 秀樹, 山川洋右, 岸川博隆, 靱山利雄: 内視鏡的に虫体を摘出し得た胃アニサキス症の2例. *外科診療* 28, 1607-1610 (1986)
 - 3) 坂井直司, 加藤元久, 田中千凱, 伊藤隆夫, 松村幸次郎, 大下裕夫, 野々村 修, 大岩卓明, 大友弘士: イレウス症状を呈した腸アニサキス症の1例. *岐阜市民病院年報* 6, 87-91 (1986)
 - 4) 吉村裕之: 幼虫移行症. *病理と臨床* 1, 1389(1983)
 - 5) Glickman LT, Magnaval JF, Domanski LM, Shofer FS, Lauria SS, Gottstein B, Brochier B: Visceral larva migrans in French adults: A new disease syndrome?. *Am J Epidemiol* 125, 1019-1034 (1987)
 - 6) Morris PD, Katerndahl DA: Human toxocarasis. Review with report of a probable case. *Postgrad Med* 81, 263-267 (1987)
 - 7) 伊藤孝一郎, 酒井健二, 岡嶋泰一郎, 大内和弘, 船越顕博, 西村純二, 井林 博, 辻 守康: 鶏肝や牛肝の生食により発症したと考えられる内臓幼虫移行症の3例. *日内会誌* 75, 39-46 (1986)
 - 8) 粕谷志郎, 後藤千寿, 大友弘士: アニサキス症の予防の試み-殺虫効果のある食品のスクリーニング. *感染症学雑誌* 62, 1152-1156 (1988)
 - 9) Williams JF, Soulsby EJJ: Antigenic analysis of developmental stages of *Ascaris suum* I. Comparison of eggs, larvae and adults. *Exp Parasitol* 27, 150-162 (1970)
 - 10) 稲垣 勲: 精油(植物揮発油). *植物化学*. 4版. 稲垣 勲 編, 東京, 医歯薬出版, 1972. 237-289
 - 11) 近藤力王至, 小泉 勤, 坪内宣之, 大西義博, 吉村裕之: 実験的移行性幼線虫症の研究(3) 犬蛔虫幼虫感染家兎の抗体価の推移. *寄生虫学雑誌* 30, 549-556 (1981)
 - 12) 菅谷愛子, 津田 整, 小渕 忠: 蘇葉の薬理学的研究(第1報) 水性エキスおよびPerillaldehydeの神経系に対する作用. *薬学雑誌* 101, 642-648 (1981)
 - 13) Nikaido T, Ohmoto T, Noguchi H, Kinoshita T, Saitoh H, Sankawa U: Inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase in medicinal plants. *Planta Medica* 43, 18-23 (1981)
 - 14) 岡崎寛蔵, 加藤 宏, 若田部武男: 高等植物の抗菌性(第6報) 生薬類の抗菌性(第2報). *薬学雑誌* 71, 1-5 (1951)
 - 15) 本多義昭, 古賀健二郎, 肥塚靖彦, 田端 守: シソの抗白癩菌作用成分について. *生薬学雑誌* 38, 127-130 (1984)
 - 16) 日野五七郎, 一色直太郎: 唇形科. 最新和漢薬物学. 3版. 日野五七郎, 一色直太郎 編, 大阪, 同濟堂書房, 1918. 351-363
 - 17) 伊藤 宏: 蘇葉の研究(第2報) イソエゴマクエトンについて. *薬学雑誌* 84, 1123-1125 (1964)
 - 18) 菅谷愛子: 蘇葉の薬理. *漢方医学* 8, 1-2 (1984)
 - 19) 赤松金芳: 単子葉植物. 新訂和漢薬. 赤松金芳 編, 東京, 医歯薬出版, 1970. 540-654
 - 20) Connell DW, Sutherland MD: A reexamination of gingerol, shogaol and zingerone, the pungent principles of ginger (*Zingiber officinale*). *Aust J Chem* 252, 1033-1043 (1969)
 - 21) Goto C, Kasuya S, Koga K, Ohtomo H, Kagei N: Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6] gingerol in *Anisakis* larvae *in vitro*. *Parasitol Res* 76, 653-656 (1990)
 - 22) Narasimhan S, Govindarajan VS: Evaluation of spices and oleoresin-VI-pungency of the ginger components, gingerol and shogaol and their quality. *J Food Technol* 13, 31-36(1978)
 - 23) Suekawa M, Ishige A, Yuasa K, Sudo K, Aburada M, Hosoya E: Pharmacological studies on ginger. I. Pharmacological actions of pungent constituents, [6]-gingerol and [6]-shogaol. *J Pharm Dyn* 7, 836-848 (1984)
 - 24) Nakamura H, Yamamoto T: Mutagen and anti-mutagen in ginger. *Zingiber officinale*. *Mutat Res* 103, 119-126 (1982)
 - 25) Mahrle G: Domain turnover of junctional membrane areas in the epidermis. *Arch Dermatol Res* 274, 93-99 (1982)
 - 26) Macadam RF: Fine structural demonstration of cytoplasmic protrusions (Filopodia) in Trypanosomes. *Experimental Parasitology* 27, 1-8 (1970)
 - 27) Ito Y, Furuya M, Oka M, Osaki H, Aikawa M: Transmission and scanning electron microscopic studies of the micronemata of *Trypanosoma gambiense*. *J Protozool* 28, 313-316 (1981)
 - 28) 近藤力王至: 移行性幼線虫症の実験的研究. *京府医大誌* 79, 32-56 (1970)
 - 29) Koizumi T Hayakawa J: Mouse strain difference in visceral larva migrans of *Toxocara canis*. *Exp Anim* 33, 291-295 (1984)
 - 30) Honda G, Koezuka Y, Kamisako W, Tabata M: Isolation of sedative principles from *Perilla frutescens*. *Chem Pharm Bull* 34, 1672-1677(1986)

