

Babesia gibsoni : 実験感染犬に対する レバミゾールの免疫増強効果

高橋清志*・其田三夫*・黒沢 隆*

Immunopotentiating Effect of Levamisole in Dogs Experimentally Infected with *Babesia gibsoni*

Kiyoshi TAKAHASHI*, Mitsuo SONODA*
and Takashi KUROSAWA*

(May, 1981)

レバミゾールは、元来線虫の駆虫薬であるが1971年 Renoux and Renoux によって、本剤に免疫増強作用のあることが発表されて以来、人医界で免疫不全症、各種感染症および腫瘍の補助療法⁷⁾として使用されてきた。最近獣医学領域でも慢性乳房炎^{4),5),11)}やマレック病³⁾に応用し効果が認められている。また原虫性疾患でもニワトリコクシジウム²⁾および牛のタイレリア病¹⁾について効果が検討されているが、犬の *Babesia* 病に用いた報告はない。そこで、犬 *Babesia* 病に対するレバミゾールの免疫増強効果について以下の検討を行った。

供試材料および実験方法

1. 供試薬物

レバミゾールは、Fig. 1 のような構造式を持ち、安定な白色結晶である。水に容易に溶解し、酸性で安定である。アルカリ溶液では、加水分解されて thiazole ring が開環して水に不溶な OMPI (L-2-oxo-3-[2-mercapto ethyl]-5-phenylimidazolidine)-on となる。レバミゾールは経口投与により消化管からすみやかに吸収され、全身の組織に広く分布するが、血中の半減期は約4時間である。本実験では、少量の水に溶解直後 7.5 mg/kg 宛経口投与した。

2. 実験犬および方法

1) 実験1: 供試犬およびレバミゾール投与法の概要を Table 1 に示した。8~14 kg の

* 獣医学科、家畜内科学教室

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Veterinary Medicine, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, 069-01, Japan.

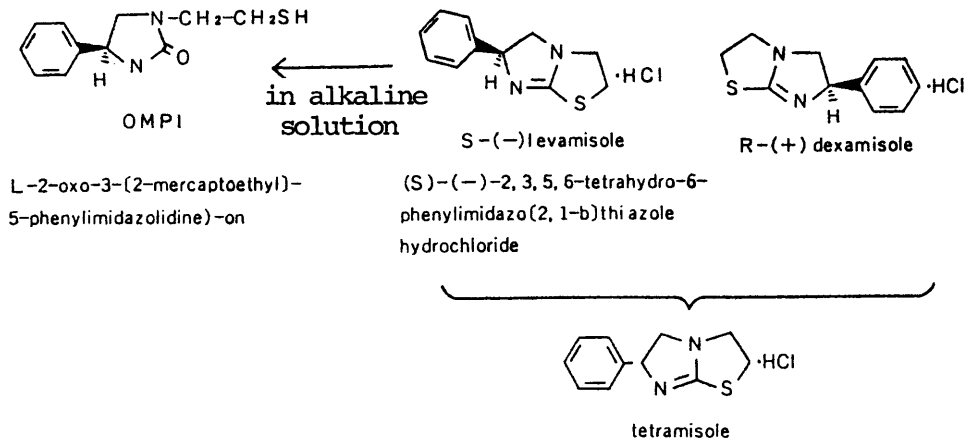


Fig. 1. Structural formula of levamisole, tetramisole and OMPI.

Table 1. Experimental animals, dose and period of medication by levamisole (Experiment 1)

Group	No.	Sex	Body weight (kg)		Administration of levamisole 7.5 mg/kg/day	
			Start of experiment	End of experiment	Total dose (mg)	Period of administration (days after inoculation)
1	1	Female	10	7	37.5	1~8
	2	Male	14	10	52.5	1~8
2	3	Male	10	8	37.5	8~16
	4	Male	10	7	37.5	8~16
3	5	Male	8	.	30.0	16~24
	6	Male	10	7	37.5	16~24
4	7	Male	8	.	0	.
	8	Male	14	12	0	.
5	9	Male	10	.	37.5	1~8
	10	Female	9	.	33.8	1~8

Except for group 5, 5×10^8 of parasitized erythrocytes per kg were inoculated I.V.

雑種犬 10 例を 2 例ずつ 5 群に分け、第 1~第 4 群に *Babesia gibsoni* 寄生赤血球 10^8 /kg 個静脈内に接種した。レバミゾールは、7.5 mg/kg 宛内服により 1 日間隔で 5 回投与した。投与時期を第 1 群は接種日から 8 日間、第 2 群は 8~16 日および第 3 群は 16~24 日とした。第 5 群は対照として *Babesia* 接種のみで、第 5 群は無処置対照とした。

各群は接種後 33 日まで、一般臨床検査、原虫寄生度、赤血球容積、血清 γ -グロブリン量、リンパ球数および抗体価の推移を観察した。各測定法は、以下の通りである。原虫寄生度は血液のギムザ染色標本より算出し、赤血球容積は毛細管法、血清 γ -グロブリン量は屈折法により血清総蛋白を求め、セルローズアセテート膜電気泳動法によって得た分画の比率

Table 2. Summary of experimental animals (Experiment 2)

Group	No.	sex	Body weight (kg)			Spleen/Body weight (%)
			Start of experiment	End of experiment		
1	1	Male	9.0	6.5	†	1.7
	2	Male	8.0	7.5	†	1.3
	3	Male	9.6	7.5	†	2.1
	4	Female	11.0	8.5	†	2.0
	5	Male	12.5	12.0	†	2.0
	Mean			10.0±1.7	8.4±2.1	
2	6	Female	9.4	7.5	†	2.9
	7	Male	9.5	7.5	†	2.8
	8	Female	14.8	12.5	†	1.8
	9	Male	9.0	9.0	† (22 day)	1.6
	10	Male	8.8	6.5	† (30 day)	1.4
	Mean			10.3±2.5	8.6±2.4	
3	11	Female	8.5	8.5	†	0.3
	12	Female	9.0	9.0	†	0.4

Group 1 and 2: 10^8 of parasitized erythrocytes per kg were inoculated I.V.

Group 1 and No. 11: 7.5 mg/kg levamisole administered 5 time from 8 to 16 days after inoculation.

No. 12: Intact.

†: Sacrificed 30 days after inoculation.

†: death.

から算出した。リンパ球数は、白血球総数および白血球百分比から算出し、抗体価は蛍光球体間接法により測定⁸⁾した。

2) 実験2: 供試犬およびレバミゾール投与法の概要を Table 2 に示した。8.0~14.8 kg の雑種犬 12 例を使用し、このうち 10 例を 5 例ずつ 2 群に分け、第 1 群には *B. gibsoni* 寄生赤血球を 1 頭当り 10^8 個宛静脈内接種、8 日目から、1 日間隔でレバミゾールを 7.5 mg/kg ずつ 5 回経口投与した。第 2 群は第 1 群と同一方法で原虫接種のみ、第 3 群の 1 例は第 1 群と同一条件でレバミゾールのみ投与し、他の 1 例は無処置対照とした。

全例について接種第 30 日まで体重、食欲、体温、原虫寄生度、赤血球数、赤血球容積、ヘモグロビン量およびリンパ球数について観察した。赤血球数は、コールターカウンターで、またヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビン法でそれぞれ測定し、その他は実験 1 と同一方法で測定した。

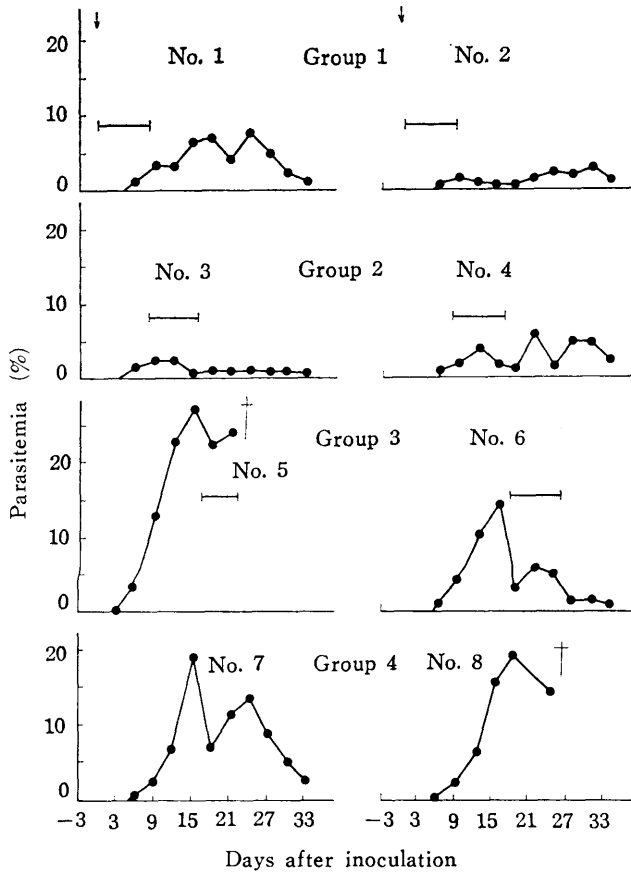
実験成績

1. 実験 1

1) 生存率: 各群の転帰は、Table 1 表に示すように第3群で1例、第4群で1例死亡したが他は全て回復した。

2) 臨床症状の変化: 体温は投与群と非投与群との間で差は認められなかった。食欲は第1, 第2および第5群では全期間正常であり、第3群および第4群では、食欲の減退および廃絶があり、群間に差が認められた。可視粘膜の貧血所見は、第5群(対照群)の2例を除き全例に認められたが、第2群は他の群に比較して軽度であった。

3) *Babesia* 原虫の寄生度の変化: 第1群および第2群は、いずれも10%以下で推移



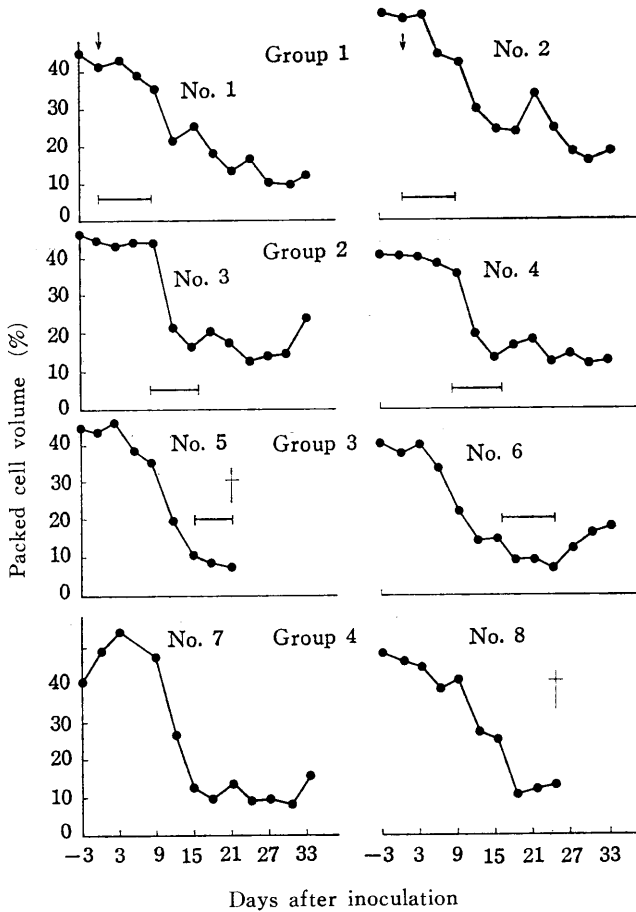
↓ : Intravenous injection 10⁸/kg of parasitized erythrocytes.
 ━━━ : Duration of medication by levamisole.

Fig. 2. Changes of severity of the parasitemia.

したのに対し、第3群および第4群では、15~34%と高い寄生度であった (Fig. 2.)。

4) 赤血球容積の変化: 各群によって異った変動が観察された。すなわち第1群は第4群に比べて、ヘマトクリット値の低下が緩慢で、第4群の最低値が接種後第18日目であったのに対して第1群のそれは、接種後第30日と遅延した。第2群では、レバミゾール投与初期急速に低下したが、投与終了後一時回復傾向が見られ、最低値も10%以下にはならなかった。第3群では、投与開始時すでに10%前後の貧血極期で、投薬後に貧血は進行し、1例 (No. 5) は死亡したが、生存した他の1例 (No. 6) はその後回復傾向が見られた (Fig. 3)。

5) 抗体価の変化: 第1群では、漸次上昇傾向が、第2群では投与直後から急速に上昇



↓ : Intravenous injection 10^8 /kg of parasitized erythrocytes.
 — : Duration of medication by levamisole.

Fig. 3. Changes of packed cell volume.

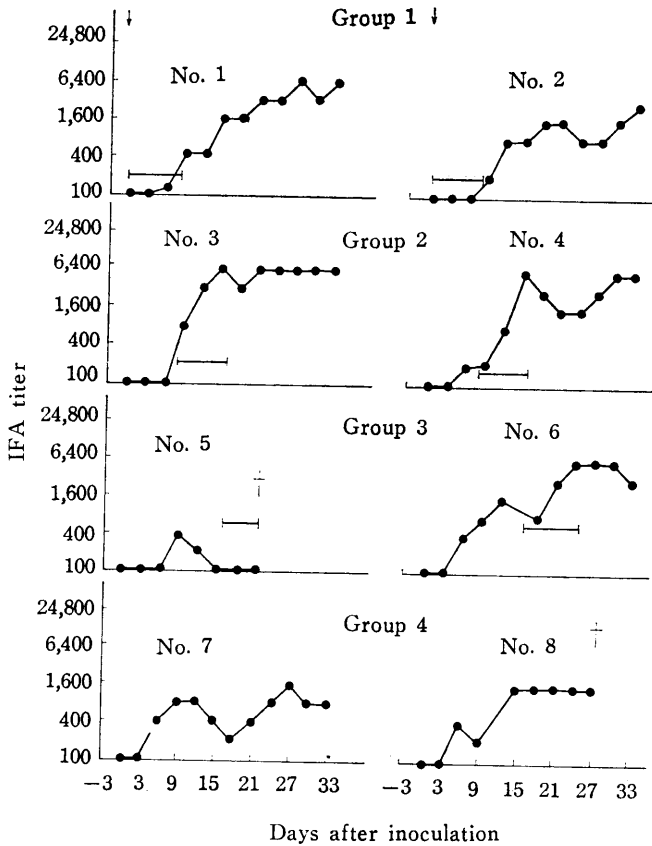
した。第3群では死亡した1例(No. 5)は抗体産生反応が極めて弱かったのに反し、回復した他の1例(No. 6)では抗体価の急激な上昇が認められた。第4群は生存したいずれのレバミゾール投与群よりも抗体価は低かった(Fig. 4)。

6) 血清 γ -グロブリンの変化: γ -グロブリン量は、パペシア接種犬の全例で上昇傾向を示した。第1群では2例中の1例(No. 2), 第2群では2例とも, 第3群では生存した1例(No. 6)で第4群に比較して著明な γ -グロブリンの上昇傾向が認められた(Fig. 5)。

7) リンパ球数の変化: リンパ球数の変動は、各群で特に一定の傾向は認められなかった。

2. 実験2

1) 生存率: 各群の転帰は、Table 2 に示すように、対照の第2群で接種後第30日目



↓: Intravenous injection 10^8 /kg of parasitized erythrocytes.
 ━: Duration of medication by levamisole.

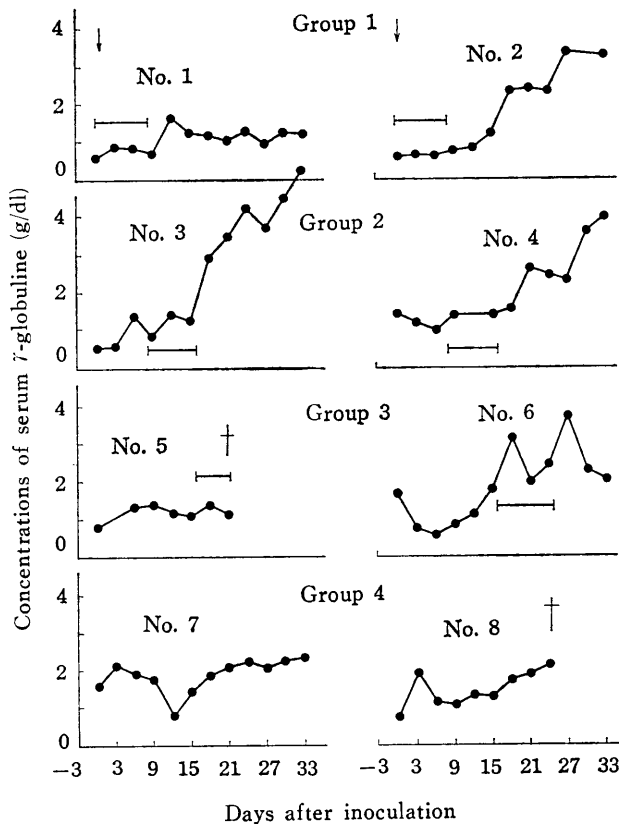
Fig. 4. Changes of the antibody titer.

に2頭死亡(40%)したが、レバミゾールを投与した第1群および第3群では死亡せず全て回復した。

2) 体重: 第1群は平均1.6 kg および第2群1.7 kg の減少で両群に差はなかった。また, Nos. 11 および 12 の体重に変化はなかった。*Babesia* 接種犬の脾臓の体重比は, 対照(非接種犬)の約5倍に上昇していたが, 第1および第2群では差が認められなかった。

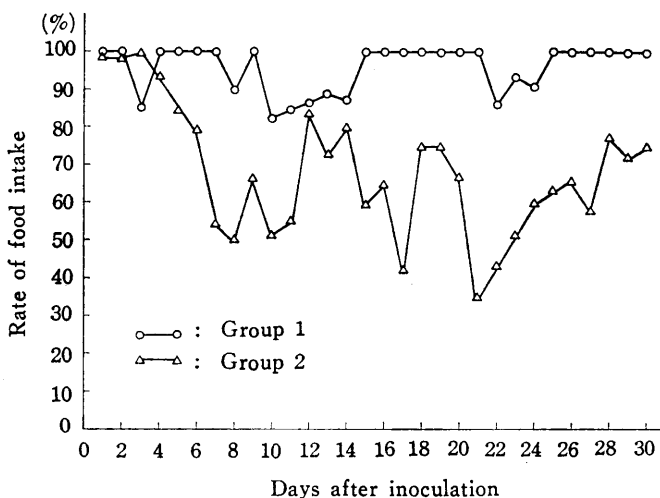
3) 食欲: Fig. 6 に示すように第1群では接種後8~14と22~24日に軽度の不振が認められた。これに対して第2群では4日後から食欲が減退し, 特に貧血が高度となった20~22日に最低となり, 以後徐々に回復した。また Fig. 6 から明らかなようにレバミゾールを投与した第1群が無投与の第2群よりも, 観察の全期間を通じて食欲は良好であった。

4) 体温: 第1群と第2群との間に差は認められなかった。



↓ : Intravenous injection 10^8 /kg of parasitized erythrocytes.
 ┆ : Duration of medication by levamisole.

Fig. 5. Changes of the γ -globulin.



Rate of food intake = $100 - \text{rest food} / \text{food (50 g/kg/day)} \times 100$

Fig. 6. Changes of food intake in experimental dogs (Experiment 2)

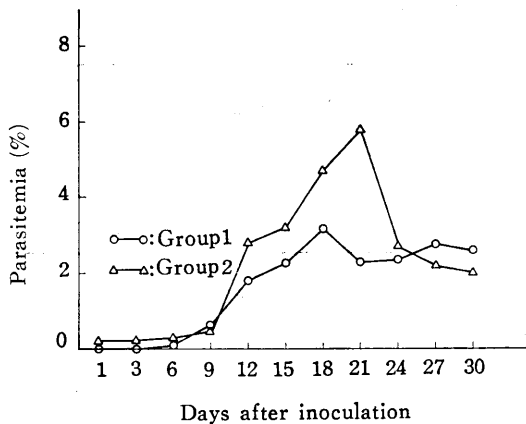


Fig. 7. Changes of parasitemia.

5) 原虫寄生度: Fig. 7 に両群の寄生率の推移を示した。すなわち, 第1群と第2群との間で大きな差はなかったが, レバミゾールを投与した第1群では第2群に比較し赤血球寄生率の上昇がゆるやかであり, 最高寄生率も低かった。

6) 赤血球数, 赤血球容積およびヘモグロビン量: 赤血球数ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の変化は同一であった。そのうち Fig. 8 に赤血球数の推移を示した。第1群および第2群とも接種後第6~18日の間に急激な減少が認められた。この急性貧血の期間中わずかではあったが, 第1群の方が第2群より減少傾向が緩徐であった。一方, 非接

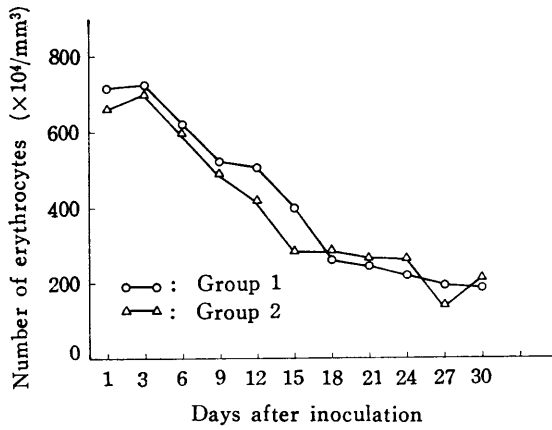


Fig. 8. Changes of erythrocytecount.

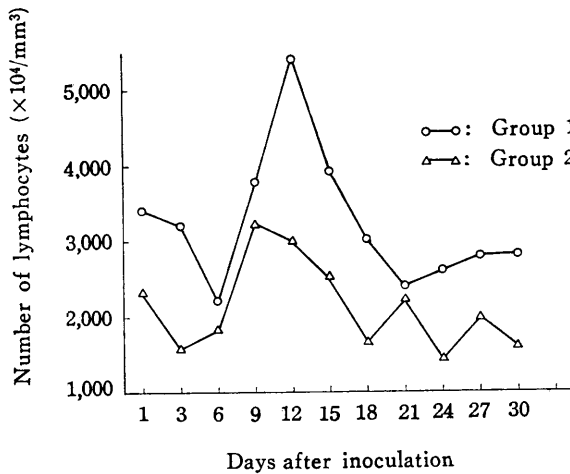


Fig. 9. Changes of numbers of lymphocyte.

種犬では、貧血は全く認められなかった。

7) リンパ球数の推移: Fig. 9 に示すように両群とも同一傾向を示した。すなわち接種3~6日後減少し、その後増加傾向がみられ、第9~12日後に最高となり、第18日後には、ほぼ正常値に復帰した。リンパ球数はレバミゾールを投与した第1群において投与期間中、第2群よりも増数した。

考 察

犬 *Babesia* 病の感染防御機序は、明らかにされていないが摘脾手術や副腎皮質ホルモン投与によって抵抗力が著しく減弱され、1度耐過した犬にも再発が起こる⁸⁾。従って脾臓に

おける食作用が *B. gibsoni* の増殖抑制に重要な役割を演じていると考えられている。一方、レバミゾールの薬理作用については最近 Symoens⁷⁾ の総説にまとめられているように、Tリンパ球、マクロファージあるいは多形核白血球に作用し、食作用、遊走性、リンホカイン産生能を正常に回復させ、生体の防御機構を正常化させることが証明されている。このため本剤は免疫能の低下時には、これを回復させるが正常機能を亢進させる作用はないと考えられている。また、マクロファージやTリンパ球活性の機序は、レバミゾールによって細胞内ペルケキナーゼが活性化されることにより、食作用が刺激されると考えられている。以上の報告から、レバミゾールの *Babesia* 感染防御の主役と考えられているマクロファージやTリンパ球の作用を正常に維持することにより、罹患犬は一過性の貧血後に速やかに回復し、強度の免疫を獲得することが推定される。そこでレバミゾールを犬 *Babesia* 病の補助療法として使用する場合、その投与時期を確立する必要がある。よってこの点について検討した結果、接種時投与では、原虫の増殖および貧血は一時期抑制されるが投与中止後は再発する傾向があった。貧血極期の投与では、効果がなく、また、原虫の増殖がはじまる直前の時期に投与した群においては、抗体価が急速に上昇し、原虫の増殖を抑制したことから、この投与時期が最も有効と考えられた。レバミゾールの作用は上述のように主として細胞性免疫の賦活化作用であると考えられているが、原虫増殖前期投与群において抗体産性反応が促進された原因として、Tリンパ球およびマクロファージの機能が活性化されることにより、抗原情報がすみやかにBリンパ球に伝達された結果と推察された。

レバミゾールを接種第8～16日目に投与した群(実験2)は、無投与群に比較して食欲良好で全例耐過したが、無投与群では5例中2例が死亡した。このことからレバミゾールは犬 *Babesia* 病に対してある程度の予防効果がうかがわれた。その機序は本試験のみでは明らかではないが、*Babesia* 感染の初期に一時的なリンパ球数の減少が観察され、これらの感染犬にレバミゾールを投与すると速やかに増数した。このような反応はレバミゾールの持つ免疫増強効果の表現と考えられ、レバミゾールの予防効果は、免疫増強作用による原虫の増殖抑制と急性貧血の阻止によると判断された。実験2の対照群中死亡した2例の経過を見ると、1例(No. 9)は接種第22日に死亡し、体重の減少もなく、急激な原虫増数に起因する急性貧血が死因と考えられた。他の1例(No. 10)は急性貧血を耐過したが、長期間食欲不振が続き消瘦著明で、死因は貧血と肝機能障害と考えられた。また、レバミゾール投与は投与時期の差なく、*Babesia* 原虫の増殖および貧血を完全に抑制することはできなかった。ヒトの各種腫瘍に対するレバミゾールの抗腫瘍効果も投与のタイミングおよび量によって不定であるが、単独投与では効果が少なく、他の療法による免疫抑制時に併用すると生存期間の延長が可能になる¹⁰⁾。犬 *Babesia* 病に対するレバミゾールの効果も同様

で単独投与によって、一時的な急性貧血の緩和および食欲亢進を惹起し一定の予防効果があると判断されたが、原虫に対する増殖抑制は弱く、治療には殺原虫剤の併用が必須であると考えられた。

要 約

犬の *Babesia gibsoni* 感染症におけるレバミゾールの免疫増強作用を検討する目的で2回の実験を実施し以下の結果を得た。

1. レバミゾールの投与時期は、*Babesia* 感染の初期 (8~16日の期間) で貧血発現前が最も有効であった。投与量は、7.5 mg/kg を経口的に、隔日5回投与したが副作用は認められなかった。

2. レバミゾールを *Babesia* の感染初期に投与すると、リンパ球の増数および抗体産生を促進し、投与期間中原虫の増殖および貧血が軽減された。しかし、原虫の増殖および貧血を完全に防止することはできなかった。

3. レバミゾール投与により、高度貧血時においても食欲の低下が防止できた。

4. 健康雑種犬に *Babesia* 寄生赤血球を 10^8 /kg 個静脈内に接種したところ。レバミゾール投与犬では全例回復したが、非投与犬では40%の死亡率であった。

本研究の実施にあたり、レバミゾールの提供をいただいた日本レダリー株式会社に深謝する。

文 献

- 1) 藤田壽吉・石井俊雄・太田 実・星 重義・南 哲郎・西岡昌光・安梅陽三・小松重栄・竹本巖・田村儀一, 1979. 非特異免疫による牛ピロプラズマ病の発症予防試験 (予報). 第88回日本獣医学会講演要旨, 162.
- 2) 石井俊雄・大永博資・小山文雄・藤田壽吉, 1980. 非特異免疫による鶏コクソンジウム症の発症予防試験 (予報). 第89回日本獣医学会講演要旨, 89.
- 3) Kodama, H., Mikami, T. and Izawa, H. 1980. Effect of levamisole on Marek's disease. J.N.C.I. 65: 155-159.
- 4) 小野寺強・塚本俊一・久米常夫, 1980. 塩酸レバミゾールによる牛慢性乳房炎の治療試験. 日獣会誌, 33: 375-378.
- 5) Ovadia, H., Flesh, J. and Nelken, D. 1978. Prevention of bovine mastitis by treatment with levamisole. Israel. J. Med. Sci., 14: 394-396.
- 6) Renoux, G. and Renoux, M. 1973. Stimulation of anti-brucella vaccination in mice by tetramisole, a phenyl-Imidothiazole salt. Infect. Immun., 8: 544-548.
- 7) Symoens, J. and Rosenthal, M., 1977. Levamisole in the modulation of the immune response the current experimental and clinical state. J. Ret. Soc., 21: 175-221.
- 8) 田村 孝・高橋清志・其田三夫・小岩政照・長崎和信, 1979. *Babesia gibsoni* 感染犬における免疫抑制処置の影響. 酪農学園大学紀要, 8: 89-98.

- 9) Tamura, T., Takahashi, K., Sonoda, M. and Koiwa, M. 1980. The indirect fluorescent antibody test as a method for detecting antibody in dogs infected with *Babesia gibsoni*. J. Coll. Dairying. 8: 249-256.
- 10) 蝶良英郎, 1980. Levamisole 一駆虫薬から免疫調節剤への展開一, 感染, 炎症, 免疫. 10: 15-27.
- 11) 吉田康幸・佐藤輝夫・高桑一雄・浜名張彦・渡辺正基, 1981. レバミゾールによる牛慢性乳房炎の治療試験. 獣医畜産新報, 715: 10-14.

Summary

This experiment was carried out to determine immunopotentiating effect of levamisole in dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*.

1. The most favorable time of levamisole-treatment for immunopotentiating effects was in the early experimental stage at about 8-16 days after inoculation. By the oral administration of 7.5 mg/kg for 8 dogs, no side effects were observed in all experimental dogs.

2. An increase of lymphocyte in number and rapid antibody responses were occurred in the dogs administered with levamisole at the early stage of infection. Severity of anemia and proliferation of *Babesia gibsoni* were slightly inhibited by levamisole, however they were not inhibited completely the immunopotentiating effects of levamisole.

3. Anorexia in the dogs treated with levamisole was mild at the anemic stage as compared with the control.

4. The dogs inoculated intravenous with 10^8 parasitized erythrocytes of *Babesia gibsoni*, levamisole-treatment dogs out of 5 cases were all recovered from temporary severe anemia, however in the control group 2 out of 5 cases (40%) died from anemia.