

犬 *Babesia gibsoni* 感染症の分子生物学的診断, 貧血と再発の病態生理, クリンダマイシン治療

牧村 進

宮崎大学農学部家畜内科学講座

(2006年1月25日 受理)

Canine *Babesia gibsoni* Infection—Molecular Biological Diagnosis, Pathophysiology of Anemia and Relapse, and Chemotherapy with Clindamycin

Susumu MAKIMURA

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

Summary : Detection of babesia parasites on blood smear specimens from dogs of the early stage of infection, chronic stage, and babesia carrier is very difficult because of their very low parasitemia. Polymerase chain reaction (PCR) was found so highly sensitive that showed positive even on the blood of extremely low parasitemia (0.0001 %). Anemia at babesiosis is associated with the following pathophysiological process, such as the activation of phagocytes in spleen and liver, the bound of IgG to oxidatively damaged erythrocyte membrane and the phagocytosis of erythrocytes into phagocytes. Intractable babesiosis that sometimes repeats severe recurrences every several weeks shows both humoral and cellular immune suppression. Diminazene diaceturate, a specific medicine against canine babesiosis, sometimes induces severe side effect, central neurodamage and so on, so alternative safe and effective medicine is required. Thus, we examined therapeutic effect of clindamycin (CLM) on dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*. On the acute stage of infection, CLM treatment resolved anemia and other clinical findings of babesiosis. There were no significant differences between treated and untreated dogs in parasitemia levels. However, morphological changes that indicated degeneration in the majority of parasites were observed. The numbers of CD₄⁺ showed a significant increase in treated dogs, especially after treatment. On the chronic stage, either CD₄⁺ cells maintained high level both of the treated and untreated dogs. A rapid humoral antibody response was observed in treated dogs after relapses. No side effect showed during CLM treatment. CLM might be useful as a medicine for the treatment of *B. gibsoni* infection.

Key words : Dog, Babesia, Anemia, Relapse, Clindamycin-chemotherapy

はじめに

獣医学領域では、バベシア、タイレリア、コクシジウム、ロイコチトゾーン、レーシュマニア、トリパノゾーマなどの原虫による感染症は世界中

の家畜や小動物に甚大な被害を与えている。その理由は、①これら病原体は蚊やダニなどのベクターを介して動物の体内に侵入するが、地球の温暖化傾向とともにこれらのベクターの生息区域が拡大

しており撲滅することが困難であること、②一見治癒したかにみえてもその後長期間（数年から十数年）体内にキャリアーとして病原体が存在し続け、他の動物への感染源となること、③これまでにいくら駆虫薬を開発してもそれら薬剤に対する抵抗性のある原虫が出現してしまうこと、④長年にわたる世界的規模でのワクチン開発研究にもかかわらず有効なワクチンの開発がいまだ成功していないことなどがあげられよう。これら原虫病の1つであるバベシア病は、ダニを媒介とする胞子虫類のうち動物に病原性バベシア原虫が赤血球内に寄生することによって起こる疾患であり、広く世界中に存在し、また、多くの種類の哺乳動物を宿主として感染することが知られている（Böse *et al.* 1995 ; Carret *et al.* 1999 ; Kutter 1998）。バベシア症がもたらす問題には、牛や馬などの経済動物に感染することによって生じる経済的な問題のみならず、人間にも感染するズーノーシスとしても近年注目が増している（Krause 1994）。これらバベシア種のうち、犬のバベシア症の原因となる原虫は*Babesia (B.) canis*及び*B. gibsoni*の2種類である。*B. canis*は大型ピロプラズマ（ $2 \sim 4 \times 4 \sim 7 \mu\text{m}$ ）に分類され（Ristic 1988）、南部ヨーロッパ、北アメリカ、アフリカ、アジア等に分布する。*B. canis*はさらに*B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi*の3つのsubspeciesに分類される。また、それぞれの分布領域も*B. canis canis*がヨーロッパ、*B. canis vogeli*が熱帯及び亜熱帯地域、*B. canis rossi*が南アフリカとされている（Carret *et al.* 1999, Schetters *et al.* 1977）。*B. gibsoni*は小型ピロプラズマ（ $1.1 \sim 2 \times 1.2 \sim 4 \mu\text{m}$ ）に分類され、主にアフリカ、アジアが分布領域で、最も最初に報告されたのは、1910年にPattonによってインドでハウンド、ジャッカルから見出された。日本における犬の*B. gibsoni*感染症は、1925年大分県において井関による報告を最初に、その後、宮崎県（大塚他 1962）をはじめ、西日本各地で報告されている。近年、本病は、西日本のみでなく、北は青森県まで感染が拡大している（Miyata *et al.* 2005b）。また、*B. canis*感染は沖縄県のみで報告されている（Inokuma 2004 ; Oyamada *et al.* 2005）。温暖な気候地帯にある宮崎県では、周年を通じて媒介となるダニが多く生息し、*B. gibsoni*感染症は

多発している（牧村他 1990）。本総説では、バベシア病のPCR法による遺伝子診断、およびバベシア病の病態生理と治療法について概説する。

1. 犬バベシア病のPCR法による遺伝子診断

1) バベシア病における診断の重要性

犬が*B. gibsoni*に感染すると元気消失、食欲不振、発熱、粘膜蒼白、脾腫、便の色が黄色ないし橙色化などの臨床症状がみられる。西日本地域では、これらの症状をもった犬が動物病院に来院すると獣医師はまずバベシア症を疑い、血液検査を行なう。血液検査における本病の特徴は、大球性正色素性貧血、大小不同症、多染性赤血球、網状赤血球が多く見られる再生性貧血であり、血小板減少、単球増多である。しかしこれらの所見だけでは、バベシア症と他の溶血性疾患、たとえば犬でしばしばみられる自己免疫性溶血性貧血（AIHA）との鑑別ができない。両者は治療法が全く異なる。つまりバベシア病を間違えてAIHAと診断してステロイド治療するとバベシア症は悪化してしまう。したがって、獣医師はこれらの症状を示す病犬に遭遇した場合、確定診断を行う必要がある。

一般的に本病の確定診断には光学顕微鏡下での血液塗抹標本の観察によるバベシア原虫の確認が良く用いられる（Etkind *et al.* 1980 ; 並河他 1988）。この方法は簡便かつ迅速にかつ特殊な器具を必要とせず実施できるという利点がある。しかし、感染初期や急性期の臨床症状が消失してはいるものの依然としてバベシア原虫が持続的に感染し続けている慢性期や何時感染したかも不明なキャリアー犬などでは、寄生率がきわめて低く（Krause *et al.* 1998）、貧血もみられず元気で外見上非感染犬とほとんど変わらないため、血液塗抹標本の観察によって検出することはきわめて困難である。さらに、慢性感染犬やキャリアー犬では、低寄生率に加えてしばしば原虫の形態は典型的でなく、点状またはコマ状の非典型的なことが多く、原虫の確認には経験や熟練を要する。

上記の顕微鏡的観察の他に、これまで用いられた診断法に血清学的方法があり、補体結合反応、間接的蛍光抗体法や酵素免疫測定法（ELISA）などがある。しかしこれらの血清学的検査はバベシア特異抗体を検出するもので、バベシア抗原を

検出しているわけではないので, 抗体陽性イコール病原体陽性とはいえない弱点がある.

近年, いくつかのバベシア原虫では分子生物学的手法を用いた診断法が報告されている. DNAプローブを用いる方法は, 標識したプローブと被検体の血液や組織中のバベシアDNAとをハイブリダイズさせることで原虫感染を検出する方法である (Conrad *et al.* 1992). 特異性も高く, 高感度であるが, サンプル中のターゲットとなるDNA量に左右される (Böse *et al.* 1995). また, 時間的, 設備的にみてあまり実用的とはいえない. Polymerase chain reaction (PCR) 法は感染サンプルから抽出した虫体DNAを鋳型とし, プライマーを用いることにより, 目的とする遺伝子断片を特異的に増幅することでバベシア感染を検出するものである. PCR法は, ごく微量の原虫DNAからでも増幅することが可能であり, その反面, 偽陽性を示すことがあるのが欠点ではあるが (Persing 1991), 検出感度が高く, 感染初期の症例やキャリアーの検出に適している.

2) PCR法の概略と検出感度

微量血液サンプルを用いたPCR法によるバベシア診断の有効性が数多く報告されているが (Zahler *et al.* 2000; Ano *et al.* 2001a; Fukumoto *et al.* 2001; Jefferies *et al.* 2003; Inokuma *et al.* 2003). 私たちは宮崎県内で発生

した犬バベシア症の自然感染犬及び実験感染犬の血液を用いてPCR法により *B. gibsoni* の small subunit ribosomal DNA (rDNA) の部分的遺伝子断片を増幅・検出し, その検出感度を検討した. 私たちが用いたPCR法の概略を述べると, まず, 血液塗抹標本での鏡検で原虫の確認できた西日本で自然感染犬10頭および実験感染犬3頭から採取したEDTA加全血200 μ l からDNAを抽出 (フェノール・クロロホルム法あるいは市販のDNA抽出キット) した. プライマーは, データバンクに登録されている *Babesia gibsoni* の16S ribosomal RNA中の塩基配列 (Gen Bank accession No. L13729) から2つのプライマーを設計, すなわち, PIRO-F (5'-AGTCATATGCTTGTCTTA-3') と PIRO-R (5'-CCATCATTCCAATTACAA-3'), ならびに PIRO2-F (5'-ATAACCGTGCTAATTGTAGG-3') と PIRO2-R (5'-TGTTATTTCTTGTCCTACC-3') を設計し, PCRの条件 (denature 94 $^{\circ}$ C, 30 sec, annealing : 55 $^{\circ}$ C, 1 min, extension : 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min, 30サイクル) に沿って, *B. gibsoni* 16s ribosomal DNAの一部1.7 kbの断片を増幅した. PCR反応後1.0 %アガロースゲル電気泳動, エチレンブロマイド染色, PCR産物バンドの写真撮影を行なった. その結果, 最初のプライマーPIRO-FとPIRO-Rでは十分な増幅が得られなかったため, そのPCR産物を再度第二のプライマー

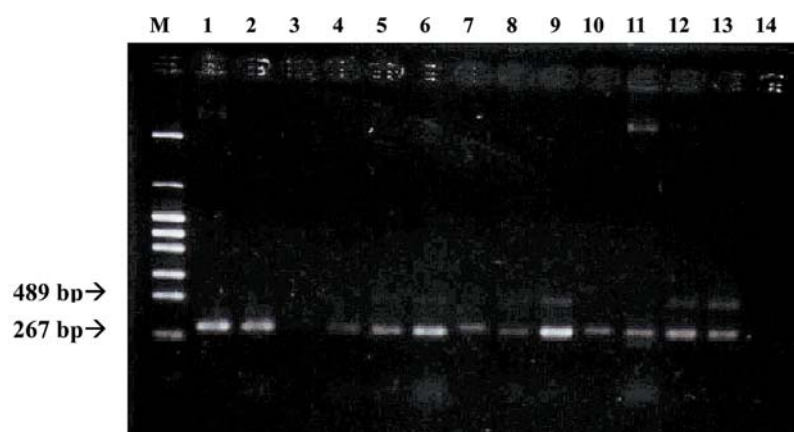


Fig. 1. The results of the nested PCR using the samples from *Babesia*-infected dog blood. Lane M is a marker. From lane 1 to lane 10 are samples from naturally infected dogs and lane 11, 12 and 13 are from experimentally infected dogs. Lane 14 is from an uninfected dog as a control. In all infected samples, a band 267 bp was visualized from the second PCR, respectively. A weak band 489 bp is a PCR-product obtained using by the first primer.

PIRP2-FPIRO2-Rで行ったところ (nested PCR), Fig. 1 に示すような明瞭な *B. gibsoni* 原虫の 16s rDNA の 489 bp と 267 bp の 2 つの断片が検出された。また、その塩基配列から宮崎県内で発症したバベシア症の原虫は従来報告されているアジア型と一致した (Ano *et al.* 2001b)。

PCR法の検出感度を検討するため、一頭の *B. gibsoni* 実験感染犬 (寄生率 1.18 %, 寄生赤血球数: $9.03 \times 10^4 / \mu\text{l}$) の EDTA 処理末梢全血を他のバベシア非感染犬の EDTA 処理末梢全血によって 10 倍ずつ段階希釈したものをそれぞれサンプルとして前述の条件で PCR を行った。その結果、0.0001 % の低寄生率でも検出可能であった。

なお、Nested PCR は実施上煩雑なので、その後、我々は、Zarler *et al.* (2000) が報告しているプライマーを用いて 1 回の PCR で十分な量の PCR 産物を検出している。

4) バベシア診断における PCR 法の有用性

PCR法の検出感度がきわめてすぐれていることから、その実施の意義として次のことが考えられる。①前述したバベシア症を疑う臨床症状と血液所見を呈する病犬が来院した場合、まずは鏡検によるバベシア原虫の確認を行なうが、もし原虫が認められなくてもバベシア症を否定することはできない。その場合、本症の確定診断のためには PCR 法は有効である。②バベシア原虫は、治療後、症状が回復しても何年にもわたって持続感染することが知られている。完全に体内から原虫が排除されたか否かを判別するため有効である。③供血犬がバベシア流行地域では知らない間にバベシアのキャリアになっている場合があり、医療行為によって (輸血など) 飼い主さんの犬にバベシアを移してしまうことになる。その危険性を回避するために PCR 法は有効である。④バベシア病は症状を示さず臨床上一見健康そうにみえてもキャリアとして原虫が体内にながく留まることから、本病の疫学的調査に PCR 法は有効である (Inokuma *et al.* 2003; Inokuma *et al.* 2004; Miyata *et al.* 2005)。

2. *B. gibsoni* 感染症の病態生理

1) バベシア病の貧血発症機序

犬 *B. gibsoni* 感染症における主たる臨床症状は (発症) は、通常、貧血 (PCV 低下) とパラジテ

ミア (血液中の原虫出現率) の増加、体温上昇 (発熱) で評価される。犬が *B. gibsoni* に感染すると、一般には感染後 1 週目あたりから貧血が認められるようになり、その後進行して、10 日から 14 日目に貧血のピークに達する。貧血症状が激しければ動物にとって危険な状態になるが、それを回避するため抗原虫薬による治療を施す。貧血はピークを過ぎるとたとえ治療をしなくても回復に向うことが多い。

バベシア病でみられる貧血の発症機序として、原虫が宿主の赤血球に侵入し、増殖することによって赤血球が破壊されるためと一般には考えられてきたが、たしかに、パラジテミアが増加して急激に原虫が赤血球内で増殖する時期はそのような機序による貧血も当然考えられるが、バベシア感染時に激しい貧血がみられる場合でもパラジテミアはきわめて低いことがあり、一方パラジテミアが高くても貧血はあまり認められないこともある。これまでの私たちの研究によって、バベシア感染犬の血清中の抗赤血球膜抗体価は非感染犬のそれに比較して明らかに高く (Adachi *et al.* 1992) (Fig. 2), 重篤な貧血を示したバベシア症の犬の

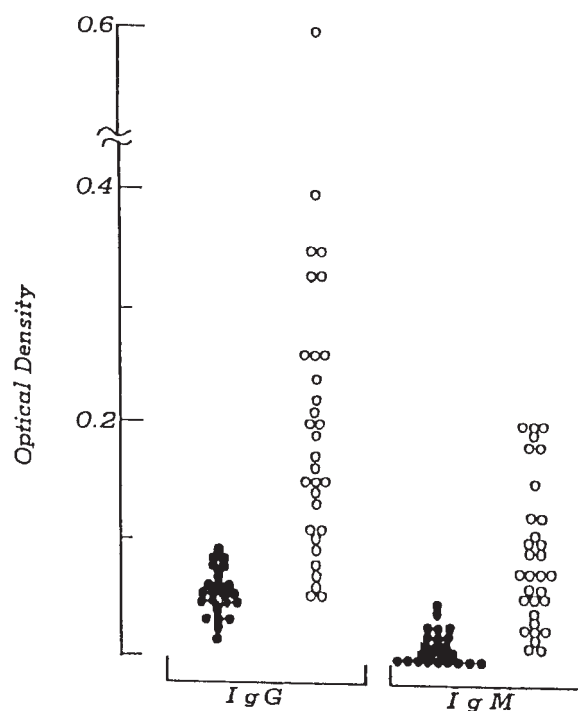


Fig. 2. Reactivity in ELISA of an individual serum of infected dogs (○) and normal control (●) to the erythrocyte membrane antigens.

赤血球はしばしば赤血球自己凝集やクームス試験陽性を示し, さらに赤血球膜に結合したIgGは非感染犬や軽度なバベシア症例に比較して明らかに高値をしめした (Adachi *et al.* 1994a) (Table 1). しかも重篤なバベシア感染犬血清中の抗赤血球膜抗体は人為的にフェニルヒドラジンで酸化変性させた正常赤血球に吸収された (Adachi *et al.* 1994b). これは酸化変性した老化赤血球が処理される過程と似ている. つまり, バベシア感染時には, まず脾臓などの貪食細胞の活性化による活性酸素の産生増大 (Otsuka *et al.* 2002), 原虫の赤血球内寄生による赤血球内活性酸素産生増加

(Otsuka *et al.* 2001) などによって赤血球膜の酸化変性 (Adachi 1994b) が起こり, IgG抗体の赤血球への結合増加 (Adachi 1994a) し, 抗体が結合した赤血球が脾や肝の活性化貪食細胞による貪食, すなわち血管外溶血という一連の過程が貧血発症に関与していることが示唆された.

2) 再発と免疫抑制

感染後長期間にわたって, PCVと寄生率の推移を調べると初回の発症に引き続き3-4週間の間隔をおいて程度の差こそあるものの2回目, 3回目あるいはそれ以上の再発がしばしば起こるが, 普通は再発の程度は回を追うごとに小さくかつ発

Table 1. RBC-bound IgG value measured by a competitive immunoassay

Dog	Coom's test ^a	PCV %	Parasitemia %	Anti-parasite ELISA level ^b	RBC-bound IgG value (ng/ml)
Healthy dogs (n=10)	NT	40<	0	<0.22 ^c	6.5 to 20 (13.5±4.6 ^d)
Dogs with subclinical babesia-infection					
Case 1	N	40<	0.1≥	0.77	17
Case 2	N	40<	0.1≥	1.38	10
Case 3	N	40<	0.1≥	3.52	6.5
Dogs with clinical babesia-infection					
Case 4	P	12	1.0	2.57	38
Case 5	P	10	7.5	0.79	38
Case 6	P	15	2.2	0.86	34
Case 7	P	15	2.5	1.00	83
Case 8	P	14	5.5	1.55	126

a) NT: Not tested, P: Positive, N: Negative

b) Anti-parasite ELISA level is expressed as OD290.

c) ELISA levels below an upper negative limit of 0.22 are considered normal.

d) Mean ± SD

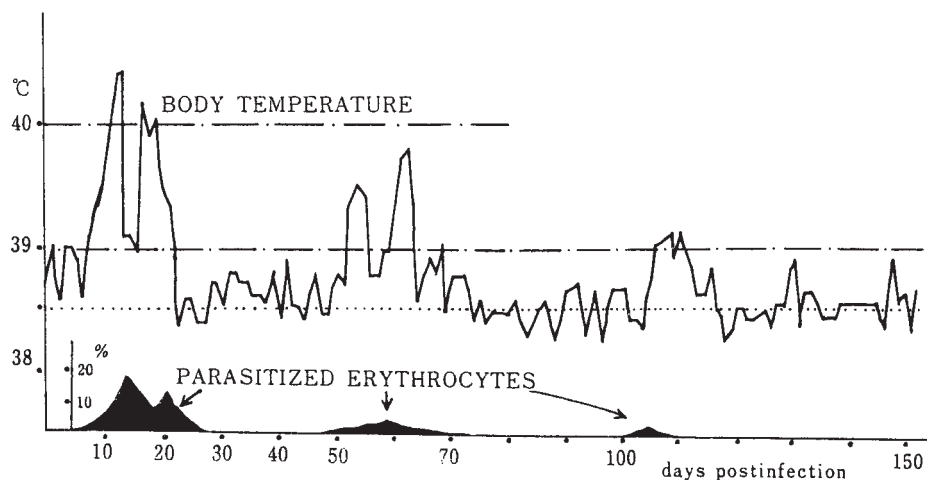


Fig. 3. Changes in body temperature and parasitemia in a beagle experimentally inoculated with 1×10^9 *B. gibsoni*-parasitized erythrocytes.

症間隔が長くなってゆく (Itoh *et al.* 1981) (Fig. 3). これはバベシア原虫に対する獲得性防御免疫が強まってゆくためと考えられる. バベシア原虫は長期間, 通常数年体内に存在し続け, 原虫増殖力と宿主の防御免疫力が平衡を保っている状態のいわゆる相関免疫 (premunity) が持続する. やがて原虫は宿主体内から完全に排除されてはじめて完全に治癒したといえよう. ところが, 犬によっては, 初回の発症もかなり激しく, たとえ抗原虫薬でいったん症状を抑えても, 数週間して初回の発症より症状重く再発が何度もおこり, かつこれら再発の間隔も予後良好な症例より短い難治症例がしばしばみられる. これまでの経験上, これら重篤な再発を繰り返す犬種としては, シェルティー, コリー, ゴールデン・レトリバーなどが多いことが知られている. 私たちは, これら難治性症例と軽度な初回の発症のみの症例における血清中バベシア抗体価 (液性免疫) およびCon Aによる末梢血リンパ球の芽球化反応 (細胞性免疫) を比較したところ, 難治性症例は液性免疫応答および細胞性免疫応答のいずれもが有意に低下していた (Adachi *et al.* 1993). つまり, 難治性症例では原虫感染に対し普通は感染経過とともに強化される防御免疫の獲得が不十分, すなわち免疫抑制状態であったと考えられる.

3. 犬 *B. gibsoni* 感染症のクリンダマイシンによる治療

1) 病態生理を考慮した治療

現在使用可能な抗バベシア薬で短期間に原虫を完全に体内から駆除するものではなく, たとえ治療によって症状が改善し一見治癒したかにみえても, 長期間ときに3-4年間も原虫が体内に存続する. バベシア症の治療にとって重要なことは, 原虫を体内から急速に完全に駆除することではなく, 本症で時として致命的になる貧血や重篤な再発につながる免疫抑制現象をコントロールし, 原虫増殖に対抗できる宿主の防御免疫の獲得を促進させることにあるといえよう. バベシア性貧血に赤血球膜の酸化障害と抗赤血球膜抗体の関与が考えられる場合, ステロイドの投与は免疫能を低下させ原虫の増殖を促進させてしまうので禁忌であるが, 活性酸素の産生や貪食細胞による赤血球の貪食=血管外溶血を抑制する目的で抗酸化活性を有する

物質 (例えば, グリチルリチン製剤やビタミンE製剤) の投与は有効かもしれない. 例えば, 並河らは重篤なバベシア感染症の治療としてクリンダマイシン (CLM) とともにグリチリン製剤を用いて良好な成績を得ている (並河他 2005). 原虫病の治癒の病態生理からみると, 抗バベシア剤としては, 原虫を体内から短時間で排除するよりむしろ原虫の活性を減弱させ, かつ増殖を抑制させるようなマイルドな薬剤がのぞましい. そのような薬剤の投与は, 結果として, 重篤な臨床症状を改善し, 不活性化した原虫が一定期間体内に留まることによって宿主の防御免疫の獲得を促進させることになる.

2) 犬 *B. gibsoni* 感染症に対するクリンダマイシン治療の有効性

我が国ではバベシア症の治療薬として *diminazene diacetate* 製剤 (ガナゼック, チバガイギ ジャパン) が使用されてきた (並河他 2002). 本薬物は, バベシア原虫に対して強力な駆虫作用を有するものの, 犬に対して中枢神経障害や嘔吐などきわめて重篤な副作用をしばしば引き起こすことが知られている (Plumb 1999). しかも, 罹患犬によっては, 本薬による治療を行ったとしても再発を繰り返し, 本剤の再投与を余儀なくされ, 結果として副作用の危険性が増すことになる. こうしたことから, 最近, 本薬剤は発売中止となり, 本薬に代わる犬 *B. gibsoni* 感染症に対する安全な化学療法が緊急に求められている. 従来, 犬以外の動物のバベシア症の治療 (Klaue *et al.* 1994) や *Babesia canis* 感染 (Farwell *et al.* 1982 ; Plumb 1999) にCLMが単独投与または他の薬剤と併用され, その有効性が報告されている. しかし, 犬 *B. gibsoni* 感染症に対する治療効果に関して必ずしも明確ではない. そこで, バベシア病に対するCLMの治癒効果を調べるため, まず, 我々は実験的 *B. rodhaini* 感染マウスへCLMを投与し, 本剤がマウスの強毒株である *B. rodhaini* 感染に対し用量依存性に治癒効果を持つこと, 本剤で治癒したマウスは原虫の再攻撃に対し抵抗性が得られることを明らかにした (Wijaya *et al.* 2000), また本剤の投与により治癒したマウスは脾臓内貪食単核細胞の貪食能と活性酸素産生能が亢進していた (Wijaya *et al.* 2001). 次に, 実験的犬 *B. gibsoni* 感染モデルを用い, CLMによる治療効

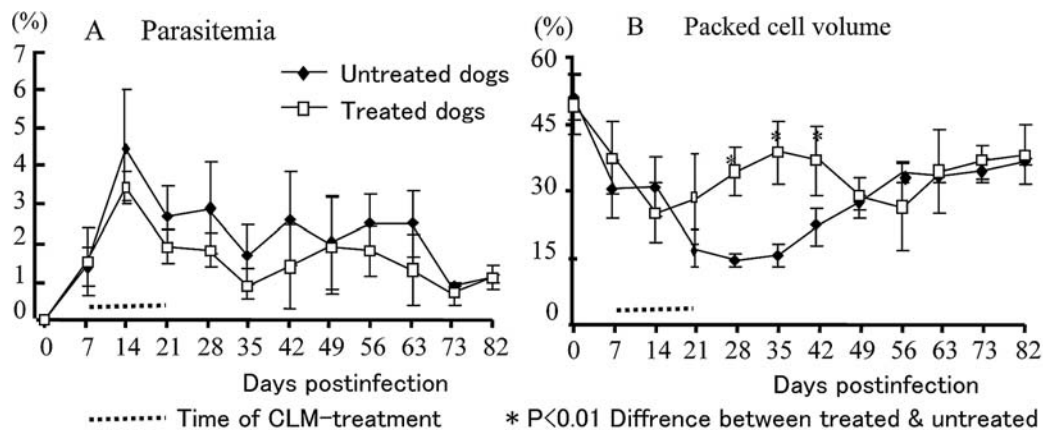


Fig. 4. Changes of parasitemia (A) and packed cell volume (B) in clindamycin (CLM)-treated and untreated dogs infected with *B. gibsoni*. Dogs were experimentally inoculated with 2×10^9 parasitized erythrocytes. There were no significant differences between treated and untreated dogs in parasitemia on the acute stage. CLM treatment resolved anemia in the acute stage.

果とその免疫応答を検討したところ、バベシア感染後の急性期において非治療群にみられた顕著な貧血、食欲不振および元気消失などの臨床症状が治療群では認められなかった (Fig. 4). また、原虫感染赤血球率 (パラジテミア) は治療・非治療群間に有意差は認められないものの、メイギムザ染色による末梢血液塗抹標本のバベシア原虫に退行性変化を示唆する形態学的変化が約70%に観察された (Wuransali *et al.* 2003a) (Fig. 5). さらに、免疫応答として、 CD_4^+ 細胞数は治療群で有意に増加したが、慢性期では、治療・非治療の両群とも実験期間中高値を維持した. 感染後のバベシア特異抗体は、急性期では両群とも同様に上昇したが、慢性期になると非治療群より治療群の方が有意に高く推移した. また、再発後の急速な抗体応答が、治療群では認められたが、非治療群では認められなかった (Wuransali *et al.* 2003b).

以上の結果から、CLMは急速に原虫を消滅させる作用ではなく原虫を損傷あるいは不活化させ、この損傷した原虫 (damaged parasites) が比較的長期間宿主体内に存続することになる. このことが結果として貧血やその他の臨床症状を改善させ、同時に宿主の細胞性および体液性免疫を刺激し、防御免疫を獲得させると考えられた. バベシア原虫感染の治癒経過の本質は原虫が宿主体内に長期間とどまり、宿主が原虫に対して抵抗力を獲得してゆくことであるという観点からみると、バ

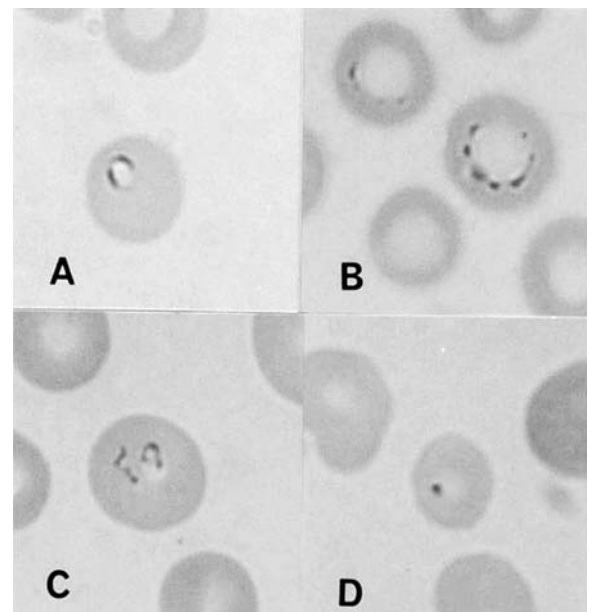


Fig. 5. Morphological changes of *B. gibsoni* on May-Grunwald Giemsa stained blood smears in untreated (A) and clindamycin-treated (B~D) on the 1st and the 19th days after the infection. Almost parasites of untreated dogs showed typical morphology, e.g. small and rounded shape with clear cytoplasm and clear nucleus in the edge of the cell (A). The majority (ca 70%) of parasites in treated dogs demonstrated morphological changes that indicated a significant incidence of parasite degeneration; these degenerative changes included segmentation of nucleus localized in the cell limbic (B); torn state of nucleus (C); size reduction of nucleus and disappearance of cytoplasm (D).

ベシア症に対するCLM治療は理にかなっている化学療法と考えられる。このことはCLM治療群における免疫学的応答からも裏付けられた。さらに、CLMの投与は通常の投与量 (25 mg/kg, b.i.d.) で2週間、経口投与することが多いが、より多い投与量 (50 mg/kg, b.i.d.) で1週間、筋肉内注射し、良好な治癒効果を示すことが並河らによって報告されているが (並河他 2005)、前者の投与方法での問題点—原虫の切れが悪く、長期間の経口投与にともなう腸内フローラへの悪い影響—を少なくする意味で後者の投与法は激しい感染例に対処するときにはよいかもしれない。

3) クリンダマイシンの作用機序と副作用

最近、マラリア、バベシア、トキソプラズマなどapicalcomplexan parasitesの細胞質内に藻類由来の環状遺伝子からなる小器官、アピコプラストapicoplast (plastid) が共通して存在し、CLMはこの小器官の23SDNAに作用し、損傷を与え抗原虫作用を有することが報告されている (McFadden *et al.* 1999)。このようにCLMの標的器官が動物の細胞にはないことが大量投与しても本薬の副作用が少ない理由かもしれない (文献的には犬で300 mg/kg/dayで連続6ヶ月でもほとんど副作用がみられなかった (Gray *et al.* 1967)。抗原虫作用は用量依存性であり、かつかなり大量投与しても副作用が少ないことから、通常の投薬量 (25 mg/kg, b.i.d. for 2 wks) では抑えきれないような高寄生率を示す症例に対してはさらに高用量を短期間 (50 mg/kg, b.i.d. for 1 wk) 筋肉内注射することも選択肢の1つであろう。

要 約

犬 *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*) 感染症の感染初期、慢性期、キャリアー犬では、低寄生率を示し血液塗抹による原虫の確認が難しいが、PCR法では0.0001%の低寄生率でも検出可能であった。バベシア性貧血は、脾臓などの貪食細胞の活性化、赤血球の酸化障害、赤血球膜へのIgG抗体の結合、および赤血球の脾や肝の貪食細胞への貪食など一連の病態生理学的過程が関与する。また、時として数週間の間隔でより重篤な再発を繰り返す難治性バベシア症例では液性・細胞性免疫の抑制

が認められた。本症の特効薬 diminazene diacetate は中枢神経障害などの重篤な副作用をしばしば引き起こし、本薬に代わる安全な化学療法が求められる。そこで、クリンダマイシン (CLM) の実験的犬 *B. gibsoni* 感染に対する治療効果を検討した。バベシア感染後の急性期において、CLM治療群では、非治療群にみられた顕著な貧血、食欲不振および元気消失などの臨床症状は認められなかった。パラジテミアは治療・非治療群間に有意差はなかったが、メイグムザ染色末梢血液塗抹標本のバベシア原虫に退行性変化と思われる形態学的変化が多数の虫体に観察された。さらに、CD4⁺細胞数は治療群で治療後有意に増加し、バベシア特異抗体は慢性期では治療群の方が有意に高く推移し、かつ再発後の急速な抗体応答が治療群では認められた。CLM治療群で副作用は認められなかった。以上の結果から、CLMは犬バベシア病の治療薬として有効であることが示唆された。

キーワード：犬、バベシア、貧血、再発、クリンダマイシン治療。

謝 辞

本総説は、1991年から2003年にかけてあしかけ十数年間にわたり、私が主指導教員として指導した山口大学大学院連合獣医学研究科博士課程学生；足立幸蔵博士 (現宮崎県農業共済組合獣医師)、Agus Wijaya博士 (現インドネシアボゴール農業大学獣医学部教員)、Retno Wuransali博士 (現インドネシアボゴール農業大学獣医学部教員)、阿野仁志博士 (現宮崎大学農学部獣医学科教員)らの博士論文の研究をもとに作成したものである。ここに、彼らの献身的な仕事に対し心から感謝申し上げる。

引用文献

- Adachi, K., Yoshimoto, A., Goto, Y., Hasegawa, T., Shimizu, T., Makimura, S. (1992) Anti-erythrocyte membrane antibody detected in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med. Sci.* **54**, 1081-1084.
- Adachi, K., Ueno, C., Makimura, S. (1993) Immunosuppression in dogs naturally infected with

- Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med. Sci.* **55**, 503-505
- Adachi, K., Tateishi, M., Horii, Y., Nagatomo, H., Shimizu, T., Makimura, S. (1994a) Elevated erythrocyte-bound IgG value in dogs with clinical *Babesia gibsoni* infection. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 757-759.
- Adachi, K., Tateishi, M., Horii, H., Nagatomo, H., Shimizu, T., Makimura, S. (1994b) Reactivity of serum anti-erythrocyte membrane antibody in *Babesia gibsoni*-infection. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 997-999.
- Ano, H., Makimura, S., Harasawa, R. (2001a) Detection of *Babesia* species from infected dog blood by polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. Sci.* **63**: 111-113.
- Ano, H., Makimura, S., Harasawa, R. (2001b) Comparison of partial ribosomal DNA sequences of *Babesia gibsoni* occurring in Miyazaki Prefecture of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **63**: 561-562.
- Böse, R., Jorgensen, W. K., Dalgliesh, R. J., Friedhoff, K. T., de Vos, A. J. (1995) Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet. Parasitol.* **57**: 61-74.
- Carret, C., Walas, F., Carcy, B., Grande, N., Precigout, E., Moubri, K., Schetters, T. P., Gorenflot, A. (1999) *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphism analysis on amplified small subunit ribosomal RNA Genes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **46**: 298-303.
- Conrad, P. A., Thomford, J. W., Marsh, A., Telford III, S. R., Anderson, J. F., Spielman, A., Sabin, E. A., Yamane, I., Persing, D. H. (1992) Ribosomal DNA Probe for Differentiation of *Babesia microti* and *B. gibsoni* Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1210-1215.
- Etkind, P., Piesman, J., Ruebush II, T. K., Spielman, A., Juranek, D. D. (1980) Methods for detecting *Babesia microti* infection in wild rodents. *J. Parasitol.* **66**: 107-110.
- Farwell, G. E., LeGrand, E. K., Cobb, C. C. (1982) Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **180**: 507-511.
- Fukumoto, S., Xuan, X., Shigeno, S., Kimbita, E., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T. (2001) Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **63**: 977-981.
- Gray, J. E., Weaver, R. N. (1967) Biochemical Research Technical Report 1-45 Code No 11501-1/67/7330/0018. Upjohn Company, Michigan.
- Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Shimada, Y., Sakata, Y., Okuda, M., Ohnishi, T. (2003) Epidemiological survey of *Babesia* species in Japan performed with specimens from ticks collected from dogs and detection of new *Babesia* DNA closely related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3494-3498.
- Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Matsumoto, K., Okuda, M., Ohnishi, T., Nakagome, K., Kosugi, R., Hirakawa, M. (2004) Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan. *Vet. Parasitol.* **121**: 341-346.
- Itoh, M., Makimura, S., Suzuki, N. (1981) Fundamental studies on the leukocyte chemotactic factor in lymphokines of dogs infected with *Babesia gibsoni*. *Jap. J. Trop. Med. Hyg.* **9**, 175-185.
- Jefferies, R. Ryan, U.K. Muhlnickel, C. J., Irwin, P. J. (2003) Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. *J. Parasitol.* **89**: 409-412.
- Kutter, K. L. (1988) Babesiosis of domestic animals and man, (Ristic, M. ed.), CRC Press, Inc. Florida, pp. 1-22.
- Krause, P. J., Spielman, A., Telford III, S. R., Sikand, V. K., McKay, K., Christianson, D., Pollack, R. J., Brassard, P., Magera, J., Ryan, R., Persing, D. H. (1998) Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N. Engl. J. Med.* **339**: 160-165.
- Krause, P. J., Telford III, S. R., Ryan, R., Conrad, P. A., Wilson, M., Thomford, J. W., Spielman, A. (1994) Diagnosis of babesiosis: Evaluation of a serologic test for the detection of *Babesia microti* antibody. *J. Infect. Dis.* **169**: 923-926.
- 牧村 進・野村 修・小川博之・加世田雄時朗・大塚宏光・薄井萬平 (1990) 酵素免疫測定法による犬血清中 *Babesia gibsoni* 抗体価の測定. 宮大農研報. **37**: 33-39.
- McFadden, G., I, Roos, D. S. (1999) Apicomplexan plastids as drug targets. *Trend in Microbiology*, **7**: 328-332.
- Miyata, T., Sakata, Y., Shimada, Y., Ogino, S., Watanabe, M., Inamoto, K., Okuda, M., Verda, R. A., Xuan, X., Nagasawa, H., Inokuma, H. (2005) Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in eastern Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **67**: 467-471.

- 並河和彦・須永藤子・菅野康則 (1988) 犬赤血球内 *Babesia gibsoni* の形態. 日獣会誌. **50** : 936-938.
- 並河和彦・須永藤子・菅野康則 (2002) 犬 *Babesia gibsoni* 感染の診断と治療. 動物の原虫病. **17** : 1-17.
- 並河和彦・須永藤子 (2006) クリンダマイシンによる *Babesia gibsoni* 感染犬の治療. 日獣会誌. 印刷中
- 大塚宏光・塚本法生 (1962) 犬バベシア病に関する研究. 日獣会誌. **15** : 360-361.
- Otsuka, Y., Yamasaki, M., Maede, Y. (2002) The effect of macrophages on the erythrocyte oxidative damage and the pathogenesis of anemia in *Babesia gibsoni*-infected dogs with low parasitemia. *J. Vet. Med. Sci.* **64** : 221-226.
- Otsuka, Y., Yamasaki, M., Yamato O., Maede, Y. (2001) Increased generation of superoxide in erythrocytes infected with *Babesia gibsoni*. *J. Vet. Med. Sci.* **63** : 1077-81.
- Oyamada M, Davoust B, Boni M, Dereure J, Bucheton B, Hammad A, Itamoto K, Okuda M, Inokuma H. (2005) Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clin Diagn Lab Immunol.* **12** : 1343-6.
- Persing, D.H. (1991) Polymerase chain reaction: Trenches to benches. *J. Clin. Microbiol.* **29** : 1281-1285.
- Plumb, D. C. (1999) Veterinary Drug Handbook. 3rd ed. Iowa State University Press. Pp : 169-171.
- Ristic, M. (1988) In: Babesiosis of Domestic Animals and Man., CRC Press, Inc. Florida.
- Schettters, TH. P. M., Moubri, K., Precigout, E., Kleuskens, J., Scholtes, N.C. Gorenflot, A. (1997) Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology* **115** : 485-493.
- Wijaya, A., Wulansari, R., Ano, H., Inokuma, H., Makimura, S. (2000) Therapeutic effect of clindamycin and tetracycline on *Babesia rodhaini* infection in mouse model. *J. Vet. Med. Sci.* **62** : 835-839.
- Wijaya, A., Wulansari, R., Ano, H., Makimura, S. (2001) Effect of clindamycin therapy on phagocytic and oxidative activity profiles of spleen mononuclear cells in *Babesia rodhaini*-infected mice. *J. Vet. Med. Sci.* **63** : 563-566.
- Wuransali, R., Wijaya, A., Ano, H., Horii, Y., Nasu, T. Yamane, S., Makimura, S. (2003a) Clindamycin in the treatment of *Babesia gibsoni* Infections in dogs. *J. Am Anim Hosp Assoc* **39** : 558-562.
- Wuransali, R., Wijaya, A., Ano, H., Horii, Y., Makimura, S. (2003b) Lymphocyte Subsets and specific IgG antibody levels in clindamycin-treated and untreated dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*, *J. Vet. Med. Sci.* **65** : 579-584.
- Zahler, M., Rinder, H., Zwegarther, E., Fukata, T. Maede, Y. Schein, E., Gothe, R. (2000) '*Babesia gibsoni*' of dogs from north America and Asia belong to different species. *Parasitology*, **120** : 365-369.