

ニワトリの Leucocytozoon 病の予防に関する研究

Ⅶ. Pyrimethamine および Sulfadimethoxine の単味投与 または、混合投与による感染予防効果

堀 慧 ・ 鳥海 徹 ・ 田辺 昭

Studies on the Prevention of Leucocytozoon Infection of the Chicken

Ⅶ. Preventive Effects of Pyrimethamine and Sulfadimethoxine Medicated Singly or in Combination

Satoshi HORI, Toru TORIUMI and Akira TANABE.

Leucocytozoonosis of chickens has given a large economic damage to the poultry industry in Japan. Since the identification of *Akiba* (= *Leucocytozoon*) *caulleryi* as the causative agent of the disease by Akiba *et al.* ^(1,2) in 1958, various attempts have been made by many workers ^(3,4,10~14,22~24) to find any effective chemotherapeutic drugs against this parasite. Akiba *et al.* ^(3,4) suggested that pyrimethamine and some of sulfonamide might be effective against this parasite, however, it was observed that the administration of pyrimethamine mixed in food at the rate of 0.004 per cent or 0.005 per cent was highly toxic. On the other hand, since Lux ⁽²⁰⁾ (1954) reported the synergistic effect of pyrimethamine and some sulfonamides used for the control of *Eimeria tenella*, the extensive experiments were reported by Rollo ⁽²¹⁾ (1955) in *plasmodium gallinaceum* infection, by Eyles & Coleman ⁽⁷⁾ (1955), Eyles & Frances ⁽⁸⁾ (1955) and Frenkel & Hitchings ⁽⁹⁾ (1957) in toxoplasmosis, and by Joyner & Kendall ⁽¹⁵⁾ (1955), Kendall & Joyner ^(16,17,18) (1956~1958) and Ball ⁽⁵⁾ (1960) in *E. tenella* infection.

Therefore, the studies in this paper were carried out to find a more practical method of administration of pyrimethamine and sulfadimethoxine to control leucocytozoonosis in chickens. The two drugs in lower concentration were used in the experiments, when each was medicated separately. Then they were tested to clarify the synergistic effect when used in combination against *A. caulleryi* infection, if any.

The activities of a drugs mixed with the diet separately or in combination were assessed by comparing the infectivity of the medicated and that of the control groups, after they were exposed to the natural infection of this parasite.

1. The preventive effect of pyrimethamine medicated singly.

As shown in Table 2, it was demonstrated that pyrimethamine prevented complete-

ly the chicken from leucocytozoon infection, even when it was medicated in such low level of 0.0001 per cent or 0.00005 per cent, but did not when in 0.00001 per cent. (Exp. I and II) This result was confirmed again by Exp. III and it was found that pyrimethamine medicated in concentration of 0.000025 per cent was not effective against this parasite. From the result mentioned above, it was considered that the minimum effective dose of pyrimethamine to prevent the chickens from this disease was 0.00005 per cent.

2. The preventive effect of sulfadimethoxine medicated singly.

The preventive effect of sulfadimethoxine against this disease was tested as shown in Table 3. From this result, it was found that the minimum effective dose of this drug was 0.0025 per cent, and was not effective when medicated in 0.001 per cent.

3. The preventive effects of pyrimethamine and sulfadimethoxine medicated in combination.

As shown in Table 4, it was found that pyrimethamine and sulfadimethoxine administrated in combination completely prevented this disease, even when they were used at the level of 0.00001 per cent and 0.00025 per cent respectively. Namely, in the case that they were used in combination, it was found possible to diminish the pyrimethamine dose to 1/5 and the sulfadimethoxine dose to 1/10. (Exp. VI)

4. The preventive effect of DA-106.

These results mentioned above were confirmed by Exp. VII which used DA-106, compounded for trial as a coccidiostat by a pharmacological company. (Table 1.) DA-106 medicated in diet in concentration of 0.008 per cent displayed a complete preventive effect against this disease, while the concentration of pyrimethamine and sulfonamide (both of sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline) in that diet were 0.000016 per cent and 0.00024 per cent respectively.

The points obtained from a series of such experiments are plotted on a graph as shown in Fig. 1, and this figure gives a clear evidence of very strong synergistic effect of pyrimethamine and sulfadimethoxine on *A. caulleryi*. Since the details of sub-effective concentration of these drugs in combination have not been obtained, the limitation curve (a dotted line) is nothing but a hypothetical one.

It is now, difficult to continue such experiments based on natural infection of this parasite, because the widespread use of 0.0001 per cent of pyrimethamine medicated in marketed feed has almost eradicated this disease in Japan. But it is considered that the use of this combination method of pyrimethamine and sulfadimethoxine in the field is a marked improvement from the point of view of safety and economy.

緒 言

わが国におけるニワトリの leucocytozoon 病は、養鶏界に大きな損害をあたえ、その病原体については1958年秋葉ら¹⁾によって *Leucocytozoon caulleryi* と同定された。(この病原

体については1965年に、*Akiba caulleryi* と改名するように提案された。) その後多くの研究者により、本病の治療予防法の研究がおこなわれ、著者らは furazolidone,¹⁰⁾ diaveridine¹²⁾ などによる予防法についての研究をおこなったが満足すべき結果がえられなかった。秋葉ら³⁾ は1959年および1961年における研究において、pyrimethamine を0.004mg/g および0.005%の割合に添加した飼料を、隔週投与することにより、本病を予防しうることを示唆した。しかしこの濃度では、ひなに対して、高い毒性がみとめられた。さらに1962年にはある種の sulfonamid においても、本病にたいする予防効果があることを認めた。その後多くの研究者^{3,4,10~14,22~24)} によって、これら薬剤の実用的な投与方法についての研究がすすめられた。

著者らは pyrimethamine および sulfadimethoxine について、特にその低濃度投与の場合の本病予防効果につき研究をおこなった。すなわち、それぞれの単味投与の場合に本病を完全に予防するための最低有効濃度を決定し、ついで、最低有効濃度以下の両薬を混合して投与した場合の効果について試験をおこなった。その結果これらの両薬は、それぞれ単味投与でも高い予防効果を有するが、その最低有効濃度に比べて、pyrimethamine では $\frac{1}{5}$ 、sulfadimethoxine では $\frac{1}{10}$ の量を混合して投与した場合にも、完全に本病を予防しうる効果を発揮するものであることを証明した。この結果は、本病の予防剤として試作された pyrimethamine, sulfadimethoxine ならびに sulfaquinolaxine などの混合剤であるところの、DA-106を低濃度に飼料中に添加した場合に、同様に本病を完全に予防しえた事実によっても確認された。

すなわち、pyrimethamine と sulfadimethoxine を混合して投与した場合は、これらの両薬剤が、*A. caulleryi* に対して相乗的に作用して、単味投与の場合の効果の合計よりはるかに大きな効果を現わすものであることが証明された。

Lux¹⁸⁾ (1954) が *Eimeria tenella* の予防剤として使用された pyrimethamine と sulfonamide との間の相乗効果について報告して以来、*Plasmodium gallinaceum* 感染症については Rollo²¹⁾ (1955) により、toxoplasma 病については Eyles & Coleman⁷⁾ (1955), Eyles & Frances⁸⁾ (1955) および Frenkel & Hitchings⁹⁾ (1957) らにより、また *Eimeria tenella* 等の coccidium 症については、Joyner & Kendall¹⁵⁾ (1955), Kendall & Joyner^{16,17,18)} (1956~1958) および Ball⁵⁾ (1960) により追試された。その結果 pyrimethamine と sulfonamide は多くの寄生原虫性疾病に対して有効であり、特に両者を混合して投与した場合には、著明な相乗効果を発揮するものであることを認めている。著者らが認めたところの、両薬剤の *A. caulleryi* に対する相乗効果も、これらの疾病におけると全く同一の機序によるものと考えられる。

一方わが国のニワトリの leucocytozoon 病は、1964年以降 pyrimethamine が、0.0001%の割合に、市販飼料に添加されるようになって、本病の発生は非常に減少している。しかしながら磯貝らによると0.0009%に飼料中に添加された pyrimethamine は幼雛に対して毒性を示すことが認められている。従って市販飼料への添加量と中毒量の間には、10倍の許容範囲しか残されていない。しかも、本病の予防のためには、その感染が予想される6月より9月、あるいはそれ以上の期間、連続的に pyrimethamine を投与しなければならない。したがって、その添加量は、有効な範囲において、極力微量であることが望ましい。この意味において、本研究で証明された、pyrimethamine と sulfadimethoxine の本病原虫に対する相乗作用を野外で応用することは望ましいことである。本研究はそのための基礎的資料を提供するものと考えてるので、その詳細について報告する。

試 験 方 法

1. 試験場所ならびに試験時期

本試験はすべて岡山大学農学部構内の実験鶏舎で、1963年および1964年の夏おこなわれたものである。

2. 観察方法

本病の感染は秋葉ら²⁾によって報告されたように、*Culicoides arakawae*が中間宿主となって感染がおこるものであるので、多数の試験鶏にたいして、同時に人工的に感染を起させることは困難であった。そのため、本研究では、供試薬を所定の濃度に添加した飼料を連続的にひなに与えながら、本病の自然感染にさらし、それらのひなの本病の感染率を、無添加対照区の感染率と比較することにより、添加薬の本病にたいする予防効果を判定した。

本病の感染の有無についての判定はすべて血液検査によっておこなった。すべての試験鶏について、7日目毎に1枚ずつの血液塗抹標本を作り、Giemsa染色をほどこしたのち鏡検して、血中に本病原虫の gametocyte をみとめたもののみをもって感染とみなした。

本病の感染が予想される時期以前に血液検査を開始し、全鶏群中で本病の発生が終熄したのを確かめてから観察を終了した。

また、血液検査と同時に全試験鶏についての体重を測定し、各区の平均体重の推移を無添加区のそれと比較して、供試薬剤の毒性の判定の資料とした。しかし本研究の範囲においては、薬剤の毒性は全くみとめられなかったのでその詳細は省略する。

3. 供試薬ならびに添加方法

本研究で使用した pyrimethamine すなわち 2,4-diamino-5-p-chlorophenyl-6-ethyl-pyrimidine は、Wellcome 社において10倍散としたものをさらに乳糖で100倍散として、飼料添加用とした。sulfadimethoxine すなわち 6-sulfanilamido-2,4-dimethoxy pyrimidine は第一製薬株式会社において、10倍散“ABCD・ソーダ”として製

作したものをそのまま添加用とした。

Table 1. The components of DA-106.

Pyrimethamine	0.2 g
Sulfadimethoxine	2.5 g
Sulfaquinoxaline	0.5 g
Glucosamine	3.0 g
Vitamine K	0.03g
Vitamine AD	100,000 unit (as V. A.)
Vitamine B	0.025g
vehicle	adequately
Total	100.0g

DA-106は武田薬品工業株式会社により、本病、coccidium 症ならびに toxoplasma 病にたいする予防治療薬として試作されたものであって、その成分は表1に示す通りである。

基礎飼料としては、各種の抗 coccidium 剤ならびに、抗生物質などを含まない飼料を用い、これに所定量の供試薬を電動式 meat-mixer で添加攪拌して試験飼料

を作った。

4. 試験鶏

本研究では、試験鶏は主として、WL種の雌ひなを使用した。表4のExp. VIIではWL×BPの雌ひなをも使用した。供試薬の添加濃度1段階ごとに1区を設定し、1区当りの羽数は14羽ないし20羽とした。試験鶏の飼育は通常の方法にしたがい、金網張りの床をもった育雛器ないし、針金製のケージを使用し、給餌は不断給飼とした。観察期間中は、できるかぎり濃厚な自然感染が起るように、鶏舎の窓は開放して、*C. arakawae*の吸血が容

易におこなわれるようにした。

試 験 結 果

1. pyrimethamine の単味投与による感染予防効果

低濃度における pyrimethamine の単味投与の場合の効果を知るために、前後3回の試験がおこなわれたが、これを一括すると表2の通りである。Exp. I においては対照区が87.5%感染したのに対し、pyrimethamine の添加濃度を0.0001%にした場合も、完全予防効果を示した。Exp. II は、これとほぼ同時におこなわれた試験であるが、対照区の感染率78.9%に対して、0.00005%区は完全予防効果を示したのに反し、0.00001%区は45.0%の感染がみられた。以上の結果を確認するために1964年に Exp. III がおこなわれた。すなわち対照区の感染率は35.0%とやや低率であったが、前年と同様に0.0005%では完全予防効果を示し、0.00001%では56.3%の感染がみとめられ、さらに0.000025%でも18.8%の感染がみとめられた。以上の結果から pyrimethamine の単味連続投与により本病を完全に予防するための最低有効濃度は、0.00005%と0.000025%の間にあるものと考えられた。

Table 2. Preventive effect of pyrimethamine medicated singly.

Exp.	Group	Concentration in food (%)	Birds infected	Infectivity (%)	Remarks
I (1963)	1	—	14/16	87.5	Birds; W.L. females hatched on Jan. 26 Medication; from Jun. 20 to Aug. 29 Blood examination; every 7th day from May 25 to Aug. 29 Infection; Observed between Jul. 4 and Aug. 8
	2	0.0005	0/16	0	
	3	0.00025	0/16	0	
	4	0.0001	0/16	0	
II (1963)	5	—	15/19	78.9	Birds; W. L. females hatched on Jun. 22 Medication; from Jul. 19 to Sept. 16 Blood examination; every 7th day from Jul. 8 to Sept. 9 Infection; observed between Aug. 5 and Aug. 26
	6	0.00005	0/17	0	
	7	0.00001	9/20	45.0	
III (1964)	8	—	7/20	35.0	Birds; W. L. females hatched on Apr. 25 Medication; from Jun. 1 to Oct. 15 Blood examination; every 7th day from May 8 to Oct. 15 Infection; observed between Jun. 16 and Oct. 1
	9	0.00005	0/16	0	
	10	0.000025	3/16	18.8	
	11	0.00001	9/16	56.3	

2. sulfadimethoxine の単味投与による感染予防効果

低濃度における sulfadimethoxine の単味投与による感染予防効果を知るために、2回の試験がおこなわれ、これを一括すると表3の通りである。すなわち、Exp. IV においては、対照区において、45.0%の感染がみとめられたのに反し、0.005%区では全く感染鶏なく、0.001%区では25.0%の感染がみとめられ、本病の完全予防効果はないものと判定された。Exp. V に示したように次年度0.0025%区について試験をおこなったところ、対照区で35.0%に感染がみとめられたのに対し、完全予防効果を示した。

以上の結果 sulfadimethoxine の単味の連続投与による本病の完全予防のための最低有効濃度は、ほぼ0.0025%と0.001%の間にあるものと推定された。

Table 3. Preventive effect of sulfadimethoxine medicated singly.

Exp. Group	Concentration in food (%)	Birds infected (%)	Infectivity (%)	Remarks	
IV (1963)	12	—	9/20	45.0	Birds; W.L. females hatched on Jun. 16 Medication; from Jun. 24 to Sept. 16 Blood examination; every 5-7th day from Jun. 24 to Sept. 16 Infection; observed between Aug. 5 and Sept. 2
	13	0.005	0/20	0	
	14	0.001	5/20	25.0	
V (1964)	15	—	7/20	35.0	Same as Exp. III.
	16	0.0025	0/14	0	

3. pyrimethamine と sulfadimethoxine を混合投与した場合の感染予防効果

前述の試験の結果から、単味投与では明らかに無効と判定されたような低濃度の pyrimethamine および sulfadimethoxine を組合せて投与して、その効果を試験した。すなわち表4に示すように、pyrimethamine は0.00001%とし、これに sulfadimethoxine を0.001%, 0.0005%, 0.00025%の3段階を組合せて3区を作り、試験をおこなったところ、無添加区では35.0%の感染がみとめられたのに反し、上記の3区とも全く感染がみとめられなかった。

以上の結果が示すように0.00001%の pyrimethamine + 0.00025%の sulfadimethoxine の組合せでも有効であったことから、これらの両薬を組合せて投与した場合は、最低有効濃度を pyrimethamine は $\frac{1}{50}$ に、sulfadimethoxine は $\frac{1}{10}$ に減じて与えても、なおかつ完全予防の目的を達成することができるものと考えられた。

Table 4. Preventive effects of pyrimethamine and Sulfadimethoxine medicated in combination.

Exp. Group	Drugs	Concentration in food (%)	Birds infected (%)	Infectivity (%)	Remarks		
VI (1964)	17	—	—	7/20	35.0	Same as Exp. III	
	18	Pyrimethamine and Sulfa- dimethoxine	0.00001 (P)	0/16	0		
	19		0.001 (Sd)	0/16	0		
	20		0.00001 (P) 0.0005 (Sd)	0/16	0		
VII (1964)	21	—	—	3/20	15.0	Birds; W.L. × B.P. females hatched Jul. 7 Medication; from Jul. 16 to Oct. 5 Blood examination; every 7th day from Jul. 17 to Oct. 5 Infection; observed between Aug. 26 and Oct. 5	
	22	DA-106	0.02	0.00004 (P) 0.0006 (S)	0/20		0
	23		0.008	0.000016 (P) 0.00024 (S)	0/20		0

Note; (P) pyrimethamine (Sd) sulfadimethoxine (S) mixture of sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline

4. DA-106 投与の場合の感染予防効果.

DA-106 は表1に示したように pyrimethamine, sulfadimethoxine および sulfaquinoxalineを主剤とする配合剤である。sulfaquinoxaline については、秋葉ら⁴⁾がこれを

0.005%に添加した場合、完全予防効果を示したとのべている。したがって、仮りに、これを sulfadimethoxine と同等の効果を持つものとして、計算の便誼上この両者を一括して sulfonamide として計算すると、DA-106 を0.2%の割合に飼料中に添加した場合の pyrimethamine と sulfonamideの濃度はそれぞれ0.00004% および0.0006% (22区) であり、0.008%添加した場合は同様に0.000016% および0.00024% (23区) である。

以上のような DA-106の配合をおこなって本病の感染予防試験をおこなったところ表4, Exp. VII に示すように対照区は15.0%の感染がみられたのに反し、両添加区は共に感染鶏がみとめられなかった。

考 察

1. pyrimethamine の単味投与の場合の予防効果

著者らのえた成績は、1963年までにおこなわれた、他の多くの研究者のものと一致している。すなわち、秋葉ら⁴⁾は pyrimethamine の0.001%, 0.0005%, 0.00025%の各濃度について、また0.0002%, 0.0001%, 0.00005%の各濃度について試験をおこない、これらすべての濃度において、本病の感染予防効果のみとめている。また玉崎ら²²⁾は0.0003% および0.0001%で有効とし、また松井ら²⁴⁾は0.0005%, 0.00025%, 0.0001%の各濃度において、五島ら²²⁾および静岡県養鶏試験場は0.0002%において、岐阜県および岐阜県種畜場では0.0001%および0.0002%において、また神奈川県では0.00005%投与で、いずれも完全に本病の感染を予防しようとのべている。また磯貝らは0.0001%より以上0.0027%までの各段階では有効であったが、0.00003%では無効であったと述べている。

したがって、これらを総合すると pyrimethamine は0.00005%以上の濃度ではいずれも有効であり、0.00003%では無効であるという結果から、著者らが Exp. I ~ Exp. III でえた成績、すなわち pyrimethamine の最低有効濃度は0.00005%以下0.000025%の間にあるという結果は正しいものと考えられる。

1964年度より、主としてこれらの成績を基礎として、農林省は pyrimethamine を市販飼料へ添加することを許可した。この場合の添加濃度は、一般には0.0001%が採用され、わが国における本病の予防に大きな効果をあげた。

2. sulfadimethoxine 単味投与の場合の予防効果

sulfadimethoxine はひなに連続または隔週投与した場合 pyrimethamine に比較して、はるかに毒性が少く、秋葉ら³⁾五島ら²²⁾によると、0.2%の添加濃度により、本病の予防に実際効果を見せているが、長期間連続投与という観点からすると、やはり低濃度投与が望ましいので、主として0.01%以下の濃度における試験がおこなわれた。

すなわち、秋葉ら⁴⁾は0.2~0.02%, 0.005%で、五島²²⁾玉崎²²⁾宮崎県等においては0.005%で、また、松井ら²⁴⁾は0.0025%ですれも、本病の予防試験に成功している。しかし著者らの成績以外はいずれも低濃度に添加して無効な段階における試験はおこなわれていないが、これらの成績と、著者らが Exp. IV. V. によってえた成績を総合すると、sulfadimethoxine の最低有効濃度は0.0025%と0.001%の間にあるという著者らの結論は正しいものと考えられる。

3. pyrimethamine と sulfadimethoxine の混合投与の場合の効果について

単味投与では明らかに無効であるような低濃度の薬剤2種を組合せて投与することによ

り、両薬の効果の合計以上の効果がみとめられる場合、それらの両薬は相乗効果を有するものと考えられる。

著者らの研究によってえられた結果のうち、pyrimethamine と sulfadimethoxine との単味投与および混合投与の試験の結果を、直角に交わる x 軸および y 軸をもつ座標上に描くと図 1 の通りとなる。

感染予防試験のおこなわれた、pyrimethamine と sulfadimethoxine の添加濃度 (%) をそれぞれ x, y 軸にとると、それらの単味投与の場合は当然、それぞれの軸上に、混合投与の

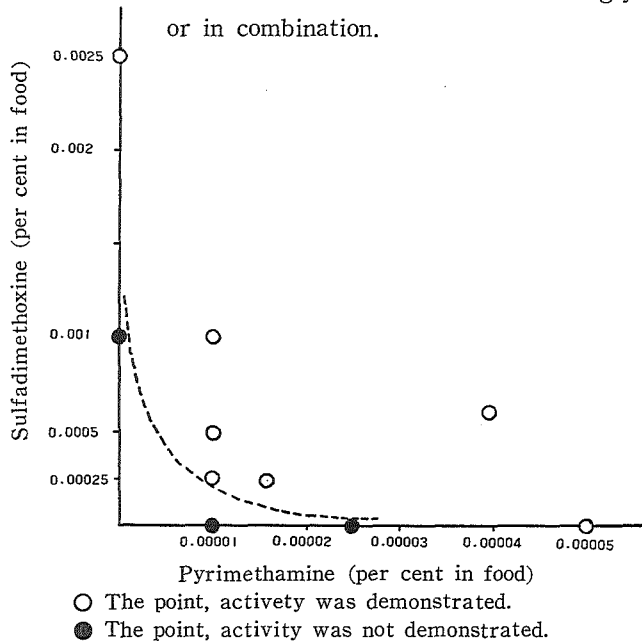
場合は両軸にはさまれた部分の点としてあらわされる。なお図 1 では高濃度の場合は省略し、また、感染予防効果のみとめられた場合を○、効果のみとめられなかった場合を●であらわした。

前項 1, 2 で述べたように pyrimethamine 単味投与の場合の最低有効濃度は 0.00005% と 0.00025% の間、sulfadimethoxine のそれは 0.0025% と 0.001% の間という結果がえられている。いま仮に両薬の最低有効濃度をこれらの値の算術平均値である 0.0000375% と 0.00175% として、両軸上のこれらの 2 点を結ぶ斜線を考えた場合、この線と両軸によって作られる三角形内の点であらわされる組合せが有効であった場合は、それらの両薬が、相乗効果を発揮しているために有効となっていると考えらる。これに反してこの三角形以外の部分の点であらわされる組合せで有効であった場合は、両薬剤の単味または相加効果によって有効であったものと考えられる。

表 4 Exp. VI に示された第 18~20 区の 3 区はいずれも、感染予防効果がありと判定されたので、それらの薬剤の組合せは、中央に縦にならんだ○としてあらわされる。これらの 3 点はいずれも、前述の斜線よりはるかに下方にあるので、いずれも明らかに両薬の相乗効果によって有効となっているものである。なかでも 3 点のうちの最下段の 0.00001% と 0.00025% との組合せのように、原点に近い点であらわされる組合せほど、強い相乗効果が働いたものであることを示している。

しかしながら、無限に原点に近付いても有効ということはいえないうで、そこにはおのずから限界が存在すると考えられる。その限界は理論的には図 1 において破線をもって表らわされたような曲線になる。従って、この曲線上にあって原点に最も近い点であらわされる組合せが、理想的な組合せとなるべきである。しかし、この曲線はあくまで仮想的なものであ

Fig. 1. The preventive effects of pyrimethamine and sulfadimethoxine medicated singly or in combination.



って、将来この種の実験を追加して、さらに実際的なものにする必要がある。(1965年にこの試験を計画したが、本病の自然感染が起らなかったため結果がえられなかった。)

このような図形を画く場合は薬剤がその病原体に対して示す ED₅₀ の量によって直接、曲線 (Dose response curve) を画くのが普通であるが、本病のように、人工感染が不可能で、偶然性の高い自然感染に依存している場合は ED₅₀ の算出が困難であるので鶏群の全部を本病の感染から、完全に予防しうることがみとめられた最低有効濃度を基礎として図を画いた。このような方法の方がやや正確を欠くとはいえ、Kendall & Joyner¹⁷⁾ (1956b) も述べているように、実地応用の場合に照して便利であると考えられる。

以上のことは、Exp.Ⅶ でおこなった DA-106 の投与試験の結果でも裏付けされる。上記の3点の右にある2個の○は、それぞれ右から DA-106 を0.02%および0.008%添加した場合の pyrimethamine と sulfonamide (sulfadimethoxine 5 : sulfaquinoxaline 1 の混合物) の組合せが、それぞれ有効であったことを示している。0.02%添加の場合の右の点は斜線の上にあるので、pyrimethamine の単味または sulfonamide の相加効果によって有効であったものと考えられるが、0.008% 添加の場合の左よりの点が有効であったことは明らかに両者の相乗効果によるものと考えられる。

4. 相乗効果の機序について

Lux²⁰⁾ (1954) は各種の 2, 4-diamino 化合物の抗 coccidium 性について研究し、特に 2, 4-diamino-5-p-chlorophenyl-6-ethyl-pyrimidine すなわち pyrimethamine は各種の sulfonamide として混合投与した場合、*Eimelia tenella* の予防にたいして、著明な相乗効果を有することをみとめ、なかでも、pyrimethamine と sulfaquinoxaline を組合せた場合は最も有効で、それぞれの単味投与の場合に比較して、 $\frac{1}{2}$ 量および $\frac{1}{4}$ 量で同等の効果をあげたと報告した。

これに引続き、各種の寄生原虫性疾病にたいする pyrimethamine と各種 sulfonamide 剤の相乗効果についての研究が多くの研究者によりおこなわれた。すなわち、Rollo²¹⁾ (1955) は、*Plasmodium gallinaceum* に対する pyrimethamine と sulfadiazine とを組合せ投与した場合、単味投与時に比べてそれぞれ約 $\frac{1}{2}$ 量で同等の効果をあげ、Kendall & Joyner^{16,17,18)} (1956~1958) らは *E. tenella* に対し $\frac{1}{2}$ 量の pyrimethamine と $\frac{1}{4}$ 量ないし $\frac{1}{10}$ 量の sulfonamide (sulfadimidine 又は sulfaquinoxaline) の組合せにより所期の効果をあげ、Ball⁵⁾ (1960) も pyrimethamine (0.005%) を併用することにより sulfadimidine を $\frac{1}{4}$ 量に、sulfaquinoxaline を $\frac{1}{12}$ 量に減じたと報告している。

また Clark⁶⁾ (1962) は pyrimethamine と類似した化学構造と薬理作用をもつ dia-veridine を sulfaquinoxaline と組合せて投与した場合に、*E. tenella* および *E. necatrix* に対する相乗効果がみとめられたと報告している。これらの研究者は一致してこのような相乗効果を利用することによる安全性と経済性を強調している。

以上述べてきたように pyrimethamine とある種の sulfonamide 剤が組合せて投与された場合、主として各種の寄生性原虫に対して、相乗効果を発揮する薬理機序について、これらの研究者は、一致して次のように解釈している。すなわち Horton-Smith ら¹⁴⁾ によれば sulfonamide の作用機序は、核蛋白形成の代謝経路のうち PABA より folic acid にいたる間で阻害作用を有し、Frenkel & Hitchings⁹⁾ によれば pyrimethamine の作用機序は、同経路中で、folic acid より folinic acid にいたる間での阻害作用をもっている。したがって、これらの両薬を混合して投与した場合は、同一経路中の異なった2点で、同時に阻害作

用をおこなうことができるので、それらの薬剤を別個に用いた場合の、それぞれの効果の合計より、はるかに大きい効果をあらわしうるものなのである。上述の著者らの研究により、認められたところの、ニワトリの leucocytozoon 病に対して、pyrimethamine と sulfadimethoxine を混合投与した場合にみられる相乗効果は、他の各種寄生性原虫症において認められたと全く同じものと考えられる。

結 論

1. ニワトリの leucocytozoon 病を完全に予防するためには、pyrimethamine を飼料中に 0.00005% 添加して連続投与することにより、その目的を達成することができる。0.000025% 添加では、完全な予防はおこなえない。
2. sulfadimethoxine を 0.0025% 飼料中に添加し連続投与することにより、本病を完全に予防することができるが、0.001% では完全な予防はできない。
3. pyrimethamine と sulfadimethoxine を混合して、飼料中に添加し、連続投与した場合には、pyrimethamine の添加濃度を 0.00001%、sulfadimethoxine の添加濃度を 0.00025% に減じても、両者の薬剤が *A. caulleryi* に対してもっている相乗効果により、完全な予防効果をあげることができる。

要 約

ニワトリの leucocytozoon 病は、わが国の養鶏界に大きな損害をあたえた。秋葉ら^{1,2)} が 1958 年に、本病の病原体として、*Akiba* (= *Leucocytozoon*) *caulleryi* の同定をおこなって以来、多くの研究者^{3,4,10~14,22~24)} によって、この病原体に有効な化学療法剤を発見しようとする色々の試みがなされた。秋葉ら^(3,4) は、pyrimethamine とある種の sulfa 剤が本虫に有効であることを示唆した。しかし pyrimethamine を 0.004% ないし 0.005% 飼料中に添加した場合は高い毒性を示した。一方、Lux²⁰⁾ (1954) が pyrimethamine とある種の sulfa 剤を *Eimeria tenella* の予防に使用した場合認められる相乗効果について報告して以来、*Plasmodium gallinaceum* については Rollo²¹⁾ (1955) により、toxoplasmosis については、Eyles & Coleman⁷⁾ (1955), Eyles & Frances⁸⁾ (1955), Frenkel & Hithings⁹⁾ (1957) らにより、*E. tenella* 感染症については、Joyner & Kendall¹⁵⁾ (1955), Kendall & Joyner^{16,17,18)} (1956~1958) および Ball⁵⁾ (1960) らによって多くの研究がおこなわれた。

そこで、本研究が、ニワトリの leucocytozoon 病を予防するための、pyrimethamine と sulfadimethoxine の実際的な投与方法を発見するためにおこなわれた。実験はまず、両薬剤の低濃度における単味投与についておこない、ついで、*A. caulleryi* の感染に対し、これらの薬剤を混合投与した場合に相乗効果があるならば、これを明らかにしようとすることを試みた。

飼料中に単味または、混合して添加した薬剤の効果は、対照区および試験区について、それらが本病原虫の自然感染に、さらされた後の感染率を比較することにより、検査した。

1. 単味添加した pyrimethamine の予防効果

表 2, に示すように pyrimethamine は、0.0001% または 0.00005% というような低濃度を添加した場合でも、本病の感染を完全に予防しえたが、0.00001% 添加では予防しえなかつた。

った。(Exp. I and II) この結果は, Exp. III によって再び確認され, また, 0.000025%の濃度に添加した場合は無効であることがわかった。上述の結果から, 本病からニワトリを完全に予防するための, pyrimethamine の最低有効濃度は, 0.00005%であると考えられた。

2. 単味投与した場合の sulfadimethoxine の予防効果

単味投与した sulfadimethoxine の予防効果は, 表3に示すようにして試験された。これらの結果から, 本剤の最低有効濃度は, 0.0025%であって, 0.001%では無効と判定された。

3. 混合投与した場合の pyrimethamine と sulfadimethoxine の予防効果

表4, に示したように pyrimethamine と sulfadimethoxine を混合投与した場合は, それぞれ0.00001%および0.00025%を使用した場合でも完全に本病を予防しえた。すなわち混合投与した場合は, pyrimethamine $\frac{1}{2}$ 量に, sulfadimethoxine 量を $\frac{1}{10}$ 量に減じうる事が判明した。

4. DA-106の予防効果

抗コクシジウム剤として, 一製薬会社により試作された DA-106を使用しての試験 Exp. VIIにより, 上述の結果が確認された。0.008%の割合に添加された DA-106 は, 本病に対して, 完全予防効果を示した。この場合, 飼料中の pyrimethamine と sulfonamide (sulfadimethoxine と sulfaquinoxaline の両方) の濃度は, それぞれ, 0.000016%および0.00024%であった。

これら一連の試験の結果をグラフ上に点描すると, 図1の通りである。本図は pyrimethamine と sulfadimethoxine が *A. caulleryi* に対する効果において著明な相乗効果を有することの明らかな証拠を示している。これらの混合した薬剤の, 無効な濃度の詳細がえられなかったので, 限界曲線(点線)は仮想的なものにすぎない。飼料中に添加した0.0001%の pyrimethamine が広く使われるようになったため, わが国における本病は, ほとんど, 制圧されてしまったので, 本病の自然感染に依存しているような試験は続けることが困難となっている。しかしながら, pyrimethamine と sulfadimethoxine の混合投与方法を野外でおこなうことは安全性と経済性の観点から著明な改良をもたらすものと考えられる。

本研究にたいし, 御援助, 御指導を賜った農林省農水産技術会議, 家畜衛生試験場, 薬品の提供をうけた Wellcome 社ならびに共立商事株式会社, 第一製薬株式会社, 武田薬品工業株式会社に謝意を表します。

また主として本研究に対して, 後藤養鶏学術奨励賞を授与された財団法人後藤学術報恩会に対して, 深甚なる謝意を表します。

引 用 文 献

- 1) Akiba, K., Kawashima, H., Inui, S. and Ishii, S. (1958) : Studies on Leucocytozoon of Chickens in Japan. I. Natural Infection of *L. caulleryi*. Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth. 34; 163~180. (In Japanese, English Summary)
- 2) Akiba, K. (1960) : Studies in Leucocytozoon Found in the Chicken in Japan. II. On the Transmission of *L. caulleryi* by *Culicoides arakawae*. Jap. J. Vet. Sci. 22 ; 309~317.
- 3) Akiba, K., Morii, T., Ebisawa, S., Nozawa, S. and Minai, T. (1963) : Field trials for the Prevention of *Leucocytozoon caulleryi* Infection in Chickens by Use of Primethamine, Sulfisomezole, Sulfadimethoxine and Furazolidone. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 3; 188~196.

- 4) Akiba, K., Ebisawa, S., Nozawa, s., Komiyama, T. and Minai, T. (1964) : Preventive Effect of Pyrimethamine and Some Sulfonamide on *Leucocytozoon caulleryi* in Chickens. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 4 (4) 222~228.
- 5) Ball, S. B. (1960) : Assosiation of Various Sulphonamide and Pyrimethamine in the Chemotherapy of Caecal Coccidiosis. J. Comp. Patho. 70; 249~256.
- 6) Clark, M. L. (1962) : A Mixture of Diaveridine and Sulphoquininoxaline as a Coccidiostat for Poultry. I. Preliminary Studies on Efficiency against *Eimeria tenella* and *E. necatrix* Infections, and Toxicity in Poultry. Vet. Rec. 74 ; 845~847.
- 7) Eyles, D. E. and Coleman, N.(1955) : An Evaluation of the Curative Effect of Pyrimethamine, alone and in Combination, on Experimental Mouse Toxoplasmosis. Antibiotics and Chemotherapy. V ; 529~539.
- 8) Eyles, D. E. and Frances, E. J. (1955) : The Chemotherapeutic Effect of Pyrimethamine and Sulfadiazine on Toxoplasmosis of the Norway Rat. Antibiotics and Chemotherapy V ; 731~734.
- 9) Frenkel, J. K. and Hitchings, G. H. (1957) : Relative reversal by Vitamins (P-Amino-benzoic Acid, Folic, and Folinic Acid) on the Effect of Sulfadiazine and Pyrimethamine on Toxoplasma, Mouse and Man. Antibiotics and Chemotherapy. VII; 630~638.
- 10) Hori, S., Toriumi, T. and Tanabe, A. (1964) : Studies on the Prevention of Leucocytozoon Infection of the Chicken. II. The Preventive Effect of Furazolidone on Leucocytozoon Infection of the Chicken. Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University. 24; 55~61. (In Japanese, English Summary)
- 11) Hori, S., Toriumi, T. and Tanabe, A. (1964) : Studies on the Leucocytozoon Disease. On the Preventive Effect of Pyrimethamine and Diaveridine. Proceeding of the 57th Meeting of J. S. V. S.
- 12) Hori, S., Toriumi, T. and Tanabe, A. (1965) : Studies on the Prevention of Leucocytozoon Infection of the Chicken. III. The Preventive Effect of Diaveridine. The Scientific Reports of the Faculty of Agriculture Okayama University. 25; 31~36. (In Japanese, English summary)
- 13) Hori, S., Toriumi, T. and Tanabe, A. (1965) : Studies on the Prevention of Leucocytozoon Infection of the Chicken, V. The Preventive Effect of Pyrimethamine and Sulfadimethoxine and the Synergism Between Them. Proceeding of 59th Meeting of J. S. V. S.
- 14) Horton-Smith, C. Long, P. L. and Collier, H. O. J. (1960) : Potentiation of Sulfadimidine by 2,4-Diamino-6,7-di-Isopropylpteridine and other 6,7-Di-substituted 2,4-Diaminopteridines Against *Eimeria* Infections of Chicks. Brit. J. Pharmacol. 15; 298.
- 15) Joyner, L. P. and Kendall, S. V. (1955) : Synergism in the Chemotherapy of *Eimeria tenella*. Nature, London. 176; 975.
- 16) Kendall, S. B. and Joyner, L. P. (1956 a) : The Synergism between Pyrimethamine and Sulphadimethylpyrimidine in the Control of *Eimeria tenella*. J. Comp. Patho. 66; 145~150.
- 17) Kendall, S. B. and Joyner, L. P. (1956 b) : The Potentiation of the Coccidiostatic Drugs by Pyrimethamine. Vet. Rec. 68; 119~121.
- 18) Kendall, S. B. and Joyner, L. P. (1958) : Potentiation of the Coccidiostatic Effects of Sulphadimidine by Five Different Folic-acid Antagonists. Vet. Rec. 70; 632~633.

- 19) Long, L. P. (1963) : The Effect of a Combination of Sulphaquinoxaline and Amprorium against Different Species of *Eimeria* in Chickens. *Vet. Rec.* 75 ; 645~650.
- 20) Lux, R. E. (1954) : The Chemotherapy of *Eimeria tenella*. I. Diaminopyrimidines and Dihydrotriazines. *Antibiotics and Chemotherapy*. IV. 971~977.
- 21) Rollo, I. M. (1955) : The Mode of Action of Sulphonamides, Proguanil and Pyrimethamine on *Plasmodium Gallinaceum*. *Brit. J. Pharmacol.* 10; 208~214.
- 22) 堀 慧, 五島治郎, 玉崎幸二, (1962~1964) : 鶏のロイコチトゾーン病に関する研究, 農林漁業試験研究費補助金による報告書, 昭. 37, 38, 39年度.
- 23) 堀 慧, 鳥海徹, 田辺昭(1963) : 鶏のロイコチトゾーン病に関する研究, Furazolidone, Sulfadimethoxine, Diaveridine による感染予防試験 (予報).
日本畜産学会関西支部報. 第38輯 : 9.
- 24) 松井 修, 小沢宜雄, 川崎 晃, 岩本敏雄, 上野満弘 (1963) : 鶏のロイコチトゾーン病の予防に関する研究. I. 予防剤の効果に関する試験, 岡山県養鶏試験場試験研究報告, 6; 82.