

臨床上健康な来院犬における *Babesia gibsoni* 抗体 保有状況の検討

相馬武久^{1)†} 今本成樹²⁾ 長谷隆司³⁾ 加藤 玲⁴⁾
砂川一浩⁵⁾ 尾原正和⁶⁾ 玄 学南⁷⁾

- 1) マルピー・ライフテック(株) 臨床検査部 (〒563-0011 池田市伏尾町103)
- 2) 奈良県 開業 (新庄動物病院: 〒639-2144 葛城市葛木104-1)
- 3) 兵庫県 開業 (姫路エルザ動物病院: 〒670-0811 姫路市野里155)
- 4) 和歌山県 開業 (アイリス動物病院: 〒646-0011 田辺市新庄町96-27)
- 5) 香川県 開業 (砂川犬と猫の病院: 〒761-0301 高松市林町1956-1)
- 6) 和歌山県 開業 (おはら動物病院: 〒645-0005 日高郡みなべ町南道329-4)
- 7) 帯広畜産大学原虫病研究センター (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

(2014年11月28日受付・2014年12月26日受理)

要 約

日本における臨床上重要な犬の住血原虫である *Babesia gibsoni* の感染状況を知るために、組み換え BgTRAP 抗原を用いた ELISA により、2014 年 3～8 月に奈良県、兵庫県、和歌山県及び香川県の動物病院に来院した健康な犬 1,905 頭について血中 *B. gibsoni* 抗体検査を実施した。その結果、101 例 (5.3%) が抗体陽性であった。飼育環境、マダニ駆虫薬投薬の有無、ダニ寄生歴の条件では陽性率に有意差は認められず、完全室内飼育例や駆虫薬を投薬した例であってもそれぞれ 5.8% 及び 3.8% が陽性であった。血液学、生化学検査の結果、貧血傾向、白血球数が高値、アルカリホスファターゼが高値の例で有意に高い陽性率であった ($P < 0.05$)。以上の知見はどのような状況や条件の犬でも本原虫の感染リスクがあり、感染例の中には見かけ上健康であっても本原虫の影響を受けている例が少なからず存在していることを示すものである。——キーワード: 抗体, *Babesia gibsoni*, BgTRAP, 健康犬, ELISA.

----- 日獣会誌 68, 301～305 (2015)

犬バベシア症はアピコンプレックス門のピロプラズマ目に分類されるバベシア原虫 (*Babesia* spp.) の血球感染に起因する犬における臨床上非常に重要なマダニ媒介性の感染症であり、溶血性貧血や血小板減少を主な徴候とする [1, 2]。日本では *B. canis* と *B. gibsoni* の 2 種のバベシア原虫の感染症例が報告されているが [3, 4]、*B. canis* は日本ではこれまで沖縄県のみで犬での発生がみられていることと、一般的に病原性が *B. gibsoni* より低いことから、日本では *B. gibsoni* が臨床上重要視されている [4]。 *B. gibsoni* の感染例は全国で見られるが、西日本で多く報告されている [5, 6]。さらに、土佐犬やピットブルテリアなどの闘犬で高率に感染が確認されており [7]、マダニによる媒介以外に咬傷などによ

る直接的な感染経路も指摘されている [8]。

B. gibsoni の感染による症状の程度には幅があり、重篤化例や感染しても飼い主が気づかない不顕性感染例も知られている [8, 9]。さらに、感染犬は症状回復後も長期間または終生キャリアーとなり [8]、その後ストレスや薬剤などにより原虫が再活性化する例も少なくない [10]。また、経胎盤感染や輸血による感染の可能性についても報告されている [1, 8]。このため、潜在的な感染例を含め、本原虫の感染状況を把握しておくことは予防獣医学的に重要であると思われる。

そこで、本研究では見かけ上健康な犬における *B. gibsoni* の感染状況を明らかにするために、抗体検出感度と特異性が高い遺伝子組み換え *B. gibsoni* トロンボ

† 連絡責任者: 相馬武久 (マルピー・ライフテック(株) 臨床検査部)

〒563-0011 池田市伏尾町103 ☎072-753-0335 FAX 072-754-2208

E-mail: takehisa-soma@ah.ds-pharma.co.jp

表1 県別にみた *B. gibsoni* 抗体陽性率

県名	抗体陽性率 (%)	合計に対する有意差
奈良	5.7 (24/423)	なし
兵庫	3.5 (35/1,011)	$P < 0.05$, $\chi^2 = 5.03$
和歌山	16.8 (18/107)	$P < 0.0001$, $\chi^2 = 24.16$
香川	6.6 (24/364)	なし
合計	5.3 (101/1,905)	

スポンディン関連接着 (BgTRAP) 抗原を用いた ELISA [1, 8, 11] により, 血中の *B. gibsoni* 特異抗体の保有状況を検討した. さらに, 抗体陽性と判定された例について寄生虫血症の有無を知るために PCR により全血材料から *B. gibsoni* DNA の検出を試みた.

材料及び方法

犬血液: 2014年3~8月に奈良県, 兵庫県, 和歌山県及び香川県の動物病院に健康診断のために来院した家庭で飼育されている臨床上健康な犬1,905頭から EDTA-2Na 処理の抗凝固処理血液を採取し, その遠心上清 (血漿) を *B. gibsoni* 抗体検査に供試した. 及び, 抗体陽性と判定された例の全血材料を用いて *B. gibsoni* PCR を実施した. 各供試犬について飼育環境, マダニ駆虫薬投薬の有無, マダニ寄生歴, 年齢, 性別, 品種, 血液学検査及び生化学検査値のデータを収集した. 血液学及び生化学値については, 血球容積比率 (PCV), 赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (HGB), 総白血球数 (WBC), 血小板数 (PLT), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アルカリホスファターゼ (ALP), 乳酸脱水素酵素 (LDH) 及び総ビリルビン (T-bil) について検討した. なお, これら検査項目の基準値は成書に従い設定した [12-14]. また, 抗体検査のカットオフ値の設定のために, SPF ビーグル犬 197 頭の血漿を供試した.

抗体検査: 大腸菌遺伝子組み換え BgTRAP 抗原を用いた ELISA 法を用いた [11, 15]. すなわち, 10mM 炭酸緩衝液 (pH9.6) で $1 \mu\text{g/ml}$ に調整した BgTRAP (陽性抗原) と大腸菌 GST (陰性抗原) を 96 ウェル ELISA 用プレートに $50 \mu\text{l}$ / ウェル分注した. 37°C で 90 分間固相化後, ブロッキング溶液 (ブロックエース, DS ファーマバイオメディカル株, 大阪) を分注し, 37°C で 1 時間放置した. この固相化プレートに 1% 牛血清アルブミン加里ン酸緩衝食塩液 (PBS) で 1:100 に希釈された血清を $50 \mu\text{l}$ / ウェル分注した. 37°C 1 時間反応後, Tween 20 加 PBS (PBST) で 3 回洗浄, 5,000 倍希釈ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗犬 IgG (H+L) 抗体 (Jackson Immuno Research, U.S.A.) を $50 \mu\text{l}$ / ウェル分注し, 37°C 1 時間反応させた. PBST で 3 回洗浄後, 0.2M

表2 飼育環境別, マダニ駆虫薬投薬の有無及びマダニ寄生歴別にみた *B. gibsoni* 抗体陽性率

環境因子	抗体陽性率 (%)	有意差	
飼育環境 n=1,854	完全室内	5.8 (47/810)	なし
	室内外	4.3 (36/838)	
	完全屋外	7.3 (15/206)	
マダニ駆虫 n=1,811	有り	3.8 (35/912)	なし
	無し	5.3 (48/899)	
マダニ寄生歴 n=1,194	有り	6.6 (9/136)	なし
	無し	4.5 (48/1,058)	

ABTS 加クエン酸緩衝液を $100 \mu\text{l}$ / ウェル分注した. 37°C 30 分間反応後, 415nm の吸光度を測定し, 陽性抗原と陰性抗原の吸光度の差を抗体価 (ELISA 値) とした.

PCR: 抗凝固処理全血材料から DNA 精製キット (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen science, U.S.A.) で得られた精製物を, *B. gibsoni* P18 遺伝子を標的とするプライマーペア (d3-d4) [16] 各 $0.4 \mu\text{M}$, 0.2mM dNTPs, 1.5U DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems, U.S.A.) を含む混合液に加え, 95°C 10 分間反応後, 変性 94°C 30 秒間, アニーリング 54°C 1 分間, 伸張 72°C 1 分間の反応を 40 サイクル行った. PCR 反応液にローディングバッファーを加え, 2% アガロースゲルにアプライし, 100V で約 30 分間泳動した. DNA バンドを可視化するためにゲルをエチジウムブロミド溶液に浸漬し, 紫外線下で 182bp の増幅産物の有無を観察した.

統計学的解析: 2 群間の抗体陽性率及び ELISA 値の比較はそれぞれカイ二乗検定及び *t* 検定を用いて検討し, *P* 値 0.05 未満を有意差ありとした.

成績

SPF ビーグル犬 197 頭での ELISA 値の平均値と標準偏差は 0.012 ± 0.036 で, 既報 [11, 17] に従いその平均値 + $3 \times$ 標準偏差をカットオフ値 (0.120) に設定した. この値以上を抗体陽性とした場合, 全 1,905 例中 101 例 (5.3%) が *B. gibsoni* 抗体陽性と判定された.

地域別の成績では, 和歌山県での抗体陽性率 (16.8%) が全体 (5.3%) と比較して有意に高く, 兵庫県 (3.5%) は有意に低い値を示した (表 1). また, 年齢別の成績 (n = 1,813) では, 1 歳未満では抗体陽性例は検出されず (n = 42), その後加齢に伴う抗体陽性率の上昇が観察された (図 1). 5 歳以下 762 例と 6 歳以降 1,051 例の抗体陽性率はそれぞれ 2.8% 及び 6.6% で, 両群間に有意な差が認められた ($P < 0.05$, $\chi^2 = 13.59$). なお, 血液採材月別, 性別及び品種別の比較では, 有意な差は認められなかった.

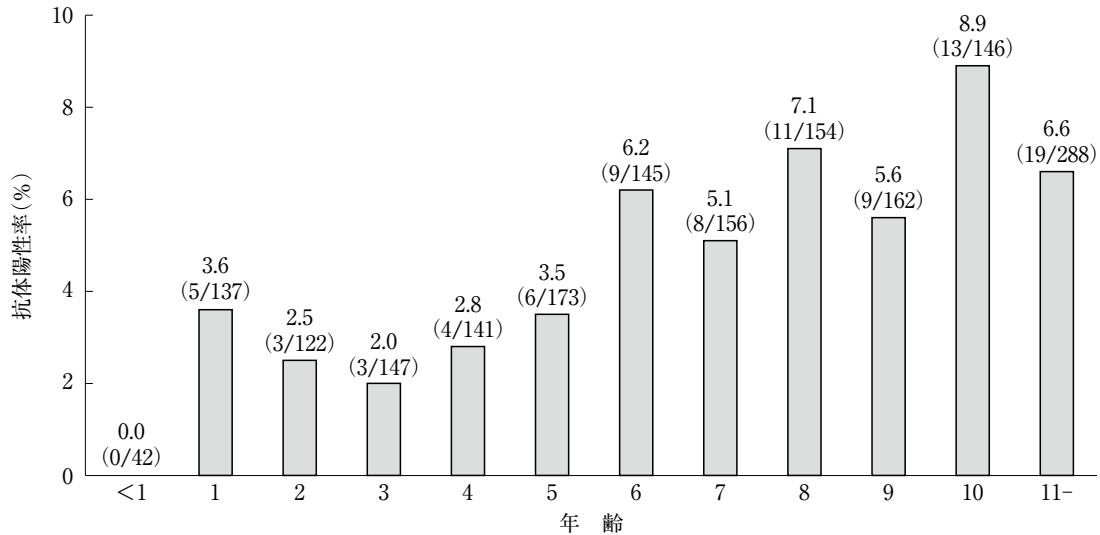


図1 年齢別に見た *B. gibsoni* 抗体陽性率

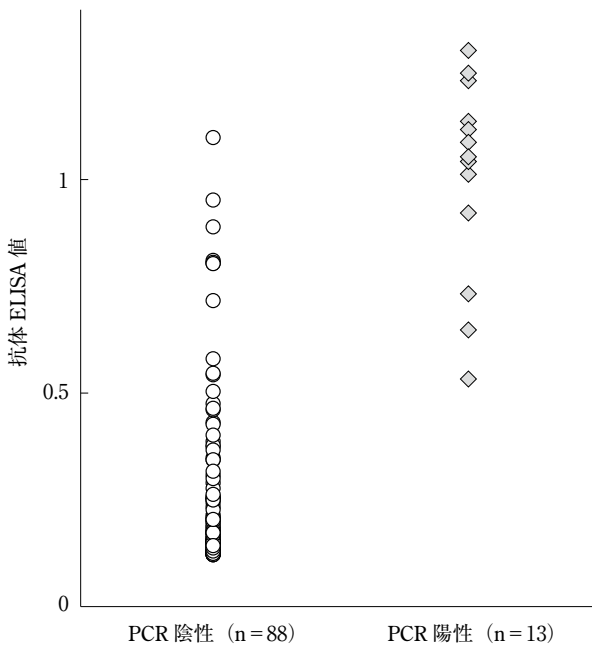


図2 *B. gibsoni* 抗体価 (ELISA 値) と PCR 検査結果との比較

表3 血液学値, 生化学値にみた *B. gibsoni* 抗体陽性率

項目	測定値	抗体陽性率 (%)	有意差
PCV (%) n=320	~36.9	40.9 (9/22)	$P<0.0001$ $\chi^2=27.65$
	37.0~	7.0 (21/298)	
RBC ($\times 10^4/\mu l$) n=304	~549	27.8 (5/18)	$P<0.05$ $\chi^2=9.04$
	550~	7.3 (21/286)	
HGB (g/dl) n=295	~11.9	40.0 (6/15)	$P<0.0001$ $\chi^2=21.47$
	12.0~	6.4 (18/280)	
WBC ($\times 10^3/\mu l$) n=322	~17.0	8.1 (24/296)	$P<0.05$ $\chi^2=9.04$
	17.1~	23.1 (6/26)	
PLT ($\times 10^4/\mu l$) n=301	~19.9	11.9 (5/42)	なし
	20.0~	8.5 (22/259)	
ALT (IU/l) n=287	~101	7.8 (19/243)	なし
	102~	13.6 (6/44)	
AST (IU/l) n=122	~60	9.9 (10/101)	なし
	61~	23.8 (5/21)	
ALP (IU/l) n=267	~237	5.0 (9/181)	$P<0.05$ $\chi^2=6.49$
	238~	14.0 (12/86)	

次に、飼育環境 (n=1,854)、マダニ駆虫薬投薬の有無 (n=1,811)、マダニ寄生歴 (n=1,194) について抗体陽性率を比較したところ、それぞれの条件において有意な差は認められず、完全室内飼育例やマダニ駆虫薬投薬歴がある例であっても、それぞれ5.8%及び3.8%で抗体陽性であった (表2)。

抗体陽性であった101例中12.9% (奈良県2例, 兵庫県1例, 和歌山県8例, 香川県2例, 計13例) においてPCRが陽性と判定され、そのうち6例及び1例はそれぞれ完全室内飼育例, マダニ駆虫薬投薬歴ありの個体であった。そして、これら抗体陽性例のELISA値とPCR検査結果を比較したところ、図2に示すように

PCR陰性例とPCR陽性例のELISA値の平均値と標準偏差はそれぞれ 0.291 ± 0.213 , 0.993 ± 0.234 で、PCR陽性例は陰性例に比べて有意に高いELISA値を示した ($P<0.0001$)。

血液学値, 生化学値と抗体陽性率との検討結果を表3に示す。PCV (n=320), RBC (n=304) 及びHGB (n=295) が低値であった例では有意に低い抗体陽性率であり、WBC (n=322) 及びALP (n=267) が高値であった例では有意に高い抗体陽性率であった。なお、有意ではなかったが、PLT (n=301) が低値, ALT (n=287) またはAST (n=122) が高値の例で高い抗体陽性率であった (表3)。なお、LDH及びT-bilについては検査

値が得られた例数がそれぞれ 19 例, 26 例と少なかったため, 今回の解析からは除外した。

考 察

BgTRAP 抗原を用いた ELISA は, これまで汎用されてきた間接蛍光抗体法とは異なり *B. gibsoni* 以外のピロプラズマ目の原虫とは交差性を示さず, 他の *B. gibsoni* の組み換え抗原を用いた ELISA よりも高感度に抗体を検出できることから, 本原虫の感染を判断するためには優れた検査方法であると考えられている [8, 11, 15]. このことから, 日本の一部の地域における結果ではあるが, 本研究の成績は一般家庭で飼育されている健康な犬における *B. gibsoni* の感染状況を反映しているものと思われる。

これまでに Konishi ら [17] により, 同様の原虫抗原を利用した ELISA による西日本の犬における *B. gibsoni* 抗体の保有率は 13.8% と報告されており, 本研究の割合 (5.3%) より高い。しかしながら, 彼らの報告では症状別の抗体陽性率は不明であり, 中には犬バベシア症が疑われる症例も含まれていることから, 健康例のみを対象とした比較はできない。今回, 国内では飼い主が気づかず見かけ上健康な犬であっても, 一定の比率で感染例が存在している可能性が示唆された。また, これまでの疫学調査 [9] と同様に, 加齢に伴う抗体陽性率の上昇が観察されており, *B. gibsoni* 感染のリスクが高齢犬でより高いことは診断上考慮すべき重要な要素の一つであると考えられる。

また, PCV, RBC または HGB が低値で貧血傾向を示す例と WBC 増加を示す例で抗体陽性率が高かったことは, 見かけ上健康であっても *B. gibsoni* に感染し, その感染の影響を受けている例が存在していることを示唆している。さらに, 飼育環境の種類, マダニ駆虫薬投薬の有無及びマダニ寄生歴の有無と抗体陽性率には有意な差が認められなかったが, 完全室内飼育の例やマダニ駆虫薬を投薬した例であっても, それぞれ 5.8% 及び 3.8% が抗体陽性と判定され, さらにそれぞれ 6 例及び 1 例で PCR 陽性であったことから, 原虫血症の状態である可能性も示唆された。以上の知見は, どのような状況や条件の犬であっても *B. gibsoni* の感染リスクがあることを示唆している。このため, 本症による犬への病原性を最小限にするためには, できるだけ早期に診断することが重要であり, 少なくとも定期健康診断などで貧血傾向や WBC の増加など血液学検査や生化学検査で異常値がみられた場合は *B. gibsoni* の感染を考慮する必要があり, 診断する手段の一つとして今回用いた *B. gibsoni* 抗体検査が有効であると思われる。

本研究において ELISA 値は PCR 陽性例で有意に高かった。今回の ELISA 値は必ずしも抗体の力価及び量を

反映しているとはいえないが, 原虫血症では本原虫の抗原刺激がより高まり, その結果として抗体産生量が増加している可能性が考えられる。このため, 特に ELISA などで抗体価が高値であった例については, 血液塗抹や PCR により原虫血症の有無についてもあわせて検査する必要があると思われる。ただし, 一般的に *B. gibsoni* 感染犬は長期間もしくは終生感染状態となると考えられており [8], さらに本症による貧血の程度は必ずしも原虫血症の強度に比例するわけではなく, 免疫が介在している場合も多い [8, 18, 19]. このため, 原虫血症の有無にかかわらず何らかの異常値がみられている抗体陽性例については治療の対象となると思われ, 今後, 治療試験などで検討する必要がある。

今回, 和歌山県での抗体陽性率が高く, 兵庫県は低い結果となり, これまでの日本での本症の発生状況 [5, 6] とほぼ一致している。しかし, 本研究での調査範囲は各県ともに一部の地域での成績であることから, 地域差について検討するためには今後さらに大規模かつ詳細な調査が必要であると思われる。

引用文献

- [1] Birkenheuer AJ: Babesiosis, Infectious diseases of the dog and cat, Greene CE, ed, 4th ed, 771-784, Saunders Elsevier, St. Louis (2012)
- [2] Irwin PJ: Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control, Parasit Vectors, 26, 2 (Suppl 1), S4 (2009)
- [3] Inokuma H, Yoshizaki Y, Matsumoto K, Okuda M, Onishi T, Nakagome K, Kosugi R, Hirakawa M: Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan, Vet Parasitol, 121, 341-346 (2004)
- [4] 猪熊 壽: 犬・猫のバベシア症, 動物の感染症, 清水悠紀臣ら編, 341-342, 近代出版, 東京 (2002)
- [5] 猪熊 壽, 田井貴子, 市川康明: 犬 *Babesia gibsoni* 感染症の発生状況に関する全国アンケート調査, 日獣会誌, 65, 293-298 (2012)
- [6] 大西堂文, 仲井真由子, 後藤あかね, 堀江牧夫, 仲田恵利香, 梶川武次: 日本における犬 *Babesia gibsoni* 感染症の発生状況, 日獣会誌, 47, 23-28 (1994)
- [7] Miyama T, Sakata Y, Shimada Y, Ogino S, Watanabe M, Itamoto K, Okuda M, Verdidia RA, Xuan X, Nagasawa H, Inokuma H: Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in eastern Japan, J Vet Med Sci, 67, 467-471 (2005)
- [8] Irwin PJ: Canine babesiosis, Vet Clin Small Anim Pract, 40, 1141-1156 (2010)
- [9] 杉村 肇, 坂口真也, 今村圭太, 見山孝子, 島田洋二郎, 坂田義美, 板本和仁, 奥田 優, 猪熊 壽: 犬糸状虫感染予防に来院した犬のバベシア, ヘモバルトネラおよびエールリッヒア感染状況調査, 日獣会誌, 59, 267-270 (2006)
- [10] Ramsey I, Gunn-Moore D, Shaw S: The haemopoietic and lymphoreticular systems, Manual of canine and

- feline infectious diseases, Ramsey I and Tennant B, ed, 65-88, Brit Small Anim Vet Assoc, Gloucester (2001)
- [11] Goo YK, Jia H, Aboge GO, Terkawi MA, Kuriki K, Nakamura C, Kumagai A, Zhou J, Lee EG, Nishikawa Y, Igarashi I, Fujisaki K, Xuan X : *Babesia gibsoni*: Serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP, *Exp Parasitol*, 118, 555-560 (2008)
- [12] Jain NC : 獣医血液学, 作野幸孝訳, 1-19, LLLセミナー, 鹿児島 (1996)
- [13] Jain NC : 獣医血液学, 作野幸孝訳, 111-140, LLLセミナー, 鹿児島 (1996)
- [14] 桃井康行 : 酵素関係, どうぶつ病院臨床検査, 福原佳子編, 1-36, ファームプレス, 東京 (2009)
- [15] Narantsatsral S, Goo YK, Battsetseg B, Myagmarsuren P, Terkawi MA, Soma T, Luo Y, Li Y, Cao S, Yu L, Kamyngkird K, Aboge GO, Nishikawa Y, Xuan X : Expression of truncated *Babesia gibsoni* thrombospondin-related adhesive proteins in *Escherichia coli* and evaluation of their diagnostic potential by enzyme-linked immunosorbent assay, *Exp Parasitol*, 129, 196-202 (2011)
- [16] Fukumoto S, Xuan X, Shigeno S, Kimbita E, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T : Development of a polymerase chain reaction method for diagnosing *Babesia gibsoni* infection in dogs, *J Vet Med Sci*, 63, 977-981 (2001)
- [17] Konishi K, Sakata Y, Miyazaki N, Jia H, Goo YK, Xuan X, Inokuma H : Epidemiological survey of *Babesia gibsoni* infection in dogs in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay using *B. gibsoni* thrombospondin-related adhesive protein antigen, *Vet Parasitol*, 155, 204-208 (2008)
- [18] Adachi K, Makimura S : Changes in anti-erythrocyte membrane antibody level of dogs experimentally infected with *Babesia gibsoni*, *J Vet Med Sci*, 54, 1221-1223 (1992)
- [19] Inokuma H, Okuda M, Yoshizaki Y, Hiraoka H, Miyama T, Itamoto K, Une S, Nakaichi M, Taura Y : Clinical observations of *Babesia gibsoni* infection with low parasitaemia confirmed by PCR in dogs, *Vet Rec*, 156, 116-118 (2005)

Prevalence of Anti-*Babesia gibsoni* Antibodies in Clinically Healthy Dogs

Takehisa SOMA^{1)†}, Shigeki IMAMOTO²⁾, Takashi HASE³⁾, Akira KATO⁴⁾, Kazuhiro SUNAGAWA⁵⁾, Masakazu OHARA⁶⁾ and Xuenan XUAN⁷⁾

- 1) *Veterinary Diagnostic Laboratory, Marupi Lifetech Co. Ltd., 103 Fushiocho, Ikeda, 563-0011, Japan*
- 2) *Shinjo Animal Hospital, 104-1 Katsuragi, Katsuragi, 639-2144, Japan*
- 3) *Himeji Elsa Animal Hospital, 155 Nozato, Himeji, 670-0811, Japan*
- 4) *Iris Animal Hospital, 96-27 Shinjocho, Tanabe, 646-0011, Japan*
- 5) *Sunagawa Animal Hospital, 1956-1 Hayashicho, Takamatsu, 761-0301, Japan*
- 6) *Ohara Animal Hospital, 329-4 Minamido, Minabecho, Hidakagun, 645-0005, Japan*
- 7) *National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inadacho, Obihiro, 080-8555, Japan*

SUMMARY

To investigate the prevalence of *Babesia gibsoni* infection, a clinically important haemoprotozoan, in dogs in Japan, we performed antibody testing using ELISA with a recombinant BgTRAP antigen. Of 1,905 healthy dogs living in the prefectures of Nara, Hyogo, Wakayama, and Kagawa from March to August 2014, 101 (5.3%) were positive for the *B. gibsoni* antibody. The rearing environment, the anthelmintic administration for treatment, and the history of ixodid parasitism had no significant influence on the rate of positive findings. Among dogs housed indoors and those given anthelmintic treatment, 5.8% and 3.8%, respectively, were positive. Hematological and biochemical examinations revealed that the positive rate was significantly greater in dogs with anemic tendency, high leukocyte count, and increased alkaline phosphatase ($P < 0.05$). These findings suggest that dogs of any status and in all rearing environments are at risk for infection with the protozoa, and not a few apparently healthy dogs have been affected. — Key words : antibody, *Babesia gibsoni*, BgTRAP, dog, ELISA.

† Correspondence to : Takehisa SOMA (Veterinary Diagnostic Laboratory, Marupi Lifetech Co. Ltd.)

103 Fushiocho, Ikeda, 563-0011, Japan

TEL 072-753-0335 FAX 072-754-2208 E-mail : takehisa-soma@ah.ds-pharma.co.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 301 ~ 305 (2015)