

犬のヘモバルトネラ症に関する研究

II. 間接蛍光抗体法による *Haemobartonella canis* 抗体の検出

情野正道**・其田三夫*
高橋清志*・黒沢 隆*

Studies on Canine Haemobartonellosis

II. Examination of *Haemobartonella canis* Antibody by Indirect Fluorescent Antibody Test

Masamichi SEINO**, Mitsuo SONODA*, Kiyoshi TAKAHASHI*
and Takashi KUROSAWA*

(May, 1986)

I 緒 言

Haemobartonella canis (以下 *H. canis* と略記) のわが国における分布を明らかにする目的で、*Theileria* 症⁸⁾、*Babesia* 症⁹⁾、*Eperythrozoon* 症^{1,4)} および猫 *Haemobartonella* 症²⁻³⁾ などの血清抗体測定法として用いられている蛍光抗体間接法を用いて、接種感染例における *H. canis* の出現状態および血液学的変化と蛍光抗体価との関係について検討した。ついで、長崎市、相模原市、盛岡および江別市の犬から得た血清について、抗体価の測定を試みたので、その概要を報告する。

II 材料および試験方法

1. 供試材料と試験方法

1) 抗体価の測定方法 抗犬 γ -グロブリンの標識抗体は、ウイルス実験学記載の方法⁵⁾ に準じて作製し、家畜内科学教室で冷凍保存中のものを使用した。

抗原と染色法 抗原は Giemsa 染色塗抹標本で、*H. canis* の寄生率が 卅~卍を示した時期の血液を採取 (Figs. 5-7) し、pH 7.2, 0.01 M の PBS で洗浄、血小板および白血球を

* 獣医学科, 家畜内科学教室

Department of Veterinary Medicine (Veterinary Internal Medicine), Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan

** 仙台市八木山動物公園

Sendai Zoological Park, 43, 1-chome, Yagiyamahoncho, Sendai, Miyagi, 982, Japan

できるだけ除去，その後，カバーガラスに薄層塗抹したもの（生塗抹）およびその生塗抹をシリカゲルを入れたシャーレに入れて密封して， -20°C に保存したもの（凍結塗抹）を抗原とした。また，*H. canis*の寄生の認められない健康犬の血液を用いて作製したものを対照とした。

染色は高橋らの方法⁸⁾に準じて行った。すなわち，塗抹抗原を冷アセトンで10分間固定し，PBSで洗浄し，被検血清で感作させた後，PBSで洗浄し，標識抗体を 37°C で30分間反応させた。ついでPBSで洗浄，風乾して50%グリセリン加蒸溜水で封入して観察に供した。

その際，蛍光顕微鏡のBOフィルターを用い，虫体が確認され，かつ蛍光を発しているのが確認出来るものを抗体陽性（+）と判定した。また抗体価は+以上の蛍光を発した血清の最大希釈倍数で表わした。この場合，出生後7日以内で*H. canis*陰性の確認された子犬の血清で20倍希釈まで非特異的蛍光が認められたため，40倍以上希釈してもなお蛍光の認められるものをもって陽性血清とした。

本法の特異性を明らかにするため，*H. canis*寄生赤血球の塗抹および正常赤血球塗抹抗原を用い，一次反応で*H. canis*陽性血清および二次反応で抗犬 γ -グロブリン標識抗体の反応系，一次反応で*H. canis*陽性血清および二次反応で生理食塩液の反応系，一次反応で*H. canis*陰性血清および二次反応で抗犬 γ -グロブリン標識抗体の反応系，一次反応で*H. canis*陰性血清および生理食塩液の反応系，一次反応に生理食塩液および二次反応で抗犬 γ -グロブリンの反応系，一次反応に抗犬 γ -グロブリン標識抗体で二次反応は行わない反応系をそれぞれ用いて検討した（Table 1）。

その結果，*H. canis*の寄生した赤血球抗原に一次反応で*H. canis*陽性血清を作用させ，ついで二次反応で抗犬 γ -グロブリン標識抗体を反応させた系列のみに蛍光が認められた（Figs. 8-10）が，その他の系列では，蛍光は全く認められなかった。また，対照とした正常犬赤血球塗抹標本では，同様の処理で，何れの系列にも蛍光は認められなかった。なお，

Table 1. Test for Specificity of Indirect Fluorescent Antibody Technique

Pretreatment serum	Labelled antibody	Result
Haemobartonella-infected	Rabbit anti-canine globulin	20-320
Haemobartonella-infected	Saline solution	-
Haemobartonella-uninfected	Rabbit anti-canine globulin	-
Haemobartonella-uninfected	Saline solution	-
Saline solution	Rabbit anti-canine globulin	-
—	Rabbit anti-canine globulin	-

生抗原と凍結抗原との比較では、両者間に全く差は認められなかった。よって凍結抗原を用いて上述の方法に従って抗体価の測定を実施した。

2) *H. canis* の寄生率の抗体価の検索

供試材料は、すでに報告⁷⁾した1例の無処置犬(血液接種後第30日に脾摘術を施した)および脾摘犬3例の計4例に *H. canis* 感染血液をそれぞれ10 ml 静注し、その後24~52日間観察し、それらの供試犬から得た血清を供試して抗体価を求めた。また、Giemsa 染色した血液塗抹標本の鏡検により得た *H. canis* の寄生率から両者の関係を検討した。なお、*H. canis* の寄生率は、赤血球500個当りの寄生赤血球を算定し、寄生赤血球の全く認められない場合(-)、10%以下の検出を(+), 10~30%の検出を(++)、30~60%の検出を(###)および60%以上の検出を(####)として寄生率を表現した。

3) 血清抗体価の地区別および年齢別調査

全国4カ所(長崎市, 相模原市, 盛岡市, 江別市)の大学附属家畜病院, または開業動物病院に治療あるいは健康診断のために来院した47例の犬から得た血清および札幌市畜犬

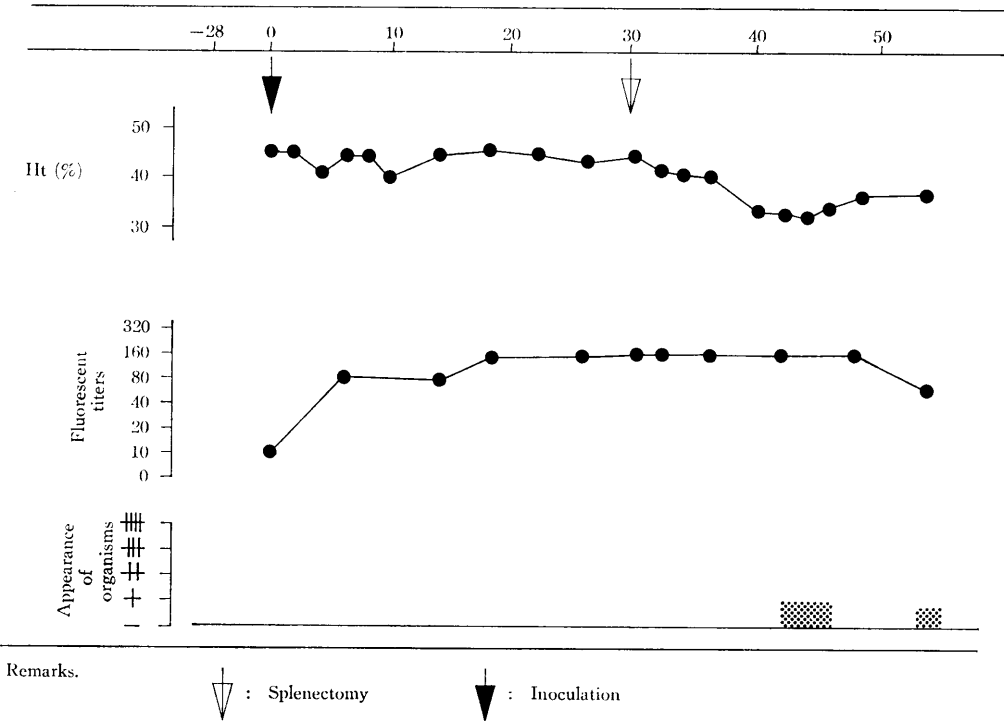


Fig. 1. Relationship between the number of organisms appearing in dogs inoculated with *Haemobartonella canis* and the fluorescent antibody titers (dog No. 1)

抑留所の幼若犬 16 例 (生後 1 週齢) から血清を採取し抗体価の測定に供した。

III 試験成績

1. *H. canis* の寄生率と抗体価

供試犬 No. 1 (無処置例-Fig. 1): 接種後第 6 日に抗体価の上昇があり, 第 18 日には 160 倍を示した。抗体価はそのまま 30 日間持続したが, その後低下した。その間, *H. canis* は接種後第 42 日 (脾摘後第 12 日) に初めて末梢血での出現が確認され, 5 日間出現した後消失した。抗体価の低下を示した時期 (接種後第 52 日) に再び, *H. canis* の出現があった。

供試犬 No. 2 (脾摘例-Fig. 2): 接種前の抗体価は 20 倍であった。接種後, 抗体価は経過とともに上昇し, 接種後第 24 日に最高値の 320 倍を示し, その後 12 日間持続した。そ

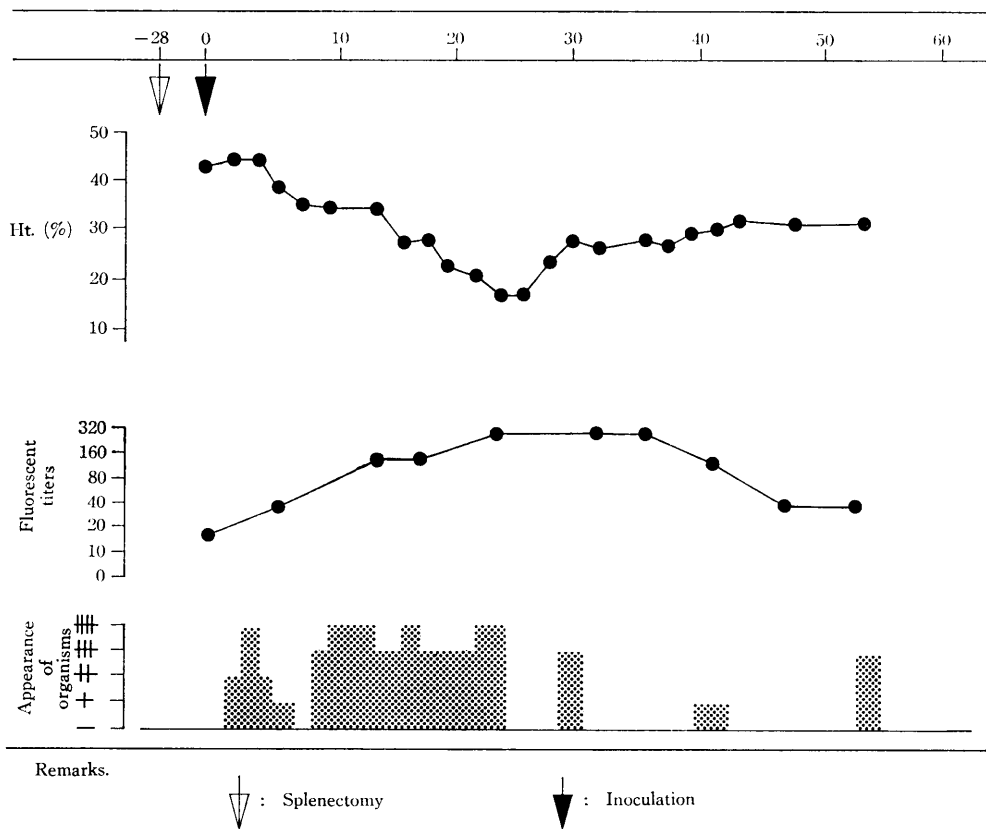


Fig. 2. Relationship between the number of organisms appearing in dogs inoculated with *Haemobartonella canis* and the fluorescent antibody titers (dog No. 2)

の後は徐々に低下し、接種後第48日には40倍となった。その間 *H. canis* は4回の消退時期があったが、総体的には+~卍の出現率を示し、抗体価のピークに達した第24日から逆に減少の傾向がみられた。観察終了時には、再び寄生率の増高を認めた。

供試犬 No. 3 (脾摘例-Fig. 3): 本例の抗体は、接種前80倍とやや高い値を示していた。その後は上昇したが、第20日には逆に低下し、抗体価は40倍の値を示した。接種後第30日以降の抗体価は80~160倍と高い値で推移した。その間 *H. canis* の寄生率は、接種後第2日に卍を示し、その後は不定の消長をとった。しかし、抗体価の低下した第20~25日頃には寄生率が卍となったが、抗体価の上昇とともに寄生率は減少傾向を示し、第40日以降には、完全に消失した。

供試犬 No. 4 (脾摘例-Fig. 4): 接種前の抗体価は、供試犬のうち最も高い320倍を示していた。観察末期の接種後第24日には、40倍と低下した。その間、*H. canis* は接種後

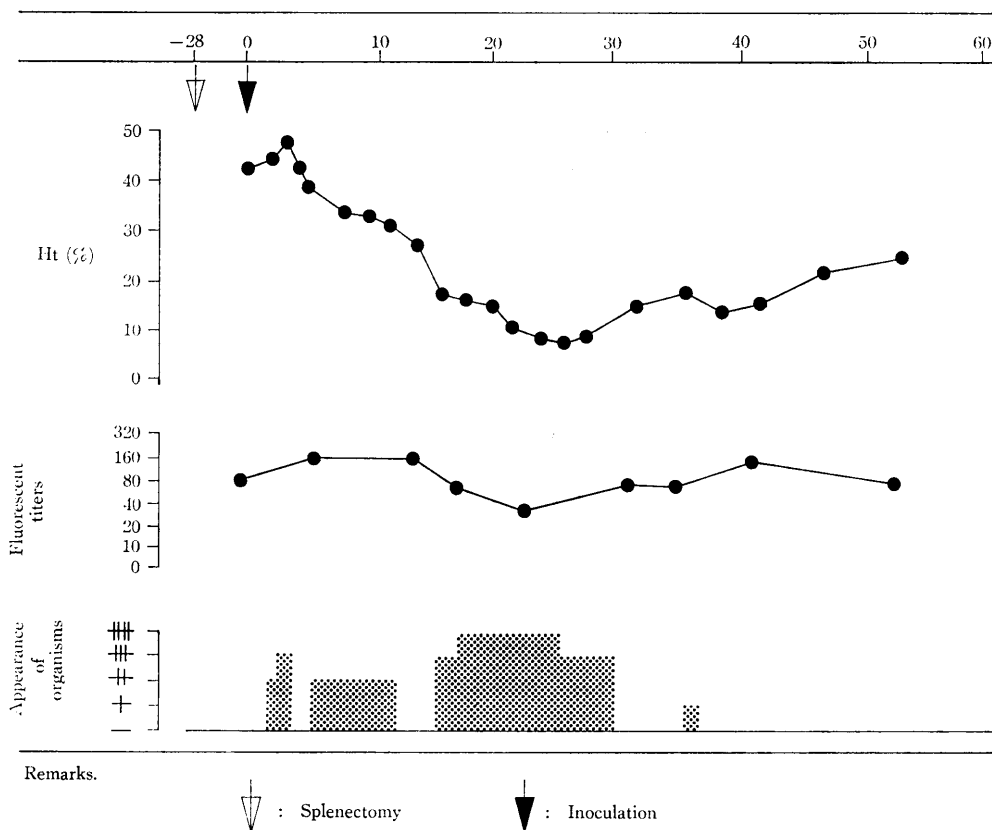


Fig. 3. Relationship between the number of organisms appearing in dogs inoculated with *Haemobartonella canis* and the fluorescent antibody titers (dog No. 3)

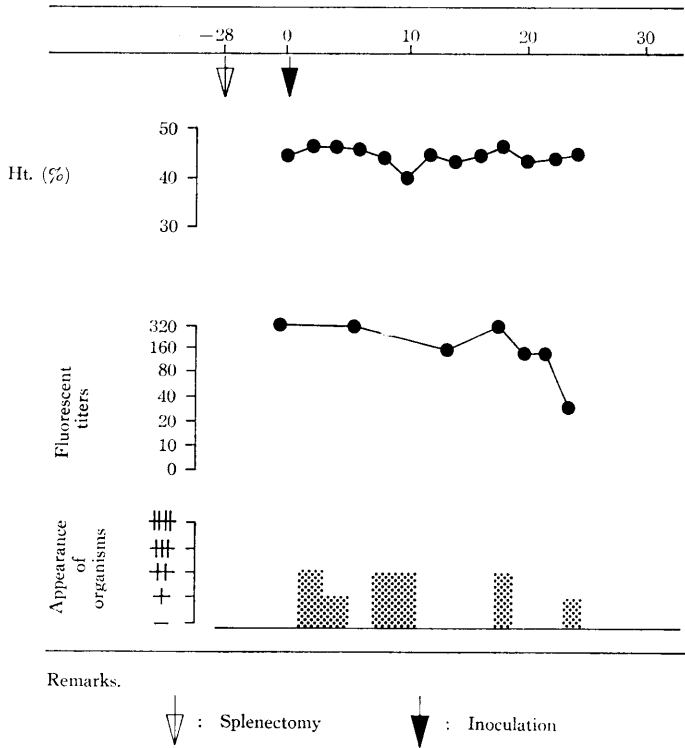


Fig. 4. Relationship between the number of organisms appearing in the dogs inoculated with *Haemobartonella canis* and the fluorescent antibody titers (dog No. 4)

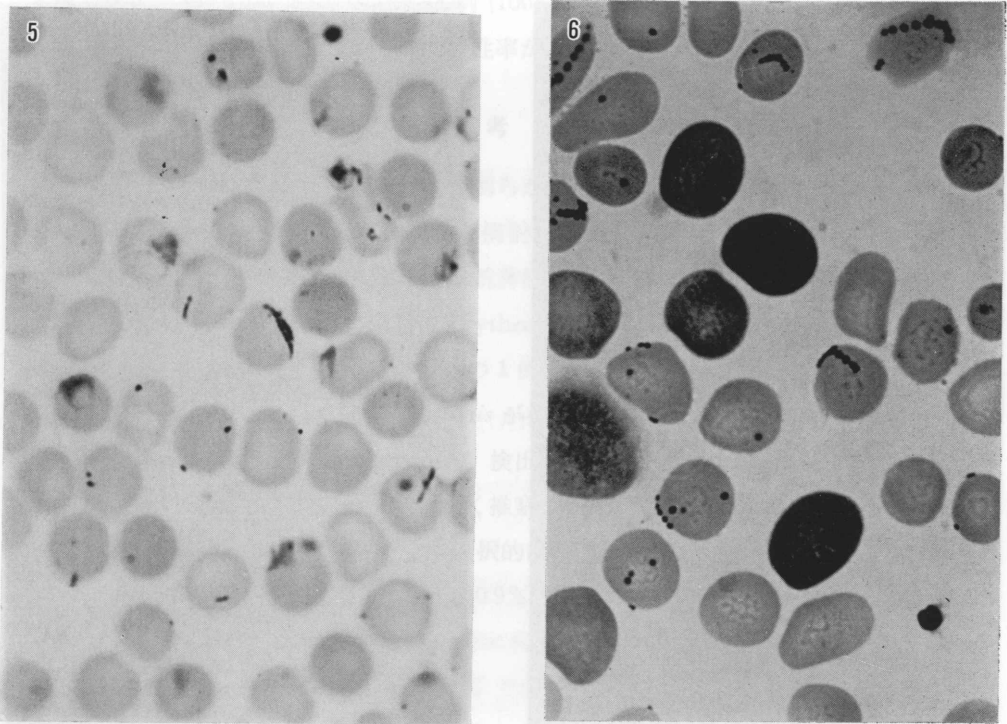
第2日から末梢に出現したが、他の脾摘供試犬に比較してその出現率は低かった。抗体価が40倍と低下した時期には、*H. canis*の再出現が認められた。

2. 地区別抗体価 (Table 2)

長崎市の8例、相模原市の16例、盛岡市の13例および江別市の10例、合計47例から得た犬血清の抗体価は、20~320倍であった。抗体価が40倍以上で、陽性と判定されたものは、長崎市で7例(87.5%)、相模原市で13例(81.3%)、盛岡市で11例(84.6%)および江別市で7例(70.0%)であった。なお、全国4カ所の蛍光抗体陽性例の平均は80.9%であった。

3. 年齢別抗体価

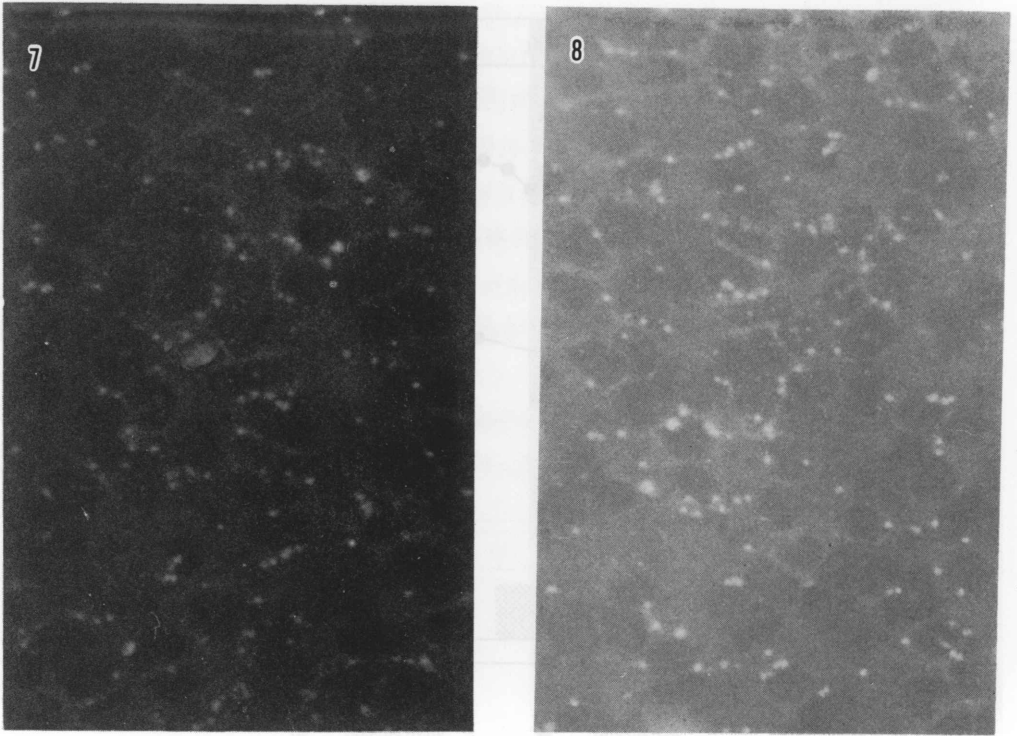
上述の47例の供試血清のうち、年齢の明らかな40例と札幌市畜犬抑留所から得た1週間以内の子犬16例について、抗体調査を行ったところ Table 3のような成績が得られた。すなわち、0~7日齢では全例が陰性であったが、8日齢~1歳未満では3例(50.0%)、1~



Figs. 5-6. Light micrographs of *Haemobartonella canis*. Whole blood smear with heavily infested erythrocytes. Organisms appear either singly as dark spots or aggregates. Giemsa-stained $\times 1000$

Table 2. Distribution of Indirect Fluorescent Antibodies against *Haemobartonella canis* in Canine Sera Collected in Four Cities

Areas	No. of sera	Antibody Titers					Antibodies	
		<1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	No. of positive sera	Percentage
Nagasaki city	8	1	3	2	1	1	7	87.5
Sagamihara city	16	3	2	7	3	1	13	81.3
Morioka city	13	2	4	5	1	1	11	84.6
Ebetsu city	10	3	2	2	1	2	7	70.0
Total	47	9	11	16	6	5	28	Average 80.9



Figs. 7-8. Blood films of dog with *Haemobartonella canis* infection stained by the indirect fluorescent antibody method. Organisms appearing as intensely fluorescent yellow coccidial bodies were apparently attached to the erythrocytes.

Table 3. Indirect Fluorescent Antibody Titers in Dogs Grouped by Age

Age	No. of dogs	Antibody Titers					No. of positive dogs	Percentage
		<1:20	1:40	1:80	1:160	1:320		
1 week old or less	16	16	0	0	0	0	0	0
between 1 week and 1 year old	6	3	3	0	0	0	3	50.0
1-2 years old	8	3	1	2	0	2	5	62.5
3-4 years old	8	0	2	2	3	1	8	100.0
5-6 years old	6	0	1	2	1	2	6	100.0
more than 7 years old	12	1	4	5	2	0	11	91.7
Total	56	23	11	11	6	5	33	Average 58.9

2歳では5例(62.5%)、3~6歳では14例(100%)および7歳以上では11例(91.7%)がそれぞれ陽性を示し、年齢の多いもので陽性率が高かった。

IV 考 察

H. canis のわが国の犬における分布を明らかにする目的で、蛍光抗体間接法を用いて、*H. canis* の接種例につき抗体価の推移を検討したところ、*H. canis* の検出率がかかなり低下するか、あるいは完全に消失した後に抗体価は増高する傾向がみられた。Rhoads and Miller⁶⁾ および Ohder⁴⁾ はヒツジの eperythrozoon 症で類似の成績を得たことを報告している。接種試験に用いた脾摘犬のうちの1例で、接種前から蛍光抗体価が320倍と高い値を示していた例では、接種後に *H. canis* が検出されたとはいえ臨床および血液所見にとくに異常は認められなかったことから、検出された抗体は、虫体の出現およびその活性に対して抑制的に作用しているものの如く推察される。

つぎに全国4カ所の47例の犬から無選択的に得た血清について抗体価を測定したところ、抗体の陽性率は70.0~87.5%、平均80.9%であった。このような高い陽性率から推察すると、わが国の犬では、*H. canis* を高率に保有しているものと推察される。年齢別にみた抗体陽性率は、0~7日齢のものでは0%であったが、加齢とともに上昇の傾向をとり、3歳以上で91.7~100.0%の陽性率を示したことから、*H. canis* の胎盤感染はないものと推察され、また年齢とともに *H. canis* の感染の機会の多いことが示唆された。

V 要 約

蛍光抗体間接法を用いて、*H. canis* 接種感染例における虫体の出現状態、およびそれと蛍光抗体価との関係について検討したのち、長崎市、相模原市、盛岡および江別市の犬から得た血清について抗体価の測定を実施した。

1. *H. canis* 感染血液を接種した無処置および脾摘犬について、蛍光抗体間法により、*H. canis* に対する抗体価の消長を検討した結果、脾臓の有無に拘りなく当初抗体価の低い例では上昇が明瞭であったが、高い例では、接種の影響は殆どみられなかった。

2. 蛍光抗体法で検出された抗体価は、血液中からの *H. canis* の減少あるいは消失に引続いて上昇し、また *H. canis* は抗体価の減少とともに出現の傾向をとった。

3. 全国カ4所からの47犬血清について抗体の陽性率をみたところ、長崎地区では87.5%と最も高く、盛岡地区84.6%、相模原地区81.3%および江別地区70.0%の順であり、全国の平均陽性率は80.9%であった。

4. 血清抗体の陽性率を年齢別に観察したところ、1週齢以内の子犬では0%、8日~1

歳未満では50.0%，1～2歳では62.5%および3～6歳では100.0%で，加齢とともに上昇していた。

謝 辞

供試犬血清の採取に御協力を賜った長崎市開業秦良治修士，麻布大学小林好作博士および岩手大学村上大蔵博士にそれぞれ御礼を申しあげます。

文 献

- 1) 花松憲光・成田亮一・吉田 宏 (1975). 牛エベリスロゾーンの螢光抗体法に関する検討. 第79回日本獣医学講演.
- 2) 岩淵成紘・山田隆紹・長谷川篤彦・臼井和哉 (1977). ネコ伝染性貧血に関する研究. 第84回日本獣医学会講演.
- 3) Herrer, A. (1943). Microorganismo, Posiblemete del grupo bartonella-grahmella, aislado de un perro. (A microorganism possible of the bartonella-grahmella isolated from the dog.) *Rev. Med. Expt.*, Lima, Peru, 2, 1-8. [*Vet. Bull.*, 17 (1958): 465].
- 4) 小岩政照・高橋清志・其田三夫 (1978). 綿羊の Eperythrozoonosis に関する研究. 2. 螢光抗体間接法による抗体の検出とその消長. 第85回日本獣医学会講演.
- 5) 国立予防衛生研究所学友会 (1973). ウイルス実験学総論. 丸善, 東京, 248-279.
- 6) Rhoads, C. P. and Miller, D. K. (1935). The association of bartonella bodies with induced anemia in the dog. *J. Exp. Med.* 61, 139-148.
- 7) Seino, M., Sonoda, M., Takahashi, K., Kurosawa, T. and Koiwa, M. (1984). Studies on canine haemobartonellosis. I. Clinical observations on dogs inoculated with *Haemobartonella canis*. *J. Coll. Dairying* 10(2), 399-413.
- 8) Takahashi, K., Yamashita, S. and Shimizu, Y. (1972). Detection of a species of bovine theileria and its antibody by fluorescent antibody technique. *Jap. J. Vet. Sci.* 34, 275-281.
- 9) 田村 孝 (1977). Babesia gibsoni 実験感染犬における臨床所見と抗体との関係についての研究. 酪農学園大学紀要, 7, 141.

Summary

To clarify the distribution of *Haemobartonella canis* among the dogs in Japan, the indirect fluorescent antibody technique was used in these studies.

1. In both groups of intact and splenectomized dogs inoculated with *Haemobartonella canis*, the antibody titers showed a marked increase in the cases of low titers at an early stage, but in the cases of high titers, no influence of the inoculation was observed.

2. The antibody titers tended to rise following the decrease or disappearance of *Haemobartonella canis* in the blood, but the number of *Haemobartonella canis* tended to increase in accordance with the decrease of the antibody titers.

3. The examinations of positive rate of antibodies in the 47 dogs from 4 cities showed a high of 87.5% for Nagasaki and a low of 70.0% for Morioka, and 80.9% for

the average.

4. The positive rates of antibodies in accordance with ages were 0% for puppies of 1 week old or less, 50% for dogs between 1 week and 1 year old, 62.5% for dogs of 1-2 years old and 100% for 3-6 years old dogs showing an increase with advance of age.