

近畿及び四国の一部地域の臨床上健康な家庭犬における トキソプラズマとネオスポラに対する抗体保有状況

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)

(2015年4月22日受付・2015年6月19日受理)

要 約

犬の重要な神経系感染因子である *Toxoplasma gondii* と *Neospora caninum* の感染状況を知るために、組換え抗原を用いた ELISA により 2014 年に奈良県, 兵庫県, 和歌山県及び香川県で飼育されていた臨床上健康な家庭犬 1,979 頭について抗体調査を実施した。 *T. gondii* と *N. caninum* の陽性率はそれぞれ 7.0%, 4.2% で, 1.2% が両抗体陽性であった。 *T. gondii* の陽性率は屋外飼育犬と雑種犬でそれぞれ 11.0%, 11.3% と, 高い値を示した。 *T. gondii* と *N. caninum* の陽性率はともに 1 歳以降, 加齢に伴い上昇した。しかしながら, 1 歳未満で *T. gondii* 陽性例がまったく検出されなかったのに対して, 11.1% で *N. caninum* 陽性を示した。以上の知見は日本の家庭犬において状況や条件により *T. gondii* と *N. caninum* の高い感染リスクが存在していることを示唆するものである。

—キーワード: 犬, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*.

----- 日獣会誌 68, 581~585 (2015)

犬におけるトキソプラズマ症とネオスポラ症はそれぞれ孢子虫綱に分類される組織内寄生性原虫である *Toxoplasma gondii* 及び *Neospora caninum* の感染による代表的な神経系疾患で, 両者は非常に類似した臨床症状を発現する [1-3]。さらに, 電子顕微鏡下ではいくつかの違いはあるものの, 形態学的にも両原虫を区別することは容易ではない [1, 4]。両原虫は恒温動物に対して広い宿主域をもっており, 犬は *T. gondii* の中間宿主, *N. caninum* の終宿主となりうる [1-3]。

T. gondii に感染した犬は通常不顕性に推移するが, ストレスや薬剤による免疫抑制や他の病原体との混合感染により症状がしばしば顕性化する [1, 5]。 *T. gondii* の犬へのおもな感染経路としては猫の糞便中に排泄され

るオーシストや食肉などの組織中シストの経口摂取があげられ, まれではあるが経胎盤感染も報告されている [1]。トキソプラズマ症は代表的な人獣共通感染症の一つであるが, 犬は猫とは異なり *T. gondii* のオーシストが糞便中へ排泄されることがないことと, 少なくとも日本では食肉として供されることがないことから, 人への直接的な感染源にはならない。しかし, 犬は汚物や糞便を好んで口にする性質があることから, 人へオーシストを機械的に媒介している可能性が指摘されている [6, 7]。

N. caninum の場合も感染犬の大半は不顕性に推移するが, 特に若齢犬では重症化し, 高齢犬においては原虫の再活性化による神経症状の発現をみることがある

† 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

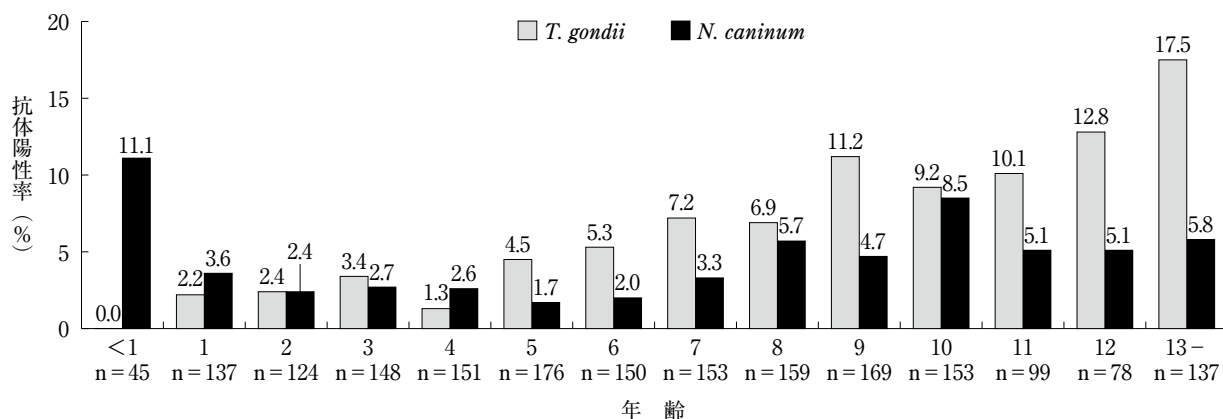


図 犬の年齢別に見た *T. gondii* 抗体と *N. caninum* 抗体の陽性率 (n: 検体数)

[1]. また, *N. caninum* は比較的容易に経胎盤感染を起し, その子犬は高い頻度で致死的な神経症状を発現するといわれている [8]. なお, 人において *N. caninum* に対する抗体の存在を示す報告はあるが, 人への感染性や病原性については証明されていない [1, 2].

T. gondii と *N. caninum* は小動物の獣医療における重要な病原体の一つであり, これら感染症の現状を把握しておくことは動物の臨床だけでなく, 公衆衛生学的にも重要と考えられる. そこで, 本研究では近年の日本における両原虫感染の疫学を知る一助として, 大腸菌遺伝子組換え抗原を用いた酵素免疫吸着測定法 (ELISA) により家庭犬を対象とした抗体調査を実施した.

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 (それぞれ1, 5, 2, 1カ所の病院) に健康診断のために来院した一般の家庭で飼育されている外見上何ら症状を呈していない (臨床的健康な) 犬の中から無作為に抽出した1,979頭から EDTA-2Na 処理で抗凝固処理血液を採取した. 採取後は速やかに郵送にて遠心上清 (血漿) をマルピー・ライフテックに送付し, 抗体検査に供試した. さらに, 各供試犬の情報として年齢, 性別, 避妊去勢の有無, 品種をカルテから, 飼育環境を病院での飼い主からの聞き取りにより入手した. また, 抗体検査のカットオフ値 (陽性判定値) 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: *T. gondii* 及び *N. caninum* 特異抗体の検出はそれぞれ大腸菌遺伝子組換え TgSAG2 抗原 [9] 及び NcSAG1 抗原 [10] を用いた ELISA で実施した. すなわち, 陽性抗原として TgSAG2 または NcSAG1, 陰性抗原として大腸菌グルタチオン S 転移酵素 (GST) をそれぞれ 10mM 炭酸緩衝液 (pH9.6) で 1 µg/ml に調整した液 50 µl/ ウエルを 96 ウエル ELISA 用プレートに分注した. 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 300 µl/ ウエル分注した. 37°C で 1 時間放置後, この固相化プレートに 1% 牛血清アルブミン加リン酸緩衝食塩液 (PBS) で 1:100 に希釈した血漿を 50 µl/ ウエル分注した. 37°C で 1 時間反応後, Tween20 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 µl/ ウエル分注し, 37°C で 1 時間反応させた. PBST で 3 回洗浄後, 0.2M ABTS 加クエン酸緩衝液を 100 µl/ ウエル分注した. 37°C で 30 分間反応後, 415nm の吸光度を測定し, それぞれの陽性抗原と陰性抗原の吸光度の差を ELISA 値とした.

統計学的解析: 2 群間の抗体陽性率の比較はそれぞれカイ二乗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 *T. gondii* 及び *N. caninum* の ELISA 値の平均値と標準偏差はそれぞれ 0.018 ± 0.045 , 0.014 ± 0.027 であった. 既報 [10, 11] に従ってこれらの平均値 + 3 × 標準偏差をカットオフ値としたところ (それぞれ 0.153, 0.095), 全 1,979 例中 138 例 (7.0%) 及び 84 例 (4.2%) がそれぞれ *T. gondii* 抗体, *N. caninum* 抗体が陽性と判定された. 両抗体が陽性と判定されたものは 23 例 (1.2%) であった.

年齢別にみたところ (n=1,879), 図に示すように *T. gondii* 抗体については 1 歳未満の 45 例中陽性例はまったく検出されず, その後加齢に伴う陽性率の顕著な上昇が観察された. そこで, 便宜的に 6 歳以下の 931 例と 7 歳以上の 948 例に分けて陽性率を比較したところ, 前者と後者の *T. gondii* 抗体の陽性率はそれぞれ 3.1%, 10.4% で, 両群間に有意差が認められた ($P < 0.0001$). 一方, *N. caninum* 抗体についても 6 歳以下と 7 歳以上の陽性率に有意差が示されており (それぞれ

表 犬の性別、避妊去勢の有無、品種別、飼育環境別及び食事別に見た *T. gondii* 抗体及び *N. caninum* 抗体検査結果

項目	測定数	陽性数 (陽性率)	
		<i>T. gondii</i>	<i>N. caninum</i>
性別	雄 n=945	63 (6.7%)	33 (3.5%)
	雌 n=923	73 (7.9%)	48 (5.2%)
去勢の有無 (雄)	有 n=267	15 (5.6%)	11 (4.1%)
	無 n=678	48 (7.1%)	22 (3.2%)
避妊の有無 (雌)	有 n=416	33 (7.9%)	18 (4.3%)
	無 n=507	40 (7.9%)	30 (5.9%)
品種別	雑種 n=247	28 (11.3%)	14 (5.7%)
	純血種 n=1,701	107 (6.3%)	67 (3.9%)
飼育環境別	室内 n=870	52 (6.0%)	33 (3.8%)
	屋外 n=218	24 (11.0%)	8 (3.7%)
	両方 n=882	62 (7.0%)	41 (4.6%)
食事別	家庭料理のみ n=18	1 (5.6%)	0
	市販フードのみ n=1,140	83 (7.3%)	51 (4.5%)
	両方 n=355	25 (7.0%)	16 (4.5%)

* 品種別 (雑種と純血種), 飼育環境別 (室内と屋外) で *T. gondii* 抗体陽性率に有意差あり (それぞれ $P=0.0035$, $P=0.0091$).

2.9%, 5.5%; $P=0.0052$), *T. gondii* に比べると緩やかではあるが, 1歳以降, 加齢に伴う陽性率の上昇が観察された (図). しかし, *T. gondii* と違って1歳未満で5例 (11.1%) の *N. caninum* 抗体陽性例が観察されており, 1歳以上の陽性率 (4.0%; 74/1,834) と比較したところ有意に高値であった ($P=0.0195$).

その他の項目の検討では, 表に示すように *T. gondii* の抗体陽性率では雑種が純血種に比べて有意に高く, 屋外飼育が室内飼育に比べて有意に高い成績であった (それぞれ $P=0.0035$, $P=0.0091$). 一方, *N. caninum* 抗体については各項目とも陽性率に有意差は示されなかった.

考 察

衛生状態の改善や生活習慣の変化などにより, 日本での *T. gondii* の感染率は人, 動物ともに近年減少傾向を示している [12-15]. しかしながら, 本研究において見かけ上健康であっても一般家庭で飼育されている犬の

7.0%が *T. gondii* 抗体が陽性と判定された. そして, 屋外飼育犬と雑種犬に限定するとその陽性率はそれぞれ 11.0%, 11.3%と, 高値を示した. この成績は依然としてわが国では犬において決して低いとは言えない感染リスクが存在していることを示すものである. *T. gondii* 抗体陽性率の加齢に伴う上昇が犬や猫の過去の疫学調査結果で示されているが [14-16], 本研究でもきわめて顕著な加齢に伴う陽性率の上昇が観察された. この成績は本原虫の水平感染が高頻度であることを強く示唆するものであり, その主要な感染経路は屋外でのオーシストの暴露によるものと思われる. なお, 一般的に雑種は純血種に比べて外出や屋外飼育の頻度が高く, 屋外飼育の条件と同様に高い陽性率となったものと推測される. また, 犬が人への *T. gondii* のオーシストの機械的ベクターであることが指摘されており [6, 7], 本研究の成績は特に屋外飼育犬や外出頻度の高い犬については公衆衛生的な問題についても考慮する必要性を示すものと考ええる.

一方, *N. caninum* 抗体の陽性率については *T. gondii* のような飼育環境や品種による差はみられなかった. この知見は屋外での *N. caninum* の感染リスクは必ずしも高いものではなく, 食肉中のシストや垂直感染などその他の重要な感染経路が存在しているものと考えられる. *N. caninum* においても緩やかではあるが, 同様に加齢に伴う抗体陽性率の上昇が観察された. しかしながら, 1歳未満において *T. gondii* の抗体陽性例がまったく検出されなかったのに対して, 5例 (11.1%) で *N. caninum* 抗体が陽性と判定された. *N. caninum* に感染した母犬では非常に頻繁に, かつ反復して経胎盤感染が起こるといわれており [8, 17-19], さらに過去のいくつかの疫学調査では1歳未満の *N. caninum* 抗体の陽性率が1歳以上に比べ高値を示す成績が示されている [20, 21]. 本研究での1歳未満の *N. caninum* 抗体陽性例は8カ月齢以上であったため移行抗体とは考えにくく, 経胎盤感染例の可能性が高いものと推測される. 残念ながらこれら5例の予後についての情報を得ることができなかったが, 1歳以降に観察された *N. caninum* 抗体陽性率の著減は, 経胎盤感染子犬における高頻度な致死的症状の発現に起因しているものと推測される [8].

本研究により, 日本の家庭犬における *T. gondii* と *N. caninum* の感染状況の概要を得ることができたものの, 調査地域が近畿と四国の一部に限定していたことから, 日本での両原虫感染の疫学を示すには十分な成績とは言えない. さらに, *T. gondii* と *N. caninum* は産業動物における主要な繁殖障害の感染性因子でもあり [22, 23], そのリザーバーとしての面からも犬での両原虫の感染状況は重要と思われる. 以上のことから, 両原虫感染に対して, より正確かつ詳細で, 時宜にかなった

疫学情報を提供できるように今後も継続した調査に努めていきたいと考えている。

引用文献

- [1] Dubey JP, Lappin MR : Toxoplasmosis and neosporosis, Infectious diseases of the dog and cat, Greene CE, ed, 4th ed, 806-827, Saunders Elsevier, St Louis (2012)
- [2] Lappin MR : Toxoplasmosis, Canine and feline infectious diseases, Syke JE, ed, 693-703, Elsevier Saunders, St Louis (2014)
- [3] Sykes JE : Neosporosis: Canine and feline infectious diseases, Sykes JE, ed, 704-712, Saunders Elsevier, St Louis (2014)
- [4] Speer CA, Dubey JP : Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*, J Protozool 36, 458-463 (1989)
- [5] Capen CC, Cole CR : Pulmonary lesions in dogs with experimentally and naturally occurring toxoplasmosis, Pathol Vet, 3, 40-63 (1996)
- [6] Etheredge GD, Michael G, Muehlenbein MP, Frenkel JK : The roles of cats and dogs in the transmission of *Toxoplasma* infection in Kuna and Embera children in eastern Panama, Rev Panam Salud Publica, 16, 176-186 (2004)
- [7] Lindsay DS, Dubey JP, Butler JM, Blagburn BL : Mechanical transmission of *Toxoplasma gondii* oocysts by dogs, Vet Parasitol 73, 27-33 (1997)
- [8] Barber JS, Trees AJ : Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs, Int J Parasitol, 28, 57-64 (1998)
- [9] Huang X, Xuan X, Kimbita EN, Battur B, Miyazawa T, Fukumoto S, Mishima M, Makala LH, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T, Igarashi I : Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant SAG2 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats, J Parasitol, 88, 804-807 (2002)
- [10] Chahan B, Gaturaga I, Huang X, Liao M, Fukumoto S, Hirata H, Nishikawa Y, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Igarashi I, Mikami T, Xuan X : Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1, Vet Parasitol, 118, 177-185 (2003)
- [11] Kimbita EN, Xuan X, Huang X, Miyazawa T, Fukumoto S, Mishima M, Suzuki H, Sugimoto C, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T, Igarashi I : Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1, Vet Parasitol, 102, 35-44 (2001)
- [12] 浅見成志, 川合 覚, 井上ますお, 清水泰美, 狩野繁之, 鈴木 守 : 群馬県内の飼育豚における抗トキソプラズマ抗体保有率の現状, 寄生虫誌, 44, 28-31 (1995)
- [13] Khin-Sane-Win, Matsumura T, Kumagai S, Uga S, Konishi E : Prevalence of antibody to *Toxoplasma gondii* in Hyogo prefecture, Japan: comparison at a 10-year interval, Kobe J Med Sci, 43, 159-168 (1997)
- [14] 相馬武久, 齋藤奈美子 : 1993~2004年の本邦の家猫におけるトキソプラズマ抗体の保有率, 環境と病気, 14, 5-9 (2005)
- [15] 相馬武久, 齋藤奈美子 : 犬におけるトキソプラズマ抗体の保有状況, 環境と病気, 17, 1-5 (2008)
- [16] Maruyama S, Hiraga S, Yokoyama E, Naoi M, Tsuruoka Y, Ogura Y, Tamura K, Namba S, Kameyama Y, Nakamura S, Katsube Y : Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* infections among pet cats in Kanagawa and Saitama Prefectures, J Vet Med Sci, 60, 997-1000 (1998)
- [17] Cavalcante GT, Soares RM, Nishi SM, Hagen SC, Vannucchi CI, Maiorka PC, Paixão AS, Gennari SM : Experimental infection with *Neospora caninum* in pregnant bitches, Rev Bras Parasitol, 21, 232-236 (2012)
- [18] Dubey JP, Koestner A, Piper RC : Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs, J Am Vet Med Assoc, 197, 857-860 (1990)
- [19] Heckerroth AR, Tenter AM : Immunoanalysis of three litters born to a Doberman bitch infected with *Neospora caninum*, Parasitol Res, 100, 837-846 (2007)
- [20] Maia C, Cortes H, Brancal H, Lopes AP, Pimenta P, Campino L, Cardoso L : Prevalence and correlates of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in Portugal, Parasite 21, 29 (2014)
- [21] Nguyen TT, Choe SE, Byun JW, Koh HB, Lee HS, Kang SW : Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from Korea, Acta Parasitol, 57, 7-12 (2012)
- [22] Dubey JP : Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals, Korean J Parasitol, 41, 1-16 (2003)
- [23] Quinn PJ, McCraw BM : Current status of *Toxoplasma* and toxoplasmosis: a review, Can Vet J, 13, 247-262 (1972)

Prevalence of *Toxoplasma* and *Neospora* Antibodies in Clinically Healthy Household Dogs in Some Parts of the Kinki and Shikoku Regions

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 *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections, which are clinically important infectious agents of the nervous system, in dogs, we performed antibody tests for *T. gondii* and *N. caninum* using ELISA with recombinant antigens. Of 1,979 clinically healthy household dogs living in the prefectures of Nara, Hyogo, Wakayama, and Kagawa in 2014, 7.0% were positive for *T. gondii* antibodies, 4.2% were positive for *N. caninum* antibodies, and 1.2% were positive for both. Dogs kept outdoors (11.0%) and crossbred dogs (11.3%) showed higher *T. gondii* antibody positive proportions than dogs kept indoors. Both positive proportions of *T. gondii* and *N. caninum* antibodies increased with age in the dogs aged one year or older. However, among the dogs under one year of age, none were *T. gondii*-positive, whereas 11.1% were positive for *N. caninum*. The above findings indicate that household dogs have a risk of *T. gondii* and *N. caninum* infections in Japan depending on how they are kept.

— Key words : Dog, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*.

† 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, 581 ~ 585 (2015)