

犬バベシア症流行地における犬の *Babesia gibsoni* 不顕性感染状況

白永伸行^{1),2)} 羽迫広人³⁾ 相津康宏¹⁾ 山本健人¹⁾
佐藤立人⁴⁾ 白永純子¹⁾ 猪熊 壽^{2),5)†}

- 1) 山口県 開業 (シラナガ動物病院：〒745-0806 周南市桜木2-12-18)
- 2) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
- 3) 山口県 開業 (ことのは動物病院：〒759-0204 宇部市妻崎開作38-1)
- 4) 熊本県 開業 (さとう動物病院：〒869-3205 宇城市三角町波多821-8)
- 5) 帯広畜産大学獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

(2018年7月7日受付・2018年10月29日受理)

要 約

犬バベシア症流行地において *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*) 不顕性感染状況を調査した。臨床上健康な犬500頭のうち *B. gibsoni* 特異的PCR陽性38頭(7.6%)を不顕性感染とした。不顕性感染犬の平均年齢(9.2歳)は、PCR陰性で *B. gibsoni* 感染症既往歴のない犬(7.4歳)に比べて高かった。不顕性感染犬の97.4%は外出する犬であった。*B. gibsoni* 感染症既往歴のない犬で外出する275頭を解析したところ、不顕性感染犬においてマダニ予防薬を適切に使用されていた犬の割合(6.3%)は非感染犬(44.8%)に比べて有意に低かった。外出とマダニ予防不徹底は *B. gibsoni* 感染リスクを高めると考えられた。不顕性感染犬の赤血球数、血球容積、ヘモグロビン濃度及び血小板数は非感染犬より低値を示し、*B. gibsoni* 不顕性感染は犬の血液性状に影響を及ぼしていた。

——キーワード：*Babesia gibsoni*, 犬, リスクファクター, 不顕性感染。

-----日獣会誌 72, 291~295 (2019)

日本の犬バベシア症の多くは *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*) 感染によるマダニ媒介性疾患であり、罹患犬は貧血、発熱、黄疸などを呈して死に至ることもある [1]。本症は西日本を中心に分布しているが、山口県は流行地の一つであり、古くから多くの発生例が報告されている [2-4]。一方、本症には不顕性感染があることも知られおり、犬バベシア症発症歴がない臨床上健康な犬の末梢血からも、高感度なPCR法を用いた遺伝子検査により、原虫が検出されている [5-7]。また、一度 *B. gibsoni* に感染した犬では、不顕性キャリアになるといわれている [8, 9]。不顕性感染犬は、脾臓摘出後や免疫抑制状態下で自らがバベシア症を発症するリスクを有するだけでなく [7, 10]、未感染犬に対する感染リスクを増加させる要素になる。このため、流行地の獣医師にとっては、地域の *B. gibsoni* 不顕性感染状況は、臨床上重要な関心事項である。

犬の *B. gibsoni* 不顕性感染状況については、これまで調査されているが、感染のリスクファクターや *B. gibsoni* 不顕性感染が血液性状に及ぼす影響については十分に解明されていない [11]。

そこで本研究では犬バベシア症の流行地である山口県の一動物病院において、臨床上健康な犬の *B. gibsoni* 不顕性感染状況を調査した。さらに、外出やマダニ予防が *B. gibsoni* 感染にどのような影響を及ぼすか解析するとともに、臨床上健康な *B. gibsoni* 感染犬の血液性状を非感染犬と比較した。

材料及び方法

データの収集：調査は山口県周南市の一動物病院において、2013年4月1日~6月30日までの3カ月間、犬フィラリア症予防薬処方を目的に来院した臨床上健康な1歳以上の犬500頭を対象とした。「臨床上健康」とは、

† 連絡責任者：猪熊 壽 (帯広畜産大学臨床獣医学研究部門)

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎・FAX 0155-49-5370 E-mail: inokuma@obihiro.ac.jp

表1 臨床上健康な犬500頭の*B. gibsoni*不顕性感染状況

	PCR陽性	PCR陰性 <i>B. gibsoni</i> 感染症		計	有意性
		既往歴あり	既往歴なし		
全体頭数	38	32	430	500	—
性別(頭数(%))					
雄	21 (55.3%)	22 (68.8%)	233 (54.2%)	277	
雌	17 (44.7%)	10 (31.2%)	197 (45.8%)	223	ns
年齢*	9.2±3.9	10.6±2.7	7.4±3.8	—	<i>P</i> <0.0001
品種(頭数(%))					
ミニチュアダックスフント	3 (7.9%)	4 (12.5%)	93 (21.6%)	100	
トイプードル	2 (5.3%)	2 (6.3%)	55 (12.8%)	59	
チワワ	1 (2.6%)	1 (3.1%)	51 (11.9%)	53	
柴	3 (7.9%)	1 (3.1%)	34 (7.9%)	38	
シーズー	2 (5.3%)	3 (9.4%)	24 (5.6%)	29	
ラブラドル・レトリバー	1 (2.6%)	1 (3.1%)	12 (2.8%)	14	
ウェルシュコーギ	3 (7.9%)	3 (9.4%)	6 (1.4%)	12	
ヨークシャテリア	0 (—)	1 (3.1%)	11 (2.6%)	12	
ビーグル	0 (—)	1 (3.1%)	11 (2.6%)	12	
ポメラニアン	0 (—)	1 (3.1%)	9 (2.1%)	10	
パピヨン	0 (—)	2 (6.3%)	8 (1.9%)	10	
雑種	22 (57.9%)	1 (3.1%)	50 (11.6%)	73	ns
その他	1 (2.6%)	11 (34.3%)	66 (15.3%)	78	
外出(頭数(%))					
あり	37 (97.4%)	26 (81.3%)	259 (60.2%)	322	
なし	1 (2.6%)	6 (18.8%)	171 (39.8%)	178	<i>P</i> <0.0001

* : 平均±標準偏差

受診1年以内に重大な全身性疾患による治療歴がなく、かつ受診時に一般状態低下及び身体検査異常を示さないことと定義した。なお、すべての対象犬の飼い主に対しては、本研究の趣旨を説明し同意を得た。

対象犬では、性別、年齢、品種、犬バベシア症既往歴について、診療記録を確認するとともに、外出の有無及びマダニ予防の頻度について飼い主から聞き取りを行った。外出は、室内及び自宅敷地内のみを散歩する犬を「外出なし」とし、それ以外を「外出あり」とした。さらに、マダニ予防の頻度については、前年度4～11月まで毎月マダニ予防を行った個体を「完全予防」、投与歴がまったくない、あるいは予防未実施時期のある個体を「不完全予防」とした。なお、マダニ予防薬はすべてフィプロニル製剤（フロントラインプラス、メリアル・ジャパン(株)（現ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン(株)）、東京）を用いた。

***B. gibsoni* 検出：**対象犬の末梢血は、抗凝固剤としてEDTAを用いて採取し、DNA抽出までマイナス20度に保管した。2014年4～9月に、市販のDNA抽出キット（QIAamp DNA mini kit, QIAGEN, Germany）を用いて末梢血からDNAを抽出し、PCR検査までマイナス20度に保存した。その後、2014年10月以降、種特異的PCRにより、末梢血由来DNAから*B. gibsoni*を検出した[12, 13]。

血液検査：対象犬500頭中、十分な末梢血液が採取できた407頭について血液検査を実施した。血液検査は自動血球計算機（Celltac-α、日本光電工業(株)、東京）を用いて赤血球数、血球容積、ヘモグロビン濃度及び血小板数を算出した。

統計処理：すべての統計解析はMicrosoft Excelソフトウェア（XLSTAT, Addinsoft, U.S.A.）を用いて実施した。年齢及び血液性状の平均値の差についてはOne-Way ANOVAにより有意差を検定した後、群により差がある場合にはボンフェローニ補正のマンホイットニーU検体により多重比較した。その他の項目の検定はFisherの正確確率検定を用いて解析を行った。有意水準は5%とした。なお、品種別解析では10頭以上が含まれる品種のみについて解析を行った。

成 績

犬フィラリア症予防に来院した臨床上健康な犬500頭中、38頭(7.8%)がPCR検査により*B. gibsoni*陽性を示し(不顕性感染群)、このうち21頭が*B. gibsoni*既往歴を有していた。PCR陰性の462頭のうち*B. gibsoni*既往歴がある個体が32頭(PCR陰性・既往歴あり群)、既往歴のない個体が430頭(PCR陰性・既往歴なし群)であった(表1)。これら3群間で性別、年齢、品種、外出の有無を比較したところ(表1)、雌雄及び品種の

表2 不顕性感染犬と非感染犬のマダニ予防処置実施状況

	不顕性感染犬 (PCR 陽性)	非感染犬 (PCR 陰性)	計	有意性
全体頭数	16	259	275* ¹	
完全予防* ²	1 (6.3%)	116 (44.8%)	117	
不完全予防* ³	15 (93.7%)	143 (55.2%)	158	$P < 0.0001$

*1 *B. gibsoni* 感染症既往歴のない外出する犬 275 頭

*2 完全予防：前年度4～11月まで毎月1回のマダニ予防措置を必ず実施した個体

*3 不完全予防：前年度4～11月までにマダニ予防処置をしない月があったもの、またはまったく実施していない個体

表3 *B. gibsoni* 不顕性感染の有無による血液性状の比較 (平均±標準偏差)

頭数	PCR 陽性	PCR 陰性 <i>B. gibsoni</i> 感染症		有意性
		既往歴あり	既往歴なし	
	36	32	339	
赤血球数 ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	6.3±1.2	6.6±1.2	7.1±1.1	a, b
血球容積 (%)	42.0±7.5	45.1±8.4	48.2±6.7	a, b
ヘモグロビン濃度 (g/dl)	13.9±2.7	15.5±2.8	16.7±2.5	a, b, c
血小板数 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	205.1±127.0	304.2±168.7	341.4±139.3	a, c

a：PCR 陽性群と PCR 陰性 *B. gibsoni* 感染歴なし群に有意差ありb：PCR 陰性 *B. gibsoni* 感染歴あり群と *B. gibsoni* 感染歴なし群に有意差ありc：PCR 陽性群と PCR 陰性 *B. gibsoni* 感染歴あり群に有意差あり

割合に有意差は認められなかった。一方、*B. gibsoni* 不顕性感染犬の平均年齢は9.2歳で、PCR 陰性・既往歴なし群の平均年齢7.4歳より有意に高かったが、PCR 陰性・既往歴あり群の平均年齢10.6歳とは差がなかった。不顕性感染群、PCR 陰性・既往歴あり群、及び PCR 陰性・既往歴なし群において、それぞれ37頭 (97.4%)、26頭 (81.3%) 及び259頭 (60.2%) が外出ありと回答し、不顕性感染群及び PCR 陰性・既往歴あり群では、PCR 陰性既往歴なし群に比べて外出する個体の割合が有意に高かった。

B. gibsoni 感染症既往歴がない447頭のうち、外出ありと回答した275頭について、PCR 陽性群 (16頭) と陰性群 (259頭) に分類した。各群におけるマダニ予防実施状況を比較したところ、PCR 陽性群において完全なマダニ予防が実施されていた犬の割合は6.3%で、PCR 陰性群の44.8%に比べて有意に低かった (表2)。

次に、血液検査の実施が可能であった407頭のうち、*B. gibsoni* 不顕性感染群36頭と PCR 陰性・既往歴あり群32頭、及び PCR 陰性・既往歴なし群339頭の血液性状を比較したところ、不顕性感染群の赤血球数、血球容積、ヘモグロビン濃度及び血小板数はいずれも PCR 陰性・既往歴なし群に比べて有意に低値を示した (表3)。また、不顕性感染群と PCR 陰性・既往歴あり群を比較したところ、赤血球数と血球容積に差はみられなかったが、ヘモグロビン濃度と血小板数は不顕性感染群で有意に低値を示した。さらに、PCR 陰性犬について既往歴の有無により比較したところ、既往歴あり群の赤

血球数、血球容積及びヘモグロビン濃度は既往歴なし群に比較して有意に低値を示した (表3)。

考 察

今回の調査は犬バベシア症流行地である山口県周南市において、*B. gibsoni* 不顕性感染状況を調査したものである。調査対象動物病院では、犬バベシア症の年間診療頭数は25.4頭であり、全国平均0.537頭の47倍の発生数である [4]。

今回の調査結果から、山口県周南市の一動物病院にフィラリア予防のため来院した臨床健康な犬の7.6%が *B. gibsoni* 不顕性感染であったことが示された。同じく犬バベシア症流行地である兵庫県洲本市において実施された同様の調査と比べると、洲本市の *B. gibsoni* 不顕性感染率は1.9%であり [7]、周南市の不顕性感染率の方が高く、地域差があることが明らかとなった。地域差の原因としては、マダニの *B. gibsoni* 保有率や生息密度の違いが関与することが考えられるが、今回の調査では不明であった。不顕性感染犬では医原性に症状が顕性化することがあることを考慮すると [7, 11]、犬バベシア症流行地の臨床獣医師は臨床健康な犬の中に *B. gibsoni* 不顕性感染が相当な割合で存在することに留意するべきと思われた。

B. gibsoni 感染状況に雌雄及び品種による影響はみられなかったが、不顕性感染犬及び PCR 陰性で既往歴のある犬の平均年齢は高い傾向にあった。一度感染した *B. gibsoni* は、生体から完全に排除されにくく、潜伏感

染が続くといわれており [8, 9], 犬バベシア症流行地では、長生きするほどマダニ寄生による *B. gibsoni* 感染機会が増加するためと思われた。

また, *B. gibsoni* 不顕性感染犬では、非感染犬に比べて外出する犬の割合が有意に高かった。犬バベシア症のおもな感染経路はマダニ刺咬であり [1, 14], 外出する犬ではマダニに刺咬される機会が高まるのが原因と考えられた。なお, 「外出なし」の犬にも *B. gibsoni* 感染が認められているが, これは「外出なし」と回答された場合でも, 自宅敷地内の庭や畑でのマダニ刺咬リスクが完全には排除されないことを示唆すると考えられた。

B. gibsoni 感染症既往歴がなく, 外出する犬 275 頭において, PCR 結果とマダニ予防の関連を調べたところ, 不顕性感染犬においては前年度の春から秋にかけて毎月きちんとマダニ予防薬を投与されている犬の割合は, PCR 陰性群に比べて有意に少なかった。春から秋にかけての定期的なマダニ予防は *B. gibsoni* 感染予防に有効であると考えられた。なお, *B. gibsoni* 感染症既往歴のある個体の飼い主は, 感染症発症後にマダニ予防に対する意識が変化した可能性があるため, 今回の調査では, マダニ予防に関する解析から除外した。

B. gibsoni 不顕性感染群では PCR 陰性・既往歴なし群に比べて赤血球数, 血球容積, ヘモグロビン濃度及び血小板数が低かった。いずれの平均値も異常を示すものではないが, 基準値以下の値を示す個体もいることから, *B. gibsoni* 不顕性感染を貧血及び血小板減少症のリスク要因として認識する必要があると思われる。また, PCR 陰性であっても既往歴のある群では, 赤血球数, 血球容積及びヘモグロビン濃度が PCR 陰性・既往歴なし群よりも低値を示していた。感染した *B. gibsoni* を犬体内から完全に排除することは困難であると考えられている [8, 10], *B. gibsoni* 感染症既往歴のある個体については不顕性感染犬と同様に, *B. gibsoni* が体内に残っている可能性と発症リスクを考慮する必要があると思われた。

なお, 今回検査に用いた PCR の感度は末梢血 1 μ l 当たり 10 個の感染赤血球を検出できる [12, 13]。つまり, 感染赤血球数が 10 個 / μ l 未満であれば検出できない系であり, PCR 陰性結果は必ずしも感染を否定するものではない。*B. gibsoni* 感染後に検出される抗 *B. gibsoni* 抗体は感染後長期間持続するとされており [15], 感染の有無の判断には, PCR 検査のみならず, 抗体検査も組み合わせた方法を考慮するのがより適切であると考えられる。

今回の調査結果から, *B. gibsoni* 感染症流行地においては, 赤血球数などが基準値内であっても低値を示す個体については, 外出及びマダニ予防の状況を考慮して *B. gibsoni* 不顕性感染リスクを考慮すべきと思われた。

さらに, 流行地において散歩で敷地外に出かける飼育形態の犬では *B. gibsoni* 感染リスクが常にあるため, 毎年春から秋まで毎月 1 回のマダニ予防をきちんと行うことが感染予防のために重要であると考えられた。

本研究の一部はメリアル・ジャパン(株)(現:ペーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン(株))からの研究費により実施した。また, PCR の実施に当たりご協力いただいた富川明子氏に深謝する。

引用文献

- [1] Birkenheuer AJ : Babesiosis, Infectious diseases of the dog and cat, Greene CE, ed, 4th ed, 1274-1293, Saunders Elsevier, St Louis (2012)
- [2] Miyama T, Sakata Y, Shimada Y, Ogino S, Watanabe M, Itamoto K, Okuda M, Verdida 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)
- [3] 大西堂文, 仲井眞由子, 後藤あかね, 堀江牧夫, 仲田恵里香, 梶川武次 : 日本における犬の *Babesia gibsoni* 感染症の発生状況, 日獣会誌, 47, 23-28 (1994)
- [4] 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)
- [5] Adaszek L, Ukaszewska J, Winiarczyk S, Kunkel M : The first case of feline babesiosis in Poland, Zycie Weterynaryjne, 83, 668-670 (2008)
- [6] Farwell GE, LeGrand EK, Cobb C : Clinical observations on *Babesia gibsoni* and *Babesia canis* infections in dogs, J Am Vet Med Assoc, 180, 507-511 (1982)
- [7] 杉村 肇, 坂口真也, 今村圭太, 見山孝子, 島田洋二郎, 坂田義美, 猪熊 壽 : 犬糸状虫感染予防に来院した犬のバベシア, ヘモバルトネラ及びエールリッピア感染状況調査, 日獣会誌, 59, 267-270 (2006)
- [8] Ruff MD, Fowler JL, Fernau RC, Matsuda K : Action of certain antiprotozoal compounds against *Babesia gibsoni* in dogs, Am J Vet Res, 34, 641-645 (1973)
- [9] Boozer AL, Macintire DK : Canine babesiosis, Vet Clin N Am-Small, 33, 885-904 (2003)
- [10] Kuehn NF, Gaunt SD : Hypocellular marrow and extramedullary hematopoiesis in a dog: hematologic recovery after splenectomy, J Am Vet Med Assoc, 188, 1313-1315 (1986)
- [11] Matsuo A, Kawabe A, Koshida Y, Ikadai H, Okano S, Higuchi S : Incidence of canine *Babesia gibsoni* infection and subclinical infection among Tosa dogs in Aomori Prefecture, Japan, J Vet Med Sci, 66, 893-897 (2004)
- [12] 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)
- [13] 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, 116-117 (2005)
- [14] Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L : *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission, *Vet Res*, 40, 37 (2009)
- [15] Fukumoto S, Xuan X, Nishikawa Y, Inoue N, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T : Identification and expression of a 50-kilodalton surface antigen of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay, *J Clin Microbiol*, 39, 2603-2609 (2001)

Subclinical Infection of *Babesia gibsoni* in Dogs in an Endemic Area in Japan

Nobuyuki SHIRANAGA^{1),2)}, Hirohito HASAKO³⁾, Yasuhiro SOUZU¹⁾,
Kento YAMAMOTO¹⁾, Tatsuto SATO⁴⁾, Junko SHIRANAGA¹⁾
and Hisashi INOKUMA^{2),5)†}

1) *Shiranaga Animal Hospital, 2-12-18 Sakuragi, Shunan, 745-0806, Japan*

2) *United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan*

3) *Kotonoha Animal Hospital, 38-1 Tsumazaki-gaisaku, Ube, 759-0204, Japan*

4) *Sato Animal Hospital, 821-8 Hata, Misumi-cho, Uki, 869-3205, Japan*

5) *Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan*

SUMMARY

The subclinical infection of *Babesia gibsoni* in 500 clinically healthy dogs was examined in an endemic area for canine babesiosis in Japan. A total of 38 dogs (7.6%) was defined as having a subclinical infection based on positive results of *B. gibsoni*-specific PCR. The mean age of dogs with a subclinical infection was 9.2 years, which was significantly higher than that of dogs with negative PCR and no history of *B. gibsoni* infection (7.4 years). Almost all dogs in the subclinical population (97.4%) go outside regularly. Analysis of 275 dogs with a habit of going outside and no history of *B. gibsoni* infection revealed significantly lower complete prevention rate for tick infestation in the subclinical population (6.3%) than the PCR-negative population (44.8%). Outdoor activity and incomplete tick-prevention were thought to be risk factors for *B. gibsoni* infection. Red blood cell counts, packed cell volume, hemoglobin concentration and platelet counts for dogs with a subclinical infection were all significantly lower than those of dogs without an infection and history of *B. gibsoni* infection. It is obvious that subclinical infection of *B. gibsoni* affects blood test findings of dogs.

— Key words : *Babesia gibsoni*, dogs, risk factors, subclinical infection.

† Correspondence to : Hisashi INOKUMA (*Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine*)

Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan

TEL · FAX 0155-49-5370 E-mail : inokuma@obihiro.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 291 ~ 295 (2019)