

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580321

研究課題名（和文）犬糸状虫症の免疫学的診断法の改良に関する研究

研究課題名（英文） Improvement of immunodiagnosis of dirofilariasis

研究代表者

野上 貞雄（NOGAMI SADAŌ）

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90172767

研究成果の概要：

犬における主要な寄生虫症である犬糸状虫症の免疫学的診断法のターゲットとなっている循環抗原の詳細な解析を行い、診断法の改良と疫学調査を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,100,000	0	2,100,000
2007 年度	700,000	210,000	910,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：Dirofilaria immitis、犬、犬糸状虫、寄生虫、血清診断、免疫診断、循環抗原

1. 研究開始当初の背景

犬の犬糸状虫（*Dirofilaria immitis*）症は、全国平均で現在も 40%前後の高い陽性率が観察され、病害、診療および病院経営上からも小動物臨床において最も重要な感染症である。本症においては、キット化された診断器具があり、強力な殺成虫作用を有する治療薬が市販されているが、虫体が少数感染の場合の誤診、駆虫剤投与後の死亡虫体による肺動脈栓塞での急死が散見されるので、犬糸状虫症診断法の精度向上並びに安全な駆虫プログラムやワクチンの開発が急務とされている。

2. 研究の目的

本研究課題では、犬糸状虫症の免疫学的診断法のターゲットとなっている流血中の虫体由来循環抗原の詳細な解析を行い、犬糸状虫症診断法の改良、発症防止ならびに治癒判定システムについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 人工感染犬における解析：

感染早期の感染様相に注目し、犬糸状虫を定量感染させた犬の感染早期の抗体保有性状の解析を行った。犬糸状虫の m f 陽性犬に吸血させたトウゴウヤブカから回収した感染幼虫（L3）を 5 頭のビーグル犬（雄）に 100 虫ずつ皮下に注入し、経時的に採血した血清

を用いて抗体価の推移を206日後まで観察した。抗体価は、犬糸状虫の雌雄成虫抗原をそれぞれ固相化したマイクロプレートを用い、IgG1, IgG2, IgA, IgE, IgM の各抗体クラス(サブクラス)についてELISA法で観察した。

2) マウスモデルにおける解析：

犬糸状虫感染実験は好適宿主である犬にL3を感染させる実験系が主であるが、犬を供試し、L3から成熟成虫になるまでに数カ月かかるなど、問題点がある。そこで実験動物として管理し易いマウスに犬糸状虫成虫を移植し、短期間でのマイクロフィラリア(Mf)や抗原の検出の可能性を確認した。マウスは4~5週齢の雄のICRマウスを用いた。犬糸状虫成虫は犬への人工感染24週後、29週後にそれぞれ摘出したものを用いた。マウス腹腔内に犬糸状虫成虫を雌雄別にそれぞれ移植した。移植3日後に移植成虫の状態の確認、Mfの有無、分離血清での抗原検出の確認を行った。Mfは腹腔内洗浄を行い、その洗浄液を鏡検することで確認した。抗原検出には市販の3種類の抗原検出キットを用いた。

3) 血清診断による犬の犬糸状虫感染状況：

本邦の飼育犬数は約1,300万頭といわれているが、登録犬数は約680万頭で、そのうち狂犬病ワクチン接種頭数は約510万頭しかなく、来院しない飼育犬がかなりいることは明白である。予防投薬の普及により来院犬の多くはフィラリア症の予防投薬を受けている、即ち来院犬にはフィラリア陽性犬は少ないため、フィラリア症を体験することがない臨床獣医師が増加しつつある。そこで、フィラリア症の感染様相を把握する一助として、フィラリア症予防の投薬を1年以上受けていない来院犬119頭(2~16歳)を対象に、免疫学的な抗原検出法による疫学調査を実施した。

4) 血清診断による猫の犬糸状虫症診断：

猫の犬糸状虫症は免疫学的検査手法に困難があり、近年の疫学様相は明らかではない。本症用の抗体検査キットの性能に関する情報が少ないので、人工感染猫の材料を用いて、猫フィラリア抗体検査キットの性能を検討した。感染トウゴウヤブカから得た犬糸状虫の感染子虫を皮下に人工感染させた猫(3頭)の血清を用いて、イムノクロマトグラフィで経時的に抗体の有無を検査した。血中抗原はSnapハートワームで検査した。また犬糸状虫の感染子虫を、2週間おきに10匹ずつ2回、皮下に人工感染させ、それぞれの感染の30日後にイベルメクチンで駆虫した猫(2頭)の血清を用いて、イムノクロマトグラフィで経時的に抗体の有無を検査した。

5) 血清診断による猫の犬糸状虫感染状況：

犬糸状虫は、猫やヒトにも感染する。特に猫では、大部分は無症状だが発症した場合の病害は大きく、米国では突然死をも招く重大な疾患として捉えられつつあるが、本邦の獣医療において、猫に対する犬糸状虫症の予防投薬はほとんど行われていない。従って、猫のフィラリア陽性率を調査することは、暴露状況把握の指標の一つとなる。そこで、来院猫216頭(2~17歳)を対象に、免疫学的な抗体検出法による疫学調査を実施した。

6) 同一地域における犬糸状虫陽性状況の変化：

近年、猫の飼育形態の変化あるいは飼育環境の向上に伴い、猫が各種感染症に罹患する機会は減少傾向にあると予測されるものの、その実態は明らかではない。そこで、本研究では関東地方の猫の新旧異なる年代(1990年代と2000年代)における犬糸状虫症の感染状況について血清学的に比較、検討を行った。

4. 研究成果

1) 人工感染犬における解析：

剖検の結果、平均36.4匹の感染が確認された。成虫抽出抗原に対する抗体価を抗体クラス別に検討した結果、IgG1, IgG2, IgM抗体は感染20日後から陽転した。一方、IgAとIgE抗体はともに感染60日後まで陽転しなかった。雌雄の抗原間の比較では、IgG1は雄抗原に対して、IgG2は雌抗原に対して高い傾向を示した。また、IgG2は全体に他のクラスの抗体よりも高値を示した。IgGサブクラスの推移では、IgG2が早期に上昇し、その後にIgG1が上昇した。

以上の様に、抗体クラス別に抗体価の推移を検討した結果、抗体クラスによって陽転時期が異なることが分かった。虫体が皮下織から血管系に移動する時期である感染60日後にIgG1とIgG2の両者において抗体価の明瞭な低下が認められ、この時期からIgEとIgA抗体が陽転したことは抗原刺激が異なったことを示唆するものと考えられる。IgG(L+H)において寄生数の多いものが60日目により抗体価が低値を示すという変動傾向がみられることから、この時期に免疫抑制が起きているか、またはMf数が急増すると抗体価は逆に減少するという現象があるので感染後60日にL4からL5に脱皮することによる抗体の著しい消費が起きていることが示唆された。一方、その分泌される抗原に着目して解析することにより、Mf出現前の診断が可能になるかもしれない。

今回の結果では、Th1の関与するIgG2が最初に上昇し、次にTh2に関与するIgG1が上昇した。また、感染早期にIgG2が上昇することから、IgG2に注目した検査が感染早期の

犬糸状虫感染の指標であることが示唆された。この知見は、今後新しい抗原検出キットを開発する上で有用な情報を提供するものと考えられる。

なお、今回の実験で感染早期の免疫応答において雌雄差が明らかになったことは感染防御や病態を研究する上で興味ある知見と考えられる。

2) マウスモデルにおける解析：

腹腔内移植された犬糸状虫成虫は一部被嚢化しているものはあったが全て生存していた。また、24 週齢雌成虫移植マウスでは Mf は認められなかったが、29 週齢雌成虫移植マウスでは全頭の腹腔洗浄液から Mf が確認された。キットによる抗原検出検査では、雌成虫移植マウスで 24 週齢虫体、29 週齢虫体ともに抗原が検出された。一方、雄成虫移植マウスでは 24 週齢虫体で検出されなかったが、29 週齢虫体では抗原検出されるものもあった。雄成虫移植マウス血清で抗原陽性となったことから、雄成虫からも雌成虫と同様に抗原が分泌されていると考えられた。雌成虫移植マウスでは 24 週齢虫体から抗原検出されたことから、抗原は 24 週齢の時点で分泌されていると考えられる。一方、雄成虫移植マウスからは抗原が検出されなかった理由として、雄成虫から分泌される抗原量が雌成虫から分泌される抗原量よりも少ない可能性が考えられる。既報では犬で抗原が初めて検出されるのは感染後 26 週～34 週とされている。本実験では、犬で抗原陰性となった 24 週齢成虫を移植したマウスで抗原陽性となったことから、24 週齢成虫が分泌する抗原が犬で検出されないのは宿主動物当たりの抗原量が問題であることが示唆される。

以上のように、マウスへの犬糸状虫成虫移植により、Mf、抗原ともに検出可能であることが確認された。また、雄成虫移植マウス血清から抗原が検出されたことから、雄成虫からも雌成虫と同様に抗原が放出されていることが確認された。

3) 血清診断による犬の糸状虫感染状況：

犬糸状虫陽性率は、雄 13.3% (8/60)、雌 5.1% (3/59)、全体で 9.2% (11/119) であった。この成績は、臨床獣医師の実感・体験とは大きく異なり、本邦の犬の獣医療において、依然としてフィラリア対策が重要なことを示している。

4) 血清診断による猫の犬糸状虫症診断：

人工感染前の検体は、全て抗体陰性であった。人工感染猫の抗体陽転日は、猫 A および B が感染 80 日後で、猫 C は 90 日後であった。また、感染 210 日後でも陰転はしていなかった。駆虫猫の抗体陽転日および陰転日は、猫

D が感染 69 日後および 160 日後、猫 E は感染 56 日後および 190 日後であった。

5) 血清診断による猫の糸状虫感染状況：

猫の本症の陽性率は、本邦では収容猫で 0.5～9.5%、飼育猫で 3.0～5.2% との報告があるが、近年の状況は明らかではない。また、猫の犬糸状虫感染を検査するキットは、現在、日本では実用化されていない。更に、感染子虫が猫に感染した場合その多くが成虫にまで発育せず、成長したとしても単数寄生や単性寄生が多くてマイクロフィラリアの出現も少ないとされ、抗原検出キットは感度が低いとされる状況を踏まえると、抗体を検出できるキットへの期待は大きい。犬糸状虫陽性率は、雄 10.3% (8/78)、雌 10.5% (9/86)、不明の 2 頭を含め全体で 8.8% (19/216) であった。フィラリア抗体陽性率は、0 から 30% と動物病院間による差が大きかった。

6) 同一地域における犬糸状虫陽性状況の変化：

犬糸状虫抗体は 1990 年代の旧検体の 2.0% が陽性を示したのみで、新検体は全て陰性であった。減少のこの背景として、約 20 年前と比べ周辺の環境衛生が向上したこと、多くの猫が屋外から屋内飼育に移行したこと、飼育方法の変化に伴い、感染症に対する啓発活動により、飼い主の疾病予防に対する意識が向上したこと、犬のフィラリア症予防の普及により感染の機会が減少したこと等が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

① 野上貞雄：原虫，寄生虫による人獣共通寄生虫症．防菌防黴（日本防菌防黴学会誌）、36(4)：263-272．2008 年、査読有．

② Nakagaki, K., Yoshida, M., Nogami, S. and Nakagaki, K.: Experimental infection of *Dirofilaria immitis* in Raccoon dogs. Journal of Parasitology, 93(2):432-434. 2007 年、査読有．

③ Inokuma, H., Makino, T., Kabeya, H., Nogami, S., Fujita, H., Asano, M., Inoue,

S. and Maruyama, S.: Serological survey of *Ehrlichia* and *Anaplasma* infection of feral raccoons (*Procyon lotor*) in Kanagawa Prefecture, Japan.

Veterinary Parasitology, 145:186-189. 2007年、査読有.

[学会発表] (計7件)

- ① 福島奏絵、松本 淳、本谷眞澄、香川尚徳、野上貞雄:猫フィラリア症の抗体検査キットによる検出について. 日本獣医内科学アカデミー2009年大会、2009年2月15日、東京都新宿区.
- ② 福島奏絵、松本 淳、本谷眞澄、香川尚徳、野上貞雄:猫フィラリア症の抗体検査キットに関する基礎研究. 第29回動物臨床医学会年次大会、2008年11月15日、大阪市.
- ③ 井上 快、大島夕佳、壁谷英則、坂田義美、野上貞雄、丸山総一: 関東の猫におけるトキソプラズマ、バルトネラ、FIV、FeLV、およびフィラリアの感染状況の年次推移. 平成20年度日本獣医公衆衛生学会、2008年9月15日、つくば市.
- ④ 土井純子、亘 敏広、関 泰一郎、森友忠昭、野上貞雄: 犬糸状虫の抗凝固活性に関する研究. 第144回日本獣医学会、2007年9月3日、江別市.
- ⑤ 土井純子、亘 敏広、野上貞雄: 犬糸状虫の抗凝固活性に関する研究. 第4回日本獣医内科学アカデミー学術大会、2007年8月11日、東京都新宿区.
- ⑥ 鴨井亮平、中屋朋子、中垣和英、前田龍一郎、野上貞雄: 犬糸状虫人工感染犬の抗体保有性状に関する研究. 第15回獣医臨床寄生虫研究会、2006年12月9日、目黒区.
- ⑦ 鴨井亮平、中垣和英、前田龍一郎、野上貞雄: 犬糸状虫人工感染犬の抗体保有性状に関する研究. 平成18年度日本小動物獣医学会、2006年9月10日、川崎市.

[図書] (計4件)

- ① 野上貞雄、文永堂出版、サウンダース小

動物臨床マニュアル第3版 (217-227, 全1830頁)、2009年. [ISBN 978-4-8300-3220-2 C3061]

② 内田明彦、野上貞雄、黄 鴻堅、メディカグローブ、改訂図説獣医寄生虫学 (全328頁)、2008年. [ISBN 978-4-938498-82-5 C3047]

③ 野上貞雄、インターズー、犬・猫の感染症と寄生虫病 (2-7; 28-44; 51-53; 57-59; 63-68, 全449頁)、2007年. [ISBN 978-4-89995-435-4 C3047]

④ 内田明彦、野上貞雄、黄 鴻堅、メディカグローブ、図説獣医寄生虫学 (全207頁)、2006年. [ISBN 978-4-938498-78-2 C3047]

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野上 貞雄 (NOGAMI SADAŌ)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 90172767

(2) 研究分担者

松本 淳 (MATSUMOTO JUN)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号: 70296169

(3) 連携研究者

なし