

# 免疫ブロット法を用いた山口県における 猫の犬糸状虫感染調査

早崎峯夫<sup>1)†</sup>勝矢朗代<sup>1)</sup>Song Kun-Ho<sup>2)</sup>

1) 山口大学農学部附属動物医療センター研究室 (〒753-8515 山口市吉田1677-1)

2) Laboratory of Veterinary Internal Medicine, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University (Daejeon, 305-764, South Korea)

(2007年1月29日受付・2007年12月18日受理)

## 要 約

犬糸状虫抗原を用いた免疫ブロット検査により、2000年11月から2001年8月にかけて、山口県内で飼育されている猫315頭(雄136頭, 雌168頭, 不明11頭)を対象に犬糸状虫の感染調査をしたところ、19頭(6.0%)が検査陽性と判定された。雄(12頭/136頭, 8.8%)は雌(7頭/168頭, 4.2%)より陽性率が高かったが有意差は認められなかった( $P=0.095$ )。屋内外を自由行動する猫(11頭/199頭, 5.5%)と屋内飼育の猫(5頭/90頭, 5.6%)との間の陽性率に有意差は認められなかった( $P=0.594$ )。猫の年齢別では、2歳以下(5頭/117頭, 4.3%)、3~6歳(6頭/86頭, 7.0%)および7歳以上(7頭/92頭, 7.6%)の順に年齢が高くなるとともに陽性率は上昇したが有意差は認められなかった( $P=0.559$ )。東部(7頭/106頭, 6.6%)、中部(6頭/123頭, 4.9%)、西部(5頭/65頭, 7.7%)および北部(1頭/11頭, 9.1%)の地域間の陽性率に差は認められなかった。

— キーワード: 猫, 犬糸状虫, 免疫ブロット法, 感染調査.

----- 日獣会誌 61, 549~552 (2008)

猫の犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* 感染を診断する精度の高い方法が求められている。最近、免疫ブロット法を用いた猫の犬糸状虫検査法が犬糸状虫の寄生を予測する検査法として有用であると提唱されている [1]。すなわち、本検査法において、犬糸状虫抗原分画のうち14, 19, 22, 32および36kDaの5分画の一つ以上が検出された時、犬糸状虫感染が強く疑われると指摘されている。このことから、この研究では、免疫ブロット法を用いて、山口県内の飼い猫における犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* の感染状況を調査した。

## 材料および方法

**免疫ブロット検査:** 抗原には犬糸状虫成虫抽出粗抗原、一次血清として被検血清(猫血清および陽性・陰性対照血清)、二次血清として製品化ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗猫IgG抗体(ICN, U.S.A.)を用いた。術式は、既報 [1, 2] に基づき、0.1% SDS加12.5% アクリルアミドゲルにて抗原を泳動し、1%ゼラチンを含む100倍希釈被検血清に反応させ、次いで1%ゼラチンを含む500倍希釈二次血清に反応させて、さらに発色液に

て発色させ、標準分子量マーカーを基準に出現分画の分子量を算定した。

**犬糸状虫成虫抽出粗抗原(Di抗原)の精製:** 犬糸状虫成虫の雄雌同数にリン酸緩衝液(PBS, 0.01M, pH7.2)を加えて超音波細胞破碎装置(50W, 15分曝射)にて抽出操作を加え、高速遠心(20,000×g, 60分)後、上清を回収してDi抗原とした。

**被検血清:** 2000年11月から2001年8月の間に、山口大学農学部附属動物医療センターに来院した猫および山口県内の開業動物病院に来院した猫から、無作為に採取した血清315検体を用いた。被検猫の性別は雄136頭, 雌168頭, 不明11頭であった。生活様式は屋内外自由行動199頭, 屋内飼育90頭, 不明26頭であった。年齢は1歳未満から21歳までの295頭(平均5.1歳, 2歳以下117頭, 3~6歳86頭, 7歳以上92頭)および不明20頭であった。県内の居住地区は西部地区65頭, 中部地区123頭, 東部地区106頭, 北部地区11頭, 不明10頭であった。また、直接塗抹糞便検査では猫回虫虫卵の検出されたもの2頭, 瓜実条虫片節の検出されたもの2頭, マンソン裂頭条虫虫卵の検出されたもの2頭, コクシジ

† 連絡責任者: 早崎峯夫 (山口大学農学部附属動物医療センター研究室)

〒753-8515 山口市吉田1677-1 ☎・FAX 083-933-5896 E-mail: hayasaki@yamaguchi-u.ac.jp

表1 免疫プロット検査陽性の19検体における抗原分画

No.	36kDa	32kDa	22kDa	19kDa	14kDa	その他
18				○		
21				○		
31	○					
37				○		
47				○		
66			○			
68		○				
87		○				
134					○	
165				○		
172			○			
192				○		
206	○					
219			○			38kDa
246			○			
249				○		
267			○			
277				○	○	16kDa
280				○		34kDa

No: 猫血清検体番号, kDa: キロダルトン,  
○印: 認められた抗原分画

ウムオーシストの検出されたもの1頭であり、また検査陰性だったものは74頭、未検査のものは234頭であった。すべての血清は使用時まで-80℃にて保存した。

**抗原検出キット検査:** Di抗原免疫プロット検査において犬糸状虫感染陽性と判定された検体について、犬用の犬糸状虫抗原検査キット (SNAP Heartworm, IDEXX) を用いて検査した。

**統計解析:**  $\chi^2$  独立性の検定, または Fisher の直接確率計算法により解析を行った。危険率は5%をもって有意とした。

### 成 績

**免疫プロット検査陽性率と出現分画 (表1):** 判定は既報 [1] の方法に従い、犬糸状虫抗原分子量14, 19, 22, 32, 36kDaの5分画のうち1分画以上が検出された場合、犬糸状虫感染 (寄生) 陽性と判定した。その結果、被検血清315検体のうち19検体 (6.0%) から上記分子量の1から2分画が検出された。上記5分画のうち最も多く検出されたのは19kDa (9検体, 47.3%) の分画で、次いで22kDa (5検体, 26.3%), 36kDa, 32kDa, 14kDa (おのおの2検体, 10.5%) であった。

なお、糞便検査にて消化管内寄生虫感染の認められた7検体はすべて免疫プロット検査陰性であった。

**性別・生活様式別の陽性率の比較 (図1):** 性別による陽性率は、雌 (7頭/168頭, 4.2%) に対して雄 (12頭/136頭, 8.8%) が高値であったが、有意差は認められなかった ( $P=0.095$ )。いっぽう、生活様式別による陽性率は、屋内外自由行動 (11頭/199頭, 5.5%)

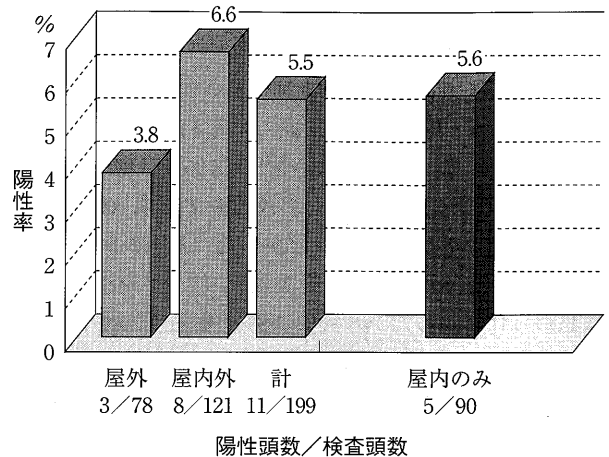
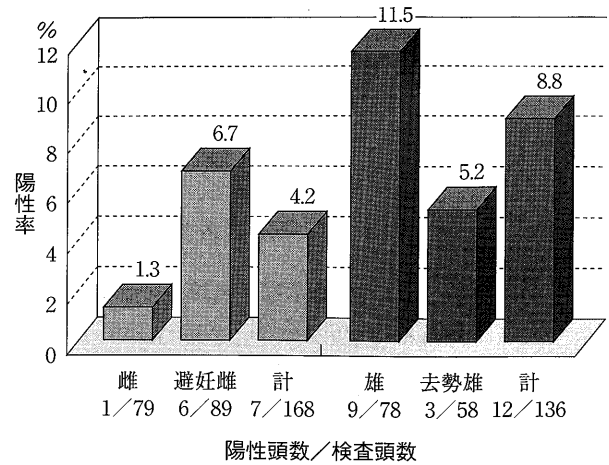


図1 性別・生活様式別の免疫プロット検査陽性率

と屋内飼育 (5頭/90頭, 5.6%) の間に差異は認められなかった ( $P=0.594$ )。

**年齢別の陽性率の比較 (図2):** 年齢別による陽性率は、0~2歳 (5頭/117頭, 4.3%), 3~6歳 (6頭/86頭, 7.0%) および7歳以上 (7頭/92頭, 7.6%) と年齢が高くなるにつれ、陽性率は高くなる傾向が認められたが、有意差は認められなかった ( $P=0.559$ )。

**地域別の陽性率の比較 (図3):** 地域別による陽性率は、東部 (7頭/106頭, 6.6%), 中部 (6頭/123頭, 4.9%), 西部 (5頭/65頭, 7.7%) および北部 (1/11頭, 9.1%) の間に明らかな差異は認められなかった。採取された検体数が123検体から11検体まで偏りがあったため、統計的検討は行わなかった。

**犬糸状虫抗原検出キット検査:** Di抗原免疫プロット検査陽性19検体について、キットによる抗原検査を行った結果、全例検査陰性であった。

### 考 察

猫の犬糸状虫感染はオカルト感染になることが多く、通常は無症状で耐過するが、ときに一過性の咳嗽、呼吸困難、嘔吐、傾眠、食欲不振などの原因を特定しにくい

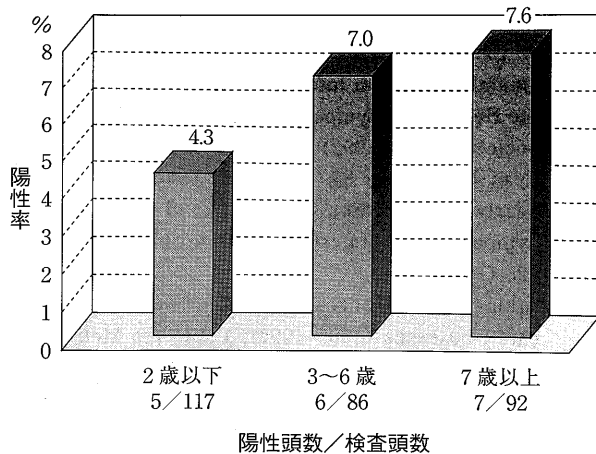


図2 年齢別の免疫ブロット検査陽性率

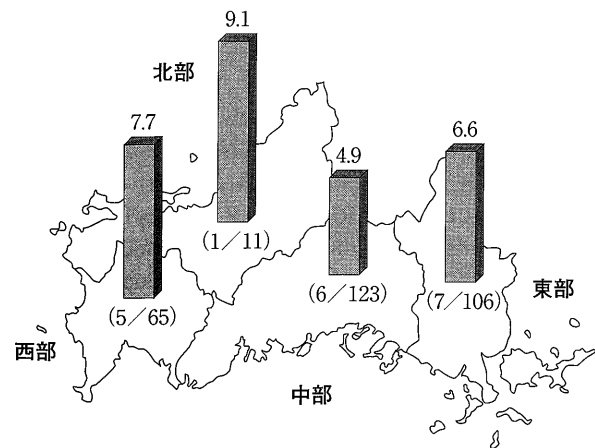


図3 山口県の地域別の免疫ブロット検査陽性率

症状を示すものがあり、さらに突発性の呼吸困難やけいれんを発症して突然死する症例も寄生猫の約10~30%で認められている [3-8]。このため、小動物臨床の現場では猫の犬糸状虫感染診断法の改良が望まれているが、診断法の開発的研究において、診断の特異性と鋭敏性を検定するためには被験動物の剖検による感染（寄生）の有無を精査する必要がある。しかし近年、被験動物の剖検を組み込んだ実験研究は実施困難になりつつあることから、臨床の現場には確定診断に至らずとも予測診断で十分とする考え方も広まっている。既報の免疫ブロット検査法は猫への犬糸状虫の寄生の有無を予測し得る検査法として提唱されているものである。

本研究では、山口県における猫の犬糸状虫感染率は6.0%であった。過去50年間におけるわが国の猫の感染率は、寄生の有無を確実に判別できる剖検成績に限ってみると0~7%（調査頭数15~307頭） [7] であり、本研究で得られた感染率と同様の感染率であった。

性別における陽性率は、有意差は認められなかった ( $P=0.095$ ) が、雌 (4.2%) よりも雄 (8.8%) で高くなる傾向がみられた。このように性別における易感染性は、実験感染では雌よりも雄の方が犬糸状虫に感染しやすいと指摘 [9-11] されているが、自然感染例では雌雄差はみられないと指摘 [9, 12-15] されていて、犬糸状虫感染の宿主適応性を検討するうえで興味深い。

生活状況別では屋内外自由行動 (5.5%) と屋内飼育 (5.6%) の陽性率に有意差は認められなかった ( $P=0.594$ ) が、わが国同様に犬糸状虫の濃厚蔓延国である米国でも両者に差異はないと報告 [12, 13, 16, 17] されており、屋内飼育が犬糸状虫の感染予防にはならないことを示唆している。

地域別では、多少の差異はみられたが、全域がおおむね類似の陽性率を示しており飼育猫は平均的に犬糸状虫感染に暴露されていることが示唆された。

被検猫の年齢は5カ月齢から21歳齢で、年齢が高く

なるにつれ、陽性率も高くなる傾向がみられたが、有意差は認められなかった ( $P=0.559$ )。猫の年齢と感染率は関係しないことは既報 [11, 18, 19] も指摘しているが、1歳未満の若齢個体は蚊に曝露される機会が少ないため感染の危険は少ないとこれまで考えられてきた [15, 17]。しかし、本研究での免疫ブロット検査陽性例には9カ月齢1頭 (1歳未満検査総数22頭) が含まれており、1歳未満でも4.5%の感染率が示されたことから新生子猫でも高頻度で蚊に曝露されれば感染が成立することが示唆された。

免疫ブロット検査陽性19検体における犬用の犬糸状虫抗原検出キット検査において全検体が反応陰性であったことは、犬用キットは猫検体には無効であったか、寄生虫体数がきわめて少ないためキットの検出感度以下であった可能性が示唆され、いずれにして犬用キットは猫には有用ではないことが確認できた。

なお、本研究では、予備試験として猫回虫との間の抗原交差性についても検討し、犬糸状虫免疫ブロット検査と猫回虫免疫ブロット検査を行い、そのそれぞれに抗体吸収試験を組み合わせて吸収処置後の両イムノブロット検査結果と比較して交差反応の関与の有無を検討した試験を行ったが、両者の間に交差反応はまったく認められなかった (未発表)。しかし、今後は、他種寄生虫寄生が本検査法に与える影響について、詳細な検討が必要であろう。

終わりにあたり、検体を提供して下さった山口県開業の動物病院のアミカベットクリニック、片桐動物病院、河上動物病院、くどう動物病院、さくら動物病院、竹田動物病院、田村動物病院、中島動物病院、のぐち動物病院、のじま動物病院、藤澤動物病院、萌動物病院、森崎動物病院、三谷獣医科病院、渡邊動物病院 (五十音順) に深謝する。

## 引用文献

- [1] Hayasaki M, Mori N, Hongo H, Katsuya A, Song KH, Une S, Ikeda T, Ooi HK, Uchida A : Immunoblot

- analysis of specific antigen bands predictable for *Dirofilaria immitis* infection in cats, *Vet Parasitol*, 131, 325-329 (2005)
- [ 2 ] Hayasaki M, Nanamura F, Konno K : Immunoblotting analysis of somatic components of *Dirofilaria immitis*, *J Vet Med Sci*, 56, 1181-1183 (1994)
- [ 3 ] Atkins CE, Atwell RB, Dillon R, Genchi C, Hayasaki M, Holms RA, Knight DH, Lukof DK, McCall JW, Slocumbe JOD : American Heartworm Society Guideline : Guideline for the diagnosis, treatment, and prevention of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats, *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 19, 422-429 (1996)
- [ 4 ] Atkins CE, Gallo AM, Kurzman ID, Cowen P : Risk factor, clinical signs, and survival in cats with a clinical diagnosis of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy : 74 cases (1985-1989), *J Am Vet Med Assoc*, 201, 613-618 (1992)
- [ 5 ] Doiron DW, Longhofer SL, Rubin SB, Knight DH, Downing R, Nelson CT, McCall JW, Seward RL : 2002 Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in cats. *Proceedings of the Heartworm Symposium'01*, American Heartworm Society, 267-273 (2001)
- [ 6 ] 早崎峯夫 : 猫の犬糸状虫症の臨床, *獣医畜産新報*, 50, 330-333 (1997)
- [ 7 ] 早崎峯夫 : 犬糸状虫感染と犬糸状虫症, *獣医畜産新報*, 50, 463-469 (1997)
- [ 8 ] 早崎峯夫 : 猫の犬糸状虫症, *獣医寄生虫学会誌*, 4, 31-38 (2005)
- [ 9 ] McCall JW, Supakprndej N, Ryan W, Soll MD : Utility of an ELISA-based antibody test for detection of heartworm infection in cats, *Proceedings of the Heartworm Symposium'95*, American Heartworm Society, 127-133 (1995)
- [ 10 ] McCall JW, McTier TL, Jung JJ : Biology of experimental heartworm infections in cats, *Proceedings of the Heartworm Symposium'92*, American Heartworm Society, 71-79 (1992)
- [ 11 ] Ryan WG, Gross SJ, Soll MD : Diagnosis of feline heartworm infection, *Proceedings of the Heartworm Symposium'95*, American Heartworm Society, 121-125 (1995)
- [ 12 ] Atkins CE, DeFrancesco TC : Heartworm infection in cats : 50 cases (1985-1997), *J Am Vet Med Assoc*, 217, 355-358 (2000)
- [ 13 ] Atkins CE, DeFrancesco TC, Miller MW : Prevalence of heartworm infection in cats with signs of cardiorespiratory abnormalities, *J Am Vet Med Assoc*, 212, 517-520 (1998)
- [ 14 ] Genchi C, Guerrero J, DiSacco B, Formaggini L : Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in Italian cats, *Proceedings of the Heartworm Symposium'92*, American Heartworm Society, 97-102 (1992)
- [ 15 ] Nogami S, Sato T : Prevalence of *Dirofilaria immitis* Infection in cats in Saitama, Japan, *J Vet Med Sci*, 59, 869-871 (1997)
- [ 16 ] Hermesmeier M, Limberg-Child RK : Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection among shelter cats, *J Am Vet Med Assoc*, 217, 211-212 (2000)
- [ 17 ] Kalkstein TS, Kaiser L : Prevalence of heartworm infection in healthy cats in the lower peninsula of Michigan, *J Am Vet Med Assoc*, 217, 857-861 (2000)
- [ 18 ] Calvert CA, Mandell CP : Diagnosis and management of feline heartworm disease, *J Am Vet Med Assoc*, 180, 550-552 (1982)
- [ 19 ] Miller MW : Feline dirofilariasis, *Clin Tech Small Anim Pract*, 13, 99-108 (1998)

## Immunoblot Analysis of Prevalence of Canine Heartworm Infection in 315 Cats in Yamaguchi

Mineo HAYASAKI \*†, Akiyo KATSUYA, Kun-Ho SONG

\* *Veterinary Clinical Center, School of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753-8515, Japan*

### SUMMARY

Immunoblot analysis revealed canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in 19 cats (6.0%, 12 males and seven females) of among 315 domestic cats (136 males, 168 females and 11 unknown) in Yamaguchi Prefecture. No significant difference was observed based on the criteria of sex ( $P = 0.095$ ), with males (12/136, 8.8%) and females (7/168, 4.2%), behavior ( $P = 0.594$ ), with indoor only (5/90 cats, 5.6%) and both indoor and outdoor (11/199 cats, 5.5%), or age ( $P = 0.559$ ), with < 2 years old (5/117 cats, 4.3%), 3-6 years old (6/86 cats, 7.0%) and 7 < years old (7/92 cats, 7.6%). Nor was a marked difference observed among the eastern (7/106 cats, 6.6%), central (6/123 cats, 4.9%), western (5/65 cats, 7.7%) and northern (1/11 cats, 9.1%) parts of Yamaguchi Prefecture. — Key words : cat, *Dirofilaria immitis*, immunoblotting, prevalence.

† *Correspondence to : Mineo HAYASAKI (Veterinary Clinical Center, School of Veterinary Medicine, Yamaguchi University) 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753-8515, Japan*

TEL · FAX 083-933-5896 E-mail : hayasaki@yamaguchi-u.ac.jp

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 61, 549 ~ 552 (2008)