

犬および猫における貧血関連性感染症の遺伝子診断の臨床応用に関する研究

Clinical studies on molecular diagnosis in canine and feline infectious-disease related anemia

山田隆紹, 土屋 亮, 久末正晴, 渡辺 征

麻布大学 獣医学部 内科学第二研究室

Takatsugu Yamada, Ryo Tsuchiya, Masaharu Hisasue, Masashi Watanabe

Laboratory of Internal Medicine II, Azabu University, School of Veterinary Medicine

Abstract. *Babesia gibsoni* (*B.gibsoni*) and *Mycoplasma haemofelis* (*M.haemofelis*) are defined as infectious agent which can infect the erythrocyte and induce anemia in dog and cat, respectively. Although, the definitive diagnosis has been performed by cytological examination in blood smear, it was often difficult to confirm since the examination was not sensitivity and specific. In the present study, 2 clinical studies were designed.

Section 1, comparative investigation of *B.gibsoni* infection using the polymelase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were performed on 38 dogs suspected of the infection. Sixteen out of 38 dogs (42.1 %) were positive by ELISA, while 27 dogs (71.1 %) were positive by PCR including 11 ELISA negative cases additional to the 16 ELISA-positive ones. The protozoa were not detected on blood smears from 4 of 27 PCR-positive cases. PCR method was able to detect the cases even with parasitemia as low as 0.0003 % of the red blood cells. These results suggested that the PCR method may be more sensitive for detecting canine *B.gibsoni* infection than ELISA and direct microscopic examination. PCR, therefore, is thought to be an effective diagnostic method for the detection of *B.gibsoni* infection in a dog even with low-grade parasitemia.

However, the PCR method was indicated as high sensitive and specific examination to confirm protozoal disease, the technique have been complicated and clinical using was uncommon in veterinary field. Then, in the section 2, we established direct PCR method and estimated about sensitivity and specificity in many clinical cases. In our direct PCR method, small amount of blood sample is used as the template, which was not extract to DNA. The dog and cat's blood samples were analyzed by this direct PCR method to detect the *B.gibsoni* and *M.haemofelis* infection, respectively. The results of direct PCR method correlated closely with the other method described previously. The sensitivity were 0.08 % parasitemia and 0.12-0.26 % parasitemia in *B.gibsoni* and *M.haemofelis* infection, respectively. These results indicated that direct PCR method could progress to be fast, simple and economical, and then it would be useful to clinical using of molecular diagnosis.

In the present study, it was demonstrated that PCR method would be high sensitive to detect the protozoal infectious disease and that direct PCR methods would be one of the simple analyzing protocol.

研究 1

(1) 目的

イヌのバベシア感染症 *Babesia gibsoni* (*B.gibsoni*) およびネコのマイコプラズマ感染症 *Mycoplasma haemofelis* (*M.haemofelis*) は、それぞれ貧血を発生させる感染性の疾患である [1, 2]。診断は、主に末梢血血液塗抹における直接鏡検によって行われているが、極端に寄生率の低い時には確定診断を行うことがしばしば困難である [3, 4]。我々は以前から簡便かつ高感度な検出法として PCR 法に着目し、その臨床応用に関する研究を行ってきた [2]。本研究では、2つの臨床的な研究を行った。

(2) 材料・方法

研究 1 では、イヌのバベシア症における PCR 法の有用性を評価するため、*B.gibsoni* 感染が疑われた犬 38 症例について Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法による血中抗体価の測定と、Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた遺伝子の検出による感染診断の比較検討を行った。症例は、徳島市 (15 例)、大阪府吹田市 (12 例)、徳島県鳴門市 (10 例) および徳島県美馬郡 (1 例) の動物病院において発熱、黄疸といった臨床所見および血液検査結果より貧血が認められたことから *B.gibsoni* 感染症が疑われた 4ヶ月齢から 14 歳齢の計 38 頭の犬 (雌 21 頭、雄 17 頭) であった (Table 1)。これら被疑犬の主な症状は貧血 (Ht < 33 %) で、29 例と最も多く、Ht 値の平均は 24.1 ± 13.6 % であった。次いで食欲不振 17 例、発熱 7 例であった。各症例についてギムザ染色による血液塗抹標本を作製し、*B.gibsoni* 感染の有無を評価した。鏡検により明瞭な感染が認められた場合には、赤血球 1,000 個当たりの寄生赤血球数を算定し、寄生赤血球率 (%) を算出した。その結果、38 例中 22 例に 0.2 % から 30 % の範囲で感染像が認められた。

ELISA 法は、Fukumoto らが開発した方法に従って実施した [5]。抗原としては、*B.gibsoni* の膜表面蛋白質である分子量 50 kDa の P50 組換え体蛋白質抗原を用いた。方法は固相バッファー (pH 9.6) で予め 5 μ g/ml に希釈した P50 蛋白質抗原を 50 μ l/well 当たり 96 穴マイクロプレートに 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベート

して固相化した。洗浄バッファー (0.05 % Tween20 加 PBS) で洗浄後、希釈した被検血清 50 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C 1 時間インキュベートした。更に洗浄バッファーで 6 回洗浄後、酵素標識 2 次抗体を 50 μ l 加え、室温で 1 時間反応後洗浄した。その後、基質 (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid) を 100 μ l 加え、室温で 1 時間反応後、マイクロプレートリーダーを用いて OD415 nm にて吸光度を測定し、吸光度が 0.1 以上を示す症例を感染陽性と判定した。

PCR 法による検討では福本らの報告に従っておこない [6]、ゲノム DNA の分離は、血液 100 μ l から行った。*B.gibsoni* の P18 遺伝子を標的遺伝子とし d3 および d4 のプライマーセット (d3, 5'-TCCGTTCCCACAACACCAGC-3'; d4, 5'-TCCTCCTCATCATCCTCATTCG-3') を用い PCR 反応を行った。10 ng の DNA を鋳型として用い、0.4 μ M プライマーセット、1 x PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 2.5 unit DNA ポリメラーゼを混和し、総量が 50 μ l となるよう調製して反応を行った。反応条件は 95 $^{\circ}$ C、2 分間変性の後、90 $^{\circ}$ C で 30 秒、53.8 $^{\circ}$ C で 1 分、72 $^{\circ}$ C で 1 分のサイクルを 30 回行った。得られた PCR 産物は 2 % アガロースゲル電気泳動を行い、図 1 に示した 182 bp の増幅 DNA バンドが見られた場合を感染陽性と判定し、遺伝子断片の増幅が認められない症例は感染陰性と判定した。

(3) 結果

全 38 症例について ELISA 法により *B.gibsoni* 感染診断を行ったところ、16 例 (42.1 %) が陽性であった (Table 1)。No.16 の不明を除いたこれら 15 例の全てで血液塗抹検査においても感染赤血球が認められた。しかし、その内 7 例 (No.17 ~ 23) では ELISA 法で陰性であったにもかかわらず血液塗抹検査では感染陽性であった。一方、Ht 値および感染赤血球比率と ELISA 値との間には特に相関は認められなかった。

PCR 法では 38 例中 27 例 (71.1 %) が、図 1 に示したように 182 bp の DNA 断片の増幅が認められたことから *B.gibsoni* 感染陽性と判定された (Table 1)。その内 16 症例 (No.1 ~ 16) は ELISA 法でも陽性であったが、No.17 ~ 23 の 7 症例は血液塗抹検査および PCR 法のみが陽性で、ELISA 法では陰性であった。

Table 1 Result of PCR and ELISA in the dogs suspected *B.gibsoni* infection

Case No	Age (Years)	Sex	Chief Sympton	Ht (%)	Parasitemia (%)	ELISA ^a	PCR
1	5.8	F	Anemia, Inappetence, Jaundice	8.7	27.5	2.653(+) ^b	+
2	1	M	Weakness	40.3	6	2.1315(+)	+
3	6	M	Hemoglobinuria, Inappetence, Weakness	9.7	15	2.0265(+)	+
4	6	M	Anemia, Weakness	11.2	1.1	2.011(+)	+
5	6	F	Anemia, Fever	17.1	20	1.9845(+)	+
6	11	M	Anemia	19.1	7.5	1.9705(+)	+
7	6	F	Anemia, Inappetence, Hemoglobinuria	8.2	13.8	1.233(+)	+
8	0.4	M	Anemia, Inappetence	18.8	4	1.004(+)	+
9	11	M	Anemia, diarrhea, Inappetence	16.8	3.4	1.003(+)	+
10	10	M	Anemia, Inappetence, Fever	28.2	30	0.814(+)	+
11	8	F	Anemia, Jaundice	11.8	4.5	0.543(+)	+
12	1.8	M	Weakness	34	1	0.536(+)	+
13	8	F	Anemia, Inappetence, Fever	20.7	6.5	0.314(+)	+
14	13	M	Anemia, Renal failure	27.8	0.2	0.1825(+)	+
15	0.7	F	Anemia	24	11	0.101(+)	+
16	1.7	M	Fever	33	ND ^d	0.0755(+)	+
17	8	F	Anemia, Inappetence, Fever	20.4	10.6	0.0775 (-) ^c	+
18	9	F	Anemia, Inappetence, Fever	24.7	1.5	0.0715 (-)	+
19	14	F	Anemia, Inappetence	26.8	7.5	0.038 (-)	+
20	8.6	M	Anemia, Inappetence	27.5	2.5	0.0285 (-)	+
21	12	F	Anemia, Fever	30	15.5	0.024 (-)	+
22	5.7	F	Anemia, Inappetence, Weakness	19.7	7	0.005 (-)	+
23	1.7	F	Anemia, Weakness	16.7	1.5	0.005 (-)	+
24	13	M	Anemia, Weakness	28	-	0.005 (-)	+
25	8	M	Anemia, Inappetence, Weakness	20	-	0.0655 (-)	+
26	3.8	M	Hemoglobinuria	39.2	-	0.0445 (-)	+
27	0.4	F	Anemia	25	-	0.047 (-)	+
28	8	F	Anemia	12.6	-	0.081 (-)	-
29	14	M	Inappetence	53	-	0.0615 (-)	-
30	9	F	Fever	24	-	0.0505 (-)	-
31	4	M	Hemoglobinuria	43	-	0.0445 (-)	-
32	12	F	Jaundice	30.8	-	0.0435 (-)	-
33	11	F	Anemia	15	-	0.038 (-)	-
34	1	F	Anemia, Inappetence	28	-	0.0345 (-)	-
35	7	F	Anemia	14.3	-	0.0275 (-)	-
36	7	M	Anemia, Inappetence	20	-	0.027 (-)	-
37	14	F	Hemolytic anemia	26	-	0.0135 (-)	-
38	9	F	Inappetence	40.6	-	0.0065 (-)	-

a; absorbance of OD415nm, b; positive, c; negative, d; not determined

また、4症例 (No.24~27) はNo.26を除いて貧血 (Ht: 20%, 25%, 28%) を呈しているにもかかわらず、血液塗抹検査およびELISA法では陰性であったが、PCR法のみが陽性反応を示した。このことはPCR法が最も検出感度が高いことを証明している。PCR法の検出感度を検討するため、症例No.10の血液 (30%寄生率) を健康犬血液で 10^{-1} から 10^{-8} まで10倍階段希釈を行い、各希釈血液からゲノムDNAを分離し、PCR法を行った。その結果、図2に

示すように 10^{-5} 希釈、即ち0.0003%の寄生赤血球率でも本PCR法は*B.gibsoni*感染を高感度に検出できることが明らかとなった。

(4) 考 察

Fukumotoらは、PCR法とIFA法を用いて犬における*B.gibsoni*感染の臨床例における有用性を比較検討しているが、PCR法とELISA法との検討は行っていない [6]。そこで今回、*B.gibsoni*の自然感染が疑わ

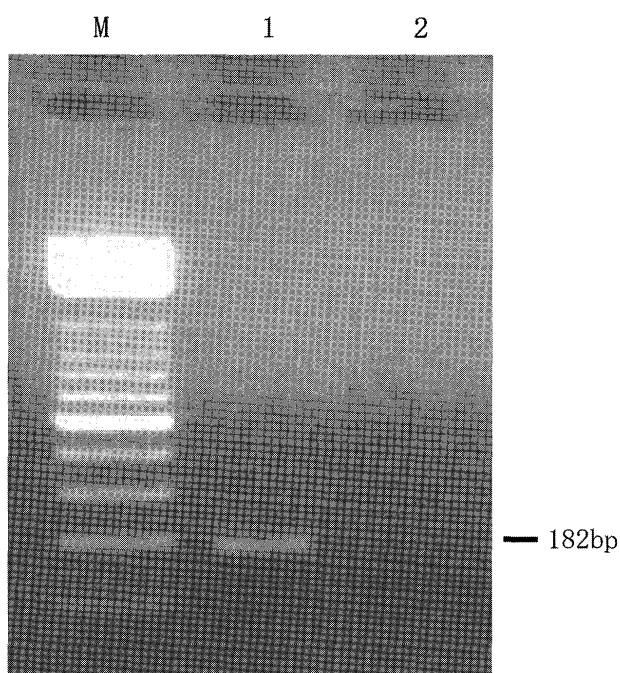


Fig 1 Result of PCR assay in the dog infected with *B. gibsoni*

M: 100 bp DNA size marker,
Lane 1: *B. gibsoni* positive sample (Case No.1),
Lane 2: *B. gibsoni* negative sample (Case No.28)

れた38症例についてPCR法およびELISA法を実施し、その診断的価値について比較検討を行った。本研究において血液塗抹検査およびELISA法の両検査法で感染陰性でありながら、PCR法で陽性となった症例が4例(No.24～27)認められ、ELISA法および血液塗抹検査と比較し、本PCR法は*B. gibsoni*の感染検出法として優れていることが示唆された。その理由として今回行ったPCR法は*B. gibsoni*に特異的なP18遺伝子を検出する方法であるため特異性に優れ、また0.0003%のような低い寄生率でも検出可能という高い感度を有していたことが挙げられる。

PCR法がELISA法よりも検出感度が優れている理由としては、虫体の感染時期や感染動物の免疫状態によって、*B. gibsoni*に対する血中抗体価の上昇が得られないことが考えられる。実際に*B. gibsoni*に対する免疫抗体は感染後2週間程度は上昇せず、感染初期ではELISA法による抗体測定では検出不可能となる場合が多い[5]。このことはELISA法に比べPCR法は、*B. gibsoni*の感染初期であっても診断可能な有力な検出法と思われる。従ってPCR法は高感度であるため低寄生率であってもその大部分の症例について検出し得るものと予想された。本研究によってバ

ベシア症の臨床症状や貧血を呈した症例について検討を行い、PCRの有用性が確認された。

研究2

(1) 目的

研究1から、PCR法が原虫疾患を診断する上で高感度かつ特異的な方法であると示されたが、その手技は複雑で獣医領域では未だ一般的に臨床応用されていない。そこで研究2では、猫の*M. haemofelis*感染および犬の*B. gibsoni*感染のPCR診断において、DNAの分離なしに全血から直接PCRを行うことを試み、従来のDNAからのPCRと同様な結果が得られるかどうか検討した。

(2) 方法

犬*B. gibsoni*感染の全血にて、上述のプロトコールに若干改変を加えてPCRを行なった(Fig 2)。対象は、臨床症状から*B. gibsoni*感染が疑われた犬19症例であった。ネコの*M. haemofelis*感染症の診断に用いた症例は、稟告、臨床症状、血液検査および血液塗抹所見から*M. haemofelis*感染が疑われた18症例であった。方法は、以前著者らが報告した方法で行った(2)。*M. haemofelis*には、Ohio-Florida/Oklahoma株(OF/OK)とCalifornia/Birmingham株(CA/BM)が存在することが知られており、それぞれの株の16S rRNAの塩基配列を基に個々の株を特異的に認識しうるセンスプライマーを作製した。さらに、16S rRNAの*M. haemofelis*特異的な共通領域の塩基配列に基づきアンチセンスプライマーを作製し、得られたDNAを鋳型としてPCR反応を行った。犬および猫の血液1～2 mlから定法どおりDNAを抽出したものの他に、DNA抽出を行わず直接血液を2.5 μlを鋳型として用いて同時にPCR反応を行った(Fig 2)。

(3) 結果

*B. gibsoni*感染が疑われた犬では鋳型が血液およびDNAのいずれにおいても、19例中14例(74%)に陽性反応が認められ、その結果はすべて一致していた(Table 2)。また*M. haemofelis*感染が疑われた猫では鋳型が血液およびDNAいずれも、18例中9例(50%)に陽性反応が認められ、その結果もすべて一致していた(Table 3)。検出感度は、*B. gibsoni*では

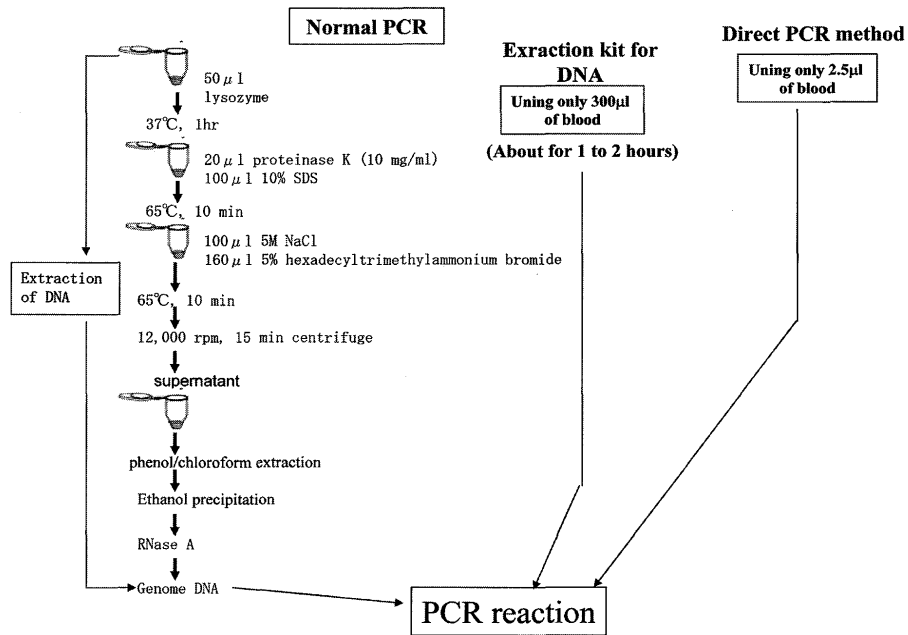


Fig. 2 The Methods of normal PCR and Direct PCR

Table 2 Detection of *B. gibsoni* infection by direct PCR

Case No	Age (Years)	Sex	Sympton	Ht (%)	Parasitemia (%)	PCR	
						Blood	DNA
1	1.2	M ^a	Inappetence	19.9	4	+ ^d	+
2	8	F ^b	Anemia, Vomiting	18.2	0.67	+	+
3	6	M	Anemia, Fever	16.3	8	+	+
4	3.9	M	Anemia	28.2	1.25	+	+
5	18	M	Anemia	16.6	UK ^c	+	+
6	3	F	Inappetence	33	UK	+	+
7	5.7	F	Inappetence, Anemia	19.7	7	+	+
8	9	F	Inappetence, Anemia	24.7	1.5	+	+
9	6	M	Inappetence, Hemoglobinuria	9.7	15	+	+
10	1.7	F	Weakness, Anemia	16.7	1.5	+	+
11	9	M	Inappetence, Anemia	9.3	14	+	+
12	8	M	Inappetence, Anemia	29	3	+	+
13	6	F	Anemia, Hemoglobinuria	8.2	13.8	+	+
14	0.5	M	Inappetence, Weakness	21.9	2.5	+	+
15	9	F	Weakness	31.2	— ^e	—	—
16	7	M	Inappetence, Jaundice	13	—	—	—
17	3	F	Inappetence, Weakness	10	—	—	—
18	13	M	Inappetence, Jaundice	24	—	—	—
19	12	F	Weakness, Anemia	18	—	—	—

a; male, b; female, c; unknown, d; positive, e; negative

0.08%寄生率では、*M. haemofelis*のCA株感染では0.12%寄生率、OH株感染では0.26%寄生率において検出可能であった。本法は迅速性、簡便性、経済的であることからPCRのベットサイドでの応用に有用な方法であると考えられた。以上の研究の結果から、感染性の疾患の病原体を検出する方法としてPCR法が高感度な方法であることが明らかとなっただけでなく、直接PCR法が実用にむけての簡便なプロトコールの一つであることが示された。

要約

イヌのバベシア症およびネコのマイコプラズマ症は、それぞれ貧血を発生させる感染性の疾患である。本邦では、これら疾患の病原体はバベシア症では*Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*)で、マイコプラズマ症では*Mycoplasma haemofelis* (*M. haemofelis*)とされており、それぞれ赤血球に寄生し宿主に貧血を発生させる。診断は、主に末梢血血液塗抹における直接鏡検

Table 3 Detection of *M. haemofelis* infection by direct PCR

Case No	Age (Years)	Sex	Sympton	Ht (%)	Parasitemia (%)	PCR	
						Blood	DNA
1	2	F ^b	Inappetence, Weakness	12.8	26	+ ^d	+
2	UK ^a	M ^c	Anemia, Splenomegaly	9.5	23.3	+	+
3	2	M	Inappetence, Weakness	13	15	+	+
4	9	M	Inappetence, Weakness	11.2	1.2	+	+
5	8	F	Weakness	16	UK	+	+
6	UK	F	Anemia	UK	5.5	+	+
7	UK	M	Anemia	8.9	UK	+	+
8	UK	M	Anemia	16	4	+	+
9	8	M	Anemia	11.2	12.5	+	+
10	9	M	Weakness, Vomiting	24.5	— ^e	—	—
11	11	M	Fever	26	—	—	—
12	2.5	F	Inappetence, Weakness	11	—	—	—
13	3	F	Anemia	10.8	—	—	—
14	1.5	M	Inappetence	27	—	—	—
15	7	F	Anemia	12	—	—	—
16	17	M	Inappetence, Weakness	20	—	—	—
17	UK	F	Inappetence, Weakness	10	—	—	—
18	8	M	Jaundice, Anemia	20.3	—	—	—

a; unknown, b; female, c; male, d; positive, e; negative

によって行われているが、極端に寄生率の低い時には確定診断を行うことがしばしば困難であり、またゴミなどの夾雑物との鑑別は難しい。我々は以前から簡便かつ高感度な検出法としてPCR法に着目し、その臨床応用に関する研究を行ってきた。*M. haemofelis*には、Ohio株(OH)とCalifornia株(CA)が存在することが知られており、それぞれの株の16S rRNAの塩基配列を基に個々の株を特異的に認識しうるプライマーを作製し、マイコプラズマ症疑いの症例の血液から得られたDNAを鋳型としてPCR反応を行った。その結果は、血液塗抹検査所見とすべて一致し、優れた検出系であることを報告している。

本研究では、イヌのバベシア症におけるPCR法の有用性を評価するため、*B. gibsoni*感染が疑われた犬38症例についてEnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法による血中抗体価の測定と、Polymerase chain reaction (PCR)法を用いた遺伝子の検出による感染診断の比較検討を行った。その結果、ELISA法では38例中16例(42.1%)が感染陽性を示したのに対し、PCR法ではELISA陽性16例の他にELISA法により陰性であった11例を含む27例(71.1%)が陽性と判定された。PCR法で陽性の27例中4例では血液塗抹上で感染は確認できなかった。さらにPCR法では0.0003%の低い寄生赤血球率を持つ犬でも検出可能であった。以上のことから*B. gibsoni*自然

感染症例の診断では、PCR法の方がELISA法および直接鏡検法よりも検出感度が高かった。そのため*B. gibsoni*感染において低寄生赤血球率の場合でもPCR法は有用な検査法であることが示唆された。

また、猫の*M. haemofelis*感染および犬の*B. gibsoni*感染のPCR診断において、DNAの分離なしに全血から直接PCRを行うことを試み、従来のDNAからのPCRと同様な結果が得られるかどうか検討した。猫の*M. haemofelis*感染および犬*B. gibsoni*感染の全血にて、以前報告されているプロトコールに若干改変を行ない直接PCRを行なった。その結果、いずれの検体においてもDNAを鋳型とする従来のPCRと同じ結果が得られた。検出感度は、*B. gibsoni*では0.08%寄生率、*M. haemofelis*のCA株感染では0.12%寄生率、OH株感染では0.26%寄生率において検出可能であった。本法は迅速性、簡便性、経済的であることからPCRの臨床応用に有用な方法であると考えられた。以上の研究の結果から、感染性の疾患の病原体を検出する方法としてPCR法が高感度な方法であることが明らかとなっただけでなく、直接PCR法が実用にむけての簡便なプロトコールの一つであることが示された。

文 献

- 1) Wozniak EJ, Barr BC, Thomford JW, Yamane I, McDonough SP, Moore PF, Naydan D, Conrad PA: J

- Parasitol, 83, 692-699 (1997)
- 2) Watanabe M, Hisasue M, Hashizaki K, Furuichi M, Ogata M, Hisamatsu S, Ogi E, Hasegawa M, Tsuchiya R, Yamada T. J Vet Med Sci, 65, 1111-4 (2003)
 - 3) Anderson JE, Magnarelli LA, Sulzer AJ: Am J Vet Res, 41, 2102-2105 (1980)
 - 4) Westfall, D. S., Jensen, W. A., Reagen, W. J., Radecki, S. V. and Lappin, M.R. Am J Vet Res, 62,687-691 (2001)
 - 5) Fukumoto S, Xuan X, Nishikawa Y, Inoue N, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T. J Clin Microbiol, 39, 2603-2609 (2001)
 - 6) Fukumoto S, Xuan X, Shigeno S, Kimbita E, Igarashi I, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T. J Vet Med Sci, 63, 977-981 (2001)