

イヌにおける実験的レプトスピラ症

阿久沢正夫・竹之下浩和・原 由香・森園 充・坂本 紘*¹・安田宣紘*²

(家畜内科学研究室・*¹家畜外科学研究室・*²家畜病理学研究室)

昭和63年8月10日 受理

Experimental Leptospirosis in Dogs

Masao AKUZAWA, Hirokazu TAKENOSHITA, Yuka HARA, Mituru MORIZONO,

Hiroshi SAKAMOTO*¹ and Nobuhiro YASUDA*²

Laboratory of Veterinary Medicine, *¹Laboratory of Veterinary Surgery*² and Laboratory of Veterinary Pathology

緒 言

犬のレプトスピラ症(以下レ症)の罹患が鹿児島県ではかなり多くみられ、著者らの不用犬のレプトスピラ抗体保有調査(1984年5月-1987年3月)¹⁾において、25.3%からレプトスピラ抗体が検出された。最も多い血清型は *L. icterohaemorrhagiae* であったが、これに対する予防ワクチンは市販されている。これに続いて検出率が高かった *L. hebdomadis* は、予防用ワクチンがないため、この血清型の感染で起こるレプトスピラ症の診断は、臨床家にとって重要である。レ症の症状や疾病経過は動物種およびレプトスピラの各血清型によって異なるため^{5,6,7,8,11)}、犬のレ症の研究には犬の使用が必須であり、さらに前記の不用犬の調査で6種のレプトスピラ血清型の抗体が検出されたことから、本研究は犬の腹腔内に検出率の高かった *L. hebdomadis* を接種し、抗体価測定、身体検査、臨床症状観察、血液検査および病理組織検査を実施して、*L. hebdomadis* によるレプトスピラ症の臨床的経過を詳細に検討し、臨床に貢献する目的で実施した。

方 法

レプトスピラに対する抗体を持たない体重10-13 kgの雄の成犬7例に、当研究室に保存する *L. hebdomadis* の培養液を No. 1と2は2 ml, No. 3と4は4 ml, No. 5, 6, 7は3 mlを腹腔内に注入した。なお No. 5, 6, 7は免疫抑制作用により容易に感染することを期待して、注入時にプレドニゾロン6 mg/kgを筋肉内投与した。検査は、菌接種前に2回、接種後は1日目から14日目まで1ないし2日おきに8回、頸静脈から採血して検査を行い、またそ

の間体温、心拍数、呼吸数の測定、臨床症状の観察、尿検査を実施した。15日目にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させた後剖検を行い、採取した試料で組織学検査を行った。

レプトスピラ抗体価測定は Schueffner-Mochtar 法に準じて行い、被験血清が陽性であった最終希釈倍率を抗体価とし、また希釈倍率が72倍以上で菌が凝集した犬を、陽性と判定した¹⁾。

血液検査の項目と方法は、赤血球、白血球、ヘモグロビン(Micro-cell-counter: Sysmex)、ヘマトクリット(Microhematocrit法)、白血球百分比(May-Giemsa染色)、血清総蛋白(Refractometer)、血清電気泳動(セルロースアセテート膜法)、S-ALP(Nitrophosphate法)、S-GOTおよびS-GPT(pop-p-chlorphenol発色法)、BUN(Urease indophenol法)である。

尿検査は夜間ケージ内に排泄した尿を採取し、試験紙でpH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血について検査した。

病理組織検査は、剖検時に主要臓器を採取して10%緩衝ホルマリンで固定し、常法によりパラフィン切片作製後ヘマトキシリン-エオジン染色を行って鏡検した。また肝臓は、ホルマリン固定後 Levaditi 法で染色し、組織中のレプトスピラ菌体検出を試みた。

結 果

1. 臨床所見

No. 1は接種直後体温が一過性に上昇し5時間後に接種前の体温に回復したが(Table 1)、4日目から再び上昇し、6日から9日目まで39.5°C前後の体温が持続したが、10日目には平熱になった(Table

Table 1. Change of body temperatures in dogs until five hours after the inoculation with *L. hebdomadis*

No.	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	Hours 5.0
1	38.9	39.7	39.3	39.1	39.1	39.3	39.4	39.4	39.0
2	39.6	39.6	39.7	39.6	39.9	39.6	39.6	39.8	39.6
3	38.2	38.2	38.3	38.2	38.4	38.4	38.6	38.7	38.6
4	39.3	39.3	38.9	39.0	39.0	39.1	39.1	39.1	38.9
5	38.1	38.3	38.5	38.3	38.5	38.4	38.4		
6	39.5	39.4	39.4	39.2	38.9	39.1	39.2		
7	38.3	38.7	38.7	38.8	39.0	38.6	38.8		

2). 体温上昇に一致して3日目から元気がやや消失して活発でなくなり、5日目から9日目には横臥を好み食欲低下して眼脂が付着していた。また7日目には嘔吐を認めた。No. 2, 3, 4は症状変化はみられなかった。

プレドニゾロンを投与したNo. 5, 6, 7では、No. 5と7が接種直後に軽度に体温が上昇した。No. 7は4日目より体温が上昇し、終了時まで微熱が続いたが、食欲や症状には異常はみられなかった。

2. 抗体価

No. 1, 2, 3, 4は、接種後2日目までは抗体は検出されなかったが、3日目から3例 (No. 1, 2, 4) が上昇した (Table 3)。No. 1は急激に上昇して9日目に最高に達し7例中最高値を示したが、その後やや低下した。No. 2は9日目まで急激に上昇し、No. 4は9日目まで徐々に上昇したが、いずれもその後上昇傾向は止まった。一方、No. 3は終始抗体が検出されなかった。

プレドニゾロンを投与したNo. 5, 6, 7のうち、No. 6は全例を通じて最も早く2日目から抗体価が上昇し8日目に最高に達したが、その後低下した。No. 5と7は、3日目まで抗体は検出されなかったが、6日目には上昇し、No. 5は8日目に最高に達したが、12日目には低下し14日目には検出されなかった。No. 7は6日目と8日目が最高で10日目以後やや低い値が続いた。

3. 血液検査

No. 1は5日から9日目にかけて白血球が著しく増加し、GPTとALPが5日から7日目、BUN、 α_2 グロブリンが9日目、 γ グロブリンが9日と11日目に増加したが、他の項目はいずれもほぼ接種前の値の範囲内にあった (Table 4)。No. 2, 3, 4は全項目の値が接種後もほぼ接種前の範囲内にあり、異常は認

められなかった。

プレドニゾロンを投与した犬 (No. 5, 6, 7) では、1日目から全例で白血球が増加し、好中球増加、好酸球とリンパ球が減少した。この傾向はその後徐々に正常範囲に回復した。No. 5はGPTは10日目以降、ALPは6日目以降、BUNは8日から10日目、 α_2 および γ グロブリンは3日目以降いずれも増加したが、他の項目には異常は認められなかった (Table 5)。また、No. 6, 7は全項目に異常は認められなかった。

4. 尿検査

蛋白は全例において接種前より少量検出されたが、2例 (No. 3, 4) において接種後排出が増加した (Table 6)。潜血は全例において接種後排泄の開始あるいは増加が認められ、とくに2例 (No. 1, 6) は潜血が著明であった (Table 7)。糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンは全く検出されなかった。

5. 病理組織検査

肉眼所見では肝臓には特に変化は認められなかった。脾臓は割面で濾胞が明瞭であり、腎臓は被膜剝離困難が7例中4例 (No. 1, 2, 5, 6) に、表面に白斑が3例 (No. 1, 2, 7) また充血した糸球体が3例 (No. 1, 6, 7) にみられた。膀胱内に結晶状付着物または小結石を含むものが3例 (No. 1, 3, 4) あり、そのうち2例 (No. 1, 3) は粘膜に点状出血が認められた。

組織検査では肝臓は肝細胞の腫大と空胞化の著明なものが5例 (No. 3, 4, 5, 6, 7) にみられたが、発熱、元気食欲低下が最も著しかったNo. 1では、小葉中心性に好中球の浸潤が認められた。脾臓は全例でリンパ濾胞が腫大し、また動脈内に多数のリンパ球がみられるものが2例 (No. 1, 2) あった。肝臓は、

Table 2. Changes of body temperature in dogs experimentally inoculated with *L. hebdomadis*

No.	Days															
	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	38.3	38.9	38.6	38.6	38.6	39.1	38.9	39.5	39.5	39.5	39.4	38.6	39.1	38.7	38.1	38.9
2	39.4	39.6	39.5	39.5	39.2	39.1	39.2	39.5	39.4	39.4	39.5	39.6	39.5	39.4	39.2	39.2
3	38.1	38.2	38.2	37.7	38.4	38.6	38.9	38.2	38.6	38.1	38.6	37.9	37.8	37.8	38.1	38.2
4	39.5	39.3	39.0	38.6	39.2	39.1	38.7	38.6	39.2	38.8	38.9	38.6	38.7	38.4	39.3	39.6
5	37.7	38.1	38.8	38.7	38.3	38.2	39.3	38.7	38.8	38.6	38.7	38.1	38.1	38.2	38.4	38.4
6	39.2	39.5	39.8	39.1	39.3	39.1	39.5	39.5	39.3	38.9	39.7	39.1	38.8	39.5	38.8	39.1
7	38.9	38.3	38.5	38.7	38.3	39.0	39.3	38.9	39.1	38.8	38.9	38.7	39.1	38.9	38.7	39.0

Table 3. Changes of antibody titers in dogs experimentally inoculated with *L. hebdomadis*

No.	Days													
	-14	-7	1	2	3	5	7	9	11	14				
1	0	0	0	0	72	2592	15552	15552	2592	2592	2592			
2	0	0	0	0	72	432	432	2592	2592	2592	2592			
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
4	0	0	0	0	12	12	72	432	432	12	12			
5	0	0	0	0	0	12	72	72	12	12	0			
6	0	0	0	12	72	432	432	72	12	12	12			
7	0	0	0	0	0	72	72	12	12	12	12			

Table7. Changes of urine occult blood in dogs experimentally inoculated with *L. hebdomadis*

No.	Days																
	-14	-7	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	-	-			-	-	±	+	++	++	++	+	+	+	++	++	
2	-	-			-	-	±	-	-	-	±	±	±	±	±	±	
3	-	-	-	+		-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
4	-	-	-	-	±	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5	-	+	±		++		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	+	++	++	-	-	+	+	+	±	±	±	±	-	±
7	-	-	-		-	+	-	±	-	+	-	±	-	±	+	±	+

尿細管にレプトスピラ菌体を認めたものが4例 (No.1, 3, 5, 7) あり、そのうち2例 (No.1, 7) は剖検時まで抗体価が高かった。また、リンパ球やプラズマ細胞の浸潤が髓質 (No.2)、間質 (No.3, 5, 7)、被膜下皮質 (No.7) に認められるもの、壁が肥厚し (No.3) あるいは内腔の狭い (No.3, 4, 5, 6) 糸球体囊が散在しているもの、さらに尿細管細胞が腫脹しているもの (No.7) があった。

考 察

接種後、7例中2例が発熱、元気食欲の低下、嘔吐を示した。この変化は抗体価の上昇とほぼ一致し、さらに抗体価が最高の時期と前後して体温の上昇と臨床症状の変化が発現し、抗体価の上昇と臨床症状の変化には密接な関連が認められた。体温上昇は3例に認められ、感染後早期に認められる身体検査における変化であることがわかった。しかし他の5例では抗体が上昇したにも関わらず、臨床症状の変化はみられず、不顕性感染の状態を示した。レ症は一般に不顕性感染が多いといわれ⁷⁾、これは本研究の *L. hebdomadis* によるレプトスピラ症でも確認された。

抗体価は7例中1例は2日目に、3例が3日目、2例が6日目に上昇が認められたが、1例は実験終了時の14日目まで抗体は検出されなかった。犬の実験的レプトスピラ症の報告では、抗体上昇開始は4-6日であり、また抗体価が最高に達したのは6-14日で^{9,12)}、本研究の結果よりやや遅い。抗体価の高さ、あるいは上昇のパターンは各個体によってかなり差が認められ、抗原に対する反応性の個体差^{5,12)}が示唆されたが、抗体価の上昇がとくに著しかった No.1 は、体温、血液性状の変化も他の犬より著明で

あったので、生体防御反応が強度であるほど臨床症状は著しくなると思われる。

腎臓組織の Levaditi 染色によって、4例の尿細管内にレプトスピラの菌体を認めた。この4例中2例は剖検時にも抗体は検出された。菌は接種後7日頃まで排泄され、抗体価の上昇ともなって排泄されなくなる¹²⁾が、抗体産生が起こらないため排菌が続くものもある⁴⁾といわれる。しかし、本研究では抗体価が高いにもかかわらず、腎臓に菌体が検出されるものがあり、犬は保菌動物になる危険性があることを示した。したがって、レプトスピラ感染の可能性が考えられる場合は、臨床症状がなく、さらに抗体が検出されなくても、1週間以上は他の犬から隔離し観察するべきである。

菌接種後7例中1例 (No.1) にみられた体温上昇と症状の変化は、抗体価上昇の開始から極期に至る時期、および好中球の増加による白血球増加と一致していた。No.1 にみられた白血球増加は、レプトスピラ感染による²⁾と考えられるが、あまり著明ではないから、レプトスピラ症の診断には、あまり役立たないと思われる。一方、感染成立の促進を期待して、接種と同時に免疫抑制薬のプレドニゾロン³⁾を投与した3例 (No.5, 6, 7) では、接種直後の白血球数の増加が著しかった。しかし接種後とくに症状変化はなく、抗体上昇も、とくに非投与例との差はみられず、さらに白血球分画では好中球の増加、好酸球とリンパ球の減少が認められ、プレドニゾロンは6 mg/kg の投与量では、白血球増加の効果²⁾は顕著であったが、免疫抑制作用は明らかでなかった。

血液検査では、No.1 とプレドニゾロンを投与した No.5 において、ともに GPT, ALP, α_2 グロブリンの増加が5日目頃から認められた。その他に No.

1ではBUNが、No.5では γ グロブリンの増加が同時期に認められた。これらの項目はいずれも、急性レ症あるいは組織破壊によって増加する²⁾が、本研究では増加の時期が抗体価上昇の時期と一致していたため、この血液所見の変化はレプトスピラ感染によるものであって、その変化が軽度であったことは、病理組織検査において肝臓、脾臓、腎臓の病変がいずれも軽度であり、しかも範囲が狭いことと一致していた。尿潜血や尿蛋白排出の原因となる膀胱内の結石や結晶状付着物は、レプトスピラ症に起因するものではないと考えられるが、尿蛋白や潜血は菌接種後に排泄が開始あるいは増量したことから、レ症に併発する溶血あるいは血液凝固不全¹⁰⁾による膀胱あるいは腎臓からの出血も原因になると推測された。

要 約

鹿児島県の犬において検出率が高い血清型である *Leptospira hebdomadis* を7例の犬の腹腔内に注入し、そのうち3例は注入時に免疫抑制薬プレドニゾロンを6 mg/kg 筋肉内投与して、14日間経過を観察した。菌接種後2例は体温上昇、元気食欲の低下、嘔吐がみられた。接種後7例中6例は血中の抗体価が上昇し6日から14日目の間に最高値に達したが、1例からは全く抗体が検出されなかった。血液検査では2例で白血球、GPT、ALP、 α_2 グロブリンが軽度に増加し、その内の1例はBUNが、他の1例は γ グロブリンがやや増加した。プレドニゾロンを投与した犬は全例で1日目から白血球が著しく増加し、好中球増加、好酸球とリンパ球の減少がみられプレドニゾロンの影響と考えられ、その後徐々に正常範囲に回復した。症状および血液検査に変化のみられた時期は、抗体価上昇の時期と一致していた。病理組織検査では、脾臓のリンパ濾胞が腫大し菌接種の

影響が示唆された。肝細胞の腫大と空胞化、肝臓組織の細胞浸潤、腎臓間質の細胞浸潤が認められたが、いずれも散発的であり血液所見の変化が軽度であったことと一致した。また膀胱中に結石あるいは結晶状付着物を含むものがあり、尿検査における蛋白および潜血検出の原因と考えられた。Levaditi染色で4例の腎尿細管中に菌体が認められ、そのうちの2例は剖検時にも抗体が検出された。

文 献

- 1) 阿久沢正夫, 高橋隆之, 中村康男, 竹之下浩和, 原 由香, 森園 充, 坂本 紘: 鹿児島県における不用犬のレプトスピラ抗体調査 (1984年5月-1987年3月). 日獣会誌 (投稿中)
- 2) Benjamin, M. M.: Outline of veterinary clinical pathology (3rd. ed.), Iowa State Univ. Press, Ames (1978)
- 3) 藤原公策編: 実験動物感染病学, pp. 2-12, ソフトサイエンス社, 東京 (1985)
- 4) Newman, J. P.: Studies of canine leptospirosis I. Evaluation of laboratory diagnostic procedures II. Serologic determination of the incidence of latent infection in the Lansing, Michigan area. *Am. J. Vet. Res.*, **11**, 405-411 (1950)
- 5) 笹原二郎, 柴田重考, 清水悠紀臣, 椿原彦吉編: 獣医伝染病学 (第2版), pp. 5, 396-398, 近代出版, 東京 (1984)
- 6) 其田三夫編: 牛の臨床, pp. 375-376, テーリイマン社, 札幌 (1983)
- 7) 其田三夫編: 犬の臨床, pp. 62-64, テーリイマン社, 札幌 (1985)
- 8) 其田三夫編: 猫の臨床, p. 41, テーリイマン社, 札幌 (1985)
- 9) Taylor, P. L., Hanson, L. E., and Simon, J.: Serologic, pathologic, and immunologic features of experimentally induced leptospiral nephritis in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **31**, 1033-1049 (1970)
- 10) Trowbridge, A. A., Green, J. B., Bonnett, J. D., Shohet, S. B., Ponnappa, B. D., and McCombs, W. B.: Hemolytic anemia associated with leptospirosis. Morphologic and lipid studies. *A. J. C. P.*, **76**, 493-498 (1981)
- 11) 渡辺 茂: 月盲症馬の臨床観察について, 鹿大農学術報告, **No. 8**, 1-48 (1959)
- 12) 渡辺 茂: 犬のレプトスピラ人工感染に関する研究. 鹿大農学術報告, **No. 17** 225-250 (1966)

Summary

A laboratory strain of *Leptospira hebdomadis*, detected in high percentages in Kagoshima prefecture, was inoculated with intraperitoneal injection to 7 dogs and was observed for 14 days. Three of the 7 dogs were administered 8mg/kg prednisolone intramuscularly for an immunodepressant. After the inoculation, two dogs vomited and were febrile, anorectic and depressed, while other 5 dogs were asymptomatic. In 6 of 7 dogs, antibody titers increased after the inoculation, and reached the peak at 6th to 14th day. In one dog, however, antibody was not detected until 14 days after inoculation. Leukocytes, GPT, ALP and α_2 -globulin moderately increased in two dogs, in which BUN increased moderately in one dog and γ -globulin in another. In the dogs treated prednisolone, leukocytes increased markedly in accordance with the increase of neutrophils and with the decrease of lymphocytes and eosinophils. Leukocytes gradually decreased and fell within normal range. Occurrence of clinical signs and the hematological changes were detected at the same time with the increase of antibody titer. Marked augmentation of splenic pulp found histopathologically, indicated the influence of infection. Enlarged, vacuolated hepatic cells and cell infiltration in the liver tissue, cell infiltration in the kidney interstitial tissue were also observed. The pathological changes of these organs were sporadic and moderate, which seemed to be consistent with the slight hematological change. Bladder contained small calculi or crystal-like substance, which might be the cause of the excretion of urinary protein and occult blood. In the renal tubules of four dogs, leptospira was noted by the Levaditi's staining technique, and in 2 of the 4 dogs antibody was detected just before the necropsy.