



感染予防に関するレポート 前編

若齢犬におけるイミダクロプリド 10% およびペルメトリン 50% 配合剤を用いた犬の節足動物媒介性疾患流行地帯での予防：長期野外試験

Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: A longitudinal field study

D. Otranto^{2)*}, D. de Caprariis²⁾, R.P. Lia²⁾, V. Tarallo²⁾, V. Lorusso²⁾, G. Testini²⁾, F. Dantas-Torres²⁾, S. Latrofa²⁾, P.P.V.P. Diniz³⁾, N. Mencke⁴⁾, R.G. Maggi⁵⁾, E. Breitschwerdt⁵⁾, G. Capelli⁶⁾, D. Stanneck⁴⁾

監訳：佐伯英治¹⁾

(サエキベテリナリイ・サイエンス)

キーワード：

Canine vector-borne disease (犬の節足動物媒介性疾患)

Anaplasma platys

Babesia (バベシア)

Ehrlichia canis

Hepatozoon canis

Leishmania infantum

Prevention (予防)

Imidacloprid (イミダクロプリド)

Permethrin (ペルメトリン)

要 約

犬の節足動物媒介性疾患 (CVBD) は高い発生状況にあり、かつ世界中に広まりつつある。CVBD を引き起こす病原体の発生率と、イミダクロプリド 10%+ペルメトリン 50% 配合剤 (ImPer) で処置した犬での防御能を調べることを目的に、イタリア南部で長期試験をおこなった。地元の施設で飼育されていた若齢犬 111 頭を A 群 (n=63) と B 群 (n=48) に割り付け、両群それぞれに 1 種類以上の CVBD 原因病原体陽性と陰性の犬を含ませた。さらに 2008 年 5 月に、未感染の雄ビーグル犬を各群 10 頭ずつ組み入れた。A 群には第 0 日目とそれから 21±2 日ごとに ImPer を処置し、B 群は無処置群として試験開始時 (2008 年 3 月~4 月) と初回、2 回目、および 3 回目の追跡調査時 (2008 年 7 月、10 月と 2009 年 4 月) に血液サンプルと皮膚サンプルを採取した。試験開始時と 3 回目の追跡調査時に骨髓サンプルを採取した。*Anaplasma platys*, バベシア属, バルトネラ属, *Dirofilaria immitis* (犬糸状虫), *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* および *Leishmania infantum* を検出するために、血清学的、細胞学的、および分子学的検査を実施した。試験期間中、外部寄生虫 (ノミ, マダニ, およびサシチヨ

¹⁾ 〒 156-0051 東京都世田谷区宮坂 2-14-2-203

²⁾ Dipartimento di Sanita Pubblica e Zootecnia, Universita degli Studi di Bari, Valenzano, BA, Italy

³⁾ College of Veterinary Medicine, Western University of Health Sciences, Pomona, CA, USA

⁴⁾ Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Germany

⁵⁾ Intracellular Pathogens Research Laboratory, Center for Comparative Medicine and Translational Research, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

⁶⁾ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro, PD, Italy

*Corresponding author.

Tel.: +39 080 4679839; Fax: +39 080 4679839.

E-mail address: dotranto@veterinaria.uniba.it (D. Otranto).

ウバエ)を注意して観察した。試験開始時の CVBD 有症率は 39.6%で、44 頭から少なくとも 1 種類の病原体が検出された。もっとも高い感染率を示した種は *A. platys* (27.5%) とバベシア属 (15.6%) で、2 種類以内の病原体による混合感染も 16 頭 (14.7%) に認められた。評価期間終了時に、A 群の全体的な CVBD 発生程度 (IDR) は 90.7% まで減少した。具体的には、*L. infantum* が 100%, *E. canis* が 94.6%, バベシア属が 94.4%, *A. platys* が 81.8% まで低下した。試験開始当初陽性で ImPer 処置を受けた犬では、無処置犬に比べて病原体保有率が 3 回目の追跡調査時において有意に低下した。評価期間終了時に、無処置のビーグル犬 10 頭中 8 頭が少なくとも 1 種類の病原体に感染していたのに対して、処置ビーグル犬では 1 頭が 1 度だけ (2 回目の追跡調査時)、*A. platys* に対して陽性を示した。マダニ予防に対する全体的な有効性は 97.9% であった。2009 年 10 月の同一時に残った 83 頭 (A 群 44 頭, B 群 39 頭) から、この時点における無処置対照群の犬の年間 CVBD 発生率を調べる目的でサンプルを採取した。処置中止後 7 ヶ月目の A 群では、マダニ媒介性疾患 (78.1%) と *L. infantum* (13.6%) に高い年間発生率が認められた。これらの結果から、節足動物に対する ImPer の予防的投与は、地元の施設で飼育されていた犬および未感染のビーグル犬から CVBD 原因病原体の伝播を防御しうることが示された。

1. 緒 言

犬の節足動物媒介性疾患 (CVBD) の原因は、ウイルス、細菌、原虫、蠕虫など広範囲の病原体であり、これらの病原体はマダニ、ノミ、蚊、サシチョウバエ (phlebotomine sand fly) などさまざまな媒介動物 (ベクター) により伝播される (Otranto ら, 2009 a)。一部の CVBD の中には犬の生命を脅かすものもあり、ひいては主要な人獣共通性の問題も含まれており、人の公衆衛生上も関心が集まっている。CVBD の発生率と侵淫率に関する情報はデータ量が限られており、また異なる実験計画と診断方法が採用されているため、試験結果の比較も難しくなり、多くの地中海諸国ではその評価が困難となっている (Trotz-Williams and Trees の総説, 2003)。

イタリアでは、犬にもっとも高頻度で検出される

CVBD 原因病原体は、*Anaplasma platys*, *Babesia vogeli*, バルトネラ属, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis* および *Leishmania infantum* である (Otranto and Dantas-Torres の総説, 2010)。イタリアは多くのマダニ媒介性疾患 (TBD) の分布域となっており、たとえば犬の *E. canis* 血清陽性率はイタリア南部の 14.9% (Otranto ら, 2008) からサルディニア北部の 46.7% (Cocco ら, 2003) まで多様である。犬の *A. platys* 感染はイタリア中央部 (23%) と南部 (11.3%) で見出されている (Sparagano ら, 2003, Otranto ら, 2008)。また、*A. platys* と *E. canis* の混合感染が報告されており、その犬集団では *A. platys* 感染犬の 44.4% が *E. canis* に混合感染していた (Otranto ら, 2008)。イタリア南部でおこなわれた最近の研究では、健康な犬 60 頭の 11.6% が PCR でバルトネラ属に陽性を示し、DNA シークエンシングをもとに、*B. vinsonii berkhoffii* および以前は培養されなかったバルトネラ種 (HMD 株) が特定されている (Diniz ら, 2009)。罹患犬から採取した血液サンプル中のバベシア属を対象とした分子学的研究の結果、*B. canis* は主にイタリア北部で検出されているのに対し (29.1%), *B. vogeli* は主としてイタリア中央部と南部で検出されている (16.3%) (Solano-Gallego ら, 2008)。*L. infantum* による犬のリーシュマニア症 (CanL) は、歴史的にイタリア中央部と南部が持続的な流行地帯であり (Otranto ら, 2009 b), より最近では北部でも検出されている (Maroli ら, 2008, Morosetti ら, 2009)。

CVBD の伝播を減ずるには、媒介節足動物に対する予防的防除が必要である。理想的には、殺虫作用と吸血阻害作用の両方をもつ薬剤を定期的を使用して節足動物の刺咬を防ぎ、CVBD 病原体の伝播からペットを防ぐことである (Otranto および Wall の総説, 2008)。イミダクロプリド 10% とペルメトリン 50% の配合 (ImPer) スポットオン製剤 (Advantix®; Bayer AG, ドイツ) がノミ、蚊、サシチョウバエおよびマダニに対して開発されている (Mencke ら, 2003)。この配合剤の異種マダニ (Epe ら, 2003, Mehlhorn ら, 2003, Young ら, 2003) とサシチョウバエ (Mencke ら, 2003, Miró ら, 2007) に対する有効性が実験的に実証されている。他の研究者らも、ImPer はさまざまな CVBD から犬を効果的に予防すると推察している。しかし、実験感染試験はしばしば野外条件下での真の効果を十

分に反映しておらず、不定の因子が病原体の伝播を予防するための殺虫効果に影響を及ぼすかもしれない。そのため、マダニが濃厚に分布するイタリア南部の地域で飼育されている犬について、*Rhipicephalus sanguineus* (クリイロコイタマダニ) 感染を防ぐ ImPer の効果を調べるため、いくつかの野外試験がおこなわれている (Otranto ら, 2005)。また、犬舎で飼育されている犬で *L. infantum* 感染 (Otranto ら, 2007) および *E. canis* 感染 (Otranto ら, 2008) を減少させる ImPer 配合剤の効果に関する試験も実施されている。しかしわれわれの知る限り、各種 CVBD の予防について、忌避的な外部寄生虫殺虫剤の効果判定を目的としたいかなる試験においても、供試する若齢犬がその際に初めて病原体の暴露をうけるような試験はおこなわれていない。そのため、本試験は ImPer の流行地域の未感染犬における、各種 CVBD 原因病原体の単独感染または混合感染に対する防御の有効性と安全性を評価し、また試験開始時に感染していた犬に対する同製品の副反応の有無を調べる目的で遂行された。

2. 材料および方法

2.1. 試験対象地域

試験は 2008 年 2 月から 2009 年 4 月にかけて、プティニャーノ (北緯 40 度 51 分, 東経 17 度 7 分, 海拔 372 m) (イタリア, アプーリア州バリ地方) の民間の動物保護施設でおこなった。また 2009 年 10 月には、前年に処置した犬と無処置犬の同一の犬集団について、CVBD 原因病原体の年間発生率を調べる目的で、追加のサンプリングをおこなった (下記参照)。この無蓋の動物保護施設は使用されていないサッカースタジアム内にあり、放し飼いの動物を集めて動物保護団体が飼育していた。敷地は草や灌木、一部は砂や小石で覆われていた。保護施設の犬のほとんどが、いくつかの集団に分けられて放し飼いされていた。この地域で試験をおこなった理由は、犬にマダニとノミが蔓延し、サシチョウバエの存在も確認されていたためである。

2.1.1. 動物の管理と飼育

本試験の被験動物は、(2008 年 3~4 月時点で) 90 日齢から 145 日齢の若齢犬であった。さらに

2008 年 5 月に、Green Hill SRL (イタリア, BS モンティチアリ) から実験室飼育の 120 日齢のビーグル犬 (20 頭) を入手し、指標犬として試験に加えて投与群と無投与群に割り付けたうえで、下記と同一の処置をおこなった。試験に供試したすべての犬に一般的な病原体 (イヌパルボウイルス, アデノウイルス 2 型, ジステンパーウイルス, *Leptospira canicola* および *Leptospira icterohaemorrhagiae*) に対するワクチン (Duramune® DAPPI+LC; Fort Dodge Animal Health, イタリア) を (2 週間間隔で) 2 回, 筋肉内注射した。

全頭にフェバンテル・ピランテル・プラジクアンテルの配合剤 (Drontal plus®; Bayer AG, ドイツ) をメーカーの添付使用説明書に従って投与し駆虫処置をおこない、マイクロチップで個体識別して写真撮影した。犬のデータ (すなわち性別, 日齢, 体重, 被毛の長さ) は、それぞれの個々の用紙に記録した。

供試犬は約 10 m × 20 m の金網ケージに収容し、サシチョウバエが止まる場所 (石灰石の壁) の近くに設置して、プラスチックの屋根で日影を作った。処置群と無処置群を入れたケージのフェンスの間隔は、少なくとも 2 m とした。他の犬, すなわち試験に供試しなかった犬と外部寄生虫駆除剤を与えなかった犬は、ケージの周囲のすぐ近くで自由に放し飼いにした。犬は試験の前, 中, 後期を通して、通常の飼育条件下で管理した。1 日に 1 回, 市販のフードを与え、自由給水とした。

各処置時に臨床観察結果をそれぞれの用紙に記入した。全身状態が悪いか、あるいは死亡した犬がいた場合にだけ試験からは除外した。個々のファイルには実験期間中に使用した併用療法も記録した。副反応は、動物用医薬品の承認審査資料に協定する国際協力会議 (VICH) の臨床試験実施基準 (GCP) ガイドライン (GL9) に従って、個々に記録を残した。被験動物とそれらの周囲に、他のいかなる節足動物防除剤も使用しないようにした。

試験計画と実験方法についてはバリ大学 (イタリア) 動物倫理委員会の承認を受け、指標犬としてのビーグル犬の供給についても、イタリア保健省の承認を得た (承認番号 72/2009 C, no. 69062, 28/2008 年 11 月 28 日)。

2.1.2. 試験計画および試験方法

2008 年 3 月から 2009 年 4 月にかけて、CVBD の

予防上の ImPer スポットオン製剤の有効性に関する野外比較対照試験を実施した。試験は獣医臨床試験のための統計的原則に関するガイドライン (CVMP/816/00-Final) に従って実施した。試験設定地域内において、犬を無作為に 2 群に割り付けた：すなわち、A 群は試験開始当日第 0 日目および 21 ± 2 日ごとにメーカーの添付書に記載されている使用法に従って、イミダクロプリド 10% (w/v) + ペルメトリン 50% (w/v) 配合製剤を皮膚にスポットオン投与した；また、A 群に加えて無投与の対照群として B 群を設定した。

カードを引いて犬を A 群か B 群に無作為に割り付け、各群を個別のアルファベット (すなわち、A または B) で指定した。B 群では CVBD 原因病原体の発生率が高くなるのが予想されたため、処置群 (A 群) には多少意図的な無作為化をおこなった。犬は 1 から 12 まで番号を付けたケージに集団で収容した。犬の疫学データ (被毛の長さ、性別、日齢、体重) に関する 2 群間の同質性を、供試日の後に χ^2 検定と一元配置分散分析によって評価した。週齢が 7 週未満と推定される犬、製品滴下部位に皮膚病変がみられた犬、また理化学的検査によって既存の健康問題が確認された犬は試験から除外した。

2008 年の 2~3 月に雌雄の若齢犬 111 頭を試験に供した。さらに 2008 年 5 月に雄のビーグル犬 20 頭を指標犬として導入し、各群に 10 頭ずつ割り付けた。2008 年 3 月~5 月の間に 4 回、試験供試時 (すなわち開始時点) である 7 月と 10 月 (初回と 2 回目の追跡調査時) および 2009 年 4 月 (最後の検査となる 3 回目の追跡調査時) に、試験に用いたすべての犬から血液および皮膚生検試料 (右肩部分から) を採取した。試験開始時と 3 回目の追跡調査時には骨髓サンプルを採取した。当初の診断スクリーニング時において、陰性あるいは陽性にかかわらず、すべての犬を試験対象に含めた。事前に CVBD 病原体への曝露の証拠がある犬を含めたのは、それらの犬に外部寄生虫駆除剤を投与した場合の副反応を評価し、また試験集団内での病原体の循環を促すためであった。

試験に供した時点から 2009 年 4 月までの間、A 群に組み入れた犬には 3 週間ごとにイミダクロプリド 10% + ペルメトリン 50% 配合剤を与えた。配合剤の投与はメーカーの使用説明に従って、肩部肩甲骨間の被毛を 2 本の指で分けて皮膚にピペット全量

を局所滴下した。

細胞学的 (すなわち、全血、パフィコートおよび骨髓について)、血清学および分子学的な検査については診断方法の項で述べる通りに、*A. platys*、バベシア属、バルトネラ属、*D. immitis*、*E. canis*、*H. canis*、および *L. infantum* を含む各種病原体の検出を効率的に実施できるよう、全供試犬を対象に目的に合った組織検体を材料にして作製した。

2009 年 4 月の試験終了後、個人の飼い主に引き取られなかった両群の犬は、次のサシチョウバエおよびマダニのシーズンの間を通して、2009 年 11 月まで無処置でおいた。2009 年 4 月の最後のサンプリングの直後に、A 群のビーグル犬は所有者の同意のもと引き取られたが、B 群のビーグル犬とその他の施設飼育の犬はそのまま残った。最終投与 (2009 年 4 月) から 7 ヶ月後の 2009 年 10 月に、残った 83 頭 (A 群 44 頭と B 群 39 頭) からサンプル採取を取りこぼしなくおこない、前年度の処置群 (A 群) ないしは無処置 (B 群) 群間の CVBD 原因病原体の年間発生率を観察した。前記の病原体検出のために、上に述べた組織サンプルのすべてについて、血清学的、細胞学的、および分子学的検査のすべてを遂行した。

血清学および寄生虫学的検査をおこなう実験室のスタッフには、犬の群分けに関して盲検化のもとでおこなった。犬の飼育中に他のバイアス低下要因 (すなわち、保護施設スタッフの盲検化) は、配合剤の残効性期間に無処置群の犬にその効果が移行し、試験が混交する危険性が高まらないようにする意味で考慮に入れなかった。

2.1.3. 環境調査の方法

2008 年 3 月から 2009 年 4 月まで、さまざまな手順と方法で外部寄生虫 (すなわち、ノミ、マダニ、サシチョウバエ) を監視した。とくに 2008 年の 5 月から 11 月の間は、サシチョウバエの採集は最初に虫体が出現するまでは月に 2 回、その後は虫体が消失するまで 10 日ごとにおこなった。最後のサンプリングはその 2 週間後とした。サシチョウバエの集団密度は、ヒマシ油を塗布した 8 m² の粘着トラップを 48 時間設置して評価した。捕獲したサシチョウバエは 90% のエタノールに浸漬してヒマシ油を除去した後、70% のエタノールに移し、酢酸と水酸化ナトリウムで透徹してから最後に Hoyer 液

で封入した。サシチョウバエの数を計測し、形態学的に種レベルで同定した (Romi ら, 1994)。

2008年3月から2009年4月の間は、処置日(すなわち 21 ± 2 日)ごとに、既報 (Otranto ら, 2005) のように A, B 両群の犬の解剖的身体各所(頭, 耳, 胸-首部, 胸, 腹, 前肢および後肢, 趾間部, 腋下, 尾, および鼠径部)のマダニとノミを、親指検査法で観察した。観察期間を通して、マダニの有無、発育段階と性別を個々の用紙に記入した。一方、最後の処置日には Walker ら (2000) の同定手法にのっとり、形態学的な鑑別のためにマダニを採集した。試験期間を通して毎日平均気温および相対湿度を、2つの測候所の情報に基づき記録した。最終の処置日に以前の報告 (Otranto ら, 2005) に従い、未成熟マダニ数を帰納的に計算した。

2.2. 診断方法

上腕または頸静脈から血液サンプルを採取し、血清を分離して検査時まで -20°C で保管した。皮膚サンプルは前報 (Otranto ら, 2008) の方法で採取し、骨髄は局所麻酔 (リドカイン 2% ATI, Ozzano Emilia, イタリア, ボローニャ) 後に腸骨翼の外側仙骨稜から吸引した。

2.2.1. 血清学的検査

L. infantum, *B. canis*, および *E. canis* に対する抗体を検出するために、3種類の血清学的検査をおこなった。具体的には間接蛍光抗体法 (IFAT) では、*L. infantum* zymodeme MON1 の前鞭毛型を抗原として使った (Otranto ら, 2009c)。*B. canis* と *E. canis* に対する抗体の検出は、市販の IFAT キット (それぞれ MegaScreen Fluobabesia, MegaCor GmbH, オーストリアとイヌエールリヒア症 FA Substrate Slide, VMRD, Pullmann, アメリカ, ワシントン) を使いメーカーの推奨する手法に準拠して実施した。3回目の追跡調査時に、市販の犬糸状虫検査キット (IDEXX, イタリア, ミラノ) を使い、メーカーの使用説明に準じて犬糸状虫抗原を調べた。

2.2.2. 寄生虫学的検査

全血, バフィコート, および骨髄塗抹標本の細胞学的検査は MGG Quick Stain (Bio Optica, イタリア) で染色して観察した。全血, バフィコートおよ

び骨髄塗抹標本は、通常検出される CVBD 原因病原体の細胞内侵入を明らかにする目的で、顕微鏡検査した。加えて、骨髄塗抹標本中のリーシュマニア無鞭毛型虫体の存在を調べた。

2.2.3. 分子学的検査

骨髄, 皮膚および血液から、検査対象の病原体の種類により異なる DNA 抽出, 増幅およびシーケンシングのプロトコルにのっとり分子学的手法により、病原体の検出を試みた。*L. infantum* の分子学的検出には、骨髄および皮膚サンプルからそれぞれ QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, GmbH, ドイツ, ヒルデン) と Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems, アメリカ, ミネソタ) を使って DNA を抽出した。*L. infantum* のキネトプラスト小環体の DNA 断片の増幅は、Cortes ら (2004) の方法に Otranto ら (2007) がわずかに修正を加えた方法を用いた。

Ehrlichia 種および *Anaplasma* 種の DNA 検出には、市販のキット (MagAttract DNA Blood kit, Qiagen, アメリカ, カリフォルニア州バレンシア) を使って、EDTA 血液サンプルから全ゲノム核酸を自動的に抽出した。ゲノム DNA サンプルは、既法 (Barber ら, 2010) ですでに判明しているところの、すべてのエールリヒア属およびアナプラズマ属の熱ショックタンパク質 (groEL) 遺伝子の断片を増幅することにより、最初のスクリーニングをかけた。属レベルで陽性のサンプルについては、続いて種レベルで *A. platys* (Beall ら, 2008), *A. phagocytophilum* (Scorpio ら, 2004), および *E. canis* の DNA 検出のために個々の PCR 解析をおこなった。*E. canis* の DNA 検出には groEL 遺伝子の約 410bp 断片を増幅するために、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを設計した;つまり, gro-E. canis 163s (5'-AAA TGT AGT TGT AAC GGG TGA ACA G-3') および gro-E. canis 573as (5'-AGA TAA TAC CTC ACG CTT CAT AGA CA-3') である。groEL PCR アッセイにより、エールリヒア/アナプラズマ属レベルでは陽性であるものの、種レベルで陰性のサンプルはさらに精製し、増幅された微生物の同定を目的としたシーケンスをおこなった。バベシア属の DNA は既報 (Kordick ら, 1999) のプライマーを使って従来の PCR 法で増幅した。*B. vogeli* の DNA (AY371196 と同一) を陽性対照として使用

した。バルトネラ属のDNAは既存の方法(Dinizら, 2007)で示された, RNAポリメラーゼbサブユニット(rpoB)遺伝子の断片を標的とする従来のPCR法で増幅し, シークエンシングした。

2.3. 統計解析

2.3.1. 検体数の規模

各群の最小限のサンプルサイズ(n=23)は, 以前の報告(de Blasら, 2000)に示された以下の想定に基づき計算した: すなわち, (i) 罹患犬に暴露することのない予想最大頭数(つまりは処置群の犬)=10%; (ii) 有意な相対的リスクが検出される最小相対危険度(つまりは対照群での発生状況は処置群のそれを4.5倍上回ると予想される); (iii) 検出能力=80%; (iv) 信頼水準=95%とする。ある一定数の犬が, 試験の追跡調査時中に脱落すると想定する必要があるため, 各群30頭以上を準備した。

2.3.2. 発生率の計算と有効性の評価

とくに記載がないかぎり, ここでいう陽性の犬とは, 1つあるいはそれ以上の検査診断で1種類以上のCVBD病原体に対して陽性であった犬と定義する。発生率はまず, A, B各群について年間単純発生率(すなわち, その間に何がおころうとも1年後と2年後の最終サンプリングの結果だけを考慮する)を, 次のように計算した。つまり, 新規に感染した頭数/(当初陰性の頭数-脱落または死亡した頭数)×100とした。

さらに, 試験中に追跡調査続行不能になる犬の問題を解決するために, 感染の発生は発生密度割合(IDR)で計算した。IDRは各追跡調査時について, 細胞学的検査, 血清学的検査あるいは分子学的検査のいずれかで陽性となった頭数(すなわち新規の感染)を, それら犬の追跡調査時の月数(すなわち, 各病原体に感染するリスクがある犬の前回とその後の評価までの間の犬観察経過累積月数)で割った値として計算した。1度しか検査を受けなかった(脱落または死亡した)犬は, どの時点でも発生率の計算に含めなかった。A, B群間の発生率の差はYates補正 χ^2 検定で計算した。忌避効果はサンプリング期間の終了時に下記の式を用いて計算した, 各感染に対する防御効果の百分比という表現で示した; 計算式の次のとおりである

防御効果の百分比(%)=(対照群における年間単

表-1 試験開始時(2008年3月)に施設飼育の犬から細胞学的検査・PCRで検出された病原体または病原体感染群[犬の節足動物媒介性疾患(CVBD)およびマダニ媒介性疾患(TBD)]ごとの感染数および感染率

病原体(または病原体群)	陽性/検査頭数	感染率(%)
CVBDs	44/111	39.6
TBDs	41/111	36.9
<i>Leishmania infantum</i>	4/111	3.6
<i>Anaplasma platys</i>	30/109	27.5
パベシア属.	17/109	15.6
バルトネラ属.	6/109	5.5
<i>Ehrlichia canis</i>	1/109	0.9
<i>Hepatozoon canis</i>	2/111	1.8

純発生率またはIDRの百分比-投与群の年間単純発生率またはIDRの百分比/対照群の年間単純発生率またはIDRの百分比)×100

A, B両群間の犬へのマダニ寄生率の差は, 双方向 χ^2 計算表(Preacher, 2001)で計算した。AおよびB群間の平均マダニ寄生数はANOVAで比較した。

マダニ(未成熟虫+成虫)に対する薬剤投与の有効性は標準的な式, すなわち, 有効性(%)=[(対照群の平均マダニ寄生数-投与群の平均マダニ寄生数)/対照群の平均マダニ寄生数]×100で計算した。

とくに記載がないかぎり, 統計解析は統計パッケージSPSS for Windows, version 15.0(Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, イリノイ州, シカゴ)を使っておこなった。

2.3.3. 安全性の評価

薬物副反応の疑い(SADR)は処置群については各追跡調査時に観察した。いかなる異常な臨床兆候もSADR用紙に記入した。処置犬の総数に比較してSADRを示した犬の百分比は, SADRの百分比=(SADRを示した犬の頭数/処置犬の総数)×100で算出した。

3. 結 果

試験開始前, 処置群(A)と対照群(B)では, 1種あるいはそれ以上の検査診断で1つないしは複数の病原体に対して陽性を示す個体数, 個々の犬の特性(すなわち性別, 日齢, 体重, 被毛の長さ)において同等であった(p<0.05)。最初のサンプリング

表-2 犬の節足動物媒介性疾患 (CVBD) または各単独病原体の年間単純発生率。処置群 (A群) および無処置群 (B群) におけるImPerによる防御の有効性 (%) (08年3月に陰性であった犬にのみ基づく) を統計的有意性ととも示す

病原体 (または病原体群)	試験開始時 (08年3月) に陰性であった犬の頭数		陽性/検査頭数 (09年3月) ^a		有効性 (%)	有意性
	A群	B群	A群	B群		
CVBDs	47	40	2/34 (5.8)	25/29 (86.2)	93.27	$\chi^2=41.233, p<0.01$
<i>Leishmania infantum</i>	71	56	0/51 (0)	20/42 (47.6)	100	$\chi^2=30.939, p<0.01$
<i>Anaplasma platys</i>	56	43	3/40 (7.5)	10/33 (33.3)	77.48	$\chi^2=7.85, p<0.01$
バルトネラ属.	68	55	2/50 (4)	0/43 (0)	—	
バベシア属.	63	49	2/46 (4.3)	15/39 (38.5)	88.83	$\chi^2=15.351, p<0.01$
<i>Ehrlichia canis</i>	73	56	1/53 (1.9)	8/44 (18.2)	89.56	$\chi^2=7.584, p<0.01$
<i>Hepatozoon canis</i>	71	58	0/49	1/42 (0.24)	100	なし

^a カッコ内は年間単純発生率 (%)

表-3 1つあるいはそれ以上の検査診断で犬の節足動物媒介性疾患 (CVBDs) 陽性および各単独病原体陽性に対するの発生密度割合 (IDRs)。処置群 (A群) および無処置群 (B群) におけるImPerによる防御効果の有効性 (%) も有意性ととも示す。IDRは前回追跡調査時に陰性であった犬の頭数に基づいて計算した

病原体/検査時期	同一時検査集団内の頭数 ^a		新規感染症例数		追跡調査時の 犬観察経過累積月数		IDR(95% CI)		有効性 (%)
	A群	B群	A群	B群	A群	B群	A群	B群	
CVBD									90.7
試験開始時	47	40	—	—	—	—	—	—	
追跡調査時1回目	41	34	1	16	143	119	0.7	13.4	
追跡調査時2回目	35	18	5	13	145.5	71.5	3.4	18.2	
追跡調査時3回目	30	5	0	3	179.1	42.3	0	7.1	
計			6	32	468.1	232.8	1.3	13.7	
<i>Leishmania infantum</i>									100
試験開始時	71	56	—	—	—	—	—	—	
追跡調査時1回目	57	49	0	0	199.5	171.5	0	0	
追跡調査時2回目	53	46	0	7	236.3	192.1	0	3.6	
追跡調査時3回目	52	37	0	14	270.8	198.3	0	7.1	
計			0	21	435.8	561.8	0	3.7	
<i>Anaplasma platys</i>									81.9
試験開始時	56	43	—	—	—	—	—	—	
追跡調査時1回目	48	39	2	10	168	136.5	1.2	7.3	
追跡調査時2回目	44	26	6	14	181.2	112.7	3.3	12.4	
追跡調査時3回目	34	10	1	4	208.9	65.7	0	6.1	
計			9	28	558.2	314.8	1.6	8.9	
バベシア属.									94.4
試験開始時	63	49	—	—	—	—	—	—	
追跡調査時1回目	54	45	1	8	189	157.5	0.5	5.1	
追跡調査時2回目	50	34	1	9	208.7	144.4	0.5	6.2	
追跡調査時3回目	45	25	0	6	249.1	116.7	0	5.1	
計			2	23	646.9	418.7	0.3	5.5	
<i>Ehrlichia canis</i>									94.6
試験開始時	73	56	—	—	—	—	—	—	
追跡調査時1回目	62	51	0	3	217	178.5	0	1.7	
追跡調査時2回目	59	47	0	4	244.5	191.5	0	2.1	
追跡調査時3回目	54	39	1	7	302.4	209.3	0.3	3.4	
計			1	14	763.9	579.3	0.1	2.4	
<i>Hepatozoon canis</i>									80.1
試験開始時	71	58	—	—	—	—	—	—	
追跡調査時1回目	59	51	0	4	206.5	178.5	0	2.2	
追跡調査時2回目	53	39	1	0	247.4	164.3	0.4	0	
追跡調査時3回目	49	39	0	0	249.1	216.7	0	0	
計			1	4	703.1	559.5	0.1	0.7	

^a これらの数字は各追跡調査時にIDR計算のために同時試験集団に含まれた陰性犬の頭数

時、施設で育った若齢犬 111 頭中 44 頭 (39.6%) が、少なくとも 1 種類の CVBD 原因病原体に陽性であった (表-1)。具体的には、41 頭 (36.9%) はマダニ媒介性疾患 (TBD) のみ陽性であり、その代表的な種として *A. platys* とバベシア属が (それぞれ 27.5% と 15.6%)、続いてバルトネラ属 (5.5%)、*H. canis* (1.8%)、*E. canis* (0.9%) の順であげられた。4 頭 (3.6%) は *L. infantum* 陽性であった (表-1)。2 種類までの病原体による混合感染が分子学的検査によって 16 頭 (14.7%) に確認され、そのなかで多かったものは順に *A. platys* + バベシア属 (12/16)、続いて *A. platys* + *H. canis* (2/16)、*A. platys* + *L. infantum* と *A. platys* + バルトネラ属 (1/16) であった (データ非表示)。一方、試験供試時にビーグル犬 20 頭のうち CVBD 原因病原体が陽性の個体はみられなかった。

A、B 両群の年間単純発生率と IDR をそれぞれ表-2 と表-3 に示す。CVBD 年間単純発生率は A 群で 5.8%、B 群で 86.2% であり、ImPer の最終的な防御率は 93.3% と算出された。全体として、いずれかの検査で何回目かの追跡調査時に検出されたすべての CVBD 原因病原体の IDR は、A 群より B 群で有意に高く (表-3)、ImPer の A 群における最終的防御効果は 90.7% という結果になった。B 群の IDR 最高値は 2 回目の追跡調査時に記録された (18.19%)。同様に、A 群の IDR 最高値も 2 回目の追跡調査時に記録された (3.44%)。

試験期間を通して、A 群では *L. infantum* 陽性犬は確認されず、その結果として、年間単純発生率および IDR 計算による評価で、ImPer はもっとも高い防御効果 (100%) を示した。年間単純発生率と IDR で計算した ImPer の防御効果は、*E. canis* (それぞれ 89.56% と 94.58%)、バベシア属 (それぞれ 88.83% と 94.37%) および *A. platys* (それぞれ 77.48% と 81.87%) といずれも同様に高い値を示した。(以下次号に続く)

参考文献

- ・ Baneth, G., Samish, M., Alekseev, E., Aroch, I., Shkap, V., 2001. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally-fed or percutaneously-injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J. Parasitol.* 87, 606-611.
- ・ Barber, R.M., Li, Q., Diniz, P.P.V.P., Porter, B.F., Breitschwerdt, E.B., Clai-borne, M.K., Birkenheuer, A.J., Levine, J.M., Levine, G.J., Chandler, K., Kenny, P.,

- Nghiem, P., Wei, S., Greene, C.E., Kent, M., Platt, S.R., Greer, K., Schatzberg, S.J., 2010. Evaluation of brain tissue or cerebrospinal fluid with broadly reactive polymerase chain reaction for *Ehrlichia*, *Anaplasma*, spotted fever group *Rickettsia*, *Bartonella*, and *Borrelia* species in canine neurological diseases (109 Cases). *J. Vet. Intern. Med.* 24 (2), 372-378.
- ・ Beall, M.J., Chandrashekar, R., Eberts, M.D., Cyr, K.E., Diniz, P.P.V.P., Mainville, C., Hegarty, B.C., Crawford, J.M., Breitschwerdt, E.B., 2008. Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 455-464.
- ・ Cocco, R., Sanna, G., Cillara, M.G., Tola, S., Ximenes, L., Pinnaparaglia, M.L., Masala, G., 2003. Ehrlichiosis and rickettsiosis in a canine population of Northern Sardinia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 126-130.
- ・ Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., Campino, L., 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 12-17.
- ・ Davoust, B., Marie, J.L., Mercier, S., Boni, M., Vandeweghe, A., Parzy, D., Beugnet, F., 2003. Assay of fipronil efficacy to prevent canine monocytic ehrlichiosis in endemic areas. *Vet. Parasitol.* 112, 91-100.
- ・ de Blas, I., Ortega, C., Frankena, K., Noordhuizen, J., Thrusfield, M., 2000. WinEpiScope 2.0. EpiDicon Network. Aragon Government, Spain, <http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope>.
- ・ Diniz, P.P., Maggi, R.G., Schwartz, D.S., Cadenas, M.B., Bradley, J.M., Hegarty, B., Breitschwerdt, E.B., 2007. Canine bartonellosis: serological and molecular prevalence in Brazil and evidence of co-infection with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*. *Vet. Res.* 38, 697-710.
- ・ Diniz, P.P., Billeter, S.A., Otranto, D., DeCaprariis, D., Petanides, T., Mylonakis, M.E., Koutinas, A.F., Breitschwerdt, E.B., 2009. Molecular documentation of *Bartonella* infection in dogs in Greece and Italy. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1565-1567.
- ・ Eddlestone, S.M., Diniz, P.P., Neer, T.M., Gaunt, S.D., Corstvet, R., Cho, D., Hosgood, G., Hegarty, B., Breitschwerdt, E.B., 2007. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 1237-1242.
- ・ Epe, C., Coati, N., Stanneck, D., 2003. Efficacy of the compound preparation imidacloprid 10%/permethrin 50% spot-on against ticks (*I. ricinus*, *R. sanguineus*) and fleas (*Ct. felis*) on dogs. *Parasitol. Res.* 90, 122-124.
- ・ Fossati, F.P., Maroli, M., 1986. Laboratory tests of three repellents against *Phlebotomus perniciosus* (Diptera:

- Psychodidae). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 771-773.
- Halbig, P., Hodjati, M.H., Mazloumi-Gavvani, A.S., Mohite, H., Davies, C.R., 2000. Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Med. Vet. Entomol.* 14, 223-226.
 - Inokuma, H., Raoult, D., Brouqui, P.J., 2000. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. *Clin. Microbiol.* 38, 4219-4221.
 - Inokuma, H., Beppu, T., Okuda, M., Shimada, Y., Sakata, Y., 2003. Epidemiological survey of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* using ticks collected from dogs in Japan. *Vet. Parasitol.* 115, 343-348.
 - Kordick, S.K., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Southwick, K.L., Colitz, C.M., Hancock, S.I., Bradley, J.M., Rumbough, R., McPherson, J.T., Mac-Cormack, J.N., 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2631-2638.
 - Maroli, M., Bigliocchi, F., Khoury, C., 1994. Sandflies in Italy: observations on their distribution and methods for control. *Parassitologia* 36, 251-264.
 - Maroli, M., Mizzi, V., Siragusa, C., D'Orazi, A., Gradoni, L., 2001. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in Southern Italy. *Med. Vet. Entomol.* 15, 358-363.
 - Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health* 13, 256-264.
 - Mehlhorn, N., Schmahl, G., Mencke, N., Bach, T., 2003. In vitro and in vivo studies on the effect of a combination containing 10% imidacloprid and 50% permethrin against *Ixodes ricinus* ticks. *Parasitol. Res.* 89, 323-325.
 - Mencke, N., Volf, P., Volfova, V., Stanneck, D., 2003. Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitol. Res.* 90, 108-111.
 - Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A., Molina, R., 2007. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet. Parasitol.* 143, 375-379.
 - Morosetti, G., Bongiorno, G., Beran, B., Scalone, A., Moser, J., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2009. Risk assessment for canine leishmaniasis spreading in the north of Italy. *Geospat. Health* 4, 115-127.
 - Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T., Gradoni, L., 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1318-1322.
 - Otranto, D., Lia, R.P., Cantacessi, C., Galli, G., Paradies, P., Mallia, E., Capelli, G., 2005. Efficacy of a combination of imidacloprid 10%/permethrin 50% versus fipronil 10%/(S)-methoprene 12%, against ticks in naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 130, 293-304.
 - Otranto, D., Paradies, P., Lia, R.P., Latrofa, M.S., Testini, G., Cantacessi, C., Mencke, N., Galli, G., Capelli, G., Stanneck, D., 2007. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet. Parasitol.* 144, 270-278.
 - Otranto, D., Wall, R., 2008. New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. *Med. Vet. Entomol.* 22, 291-302.
 - Otranto, D., Paradies, P., Testini, G., Latrofa, M.S., Weigl, S., Cantacessi, C., Mencke, N., deCaprariis, D., Parisi, A., Capelli, G., Stanneck, D., 2008. Application of 10% imidacloprid/50% permethrin to prevent *Ehrlichia canis* exposure in dogs under natural conditions. *Vet. Parasitol.* 153, 320-328.
 - Otranto, D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B., 2009 a. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol.* 25, 157-163.
 - Otranto, D., Capelli, G., Genchi, C., 2009 b. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniasis vs. dirofilariosis. *Parasit. Vectors.* 2 (Suppl. 1), S2.
 - Otranto, D., Paradies, P., deCaprariis, D., Stanneck, D., Testini, G., Grimm, F., Deplazes, P., Capelli, G., 2009 c. Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 337-343.
 - Otranto, D., Dantas-Torres, F., 2010. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasit. Vectors* 3, 2.
 - Parola, P., Cornet, J.P., Sanogo, Y.O., Miller, R.S., Thien, H.V., Gonzalez, J.P., Raoult, D., Telford III, S.R., Wongsrichanalai, C., 2003. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 41, 600-608.
 - Preacher, K.J., 2001. Calculation for the Chi-Square Test: An Interactive Calculation Tool for Chi-Square Tests of Goodness of Fit and Independence [Computer Software], <http://www.quantpsy.org>.
 - Reithinger, R., Coleman, P.G., Alexander, B., Vieira, E.P.,

- Assis, G., Davies, C.R., 2004. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int. J. Parasitol.* 34, 55-62.
- Rosypal, A.C., Troy, G.C., Zajac, A.M., Frank, G., Lindsay, D.S., 2005. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J. Parasitol.* 91, 970-972.
 - Romi, R., Khoury, C., Bigliocchi, F., Maroli, M., 1994. Schede guida su acari e insetti di interesse sanitario. Istituto Superiore di Sanità, Roma.
 - Scorpio, D.G., Akkoyunlu, M., Fikrig, E., Dumler, J.S., 2004. CXCR2 blockade influences *Anaplasma phagocytophilum* propagation but not histopathology in the mouse model of human granulocytic anaplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 963-968.
 - Shaw, S.E., Day, M.J., Birtles, R.J., Breitschwerdt, E.B., 2001. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol.* 17, 74-80.
 - Simpson, R.M., Gaunt, S.D., Hair, J.A., Kocan, K.M., Henk, W.G., Casey, H.W., 1991. Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1537-1541.
 - Solano-Gallego, L., Trotta, M., Caldin, M., Furlanello, T., 2008. Molecular survey of *Rickettsia* spp. in sick dogs in Italy. *Zoonoses Public Health.* 55, 521-525.
 - Sparagano, O.A., de Vos, A.P., Paoletti, B., Camma, C., de Santis, P., Otranto, D., Giangaspero, A., 2003. Molecular detection of *Anaplasma platys* in dogs using polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 527-534.
 - Trotz-Williams, L.A., Trees, A.J., 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Vet. Rec.* 152, 97-105.
 - Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G., 2000. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge University Press, Cambridge.
 - Young, D.R., Arther, R.G., Davis, W.L., 2003. Evaluation of K9 Advantix vs. Frontline Plus topical treatments to repel brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) on dogs. *Parasitol. Res.* 90, 116-118.