Studies on Canine Haemobartonellosis

I. *Haemobartonella canis* Detected in the Blood of Dogs Inoculated with *Babesia gibsoni*

Mitsuo SONODA, Kiyoshi TAKAHASHI, Takashi TAMURA
and Masateru KOIWA

Department of Veterinary Internal Medicine, School of Veterinary Medicine,
College of Dairying, Ebetsu-shi, Hokkaido 069-01

(Received for publication August 9, 1977)

Abstract. *Haemobartonella canis* was observed in the peripheral blood of both intact and splenectomized mongrel dogs inoculated intravenously with *Babesia gibsoni* derived from a dog affected naturally in Nagasaki City. It was detected on the erythrocytes of 13 experimental dogs, except 7 dogs inoculated with the *Babesia* strain only for passage and not examined hematologically. The incubation period of *H. canis* infection was between 3 and 8 days, with 4.7 days on the average, after inoculation. *H. canis* appeared on erythrocytes on the same day with or a few days earlier than *B. gibsoni*. Its organisms attached to the surface of the erythrocyte singly, in a row, or in a cluster, and reddish-purple in color on Giemsa-stained films (Figs. 3-5). In scanning electron microscopy, erythrocytes parasitized with many *H. canis* were deformed markedly, showing invaginations of the surface membranes. Coccoid, bacillary or doughnut-shaped organisms about 0.2-0.6 μ m in diameter were located in grooves (Figs. 6 and 7). In transmission electron microscopy, the organisms were bound with a single trilaminar unit-membrane and packed with much dense granular substance (Fig. 8). This is the first report on the existence of *H. canis* in Japan.

犬の Haemobartonellosis に関する研究

I. *Babesia gibsoni* 接種犬で観察された *Haemobartonella canis*

其田三夫・高橋清志・田村 孝・小岩政照
酪農学園大学獣医学科家畜内科学教室

犬の haemobartonellosis は、*Haemobartonella canis* と呼ばれる *Rickettsiales* の小体が赤血球の表面に寄生し、貧血を惹起する疾病である。この小体は、ドイツの Kikuth [6] が1928年、摘脾犬で初めて発見してから、北米 [2, 3, 7, 8, 10-12] およびモロッコ [1] でその存在が知られている。しかし、わが国の犬について

の報告は、まだ見当たらない。

われわれは、1973年以来、犬の *Babesia gibsoni* の研究を接種犬について実施中である。これらの供試犬の血液塗抹 Giemsa 染色標本の鏡検の際、赤血球の表面にしばしば赤紫色に染まる *H. canis* 様の小体（以下 H様小体と略記）の付着が認められた。さらに電子顕

微鏡的視察を行った結果、この H 様小体は *H. canis* に一致し、わが国の犬にも、血液寄生 *Rickettsiales* の存在することが確認された。以下にその成績を報告する。

材料および方法

1. 供試犬

長崎市内で1973年11月に発見した *B. gibsoni* 自然感染犬の血液を、札幌市畜犬抑留所から譲り受けた臨床的健康犬2例に5 ml ずつ静脈に接種した。その後1975年3月まで、引き続いて12代、計20例（摘脾犬8例と非摘脾犬12例）に継代を行った。このうち種つぎにのみ用いた7例を除き、摘脾犬6例（死亡5例と耐過1例）と、非摘脾犬7例（死亡5例と耐過2例）、計13例を今回の観察の対象とした。

2. 臨床と血液学的観察

臨床所見は、一般状態と可視粘膜を主体に観察を行った。赤血球容積 (PCV): 毛細管法によった。赤血球像: Giemsa 染色した塗抹標本を用い、特に幼若赤血球の出現に注目して観察した。*B. gibsoni* と H 様小体の寄生率: Giemsa 染色した血液塗抹標本を用い、1,000倍の倍率で多数視野に寄生赤血球1個以上(+)、10視野に1個以上(++)、1視野に1個以上(+++)、および1視野に10個以上(++++)認められるものに区分し、それらの寄生率を示した。

3. 電子顕微鏡的観察

走査電子顕微鏡による観察: 1% グルタルアルデヒド・リン酸緩衝液 (pH 7.4) で1時間固定、アセトン系列で脱水した後、金で蒸着し、HHS-2R 型走査電子顕微鏡で観察した。透過電子顕微鏡による観察: 1% オスミウム酸・リン酸緩衝液 (pH 7.4) で40分間固定した赤血球をアセトン系列で脱水した後、Epon で包埋した。超薄切片を作成し、これをウランと鉛で二重染色した後、JEM7 型電子顕微鏡で観察した。

成 績

1. H様小体の出現状況

H様小体は、13例の供試犬の全例で接種後平均4.7 (3~8) 日に、また *B. gibsoni* は平均7.6 (3~12) 日に、それぞれ出現し始めた。すなわち H 様小体は、*B. gibsoni* とほぼ同時か、やや早い時点で赤血球の表面に付着する。この場合、摘脾犬と非摘脾犬とを比較すると、H様小体と *B. gibsoni* のいずれも、前者における出現がわずかに早い傾向がみられた。H様小体の

出現期間は、個体によって差があった。すなわち、平均25.6 (16~40) 日で死亡した10例のうち、4例では、出現数に著しい変動があったとはいえ、観察期間中終始出現していたが、残りの6例と、さらに耐過3例では、不定の出現と消退を繰り返しつつ推移し、一定の傾向を示さなかった。

また H 様小体の出現率と *B. gibsoni* の出現率との間には、一定の関係は認められなかった。

Figs. 1, 2 は、それぞれ接種後第28日と第24日に死亡した非摘脾接種犬 (No. 2) と摘脾接種犬 (No. 5) における H 様小体の出現状況と血液所見を示したものである。すなわち、H様小体は接種後それぞれ第7日と第4日に出現した。一方、*B. gibsoni* はそれぞれ第9日と第5日に出現した。その後両者とも観察終了時まで引き続いて認められたが、末期にはともに(卅)~(卅卅)の出現率を示した。

接種犬 Nos. 2, 5 のいずれにおいても、H様小体のみが出現していた接種初期には、臨床および血液所見に著変はなかった。しかし、*B. gibsoni* の出現開始とともに PCV 値が減少し始め、可視粘膜と黄疸および心悸亢進が漸次増強した。血液塗抹標本では、貧血の増強に対応して赤血球の大小不同症、多染色赤血球、塩基性斑点を有する赤血球および有核赤血球など、幼若赤血球の出現がみられた。

12代目の摘脾犬 (No. 20) は、接種後384日目の1976年5月19日の検査時に、著しい元気の沈衰と可視粘膜の蒼白を示した。Ht値は8.3%で、塗抹標本には幼若赤血球が多数出現していた。この時点では、多数(卅)の H 様小体が赤血球の表面に認められた (Figs. 4, 5) が、*B. gibsoni* の出現はわずか(+)であった。

2. H様小体の顕微鏡的所見

H様小体は、Giemsa 染色で淡赤紫色に染まり、点状、球菌状、桿菌状、ドーナツ状などの多形性を示し、赤血球の表面のみに寄生していた。散在するものもあったが、数個が鎖状に連なり、直線または曲線を描き、あるいは樹枝状に延びるものが多く (Figs. 3~5)、網状赤血球と類似する所見を示していた。

3. H様小体の電子顕微鏡的所見

走査電子顕微鏡像: 直径約0.2~0.6 μm の球菌状、桿菌状、またはドーナツ状などの多形性小体として、赤血球の表面に付着する。また多数寄生時には、溝状のへこみを形成して連鎖状に縦横に延び、赤血球内に深くくい込んでいる。多数の寄生を受けた赤血球は、著しく変形していた (Figs. 6, 7)。

[illegible]

↓ : Inoculation. * : Confirmed to be *H. canis*.

[illegible]

↓: Splenectomy. ↓: Inoculation. *: Confirmed to be *H. canis*.

報告している *H. canis* の光学顕微鏡的所見のそれに一致していた。さらに電子顕微鏡で観察された本小体は、McKee ら [9] および Venable and Ewing [13] が報告している *H. canis* の大きさ、形態および微細構造を示していた。このことから、今回の接種犬で認められた赤血球寄生小体は、*H. canis* であると判定した。

今回の電子顕微鏡的観察で、重度の寄生を受けた赤血球は、著しく変形するものが多かった。このことから、*H. canis* は寄生の際に赤血球の膜構造にかなり強い障害を与えるものと推察される。

今回の試験では、*H. canis* の単独感染例の観察を行っていないため、その病原性については判然としませんが、寄生赤血球の走査電子顕微鏡像からみて、貧血

の惹起にかなり大きく関与していたことは推察に難くない。事実、今回の13代目接種犬 (No. 20) では、*H. canis* の多数出現時に、*B. gibsoni* が少数しか認められなかったにもかかわらず、著しい貧血を起こしていた。この場合の貧血の発現に、*H. canis* による赤血球の損傷が関与していたことは、十分考慮される。

Pryor and Bradbury [11] は臨床的健康犬に摘脾を行ったところ、65% の例から *H. canis* が検出されたので、北米ではかなり広く *H. canis* の不顕性感染があると報じている。また *H. canis* は、実験あるいは治療の目的で脾臓を摘出した犬にみられることが多い [2, 3, 7, 8, 12]。非摘脾犬では、いろいろな感染症またはストレスの際に、まれに現われるに過ぎない [1, 5, 10]。

今回の供試犬にみられた *H. canis* の由来については、まだ不明である。脾臓の有無にかかわらず、供試例の全例で、接種当初にほとんど期を一にして出現をみたことから、長崎から得た *B. gibsoni* 罹患犬の血液に混在していた疑いが濃い。ともあれ、今回の観察成績から、わが国の犬にも *H. canis* の存在することがはじめて確認された。

要 約

1973年以来、*Babesia gibsoni* 接種試験に供試中の犬の血液塗抹標本を鏡検しているうち、赤血球に *B. gibsoni* のほかに、*Haemobartonella canis* 様小体の付着が認められたので、さらに電子顕微鏡の観察を行った。その成績を総括すると、次のごとくである。

1. 長崎市内で発生した *B. gibsoni* 感染犬の血液を、無処置および摘脾の20例の犬に逐次接種したところ、種つぎのみのため継代接種した7例を除いた他の13例で、赤血球の表面に *H. canis* 様の寄生小体 (H様小体と略す) の付着がみられた。

2. 本寄生小体の出現は、接種後第3~8日、平均第4.7日で、*B. gibsoni* の出現と同時に、またはそれよりやや早い。その後は、個体により多様な出現状況を示した。

3. Giemsa 染色した寄生赤血球を光学顕微鏡で観察すると、H様小体は赤紫色を呈し、赤血球の表面に散在するか、または連鎖状に付着していた。

4. 電子顕微鏡で観察すると、H様小体は0.2~0.6 μm の大きさで、単位膜に包まれた顆粒状物質を含有し、球菌状、桿菌状またはドーナツ状を呈する。

赤血球の表層に生じた溝に深く入り込んで付着するので、寄生赤血球は著しく変形していた。

以上の所見から、今回の接種犬で観察された赤血球寄生小体は、*H. canis* と一致するものであり、わが国の犬にも *H. canis* の存在することが明らかとなった。

謝 辞

B. gibsoni 自然感染犬の血液を提供された秦憲利氏および秦良治氏 (長崎市開業) に深甚な謝意を表す。

本論文の概要は、第82回日本獣医学会 (1976年) で発表した。

文 献

- [1] Bellocq, B., and Lacroye, R. (1955). Bartonella infections dogs in Morocco. *Rev. Cps. Armee.*, 4, 156-158 (Cited from Buckner [4]).
- [2] Benjamin, M. M., and Lumb, W. V. (1959). *Haemobartonella canis* infection in a dog. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 135, 388-390.
- [3] Brodey, R. S., and Schalm, O. W. (1963). *Haemobartonellosis and thrombocytopenic purpura in a dog. J. Amer. vet. med. Ass.*, 143, 1231-1236.
- [4] Buckner, R. G., and Ewing, S. A. (1967). Experimental treatment of canine ehrlichiosis and haemobartonellosis. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 150, 1524-1530.
- [5] Donovan, E. F., and Loeb, W. F. (1960). *Haemobartonellosis in the dog. Vet. Med.*, 55, 57-62.
- [6] Kikuth, W. (1928). Ueber einen neuen Anämieerreger, *Bartonella canis* von. sp. *Klin. Wochenschr.*, 7, 1729-1730 (Cited from Buckner [4]).
- [7] Knutti, R. E., and Hawkins, W. B. (1935). Bartonella incidence in splenectomized bile fistula dogs. *J. exp. Med.*, 61, 115-126.
- [8] Lumb, W. V. (1961). Canine haemobartonellosis. *California Vet.*, 14, 24-25.
- [9] McKee, A. E., Ziegler, R. F., and Giles, R. C. (1973). Scanning and transmission electron microscopy of *Haemobartonella canis* and *Eperythrozoon ovis*. *Amer. J. vet. Res.*, 34, 1196-1201.
- [10] McNaught, J. B., Woods, F. M., and Scott, V. (1935). Bartonella bodies in the blood of a non-splenectomized dog. *J. exp. Med.*, 62, 353-358.
- [11] Pryor, W. H., Jr., and Bradbury, R. P. (1975).

- Haemobartonella canis* infection in research dogs. *Lab. Anim. Sci.*, **25**, 566-569.
- [12] Rhoads, C. P., and Miller, D. K. (1935). The association of Bartonella bodies with induced anemia in the dog. *J. exp. Med.*, **61**, 139-148.
- [13] Venable, J. H., and Ewing, S. A. (1968). Fine structure of *Haemobartonella canis* (*Rickettsiales: Bartonellaceae*) and its relation to the host erythrocyte. *J. Parasit.*, **54**, 259-268.

Explanation of Figures

- Fig. 3. Erythrocytes parasitized with *H. canis* only (H), *B. canis* only (B), or both (HB). Giemsa staining, $\times 2,000$.
- Fig. 4. Organisms of *H. canis* attached singly or in row on an erythrocyte. Giemsa staining, $\times 2,000$.
- Fig. 5. A number of organisms of *H. canis* attached to an erythrocyte. Giemsa staining, $\times 2,000$.
- Figs. 6 and 7. Scanning electron micrographs of *H. canis*. Coccoid and doughnut-shaped (arrow) organisms located in the grooves of erythrocytes. Fig. 6, $\times 10,000$; Fig. 7, $\times 15,000$.
- Fig. 8. Transmission electron micrograph of *H. canis*. Four organisms of *H. canis* located in a groove of an erythrocyte. $\times 40,000$.