

## 鹿児島県におけるイヌパルボウイルス感染症

望月雅美・徳田祐二\*・佐藤平二

(家畜微生物学研究室)

昭和59年8月3日 受理

### Canine Parvovirus Infections in Kagoshima

Masami MOCHIZUKI, Youji TOKUDA\* and Heiji SATO

(Laboratory of Veterinary Microbiology)

#### 緒 言

4頭の健康なアメリカ陸軍軍用犬の直腸内容物から分離されたウイルスが、Minute Virus of Canines (MVC) として報告されたのは1970年である<sup>5)</sup>。MVCはその諸性状からパルボウイルスと同定され、最近まで唯一のイヌパルボウイルス (Canine Parvovirus: CPV) として文献上紹介されてきた<sup>22)</sup>。しかし、1977年以後、ネコ汎白血球減少症にきわめて類似した症状や心筋炎を呈し、パルボウイルス様粒子が検出される、主として仔イヌの急性伝染病が日本を含む世界各地で報告された<sup>2,4,8,11,13,17,21,23,25)</sup>。このウイルスは MVC とは異なり、ネコパルボウイルス (Feline Parvovirus: FPV) に類似していることが判明し<sup>3,6,7,9,12,21)</sup>、現在は FPV の亜種、CPV と分類されている<sup>16)</sup>。

著者らは1982年になって、鹿児島県下開業獣医師からの依頼、本学科内の実験犬、および本学医学部附属動物実験施設内飼育実験犬を検査する機会に遭遇し、6株の CPV と考えられるウイルスを分離し得たので、それらの諸性状と鹿児島県における CPV 感染症について報告する。

#### 材 料 と 方 法

##### 1. ウィルス

下痢を呈し急死した一腹の仔イヌ5頭を含む4発生例の下痢便から分離した合計6株を検討した。そのうち、KS 5703 株を代表株として用いた。東京大学農学部より CPV Cp 49 株<sup>9)</sup>と FPV TU 1 株<sup>14)</sup>を、京都微生物化学研究所より CPV 29F 株<sup>1)</sup>の分与を受け、参考対照株として、また一部の実験に供した。

本研究の概要は著者の一人、徳田祐二の修士学位論文 (昭和59年3月) の一部である。

\* 現在、鹿児島県鹿屋食肉衛生検査所 (Present Position: Kagoshima Prefectural Kanoya Meat Inspection Center)

##### 2. 細胞培養法

ウイルス分離にはネコ胎児線維芽細胞系である FEA 細胞を用いた。その後のウイルス培養と参考対照株の培養にはネコ腎細胞系である Crandell feline kidney (CRFK) 細胞を、また一部の実験にはイヌ腎細胞系である Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を使用した。ウイルス分離法、細胞培養法および細胞病理検査法はすでに報告した方法<sup>14)</sup>に準じた。

##### 3. 免疫血清

CPV Cp 49 株と FPV TU 1 株に対する家兎免疫血清は東京大学農学部より分与を受けた。CPV 29F 株に対する抗血清は、すでに報告した塩化セシウム密度勾配遠心法<sup>19)</sup>にて精製したウイルスと家兎を用いて作製した。

##### 4. 血清材料

当講座保存イヌ血清材料中より、採集年月日の明確な82例を実験に供した。

##### 5. イヌ感染実験

CPV に対する血球凝集抑制 (HI) 抗体が陰性 (10倍以下) である同腹の37日令、ビーグル雑種犬、6頭を用いた。分離ウイルス、KS 5703 株 (FEA 細胞で初代分離後、CRFK 細胞で2回継代培養) 5,000 HAU (HAU: 血球凝集単位) を、2頭は静脈内 (i. v.), 2頭は腹腔内 (i. p.) に接種し、残り2頭は無接種対照犬として、別のケージ内で接種犬と同様に飼育した。ウイルス接種後、2週間は毎日、一般臨床症状の観察と糞便へのウイルス排泄様相を検索した。

##### 6. その他

血球凝集反応、HI 試験および陰性染色による電子顕微鏡観察法はすでに述べた方法で<sup>14,18)</sup>、間接蛍光抗体法 (IFA) は抗 CPV 29F 株家兎免疫血清と FITC 標識抗家兎 IgG 緬羊血清を用いて常法に従い実施した。免疫電子顕微鏡観察法は、部分精製・濃縮した被検ウイルス材料 50  $\mu$ l に抗 CPV 29F 株家兎免疫血清 10  $\mu$ l を添加し、室温にて30分間反応させた後、陰性

染色・観察を実施した。

### 結 果

分離ウイルス6株は FEA および CRFK 細胞で核内封入体形成を伴ってよく増殖し (Fig. 1), 感染細胞培養上清は 4℃で豚血球のみを著明に凝集したが, 他動物種血球 (牛, 馬, 山羊, イヌ, ネコ, ウサギ, モルモット, マウス, 鶏) の凝集は認められなかった。

Table 1 には, 参考対照ウイルス株とそれらに対する抗血清, および分離ウイルス6株を用いた HI 試験の結果を示した。分離株はすべて CPV 抗血清と, またすべてのイヌ由来ウイルス株は FPV 抗血清に対しても同種抗原と同様の反応性を示した。

KS 5703 株感染 CRFK 細胞の IFA の結果を Fig. 2 に示した。本血清反応でも KS 5703 株は CPV 29F 株と同程度の反応性を示した。

Fig. 3 には KS 5703 株を分離したイヌ下痢便の, Fig. 4 には CRFK 細胞で増殖した KS 5703 株の陰性染色の結果を示した。平均直径約 20nm の球状粒子のみが認められ, これらは Fig. 5 に示したように既知 CPV 抗血清により凝集した。

感染実験犬 No. 2 (i. p. 接種) と No. 4 (i. v. 接種) はウイルス接種後3日目には粘稠軟便を排し, とくに No. 4 には血液の混入も認められ, 嘔吐が観察された。4日目には No. 3 (i. v. 接種) も下痢を呈し, ウイルス接種した4頭はいずれも元気消失・食欲廃絶に陥った。No. 1 (i. p. 接種) は5日目に嘔吐も認められたが, 6日目には No. 3 とともに回復し始めた。No. 4 と No. 2 は各々5日目と6日目に斃死した。糞

Table 1. Hemagglutination-inhibition (HI) tests of isolated viruses, canine parvovirus (CPV) and feline parvovirus (FPV)

Virus strain	Antiserum		
	CPV 29F	CPV Cp49	FPV TU 1
CPV 29F	2560*	2560	1280
CPV Cp49	2560	2560	1280
KS 5701	2560	2560	1280
KS 5702	2560	2560	1280
KS 5703	2560	2560	1280
KS 5801	1280	2560	1280
KS 5802	2560	2560	1280
KS 5803	2560	2560	1280
FPV TU 1	5120	2560	2560

\*: HI titer was expressed as a reciprocal of the highest serum dilution completely inhibiting the hemagglutination.

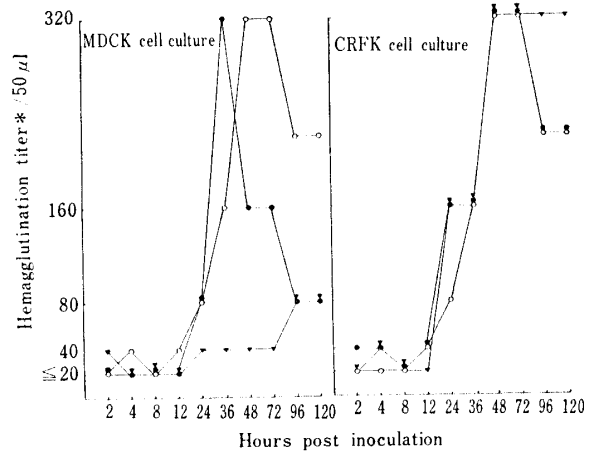


Fig. 6. Growth of KS 5703 strain of isolated viruses, canine parvovirus (CPV) 29F strain and feline parvovirus (FPV) TU 1 strain in MDCK and CRFK cell cultures.

\*: ○—○: KS 5703 strain, ●—●: CPV 29F strain, ▼—▼: FPV TU 1 strain  
\*\*: Hemagglutination (HA) titer was expressed as a reciprocal of the highest dilution showing complete HA.

便中へのウイルス排泄は接種後3日目から観察され, 斃死した2頭を除き, No. 1 で5日間, No. 3 で3日間続いた。斃死した No. 2 の肝, 脾, 骨髄, 腸間膜リンパ節, 回腸, 腎, No. 4 の肝, 脾, 骨髄, 大腸, 腎よりウイルスが回収された。心からのウイルス回収は No. 4 に試みたが陰性であった。生残・回復した No. 1 と No. 3 の接種後14日目の血中 HI 抗体価はともに80倍に上昇していた。なお, 感染実験中, 無接種対照犬は全く異常を示さず, 糞便中にもウイルスは検出されなかった。

Fig. 6 には KS 5703 株, CPV 29F 株および FPV TU 1 株の MDCK 細胞と CRFK 細胞での増殖曲線を示してある。KS 5703 株と CPV 29F 株はウイルス接種12時間以後, 両細胞で著明に増殖した。一方, FPV TU 1 株は CRFK 細胞では他の2ウイルス株と同様の増殖態度を示したが, MDCK 細胞ではウイルス接種72時間以後に若干の増殖が認められ, 96時間後の細胞病理検査では少数の核内封入体が検出された。

以上の結果より, KS 5703 株と残り5分離株は MVC とは異なる CPV と同定された。

1979年1月よりの, 鹿児島県下イヌより得た血清中の CPV Cp 49 株に対する HI 抗体検索の結果を Table 2 に示した。1979年1月採集の2例に低い HI 活性が検出されたが, 明らかな HI 抗体が認められた

Table 2. Hemagglutination-inhibition(HI) antibodies against a canine parvovirus Cp49 strain in dog serum samples collected in Kagoshima from 1979 to 1983

Date of collection of sera	Total tested	HI titer*									
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560 ≤
1979, January	8	6	1	1							
March	4	4									
May-December	14	14									
1980, January	4	3									1
February	4	3							1		
May and June	9	9									
1981, May-December	22	2				1	5	2	4	5	3
1982-1983	17	1					3	4	3	3	3
Total	82	42					40				

\*: HI titer was expressed as a reciprocal of the highest serum dilution completely inhibiting the hemagglutination.

のは1980年以後であった。

考 察

これらの成績から、鹿児島県下においても CPV に起因する下痢症が存在することが判明し、また血清学的調査結果から、少なくとも1979年1月採集イヌ血清中に HI 活性が認められたが、イヌ間に広く流行し始めたのは1980年になってからと考えられる。

現在、CPV 感染症に関する研究のなかで、最も論議され研究が継続されているのは、CPV の由来、すなわち、突然出現し短期間に世界的な流行をおこした理由と、血清学的に類似している FPV およびミンク腸炎ウイルス (MEV) との関連性であろう。CPV の由来を科学的に、また直接的に証明するものは何もない。最も一般的な推察は、FPV あるいは MEV の生ウイルスワクチン株ないし野生株がイヌに対して病原性であるように(イヌ細胞にも感染可能なウイルスに)変異し、それがワクチン製品、とくに、国際的に販売されている製品に混入し、ネコやミンクに応用あるいはイヌに誤用され、それ以後はイヌに広まっていったという説である<sup>12,15,20</sup>。さらに、MEV 野生株がその由来と考えられる成績・考察も認められる<sup>20,24</sup>。これまで FPV の *in vivo* および *in vitro* での宿主はネコ科 (*Felidae*)、イタチ科 (*Mustelidae*) とアライグマ科 (*Procyonidae*) であり<sup>22</sup>、最近の FPV と CPV の比較研究でも FPV はイヌ細胞に感染しないことが確認されている<sup>21,24</sup>。しかし、本研究のなかで、FPV TU 1 株がイヌ由来細胞系である MDCK 細胞に微弱ながら感染した証拠が示されたことは実に興味深い。TU 1 株はこれまでネコ腎細胞で25代、ネコ

肺細胞系で3代、CRFK 細胞で6代継代されている。TU 1 株分離当初の MDCK 細胞やイヌへの感染性は不明であるが、*in vitro* で多数回継代を重ねた結果による種特異性の消失なのか、あるいはイヌやその由来細胞に感染しうるような変異ウイルスが少数ながら出現・混入していた結果なのか、さらには、そのような変異ウイルスが分離当初から混入していたのか、FPV 新鮮分離株や他のイヌ由来細胞をも用いて *in vitro* と *in vivo* の両面から検討する価値はある。

MEV が本邦にも存在するものの<sup>10</sup>、ミンクの生産地が限局されており、初発地点が東京都内であること<sup>4</sup>、さらには、これまで本邦においては FPV や MEV の生ウイルスワクチンは輸入・製造・販売されていないこと(農林水産省畜産局衛生課薬事室調)から、本邦での CPV 感染症は輸入されたイヌあるいはネコに起因し、間接的に、あるいは直接、鹿児島県に広まってきたと考えるのが最も妥当である。

要 約

4例のイヌ下痢症発症例から分離された6株のウイルスは、ネコ由来細胞系である FEA と CRFK 細胞で核内封入体形成を伴ってよく増殖し、感染細胞培養上清は豚血球を凝集した。これらは既知イヌパルボウイルス (CPV) 免疫血清を用いた血球凝集阻止 (HI) 試験と間接蛍光抗体法、陰性染色による電子顕微鏡観察、免疫電子顕微鏡観察およびイヌ感染実験により CPV と同定された。

CRFK および MDCK 細胞での CPV (KS 5703 株と 29F 株) とネコパルボウイルス (FPV) (TU 1 株) の増殖性を比較した結果、CPV は両細胞で、FPV は

CRFK細胞で著明に増殖した。さらに、FPVはMDCK細胞では増殖しないと考えられていたのに反し、若干の増殖が認められた。

野外イヌ血中 HI 抗体検索の結果から、鹿児島県下において CPV 感染症が流行し始めたのは1980年以後と推察された。

**謝辞** 本研究に用いた Cp 49 株と TU 1 株、およびそれらに対する免疫血清を分与下さいました東京大学農学部、小西信一郎教授、29 F 株を分与下さいました京都微生物化学研究所、安食政幸博士に謝意を表します。

### 文 献

- 1) 安食政幸・高村恵三・平松計久・中井正久・佐々木文存・大熊俊一：わが国で分離されたイヌパルボウイルスの性状と抗体調査。日獣会誌, **36**, 68-73 (1983)
- 2) Appel, M. J. G., Cooper, B. J., Greisen, H. and Carmichael, L. E.: Status report: Canine viral enteritis. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, **173**, 1516-1518 (1978)
- 3) Appel, M. J. G., Scott, F. W., and Carmichael, L. E.: Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.*, **105**, 156-159 (1979)
- 4) Azetaka, M., Hirasawa, T., Konishi, S. and Ogata, M.: Studies on canine parvovirus isolation, experimental infection and serologic survey. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **43**, 243-255 (1981)
- 5) Binn, L. N., Lazar, E. C., Eddy, G. A., and Kajima, M.: Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.*, **1**, 503-508 (1970)
- 6) Black, J. W., Holscher, M. A., Powell, H. S. and Byerly, C. S.: Parvoviral enteritis and panleukopenia in dogs. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **74**, 47-50 (1979)
- 7) Carmichael, L. E., Joubert, J. C. and Pollock, R. V. H.: Hemagglutination by canine parvovirus: Serologic studies and diagnostic applications. *Amer. J. Vet. Res.*, **41**, 784-791 (1980)
- 8) Eugster, A. K. and Nairn, C.: Diarrhea in puppies: Parvovirus-like particles demonstrated in their feces. *Southwest. Vet.*, **30**, 59-60 (1977)
- 9) Flower, R. L. P., Wilcox, G. E. and Robinson, W. F.: Antigenic differences between canine parvovirus and feline panleucopenia virus. *Vet. Rec.*, **107**, 254-256 (1980)
- 10) Higashihara, T., Izawa, H., Onuma, M., Kodama, H., Mikami, T. and Noda, H.: Mink enteritis in Japan. I. Isolation and characterization of the causative virus and its pathogenicity in cat. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **43**, 841-851 (1981)
- 11) Horner, G. W., Hunter, R. and Chisholm, E. G.: Isolation of a parvovirus from dogs with enteritis. *N. Z. Vet. J.*, **27**, 280 (1979)
- 12) Johnson, R. H. and Spradbrow, P. B.: Isolation from dogs with severe enteritis of a parvovirus related to feline panleucopenia virus. *Aust. Vet. J.*, **55**, 151 (1979)
- 13) Kelly, W. R.: An enteric disease of dogs resembling feline panleucopenia. *Aust. Vet. J.*, **54**, 593 (1978)
- 14) Konishi, S., Mochizuki, M., and Ogata, M.: Studies on feline panleukopenia. I. Isolation and properties of virus strains. *Jap. J. Vet. Sci.*, **37**, 439-449 (1975)
- 15) Lenghaus, C. and Studdert, M. J.: Relationships of canine panleucopenia (enteritis) and myocarditis parvoviruses to feline panleucopenia virus. *Aust. Vet. J.*, **56**, 152-153 (1980)
- 16) Matthews, R. E. F.: *Classification and nomenclature of viruses*. S. Karger, Basel (1982)
- 17) McCandlish, I. A. P., Thompson, H., Cornwell, H. J. C., Laird, H. and Wright, N. G.: Isolation of a parvovirus from dogs in Britain. *Vet. Rec.*, **105**, 167-168 (1979)
- 18) Mochizuki, M., Konishi, S. and Ogata, M.: Studies on cytopathogenic viruses from cats with respiratory infections. III. Isolation and certain properties of feline herpesviruses. *Jap. J. Vet. Sci.*, **39**, 27-37 (1977)
- 19) Mochizuki, M., Konishi, S. and Ogata, M.: Studies on feline panleukopenia. II. Antigenicities of the virus. *Jap. J. Vet. Sci.*, **40**, 375-383 (1978)
- 20) Moraillon, A., Moraillon, R., Person, L. M. and Parodi, A. L.: Parvovirose canine: L'ingestion d'organes de vison atteint d'entérite à virus déclenche chez le chien une maladie identique à la maladie spontanée. *Recl. Med. Vet.*, **156**, 539-548 (1980)
- 21) Osterhaus, A. D. M. E., van Steenis, G. and de Kreek, P.: Isolation of a virus closely related to feline panleukopenia virus from dogs with diarrhea. *Zbl. Vet. Med. B.*, **27**, 11-21 (1980)
- 22) Siegl, G.: *The parvoviruses*, Virol. Monogr., **15**, Springer Verlag, Wien (1976)
- 23) Thomson, G. W. and Gagnon, A. N.: Canine gastroenteritis associated with a parvovirus-like agent. *Can. Vet. J.*, **19**, 346 (1978)
- 24) Tratschin, J.-D., McMaster, G. K., Kronauer, G. and Siegl, G.: Canine parvovirus: Relationship to wild-type and vaccine strains of feline panleukopenia virus and mink enteritis virus.

*J. gen. Virol.*, **61**, 33-41 (1982)  
25) Van Rensburg, I. B. J., Botha, W. S., Lange, A. L. and Williams, M. C.: Parvovirus as a cause of enteritis and myocarditis in puppies.

*J. South Afr. Vet. Ass.*, **50**, 249-253 (1979)  
26) Wilson, N. D.: Origin of canine parvovirus. *Vet. Rec.*, **106**, 392 (1980)

### Summary

Six viral agents isolated from the 4 spontaneous outbreaks of canine diarrhea grew well in the feline cell cultures, FEA and CREK cells, with production of the intranuclear inclusion bodies (i. b.), and agglutinated swine erythrocytes. They were successfully identified as canine parvoviruses (CPV) by several laboratory methods; such as, a hemagglutination-inhibition (HI) test, an indirect immunofluorescence test, an electron-microscopy (EM) with negative stain, and an immune EM. KS 5703 strain, a representative strain in the present study, caused severe enteritis in the 4 thirty-seven-day-old pups, killing 2 of them on the 5th and 6th days after the challenge.

Both CRFK and MDCK cells supported the propagation of CPV strains, and feline parvovirus (FPV), TU 1 strain, grew well in CRFK cells: moreover, the strain showed a slight growth with some typical i. b. in MDCK cells, in which it was supposed impossible for FPV to replicate.

Serological survey of dog serum samples by the HI test indicated a possibility that CPV infections became epizootic among dogs in Kagoshima after 1980.

### Explanation of figures

- Fig. 1: Intranuclear inclusion bodies observed in CRFK cells infected with KS 5703 strain. The cells were fixed and stained with May-Grünwald/Giemsa solutions 96 hours after inoculation.
- Fig. 2: Indirect immunofluorescence assay by using anti-canine parvovirus (CPV) 29F strain immune serum on CRFK cells infected with KS 5703 strain. The cells, 96 hours after inoculation, were treated with acetone for 10 minutes at room temperature and reacted with the antisera.
- Fig. 3: Direct electronmicroscopy (EM) of a canine diarrheal fecal sample, of which KS 5703 strain was isolated. The sample was negatively stained with 2% neutral phosphotungstic acid. Bar presents 100nm.
- Fig. 4: Direct EM of KS 5703 strain which grew in CRFK cell cultures. Bar presents 100nm.
- Fig. 5: Immune EM of KS 5703 strain. The same sample of Fig. 4 was reacted with the anti-CPV immune serum for 30 minutes at room temperature. Bar presents 100nm.

