

国内における犬呼吸器感染症の病原学的調査

勢簾 剛[†] 若月 章 増渕勝夫 高橋拓男 国分輝秋

(株)微生物化学研究所 (〒611-0041 宇治市榎島町24-16)

(2009年9月18日受付・2010年3月4日受理)

要 約

国内の呼吸器病罹患犬119頭について、PCR法により犬アデノウイルス2型 (CAV-2)、犬パラインフルエンザウイルス (CPIV), *Bordetella bronchiseptica* (Bb), 犬ジステンパーウイルス (CDV), 犬ヘルペスウイルス, 犬呼吸器コロナウイルス (CRCoV) 遺伝子の検出を試みた。1種類の病原体遺伝子が検出された47頭のうち、Bbが15頭と最も多く、次いでCRCoV, CPIVの順に検出された。複数の病原体遺伝子が検出された16頭についても、BbとCPIV, CRCoVの検出率が高かった。これらの結果からBbとCPIV, CRCoVが単独または複合して犬呼吸器感染症 (ケンネルコフ) の発生に関与することが示唆された。また、CAV-2とCPIV, CDVの検出率は、ワクチン未接種犬に比べ接種犬で低い傾向にあり、その効果が示唆された。

—キーワード: *Bordetella bronchiseptica*, 犬呼吸器コロナウイルス, 日本, ケンネルコフ, 呼吸器病。

----- 日獣会誌 63, 538~542 (2010)

犬呼吸器感染症 (canine infectious respiratory disease: CIR) またはケンネルコフ (犬伝染性気管支炎) の主要病原体として、犬アデノウイルス2型 (CAV-2) と犬パラインフルエンザウイルス (CPIV), *Bordetella bronchiseptica* (Bb) が知られている [1-4]。その他に、犬ヘルペスウイルス (CHV) やレオウイルス, ストレプトコッカスやバスタツレラ, シュードモナス属菌, マイコプラズマなどが上部呼吸器から検出される [2, 5-9]。また、犬ジステンパーウイルス (CDV) が重篤な呼吸器症状を示した犬の上部呼吸器から分離されることもある [10]。最近では下痢を惹起する犬腸炎コロナウイルスとは異なる犬呼吸器コロナウイルス (CRCoV) や犬インフルエンザウイルスなど、新興病原体の関与も報告されるようになってきた [11-14]。

国内のCIRDについても個々の病原体に関する調査報告が散見されるが [1, 3], 最近の野外状況に関する報告、特に新興病原体を含めた複数の病原体の関与を総合的に調査した報告は少ない。また、CAV-2とCPIV, CDVについてはワクチンが広く普及しているが、ワクチン接種犬と未接種犬で各病原体の検出を比較した報告もない。本報告では国内で発生したCIRD罹患犬の臨床材料を検査材料とし、CAV-2とCPIV, CDV, CHV, CRCoVおよびBbの野外浸潤状況をPCR法で調査した。

材 料 お よ び 方 法

検査材料: 2004年8月~2007年2月の間に、北海道、埼玉、千葉、東京、長野、岐阜、静岡、愛知、滋賀、京都、大阪、兵庫、和歌山、岡山、山口、香川、鹿児島の開業獣医師から診断検査の依頼のあった119頭の臨床材料を用いた。検査犬はいずれも発咳やくしゃみ、鼻汁の漏出などの呼吸器症状を示し、口腔および鼻腔、眼瞼から採取したスワブ100, 82, 37検体を検査に供した。119頭のうち、口腔と鼻腔、眼瞼スワブすべて採取した犬が19頭、口腔と鼻腔スワブ、口腔と眼瞼スワブ、鼻腔と眼瞼スワブ、口腔または鼻腔スワブのみ採取した犬がそれぞれ44, 8, 10, 29, 9頭であった。採取したスワブは2mlのイーグル基礎培地を加え、検査の実施まで-80℃に保存した。調査犬の月齢は3カ月齢未満が78頭、3~12カ月齢が16頭、12カ月齢以上が17頭で、残りの8頭の月齢は不明であった。また、34頭はCAV-2とCPIV, CDVを含む混合生ワクチンを接種されたことがあり、53頭は未接種犬であった。残りの32頭のワクチン接種歴は不明であった。ワクチンを接種されたすべての犬はスワブの採取時に少なくともワクチン接種後3週間以上経過していた。

DNAとRNAの抽出: 検査材料からのDNAとRNAの抽出は、それぞれQIAamp DNA Mini Kit (QIA-

[†] 連絡責任者: 勢簾 剛 (株)微生物化学研究所)

〒611-0041 宇治市榎島町24-16

☎0774-22-4518 FAX 0774-24-1407

E-mail: caninefeline@kyotobiken.co.jp

表1 今回の調査で使用したPCRおよびRT-PCRのプライマー

病原体		塩基配列 (5'-3')	増幅産物サイズ (bp)	標的遺伝子部位	引用文献
CAV-2	F	CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC	1,030	E3	[15]
	R	CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT			
CPIV	F	GAGTTCATCCCCTGTAACCTGTC	232	F	
	R	AAGGTATGTGTCACTTTGTGCT			
Bb	F	TGGCGCCTGCCCTATC	237	flaA	[16]
	R	AGGCTCCAAGAGAGAAAGGCTT			
CDV	F	ATGCTCCCCTACCAAGACAAG	185	H	
	R	TGGTGAAATCGAACTCCAG			
CHV	F	TAATTCATATGTCCCCTTTTT	1,287	gB	[5]
	R	GTCCTGTATCTTCTAACTCTGCT			
CRCoV	1st	F	497	HE	[13]
		R			
	nested	F	365		
		R			

GEN, Hilden, Germany) と QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使い、使用書に従って行った。

PCR と RT-PCR : CAV-2 と Bb, CHV 遺伝子の検出は、PCR (Go Taq Green Master Mix, Promega, U.S.A.) を使用し、プライマー 0.4pmols, 抽出したサンプル DNA を 1 μ l とし総量 25 μ l で行った。CAV-2 と Bb, CHV のプライマーと反応条件はそれぞれ Hu ら [15], Hozbor ら [16], Erles ら [5] の方法に従った。CPIV と CDV, CRCoV 遺伝子の検出は RT-PCR (One Step RNA PCR Kit, タカラバイオ株, 滋賀) を使用し、プライマー 0.4pmols, 抽出したサンプル RNA を 1 μ l とし総量 50 μ l で行った。CRCoV については、RT-PCR 後に Go Taq Green Master Mix を使い、プライマー 0.4pmols, 一次 PCR 産物 1 μ l, 総量 25 μ l として nested PCR を行った。反応条件は Yachi ら [13] の方法に準じた。CPIV および CDV 遺伝子の検出条件は、42 $^{\circ}$ C 30 分の逆転写の後に 95 $^{\circ}$ C 5 分を 1 回, 94 $^{\circ}$ C 30 秒と 58 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 90 秒を 30 回繰り返す, 最後は 72 $^{\circ}$ C 5 分とし、サーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice MP, タカラバイオ株, 滋賀) を用いた。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で分析し、想定される塩基数のバンドが検出された試料を当該遺伝子陽性とした。PCR および RT-PCR のプライマーの配列, 増幅したバンドの大きさは、表 1 に示したとおりである。

PCR と RT-PCR の特異性 : PCR と RT-PCR の特異性は、既知のウイルス株 (CAV-2 : OD-N/SL 株, CPIV : DS-L 株, CDV : DFE-HC 株, CHV : F205 株, CRCoV : 牛コロナウイルス No. 66 株) と Bb (Z-6 株) を用いて検討した。反応の特異性は当該病原体とのみ PCR 産物が認められることによって確認した。

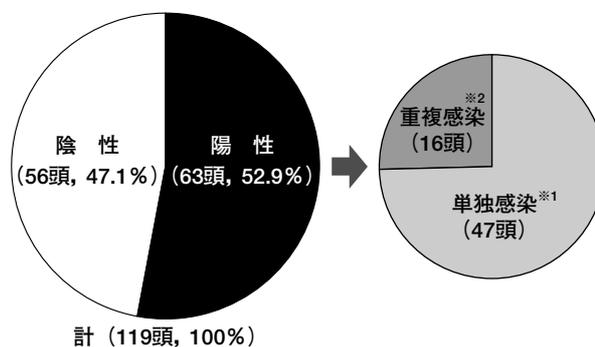


図1 呼吸器症状を呈した犬からの6種類の病原体遺伝子の検出

※1 : 1頭から1種類の病原体が検出された
 ※2 : 1頭から2または3種類の病原体が検出された

表2 単独感染または重複感染犬における各病原体遺伝子の検出

	頭数	病原体検出頭数					
		CAV-2	CPIV	Bb	CDV	CHV	CRCoV
単独感染	47	2	9	15	6	2	13
重複感染	16	2	9	13	5	1	6

成 績

呼吸器病罹患犬からの病原体遺伝子検出状況を図1および表2に示した。口腔あるいは鼻腔, 眼瞼スワブのうち少なくとも1試料からいずれかの病原体遺伝子が検出された個体は、供試犬 119 頭のうち 63 頭 (52.9%) であった。そのうち 47 頭からは1種類の病原体遺伝子が、16 頭からは2種または3種の病原体遺伝子が検出された (図1)。1種類の病原体遺伝子が検出された47頭のうち、最も検出頻度が高かったのは Bb で 15 頭, 次いで CRCoV が 13 頭, CPIV が 9 頭検出された。複数の病原

国内における犬呼吸器感染症の病原学的調査

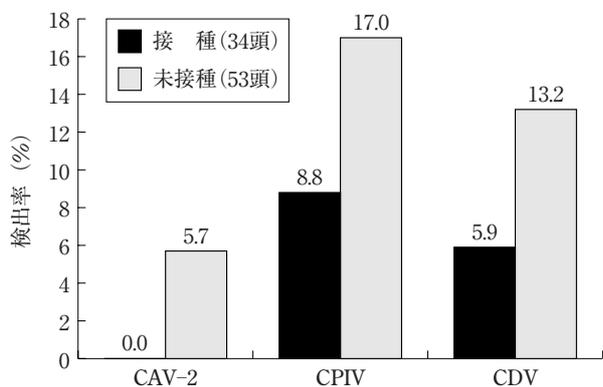


図2 ワクチン接種犬および未接種犬からのCAV-2とCPIV, CDVの検出

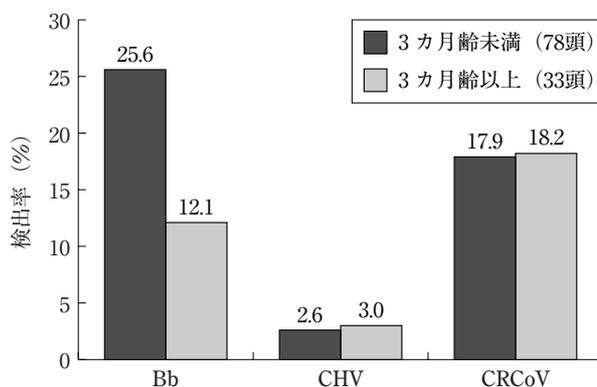


図3 月齢別のBbとCHV, CRCoVの検出率

体遺伝子が検出された症例も同様な傾向を示し、Bbが13頭と最も多く、次いでCPIVが9頭、CRCoVが6頭検出された(表2)。2種検出された症例のうち、最も多かった組合せはBbとCPIVで4頭、次にBbとCRCoVの3頭が多かった。また、3種検出された症例は、CPIV, CRCoV, CDVとBb, CPIV, CRCoVとBb, CRCoV, CHVの組合せであった。

検査材料別の病原体遺伝子の検出状況を表3に示した。BbとCAV-2, CRCoVは口腔および鼻腔スワブから同じような頻度で検出されたが、眼瞼スワブから検出された例はなかった。いっぽう、CPIVとCDVはいずれの試料からも検出されたが、CPIVは鼻腔スワブからの検出頻度が最も高かった。

CAV-2およびCPIV, CDVを含む多種混合生ワクチン接種犬と未接種犬からの各病原体遺伝子の検出状況を比較し、結果を図2に示した。CPIVおよびCDVとも未接種犬に比べ、ワクチン接種犬からの検出率が低い傾向にあった。しかしながら、統計学的有意差は認められなかった。いっぽう、CAV-2は未接種犬の3頭から検出されたが、接種犬からCAV-2が検出された例はなかった。

国内でワクチンが使用されていないBbとCHV, CRCoVの3カ月齢を境にした検出率を図3に示した。CHVとCRCoVの検出率は月齢に関係なくほぼ同一であった。Bbは3カ月齢以上の犬よりも3カ月齢未満の犬で検出率が高い傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった。

考 察

CIRD罹患犬119頭を検査したところ、Bbが検出された犬が28頭と最も多く、次いでCRCoV, CPIVの順であった。今回の調査では口腔、鼻腔、眼瞼スワブを検査材料としたが、CDV以外の病原体の検出率は検査材料によって異なり、特にCPIVは鼻腔から顕著に検出された(表3)。すべての検体を収集することができれば

表3 検査材料別の病原体遺伝子の検出状況

採材部位	検体数	病原体検出数 (%)					
		CAV-2	CPIV	Bb	CDV	CHV	CRCoV
口腔	100	3 (3.0)	5 (5.0)	18 (18.0)	6 (6.0)	2 (2.0)	14 (14.0)
鼻腔	82	2 (2.4)	14 (17.1)	19 (23.2)	7 (8.5)	1 (1.2)	12 (14.6)
眼	37	0	2 (5.4)	0	3 (8.1)	3 (8.1)	0

CPIVの検出率はさらに増加するものと考えられる。したがってこれらの成績は、CIRDの診断には複数の検査材料を用いることが望ましいことを示している。

今までの血清学的および病原学的調査で報告されたように [17, 18], 今回の調査でもBbとCPIVが多く検出され、これらの病原体が国内の犬の間に広く浸潤し、CIRDの主要な原因となっていることが推定される。特にBbは重複感染例の80%以上を占めており、他の病原体の感染を誘発する可能性が示唆される。しかし、Bbが単独に検出された15頭と重複感染犬13頭の間に大差がなかったことから(表2)、複合感染におけるBbの果たす役割については明らかにすることができず、今後検討する必要がある。

今回の調査では、近年CIRDとの関係が注目されるようになったCRCoV [11-13] も19頭から検出された。Somaら [12] は国内飼育犬の血清学的調査でCIRD罹患犬の47.8%からCRCoV抗体が検出されたことを報告している。今回の調査結果はそれらの結果を支持し、CRCoVも国内に広く分布し、CIRDの一因となっていることを示すものである。

ワクチン接種犬からのCAV-2とCPIV, CDVの検出率は未接種犬に比べ低い傾向にあり、ワクチンの効果が推定される。特にワクチン接種犬からCAV-2が検出された例はなかった。いっぽう、ワクチン未接種犬に比べ検出率は低いものの、CPIVとCDVはワクチン接種犬

からも検出された。Erlesら [5] もワクチン接種犬の19.4%の気管, 10.4%の肺からCPIVが検出されたことを報告している。今回の調査対象犬のワクチン接種からCIRD発病までの明確な期間, 臨床症状の程度, 発病時の血清抗体価などは不明であるが, CPIVとCDVが検出された犬では, 同ウイルスに対する免疫効果が低下していた可能性も考えられる。

一般にCIRDは幼若犬で重篤化することが知られている [2]。今回の調査でも, Bbの検出率は3カ月齢未満の犬で高かった。幼若犬はBbに対し高い感受性を示し, 同菌の感染によりCIRDの重篤化する危険性が危惧される。

複数の病原体の重複感染は, CIRDの病態に複雑化と重篤化を招くことが知られている [1-2]。今回の調査でも16頭に重複感染が認められた。今回の調査で口腔, 鼻腔, 眼瞼スワブのすべてを検査した犬は19頭に過ぎなかったことから, 実際の重複感染犬はさらに多いものと思われる。しかし, 臨床症状の内容と程度, 検出された病原体の種類との関係を明らかにすることができず, 病態と病原体の種類および重複感染については今後の検討課題として残された。いっぽう, CIRD罹患犬119頭のうち56頭からは検査したいずれの病原体も検出されなかった。CIRDの予防と治療法を改善するためには, 今回は検査対象としなかったレオウイルス, 犬インフルエンザウイルス, ストレプトコッカスやパストツレラ, シュードモナス属菌, マイコプラズマなどを含め, CIRDの発生に関与する病原体の実態を明らかにすることが重要である。

引用文献

- [1] Azetaka M, Konishi S : Kennel Cough Complex : Confirmation and Analysis of the Outbreak in Japan, *Jpn J Vet Sci*, 50, 851-858 (1988)
- [2] Buonavoglia C, Martella V : Canine respiratory viruses, *Vet Res*, 38, 355-373 (2007)
- [3] Takamura K, Ajiki M, Hiramatsu K, Takemitsu S, Nakai M, Sasaki N : Isolation and properties of adenovirus from canine respiratory tract, *Jpn J Vet Sci*, 42, 265-270 (1982)
- [4] Wright NG, Thompson H, Taylor D, Cornwell HJC : *Bordetella bronchiseptica* : a re-assessment of its role in canine respiratory disease, *Vet Rec*, 93, 486-487 (1973)
- [5] Erles K, Dubovi EJ, Brooks HW, Brownlie J : Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease, *J Clin Microbiol*, 42, 4524-4529 (2004)
- [6] Binn LN, Marchwicki RH, Keenan KP, Strano AJ, Engler WR : Recovery of reovirus type 2 from an immature dog with respiratory tract disease, *Am J Vet Res*, 38, 927-929 (1977)
- [7] Chalker VJ, Brooks HW, Brownlie J : The association of *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* with canine infectious respiratory disease, *Vet Microbiol*, 95, 149-156 (2003)
- [8] Angus JC, Jang SS, Hirsh DC : Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease : 264 cases, *J Am Vet Med Assoc*, 210, 55-58 (1997)
- [9] Chalker VJ, Owen WM, Paterson C, Barker E, Brooks H, Rycroft AN, Brownlie J : Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease, *Microbiology*, 150, 3491-3497 (2004)
- [10] Appeal MJ : Distemper pathogenesis in dogs, *J Am Vet Med Assoc*, 156, 1681-1684 (1970)
- [11] Erles K, Toomey C, Brooks HW, Brownlie J : Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease, *Virology* 310, 216-223 (2003)
- [12] Soma T, Ishii H, Miyata K, Hara M : Prevalence of antibodies to canine respiratory coronavirus in some dog populations in Japan, *Vet Rec*, 163, 368-369 (2008)
- [13] Yachi A, Mochizuki M : Survey of dogs in Japan for group 2 canine coronavirus infection, *J Clin Microbiol*, 44, 2615-2618 (2006)
- [14] Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EPJ, Chen L, Smith C, Hill RC, Ferro P, Pompey J, Bright RA, Media M-J, Johnson CM, Olsen CW, Cox NJ, Klimov AI, Katz JM, Donis RO : Transmission of equine influenza virus to dogs, *Science*, 310, 482-485 (2005)
- [15] Hu RL, Huang G, Qiu W, Zhong ZH, Xia XZ, Yin Z : Detection and Differentiation of CAV-1 and CAV-2 by Polymerase Chain Reaction, *Vet Res Commun*, 25, 77-84 (2001)
- [16] Hozbor D, Fouque F, Guiso N : Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction, *Res Microbiol*, 150, 333-341 (1999)
- [17] 堀籠 茂, 福安嗣昭, 小方宗次, 芦田浄美 : 犬における *Bordetella bronchiseptica* 抗体保有状況, *日獣会誌*, 48, 113-115 (1995)
- [18] Mochizuki M, Yachi A, Ohshima T, Ohuchi A, Ishida T : Etiologic Study of Upper Respiratory Infections of Household Dogs, *J Vet Med Sci*, 70, 563-569 (2008)

Etiological Investigation of Canine Infectious Respiratory Disease in Japan

Go SEHATA^{*†}, Akira WAKATSUKI, Katsuo MASUBUCHI, Takuo TAKAHASHI
and Teruaki KOKUBU

** Kyoto Biken Laboratories, Inc., 24-16 Makishima-cho, Uji-shi, Kyoto, 611-0041, Japan*

SUMMARY

The oral, nasal, and ocular swabs collected from 119 dogs suffering from canine infectious respiratory disease (CIRD) were tested for canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza virus (CPIV), canine distemper virus (CDV), canine herpes virus (CHV), canine respiratory coronavirus (CRCoV) and *Bordetella bronchiseptica* (Bb) genes using a polymerase chain reaction method. The most prominent pathogen detected in 47 dogs positive for a single pathogen was Bb, followed by CRCoV, CPIV, CDV, CAV-2 and CHV in 15, 13, 9, 6, 2 and 2 dogs, respectively. Similarly, Bb, CPIV and CRCoV were more common in 16 dogs of mixed infection, and were detected in 13, 9 and 6 dogs, respectively. These results appear to suggest that Bb, CPIV and CRCoV are major pathogens for CIRD, and concomitant infection with Bb and other pathogens exacerbates the disease. In addition, CPIV, CAV-2 and CDV were apt to be detected less frequently in dogs administered previously with the multivalent live vaccine including those viruses, compared to those unvaccinated, indicating that the vaccination was effective for preventing infections in dogs.

— Key words : *Bordetella bronchiseptica*, canine respiratory coronavirus, Japan, kennel cough, respiratory disease.

† Correspondence to : Go SEHATA (Kyoto Biken Laboratories, Inc.)

24-16 Makishima-cho, Uji-shi, Kyoto, 611-0041, Japan

TEL 0774-22-4518 FAX 0774-24-1407 E-mail : caninefeline@kyotobiken.co.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 538 ~ 542 (2010)