

下痢を呈する若齢犬における犬コロナウイルス及び 犬パルボウイルスの検出状況

家村龍司[†] 塚谷律子 野中淳子 川村佳代子 梅村美知乃

(株)インターベット中央研究所 (〒300-0134 かすみがうら市深谷1103)

(2012年6月20日受付・2012年9月10日受理)

要 約

2007年から2010年の間に国内において下痢の症状が認められた12週齢以下の犬149症例の便または腸管を検体とし、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を用いて犬コロナウイルス(CCoV)及び犬パルボウイルス2型(CPV-2)の検出状況を調査した結果、CCoV及びCPV-2の検出率はそれぞれ46.3%及び38.3%であった。CCoV陽性検体のうち、CCoV Iの検出率が年々増加傾向にあるものの、CCoV IIaの検出率に変化はなく、いまだに最も高い検出率であった(75.4%)。CPV-2陽性検体のうち、CPV-2bの検出率が最も高く(93.0%)、CPV-2cは検出されなかった。全検体の12.1%においてCCoV及びCPV-2が同時に検出された。また、検出数が最も多かったのは、7週齢の犬の検体からであった。——キーワード：犬コロナウイルス、犬パルボウイルス、若齢犬。

----- 日獣会誌 66, 61~64 (2013)

犬コロナウイルス(CCoV)及び犬パルボウイルス2型(CPV-2)は、犬の腸炎の主要原因ウイルスとしてよく知られている。CCoVは、アルファコロナウイルス1に属す1本鎖RNAウイルスであり、若齢犬において軽度から中程度の腸炎を引き起こす原因ウイルスである[1, 2]。本ウイルスの感染率は非常に高いものの、CCoV単独感染での死亡率は低く、症状は比較的速やかに回復することから臨床的にそれほど重要視されていない。しかしながら、下痢などの臨床症状の回復後も長期にわたり感染犬よりウイルスが持続的に排泄されることから、多頭飼育施設などでの本ウイルスの蔓延が問題となる[3]。また、CPV-2との混合感染により症状が重度化することが報告されており、CPV-2感染症とともに重要なウイルス性下痢症の原因であると考えられる[4, 5]。CCoVは、その遺伝子型より従来型のCCoVタイプをCCoV II、イタリアで新しく分離された型をCCoV Iとして分類されている[1]。さらに、伝染性胃腸炎ウイルス(TGE)様のCCoV IIがさまざまな国で分離されており、CCoV IIはさらにCCoV IIa(従来型CCoV II)及びCCoV IIb(TGE様CCoV II)に分類されている[6]。これら遺伝子変異株は、日本においてもすでに検出されている[7]。

CPV-2は、1本鎖DNAウイルスであり、本ウイルスが犬に感染した場合、症状は急性でかつ重度であり、死亡することもある[8, 9]。また、若齢犬において、CPV-2感染が致死的となることが多い。現在、従来型のCPV-2のほぼすべては抗原性状の異なるCPV-2a及びCPV-2bとして伝播している[10]。さらに、新たな変異株としてCPV-2cが多くの国で検出されているが、今のところ国内で検出されたという報告はない[11, 12]。

本調査では、下痢を呈する若齢犬からのCCoV及びCPV-2の検出状況を調査するとともに、国内で流行しているCCoVの遺伝子型及びCPV-2の抗原型を確認した。また、それらウイルスの発生状況を検体由来犬の週齢別にとりまとめ、若齢犬における感染症リスク週齢の詳細を検討した。

材料及び方法

検体：2007年から2010年に下痢を呈して動物病院に来院、または死亡した12週齢以下の犬149頭を対象とした。それら犬の下痢便または死亡症例の場合は剖検後の腸管を検体とした。検体は、国内33県より無作為に収集されたものであり、年齢は13日齢から83日齢であ

[†] 連絡責任者：家村龍司 (株)インターベット中央研究所)

〒300-0134 かすみがうら市深谷1103

☎029-898-3211 FAX 029-898-3214

E-mail : ryuji.iemura@merck.com

表1 CCoV の検出状況

年	CCoV ^{a)} (%)	CCoV I ^{b)} (%)	CCoV II			混合感染		
			小計 ^{b)} (%)	CCoV IIa ^{b)} (%)	CCoV IIb ^{b)} (%)	CCoV I+IIa ^{b)} (%)	CCoV I+IIb ^{b)}	CCoV IIa+IIb ^{b)}
2007 (n=40)	19 (47.5)	5 (26.3)	16 (84.2)	16 (84.2)	0	2 (10.5)	0	0
2008 (n=34)	16 (47.1)	7 (43.8)	11 (68.8)	11 (68.8)	0	2 (12.5)	0	0
2009 (n=41)	15 (36.6)	8 (53.3)	13 (86.7)	11 (73.3)	2 (13.3)	6 (40.0)	0	0
2010 (n=34)	19 (55.9)	12 (63.2)	16 (84.2)	14 (73.7)	2 (10.5)	9 (47.4)	0	0
合計 (n=149)	69 (46.3)	32 (46.4)	56 (81.2)	52 (75.4)	4 (5.8)	19 (27.5)	0	0

a) CCoV 陽性数 (陽性率%; CCoV 陽性数/n×100)

b) 陽性数 (陽性率%; 陽性数/CCoV 陽性数×100)

った (第1四分位点; 42日齢, 中央値; 49日齢, 第3四分位点; 62日齢). 本調査の目的は, 若齢犬における発生状況及び感染リスクの年齢分布を調査することであるため, 検体は12週齢以下の犬由来のものに限定した. 便検体または滅菌乳鉢と乳棒で摩砕した腸管を培地 (イーグル MEM 培地, 日水製薬(株), 東京) を用いて10% 乳剤を作製し, さらに0.45µm のフィルターでろ過したものをウイルス検出用及び遺伝子型または抗原型同定用の材料とした.

国内のブリーダーは, 一般的に CPV-2, 犬ジステンパーウイルス (CDV), 犬アデノウイルス 2 型 (CAV2), 犬パラインフルエンザウイルス (CPiV) 及びレプトスピラを含む市販の混合ワクチンを接種しており, 本調査で組み込んだ症例の91.9%において検体の採取時にそれらのワクチン接種が開始されていた. 残りの8.1%の症例はワクチン未接種であった. いずれの対象犬も CPV-2a, CPV-2b 及び CPV-2c 並びに CCoV のウイルスを含む生ワクチンは接種されていない.

すべての検体は, 検体採取後に冷蔵 (2~5℃) で(株) インターベット中央研究所に輸送し, 採取後3日以内にウイルスの検出を行った. なお, ウイルスの遺伝子型または抗原型の同定は随時実施した.

CCoV の検出及び遺伝子型の同定法: 総 RNA の抽出は, 市販キット (QIAamp RNeasy Mini Kit, (株)キアゲン, 東京) を用い, 取り扱い説明書に従って行った. cDNA 合成は, 逆転写酵素 (Superscript II MuLV reverse transcriptase, ライフテクノロジーズジャパン(株), 東京) を用い, 取り扱い説明書に従って行った. CCoV の検出は, プライマー CCV1, CCV2 及び CCV3 を用い, Pratelliら [13] の方法に従って検出した. また, 遺伝子型の同定は Erles 及び Brownlie の方法に従い, プライマーペア CEPol-1/CESP-10, CEPol-1/CESP-6 及び CEPol-1/TGSP-2 をそれぞれ CCoV I, CCoV IIa 及び CCoV IIb の同定に用いた [14].

CPV-2 の検出及び抗原型の同定法: CPV-2 の検出は, プライマーペア FY3/Ry1 を用い, Sendaら [15] の方法に従って行った. また, CPV-2 の遺伝子型の同

表2 CPV-2 の検出状況

年	CPV-2 (2aと2b) ^{a)}	CPV-2a ^{b)}	CPV-2b ^{b)}
2007 (n=40)	16 (40.0)	2 (12.5)	14 (87.5)
2008 (n=34)	12 (35.3)	1 (8.3)	11 (91.7)
2009 (n=41)	19 (46.3)	0	19 (100.0)
2010 (n=34)	10 (29.4)	1 (10.0)	9 (90.0)
合計 (n=149)	57 (38.3)	4 (7.0)	53 (93.0)

a) CPV-2 (2aと2b) 陽性数

(陽性率%; CPV-2 陽性数/n×100)

b) 陽性数

[陽性率%; 陽性数/CPV-2(2aと2b)陽性数×100]

定は, プライマーペア 51/R3 を用いて VP2 遺伝子を増幅後, インナープライマー F1, F2, R1 及び R2 を用いて得られた PCR 産物の塩基配列を決定し [16], 既知の VP2 遺伝子塩基配列の変異箇所をもとに塩基配列から抗原型を推定した [17].

成 績

ウイルスの検出率及び同定: 供試検体からの CCoV 及び CPV-2 の検出率は, それぞれ 46.3% 及び 38.3% であり (表1 及び表2), CCoV 及び CPV-2 が同時に検出されたのは 12.1% であった (表3). CCoV 陽性検体のうち, CCoV I, CCoV IIa 及び CCoV IIb はそれぞれ 46.4%, 75.4% 及び 5.8% であり, CCoV I 及び CCoV II が同時に検出された検体は 2009 年及び 2010 年の検体では 40% を超えていた (表1).

CPV-2 陽性検体のうち, CPV-2a 及び CPV-2b はそれぞれ 7.0% 及び 93.0% であり, CPV-2c は検出されなかった (表2).

CCoV 及び CPV-2 が同時に検出された検体において, CCoV IIa 及び CPV-2b の組み合わせが 94.4%, CCoV I 及び CPV-2b の組み合わせが 5.6% であった (表3).

陽性検体の年齢分布: 検体由来の犬の週齢別に CCoV または CPV-2 陽性状況を比較したところ, CCoV または CPV-2 陽性犬の 75% 以上が 6 から 8 週齢であった (表4). また, 週齢別の CCoV 及び CPV-2 陽性数の分

表3 CCoVとCPV-2混合感染の検出状況

年	CCoV+CPV-2 ^{a)}	CCoV I+CPV-2a ^{b)}	CCoV I+CPV-2b ^{b)}	CCoV II a+CPV-2a ^{b)}	CCoV II a+CPV-2b ^{b)}
2007 (n=40)	6 (15.0)	0	0	0	6 (100.0)
2008 (n=34)	5 (14.7)	0	0	0	5 (100.0)
2009 (n=41)	4 (9.8)	0	1 (25.0)	0	3 (75.0)
2010 (n=34)	3 (8.8)	0	0	0	3 (100.0)
合計 (n=149)	18 (12.1)	0	1 (5.6)	0	17 (94.4)

a) CCoV及びCPV-2(2aと2b)の同時陽性数(陽性率%; 同時陽性数/n×100)

b) 陽性数[陽性率%; 陽性数/CCoV及びCPV-2(2aと2b)の同時陽性数×100]

表4 週齢別CCoV及びCPV-2の検出状況

週 齢	CCoV	CPV-2
≤4 (n=8)	6 (75.0)	1 (12.5)
5 (n=9)	5 (55.6)	1 (11.1)
6 (n=26)	19 (73.1)	7 (26.9)
7 (n=38)	22 (57.9)	20 (52.6)
8 (n=33)	12 (36.4)	18 (54.5)
9≤ (n=35)	5 (14.3)	10 (28.6)

検出数(検出率:%)

布には有意差が認められた(Mann-WhitneyのU検定: $P < 0.05$).

考 察

本調査でのCCoVの検出状況は、すでに報告されている日本における検出状況と同程度であった[7]. 現在、CCoV II aを成分とする多くの不活化ワクチンが市販されているが、CCoV II aのみでの免疫ではCCoV IのみならずCCoV II bに対してもその有効性は低いとされている[5, 18]. 実際、本調査の結果からもCCoV Iは年々増加傾向にあると考えられるが、興味深いことに、CCoV IIの検出率は低下していない。また、CCoV Iは単独でもCCoV陽性検体の46.4%を占めるにもかかわらず、CPV-2と同時に検出されたCCoVの94.4%がCCoV II aであった。したがって、今後もウイルスのモニタリングを行い、これらの傾向を確認する必要があると考えられる。

CCoV及びCPV-2の75%以上が6から8週齢の犬由来の検体であった。この時期は、国内の子犬の流通過程においてブリーダーから子犬が動物病院やペットショップなどに集められる時期と一致している。また、本調査における陽性犬の年齢分布から、CCoVの感染がCPV-2の感染よりも早期に起こっていることを示している。一般的に、犬の新生子は胎盤及び乳汁を経て母親からの移行抗体により微生物の感染から防御している[19]. したがって、子犬がワクチン接種により免疫を獲得するまでの間の微生物に対する防御及び子犬における移行抗体持続期間は、母犬の抗体価レベルに依存するところが大きいと考えられる。国内では、一般的にブリー

ダーは毎年混合ワクチンの接種(CPV-2成分を含む)を行っているが、コスト面などからも多くはCCoV成分を含まないワクチンを接種している。したがって、母犬の抗体価レベルとその子犬における移行抗体による防御及びその持続期間を調査することはワクチンの接種時期を考慮するうえでも重要であり、今後の課題であると考えられる。

現在市販されているCCoVに対するワクチンは、ウイルスの排泄を抑制することはできないものの、CCoV感染による臨床症状の軽減を目的として使用されている。しかし、われわれの調査結果では6及び7週齢の犬においてCCoVの発生が最も多く、ワクチン接種後の免疫出現時期を考慮した場合、CCoVに対するワクチンを4週齢時に接種した場合でもその有効性には疑問が残る。

われわれのCCoV及びCPV-2の週齢別発生状況の分布調査成績は、不活化ワクチンのみならず、生ワクチンの適切な接種プログラムを作成するうえで非常に重要であると考えられる。また、野外におけるウイルスのモニタリングを続けることは、新たな遺伝子型及び抗原型の出現及びその傾向のみならず、新たなワクチンの開発にもつながるものであると考える。

引用文献

- [1] Decaro N, Buonavoglia C: An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathology, *Vet Microbiol*, 132, 221-234 (2008)
- [2] Tennant BJ, Gaskell RM, Kelly DF, Carter SD, Gaskell CJ: Canine coronavirus infection in the dog following oronasal inoculation, *Res Vet Sci*, 51, 11-18 (1991)
- [3] Pratelli A, Elia G, Martella V, Tinelli A, Decaro N, Marsilio F, Buonavoglia D, Tempesta M, Buonavoglia C: M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs, *Vet Rec*, 151, 758-761 (2002)
- [4] Pratelli A, Tempesta M, Roperto FP, Sagazio P, Carmichael L, Buonavoglia C: Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection, *J Vet Diagn Invest*, 11, 550-553 (1999)
- [5] Pratelli A: Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis, *Vet Res*, 37, 191-200 (2006)

- [6] Decaro N, Mari V, Elia G, Addie DD, Camero M, Lucente MS, Martella V, Buonavoglia C : Recombinant canine coronaviruses in dogs, *Europe Emerg Infect Dis*, 16, 41–47 (2010)
- [7] Soma T, Ohinata T, Ishii H, Takahashi T, Taharaguchi S, Hara M : Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrhea dogs in Japan, *Res Vet Sci*, 90, 205–207 (2011)
- [8] Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC : High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 379–384 (2005)
- [9] Truyen U, Steinel A, Bruckner L, Lutz H, Möstl K : Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany, *Schweiz Arch Tierheilkd*, 142, 115–119 (2000)
- [10] Buonavoglia D, Cavalli A, Pratelli A, Martella V, Greco G, Tempesta M, Buonavoglia C : Antigenic analysis of canine parvovirus strain isolated in Italy, *New Microbiol*, 23, 93–96 (2000)
- [11] Gamoh K, Senda M, Shimazaki Y, Makie H, Inoue Y, Itoh O : Chronological antigenic survey of canine parvovirus in Japan, *Vet Rec*, 152, 142–143 (2003)
- [12] Ohshima T, Hisaka M, Kawakami K, Kishi M, Tohya Y, Mochizuki M : Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolated in Japan, *J Vet Med Sci*, 70, 769–775 (2008)
- [13] Pratelli A, Tempesta M, Greco G, Martella V, Buonavoglia C : Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus, *J Virol Methods*, 80, 11–15 (1999)
- [14] Erles K, Brownlie J : Sequence analysis of divergent canine coronavirus strains present in a UK dog population, *Virus Res*, 141, 21–25 (2009)
- [15] Senda M, Parrish CR, Harasawa R, Gamoh K, Muramatsu M, Hirayama N, Itoh O : Detection by PCR of wild-Type canine parvovirus which contaminates dog vaccines, *J Clin Microbiol*, 33, 110–113 (1995)
- [16] Hirayama K, Kano R, Hosokawa-Kanai T, Tuchiya K, Tsuyama S, Nakamura Y, Sasaki Y, Hasegawa A : VP2 gene of a canine parvovirus isolate from stool of a puppy, *J Vet Med Sci*, 67, 139–143 (2005)
- [17] Truyen U : Evolution of canine parvovirus—A need for new vaccines?, *Vet Microbiol*, 117, 9–13 (2006)
- [18] Decaro N, Elia G, Martella V, Campolo M, Mari V, Desario C, Lucente MS, Lorusso E, Kanellos T, Gibbons RH, Buonavoglia C : Immunity after natural exposure to enteric canine coronavirus does not provide complete protection against infection with the new pantropic CB/05 strain, *Vaccine*, 28, 724–729 (2010)
- [19] Day MJ : Immune system development in the dog and cat, *J Comp Pathol*, 137, S10–S15 (2007)

Prevalence of Canine Coronavirus and Canine Parvovirus Infection in Diarrheic Puppies

Ryuji IEMURA^{*†}, Ritsuko TSUKATANI, Junko NONAKA, Kayoko KAWAMURA and Michino UMEMURA

** Intervet K. K. Central Research Laboratories, 1103 Fukaya, Kasumigaura-shi, 300-0134, Japan*

SUMMARY

Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect canine coronavirus (CCoV) and type 2 canine parvovirus (CPV-2) infections in 149 clinical samples from diarrheic puppies under 12 weeks of age, collected in Japan between 2007 and 2010. The results revealed that 46.3% and 38.3% of samples were positive for CCoV and CPV-2, respectively. The prevalence of CCoV I among CCoV variants appears to be increasing annually, however, that of CCoV II remains unchanged and is most prevalent (75.4%). CPV-2b was most prevalent among CPV-2 variants (93.0%) and CPV-2c was undetected. Concurrent infection with CCoV and CPV-2 was detected in 12.1% of samples. The peak incidence of CCoV and CPV-2 infection was at 7 weeks of age.

— Key words : Canine Coronavirus, Canine Parvovirus, Young Puppy.

† Correspondence to : Ryuji IEMURA (*Intervet K. K. Central Research Laboratories*)

1103 Fukaya, Kasumigaura-shi, 300-0134, Japan

TEL 029-898-3211 FAX 029-898-3214 E-mail : ryuji.iemura@merck.com

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 61 ~ 64 (2013)