

## 新規アデノウイルスによるカリフォルニアアシカの 急性肝炎の2例

近藤圭佑<sup>1)†</sup> 下田 宙<sup>2)</sup> 櫻井 優<sup>2)</sup> 前田 健<sup>2)</sup>

1) 海の中道海洋生態科学館 (〒811-0321 福岡市東区西戸崎18-28)

2) 山口大学共同獣医学部 (〒753-8515 山口市吉田1677-1)

(2018年6月27日受付・2018年8月10日受理)

### 要 約

アデノウイルスは、鰭脚類において重度の肝炎を起こす病原体であり、本邦でも過去に水族館において発症の報告例がある。今回、カリフォルニアアシカ2頭において急性肝炎の発症がみられ、精査したところ新規アデノウイルスの感染であることが示された。治療経過より、早期の治療開始により回復すること、及び症状が消失した後でも持続的なウイルスの感染がみられたため、衛生管理に注意が必要であることが示唆された。

——キーワード：アデノウイルス、カリフォルニアアシカ、PCR、ウイルス性肝炎。

-----日獣会誌 72, 49～53 (2019)

アデノウイルスは、消毒薬に比較的抵抗性の2本鎖直鎖状DNAウイルスで、多くの動物から分離されている。鯨類ではイワシクジラ (*Balaenoptera borealis*) [1]、ベルーガ (*Delphinapterus leucas*) [2]、ホッキョククジラ (*Balaena mysticetus*) [3] から検出されているが、その病原性などは明らかになっていない。鰭脚類のアデノウイルス感染症もいくつかの報告があり、カリフォルニアアシカ (*Zalophus californianus*)、ミナミアメリカオットセイ (*Arctocephalus pusillus*)、オタリア (*Otaria flavescens*) で致死的な急性肝炎を引き起こすことが知られている [4-7]。今回、カリフォルニアアシカにおける急性肝炎の発症が2例あり、精査したところ新型のアデノウイルスが検出されたので、これを報告する。

### 症 例 1

**症例：**カリフォルニアアシカ、3歳、雌、体重56.6kg (死亡時)

**既往歴：**2014年6月に当施設において出生後、特記すべき事項なし

**現病歴：**2018年1月6日朝より食欲不振、元気消失を呈し、同日夕方から食欲廃絶となった。その後も状態の改善がみられなかったため、1月8日に無麻酔保定下に

て検査を実施した。

**検査所見：**体温39.5℃。意識清明。結膜や口腔粘膜に黄疸等の病的変化はみられなかった。血液検査ではGOT >10,000U/l, GPT 2,991U/l, LDH >9,000U/l, ALP 253U/l, GGT 93U/lと高値を認めた。T-bilも1.6mg/dlと高値であったが、重度溶血のため参考値扱いとした。これら数値より、急性肝炎と診断した。表1に血液検査所見を示す。

**治療経過：**第1病日は消化管障害と仮診断し、採血直後に乳酸リンゲル液500mlにチアミン・ニコチン酸アミド配合剤注射液、チアミン塩化物塩酸塩・B<sub>6</sub>・B<sub>12</sub>配合剤注射液各2mlを混合したもの、ラニチジン50mg、メトクロプラミド10mgを皮下投与した。また、解熱のためにメロキシカム12mgを皮下投与、エンピリック治療としてエンロフロキサシン300mgを筋肉内注射にて投与した。急性肝炎と診断した第2病日以降は、酢酸リンゲル液1,000mlにチアミン・ニコチン酸アミド配合剤注射液、チアミン塩化物塩酸塩・B<sub>6</sub>・B<sub>12</sub>配合剤注射液各2mlを混合したもの、ラニチジン50mg、メトクロプラミド10mgを皮下投与し、エンロフロキサシン300mg、ウルソデオキシコール酸60mg、グルタチオン200mgを筋肉内注射にて投与した。第2病日には飼育施設内を動き回る様子が観察されたが、第3病日の

† 連絡責任者：近藤圭佑 (海の中道海洋生態科学館展示部)

表1 症例1, 第1病日の生化学検査結果

CBC			
WBC	3,600 / $\mu$ l	RBC	492 万/ $\mu$ l
Stab	2 %	Hb	18.8 g/dl
Seg	71 %	Plt	1.1 万/ $\mu$ l
Lym	12 %		
Mon	10 %		
Eos	5 %		
Baso	0 %		
生化学			
TP	6.7 g/dl	Glu	105 mg/dl
Alb	3.4 g/dl	T-Cho	219 mg/dl
CPK	372 U/l	TG	77 mg/dl
GOT	>10,000 U/l	BUN	13.2 mg/dl
GPT	2,991 U/l	Cre	0.6 mg/dl
LDH	>9,000 U/l	Na	141 mEq/l
ALP	253 U/l	K	3.5 mEq/l
GGT	93 U/l	Cl	103 mEq/l
NH <sub>3</sub>	73 $\mu$ g/dl	Ca	8.2 mg/dl
T-bil	1.6 mg/dl	IP	5.9 mg/dl

夕方より急激に一般状態が悪化し、人への反応も悪くなるなど意識レベルの低下がみられた。第4病日は朝からぐったりと寝ている状態で、時折振戦が確認され、午後死亡が確認された。

**病理所見：**小腸近位部の黒変がみられ、胃内に黒褐色の粘液が少量貯留していた。また、胃の漿膜面や肝臓などが黄疸を示した。肝臓では全葉においてマクロファージ、リンパ球を中心とする炎症細胞の軽度～中等度浸潤を伴う壊死巣が多巣状性にみられた。また、肝細胞及び血管内皮細胞において、ごくまれに好酸性核内封入体が観察された。脾臓では白脾髄の中等度の萎縮がみられるとともに、赤脾髄にはマクロファージ、リンパ球を中心とする多数の白血球の浸潤がみられた。図1及び2に肝臓の病理組織写真を示す。その他の臓器には著変はみられなかった。

**遺伝子検査：**肝臓及び血漿(第1, 4病日)を検体とし、アデノウイルス共通プライマー [8], 及びアシカアデノウイルス特異的プライマー [6] を用いて nested PCR あるいは PCR 検査を試みた。その結果、アデノウイルス共通プライマーを用いた検査において、第4病日の血漿より約 320bp のバンドが検出された。シークエンス解析を行ったところ、これまでにアシカで報告のない新規のアデノウイルスであることが確認された。シークエンス解析結果より本ウイルス特異的プライマー (アウタープライマー, フォワードプライマー, AdV1F [5'-CAG CGC CTT AAC TCA TCC AC-3'], リバースプライマー, AdV235R [5'-TTC ATT GGT CCA GCA GAG CC-3']; インナープライマー, フォワードプライマー, AdV21F [5'-ACC CAC GGG TAT GCC TTT A-3'],

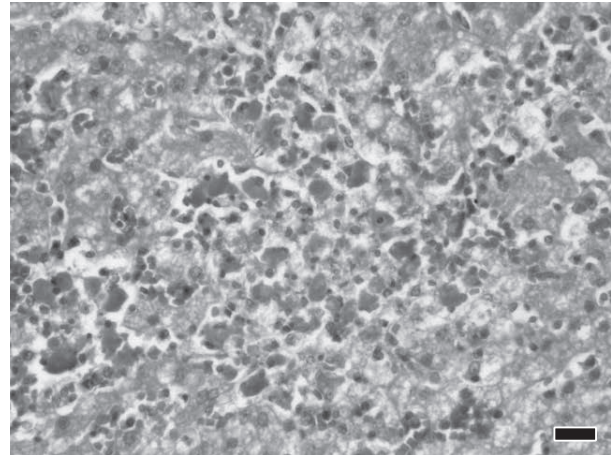


図1 肝臓全葉にみられた壊死巣  
炎症細胞の軽度～中等度の浸潤がみられる。  
(HE 染色 Bar=20 $\mu$ m)

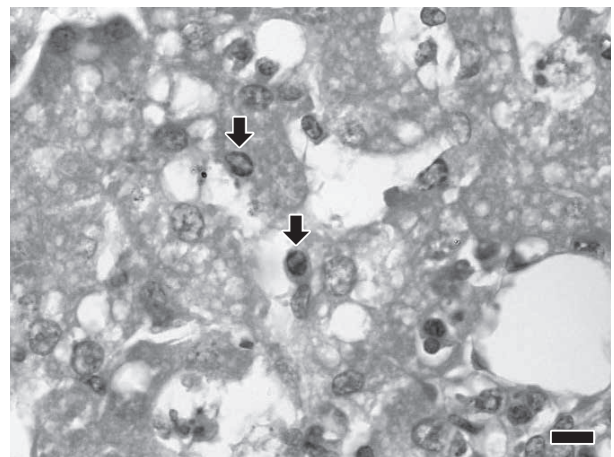


図2 肝臓壊死巣の拡大像  
好酸性核内封入体を有する細胞 (矢印).  
(HE 染色 Bar=10 $\mu$ m)

リバースプライマー, AdV208R [5'-TTT CCG GGA ACA AAA TGG CG-3']) を作製し、肝臓のホルマリン固定切片及び血漿 (第1, 4病日) を検体として再度 nested PCR 検査を行ったところ、第4病日の血漿及び肝臓のホルマリン固定切片から 188bp のバンドが検出された。

## 症 例 2

**症例：**カリフォルニアアシカ, 4歳, 雄, 体重 73.3kg (2018年1月23日時点)

**既往歴：**2013年6月に当施設において出生。2015年11月に金具片の誤飲があり、内視鏡により摘出。2016年1月に歯冠磨耗に起因する歯根膿瘍によると思われる下顎の腫脹があり、抗菌薬投与により治療。2018年1月7日より陰莖脱を呈していた。

**臨床経過：**2018年1月25日の昼頃より行動緩慢、食

表2 症例2, 第1病日の生化学検査結果

CBC			
WBC	2,500 / $\mu$ l	Hb	18.8 g/dl
RBC	492 万 / $\mu$ l	Plt	1.1 万 / $\mu$ l
生化学			
TP	7.4 g/dl	T-Cho	244 mg/dl
Alb	3.9 g/dl	TG	31 mg/dl
CPK	3,275 U/l	BUN	10.9 mg/dl
GOT	1,327 U/l	Cre	0.7 mg/dl
GPT	575 U/l	Na	144 mEq/l
LDH	4,150 U/l	K	4.1 mEq/l
ALP	125 U/l	Cl	104 mEq/l
GGT	154 U/l	Ca	8 mg/dl
T-bil	1.8 mg/dl	IP	6.2 mg/dl
Glu	130 mg/dl		

欲不振を呈した。1月26日は朝から食欲廃絶となったため、同日夕方に無麻酔保定下にて検査を行った。

**検査所見:** 体温 39.4℃。意識清明。結膜、口腔粘膜等に黄疸等の病的変化はみられなかった。血液検査では GOT 1,327U/l, GPT 575U/l, LDH 4,150U/l, GGT 154U/l と高値を示し、急性肝炎と診断した。T-bil も 1.8mg/dl と高値を示したが、重度溶血のため参考値扱いとした。また、白血球数 2,500/ $\mu$ l とやや低値を示した。表2にこの時の血液検査所見を示す。

**治療経過:** 第1病日より、酢酸リンゲル 1,000ml にチアミン・ニコチン酸アミド配合剤注射液、チアミン塩化物塩酸塩・B<sub>6</sub>・B<sub>12</sub> 配合剤注射液各 2ml を混合したもの、ラニチジン 50mg, メトクロプラミド 10mg を皮下投与した。また、解熱のためにメロキシカム 12mg を皮下投与し、肝庇護剤としてウルソデオキシコール酸 73mg, グルタチオン 200mg を筋肉内注射にて投与した。第2病日も体温 39.3℃の高熱が続いたため、メロキシカムを含め前日と同じ薬剤を投与したほか、グリチルリチン・グリシン・システイン配合剤注射液 40ml も皮下注射にて投与した。第3病日より体温 37.7℃と発熱が緩解したため、以降はメロキシカムを除いた第2病日と同じ薬剤を投与した。第6病日より食欲の回復がみられ、ウルソデオキシコール酸 (500mg×3回), グリチルリチン・グリシン・システイン配合剤 (2錠×3回), グルタチオン (100mg×3回) を経口投与に切り替えたほか、ラクトフェリン製剤 (1,000mg×1回) を追加した。酢酸リンゲルの皮下補液については、第6病日に 1,000ml, 第7病日に 500ml とし、第8病日以降はゼラチン 1,000ml の経口摂取による水分補給に変更し、皮下補液は中止した。その後良好に経過し、第33病日に血液検査を行ったところ、GOT 48U/l, GPT 51U/l と肝炎の鎮静化がみられた。一方、ALP 239U/l, GGT 349U/l とこれら数値は若干の高値を示したため、ウル

表3 症例2, 第33病日の生化学検査結果

CBC			
WBC	6,500 / $\mu$ l	RBC	467 万 / $\mu$ l
Stab	1 %	Hb	17.2 g/dl
Seg	59 %	Plt	17.6 万 / $\mu$ l
Lym	26 %		
Mon	12 %		
Eos	1 %		
Baso	1 %		
生化学			
TP	7.5 g/dl	T-Cho	195 mg/dl
Alb	3.5 g/dl	TG	66 mg/dl
CPK	1,017 U/l	BUN	51.1 mg/dl
GOT	48 U/l	Cre	0.4 mg/dl
GPT	51 U/l	Na	153 mEq/l
LDH	864 U/l	K	3.4 mEq/l
ALP	239 U/l	Cl	116 mEq/l
GGT	349 U/l	Ca	8.8 mg/dl
T-bil	1.8 mg/dl	IP	3.1 mg/dl
Glu	169 mg/dl		

ソデオキシコール酸の経口投与のみ継続し、その他の投薬は終了した。この時の血液検査所見を表3に示す。

**遺伝子検査:** 症例1の遺伝子検査より作製した新規アデノウイルス特異的プライマーを用い、血漿 (第1病日, 第33病日), 全血 (第77病日), 糞便 (第30病日, 第60病日), 及び口腔スワブ (第78病日) を検体として nested PCR 検査を行ったところ、第33病日以前の検体からはバンドが検出された。しかし、第60病日の糞便, 第77病日の全血, 第78病日の口腔スワブからは遺伝子は検出されなかった。

**系統解析:** これまで報告のあるアデノウイルスと本株の遺伝的系統解析を行ったところ、遺伝子バンクに報告のあるミナミアメリカオットセイから検出された undefined adenovirus と最も近縁であった (アミノ酸配列相同性 92%)。症例1及び症例2から検出されたアデノウイルスは塩基配列, アミノ酸配列ともに、100%一致した。作成した系統樹を図3に示す。今回解析したアデノウイルスの遺伝子情報は、GenBank/EMBL/DDBJ data base に登録した (アクセッション番号 Case1: LC390200, Case2: LC390201)。

**ウイルス分離:** 遺伝子が検出された検体よりネコ腎由来 CRFK 細胞 (JCRB 細胞バンク 9035) とイヌ腎由来 MDCK 細胞 (JCRB 細胞バンク 9029) を用いてウイルス分離を試みた。検体を細胞に接種後、5回盲継代を行った。細胞変性効果が認められなかったため、培養細胞上清より上述の新規アデノウイルス特異的プライマーを用いて、PCR を実施した。その結果、ウイルス分離陰性と判断した。

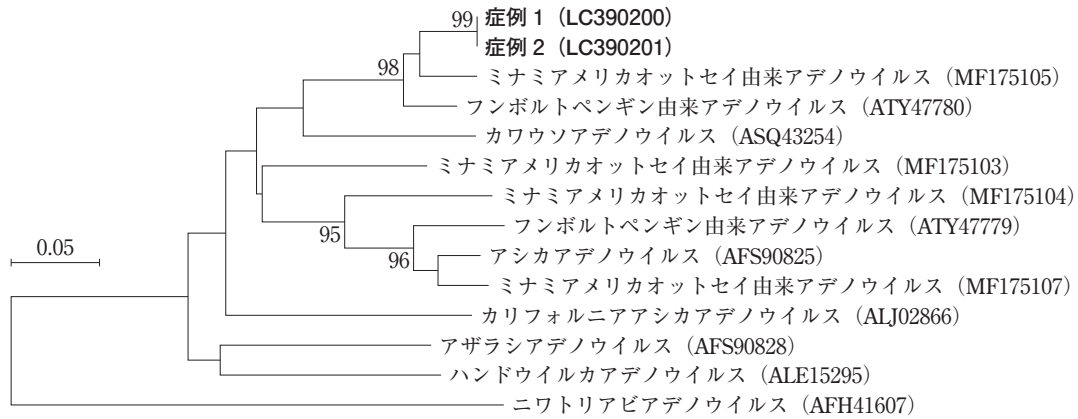


図3 検出されたアデノウイルスのポリメラーゼ遺伝子領域の系統樹

近隣結合法によりポリメラーゼ遺伝子のアミノ酸配列 (90 アミノ酸) を元に系統解析を実施した (1,000 回のブートストラップを行い, 80%以上の数値を系統樹上に示す). 今回検出されたウイルスは太字で示した. また, 既知のウイルスについてはそのアクセッション番号をカッコ内に示した. なお, 遺伝的距離 (サイト当たりの塩基期待置換数) をスケールバーで示した.

## 考 察

人ではB型肝炎, C型肝炎などのウイルス性肝炎では, インターフェロン療法や核酸アナログ製剤を用いた治療法があるが, 犬の伝染性肝炎のような, 動物のアデノウイルスによる肝炎では特異的な治療法は確立されていない. 今回, アシカでのアデノウイルス性肝炎症例を2例経験したが, 死亡例となった1例目では, 救命できた2例目よりも食欲不振を呈してから検査・治療を行うまでに時間を要し, 診断時にはかなり病態が進行した状態になっていた. 早期診断に基づく早期治療が, 本病の予後に非常に重要であると思われる.

臨床症状が消失してもなお, ウイルスの持続的な感染がみられた. このことは, 回復後の一定期間は他個体への感染源となる可能性があることを示しており, 持続的なモニタリングが必要であることを意味する. 今回, 第33病日の検体では本ウイルスの陽性反応があり, 第76病日以降の検体で陰転していることから, 少なくとも1か月以上はウイルスの排出がみられることが分かった. そのうえで, 今回糞便からもウイルスの検出に成功していることから, 血液だけでなく, 非侵襲的かつ簡便に採取できる材料でもモニタリングが可能であることは, 飼育管理上大変有意義である.

過去のカリフォルニアアシカのアデノウイルスの発症例では肝臓における多発性の壊死巣の形成がみられているが [5], 症例1においても同様の病変形成が確認された. 一方で, 過去の症例では好酸性核内封入体を持つ細胞が肝臓, 肺, リンパ節, 脾臓, 眼球などから検出されているが [6], 本症例では肝臓, 脾臓, 腎臓, 肺, 胃, 小腸のうち, 肝臓においてのみ, ごくわずかに確認された. また, 本邦で初めて確認されたアシカアデノウイルス

の感染例では, 初期症状として下痢が報告されているが [7], 今回の症例では下痢は確認されなかった. これらの違いがウイルスの違いによるものかどうかは, ウイルス学的知見のさらなる集積が必要である.

ウイルスの侵入経路として最も疑われるものは, 外部より新規に導入した個体からの水平感染である. 当館においては2015年1月に日本国内の他施設で生まれたカリフォルニアアシカを導入したのが鰭脚類の導入における直近の記録であるが, 移動前の飼育施設でのアシカの急性肝炎の発症がないこと, 導入の時期からかなりの時間が経過していること, さらには当施設において飼育しているすべてのカリフォルニアアシカ (11頭) とオタリア (2頭) の口腔内スワブを用いた nested PCR によるスクリーニング検査において陽性個体がなかったことから, この可能性は低いと思われる. その他の可能性として, 他種の生物からの感染が考えられる. 今回罹患した症例は, 屋外施設にて飼育されており, 鳥類など野生動物の往来がある環境下にある. これらの野生動物由来の病原体に感染したことは, 可能性の1つとして考えられる. ほとんどのアデノウイルスは種特異的な感染性を持つが, イヌアデノウイルス1型が多く動物を宿主とするように [9-11], 本ウイルスが他種にも感染性を持つことはあり得ることであろう. 一方, 症例2の隔離措置を行った際, 隔離施設でウイルスに汚染されたと考えられる水が2頭のゴマファザラシ飼育プールに流入していたが, この2頭のゴマファザラシは臨床症状を呈することはなかった. これは, 以前の報告とも合致するものである [7].

症例1と症例2から検出されたウイルスの塩基配列及びアミノ酸配列が100%一致したため, 症例1から症例2への水平伝播による感染が推測された. 特に, 症例2

の糞便からウイルス遺伝子が検出されていること、症例1と症例2は柵越しに隣り合った獣舎で飼育されており、症例1のプールの水が症例2の獣舎に流れ込むことにより、同ウイルスに暴露されたものと考えられる。水族館におけるアデノウイルス感染による急性肝炎を確認もしくは疑った場合には、汚染水が感染源となることを十分に理解し、早期に汚染水の消毒等の適切な対策を講じることが必要であろう。一般的に飼育水の処理工程では塩素による消毒が行われているが、アデノウイルスは塩素消毒に高い抵抗性を示し、プールでも不活化されないことが分かっている [12]。一方、オゾンによる消毒には感受性が高いことが示されている [13] ので、このような消毒システムの導入は本症の予防対策として検討の余地がある。

### 引用文献

- [1] Smith AW, Skilling DE : Virus and virus diseases of marine mammals, J Am Vet Med Assoc, 175, 918-920 (1979)
- [2] De Guise S, Lagacé A, Béland P, Girard C, Higgins R : Non-neoplastic lesions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) and other marine mammals from the St Lawrence Estuary, J Comp Pathol, 112, 257-271 (1995)
- [3] Smith AW, Skilling DE, Benirschke K, Albert TF, Barlough JE : Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*), J Wildlife Dis, 23, 92-98 (1987)
- [4] Britt JO Jr, Nagy AZ, Howard EB : Acute viral hepatitis in California sea lions, J Am Vet Med Assoc, 175, 921-923 (1979)
- [5] Dierauf LA, Lowenstine LJ, Jerome C : Viral Hepatitis (Adenovirus) in a California sea lion, J Am Vet Med Assoc, 179, 1194-1197 (1981)
- [6] Goldstein T, Colegrove KM, Hanson M, Gulland FMD : Isolation of a novel adenovirus from California sea lion *Zalophus californianus*, Dis Aquat Org, 94, 243-248 (2011)
- [7] Inoshima Y, Murakami T, Ishiguro N, Hasegawa K, Kasamatsu M : An outbreak of lethal adenovirus infection among different otariid species, Vet Microbiol, 165, 455-459 (2013)
- [8] Wellehan JFX, Johnson AJ, Harrach B, Benkö M, Pessier AP, Johnson CM, Garner MM, Childress A, Jacobson ER : Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the Atadenoviruses, J Virol, 78, 13366-13369 (2004)
- [9] 遠矢幸伸 : 犬伝染性肝炎, 動物の感染症, 小沼 操, 明石博臣, 菊地直哉, 沢田拓士, 杉本千尋, 宝達 勉編, 第2版, 232, 近代出版, 東京 (2006)
- [10] Park NY, Lee MC, Kurkure NV, Cho HS : Canine adenovirus type 1 infection of a Eurasian river otter (*Lutra lutra*), Vet Path, 44, 536-539 (2007)
- [11] Balboni A, Verin R, Morandi F, Poli A, Prospero S, Battilani M : Molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 and type 2 in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy, Vet Microbiol, 162, 551-557 (2013)
- [12] De Abreu Corrêa A, Carratala A, Monte Barardi CR, Calvo M, Girones R, Bofill-Mas S : Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater, Appl Environ Microb, 78, 6450-6457 (2012)
- [13] Thurston-Enriqueza JA, Haas CN, Jacangelo J, Gerba CP : Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone, Water Res, 39, 3650-3656 (2005)

## Report of Acute Hepatitis in Two California Sea Lions Caused by Novel Adenovirus

Keisuke KONDO<sup>1)†</sup>, Hiroshi SHIMODA<sup>2)</sup>, Masashi SAKURAI<sup>2)</sup> and Ken MAEDA<sup>2)</sup>

1) *Umino-nakamichi Marine Ecological Science Museum, 18-28 Saitozaki, Higashiku, Fukuoka, 811-0321, Japan*

2) *Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753-8515, Japan*

### SUMMARY

Lethal viral hepatitis associated with adenoviral infection has been reported in some otariid species. There was also an outbreak reported from an aquarium in Japan. Severe acute hepatitis was present in two California sea lions and a novel adenovirus was detected. It has been suggested that early treatment may be successful in saving the animal. Attention must be paid to sanitary management, because persistent viral infection was observed after the symptoms had disappeared.

— Key words : Adenovirus, California sea lion, PCR, Viral hepatitis.

† Correspondence to : Keisuke KONDO (*Umino-nakamichi Marine Ecological Science Museum*)

*18-28 Saitozaki, Higashiku, Fukuoka, 811-0321, Japan*

*TEL 092-603-0400 FAX 092-603-2261 E-mail : k.kondo@marine-world.co.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 49~53 (2019)*