

犬ジステンパー感染犬の血球内封入体の研究

II. 実験感染犬における観察

小林弘之*・其田三夫**・高橋清志**・黒沢 隆**
天野武志**・渡辺誠治***・磯貝礼二***

Studies on Inclusion Bodies of Blood Cells in Dogs Affected with Canine Distemper

II. Observations on experimentally inoculated dogs

Hiroyuki KOBAYASHI, Mitsuo SONODA, Kiyoshi TAKAHASHI
Takashi KUROSAWA, Takeshi AMANO, Seiji WATANABE
and Reiji ISOGAI

(May, 1986)

緒 論

犬ジステンパーの臨床診断については、Dunkin and Laidlaw⁵⁾ がその実験感染犬の観察により 2 峰性の発熱の価値を報告して以来、蛍光抗体法による粘膜上皮細胞のウイルス抗原の証明⁴⁾、Shorr 染色³⁾、Wright 染色^{3,16,17)}、Leishman 染色¹⁶⁾、Hematoxylin and Eosin 染色^{8,10)} および Giemsa 染色^{19,20)} による粘膜上皮細胞および末梢血における封入体の検出が試みられている。著者らは本学付属家畜病院に来院したジステンパー自然感染犬の末梢血の Giemsa 染色塗抹標本で観察された血球内封入体は、犬ジステンパーウイルス抗原に一致することを確認したが⁹⁾、その臨床診断的価値をさらに明らかにする目的で感染試験を行ない検討し、以下の結果を得たので報告する。

材料および方法

1. 供 試 犬

約 2 カ月齢の雑種犬 6 例 (体重 2.3~3.5 kg 平均 3.0 kg) を供試した。犬ジステンパー自

* 獣医学科, 家畜内科学第二教室
Department of Veterinary Medicine (Veterinary Internal Medicine), Rakuno Gakuen
University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan

** 獣医学科, 家畜内科学教室
Department of Veterinary Medicine (Veterinary Internal Medicine), Rakuno Gakuen
University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan

*** 共立商事
Kyoritsu-Shoji Co., Ltd., Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan

然感染例の末梢血血球内に封入体が観察された犬からヘパリン加末梢血を採取し、2頭 (No. 1, 2) の頸静脈内にそれぞれ1 ml 接種した。接種後第9日にこれらの2頭から採取したヘパリン加末梢血をさらに2頭 (No. 3, 4) の頸静脈内に1 ml ずつ接種した。のこりの2頭 (No. 5, 6) を非接種対照とした。

2. 観察期間、項目および方法

観察期間は接種日を第1病日とし、第35病日までとした。

1) 臨床観察

体温、脈拍数、元気、食欲、眼やに、流涙、肺胞音および便の性状について毎日観察した。

2) 血液検査

接種前および接種後は1日間隔でヘマトクリット値、白血球数および白血球百分比について観察した。血液細胞中の封入体の形態と出現率は buffy coat 塗抹 Giemsa 染色標本について毎日観察した。血清総蛋白量および血清蛋白分画 (セルロースアセテート膜による電気泳動法) は5日間隔で観察した。

3) 電子顕微鏡による観察

No. 1 および 2 は第10病日に、No. 4 は第14病日に透過型電子顕微鏡で観察した。EDTA-2Na で採取した血液から得た buffy coat をグルタルアルデヒドおよびオスミウム酸を用いて2重固定し、酢酸ウランと硝酸鉛で2重染色した超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した。

4) 蛍光抗体法による観察

No. 3 および 4 について第11病日に血液を採取し、蛍光抗体直接法によって封入体を証明した。

5) 中和抗体価の測定

接種前、封入体の出現時 (第1週)、封入体の消失時 (第2週)、その後第3週および第5週に採血し血清を得た。血清は56°C で30分間非働化し、2 v/v % 馬血清加里ン酸緩衝食塩液で5進法により希釈した。各段階の希釈液と0.1 ml 中約200 EID₅₀ の中和試験用ウイルス (F_{XNOE}-129-2-4) を含む液との等量混合液をそれぞれ4個の発育鶏卵漿尿膜上 (7日卵) に0.1 ml ずつ接種し、35~37°C で7日間培養した。培養後、接種部の病変を検査して病変を抑えた血清の希釈倍数をベーレンス・ケルバー法によって中和抗体価を求めた。

成 績

1. 臨床所見 (Fig. 1~4)

Fig. 1~4 にみられるように No. 1 と 4 は第6病日、No. 2 は第5病日に一過性の体温の

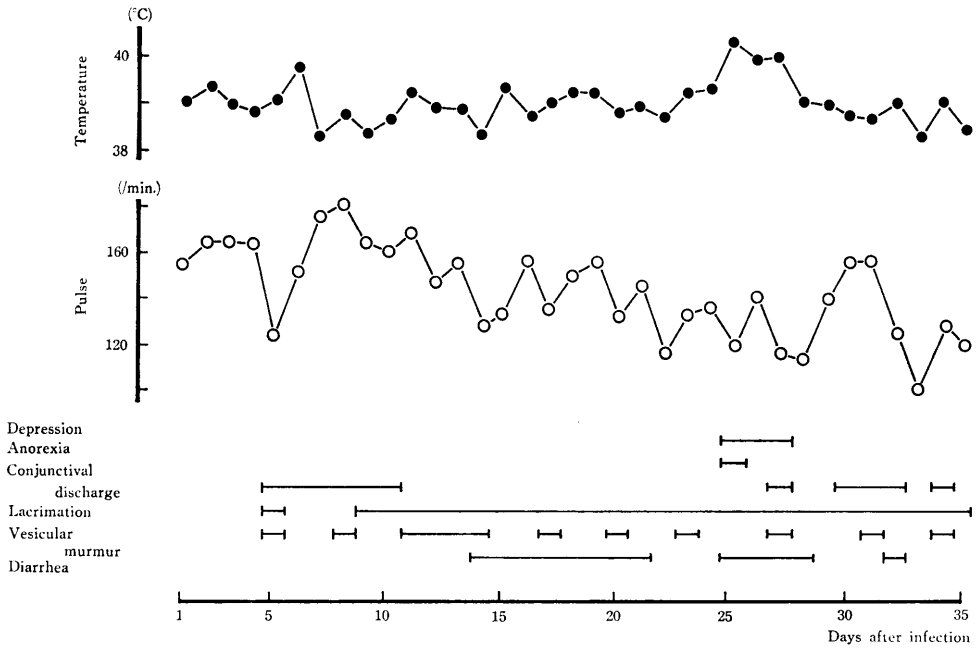


Fig. 1. Clinical symptoms (Dog No. 1).

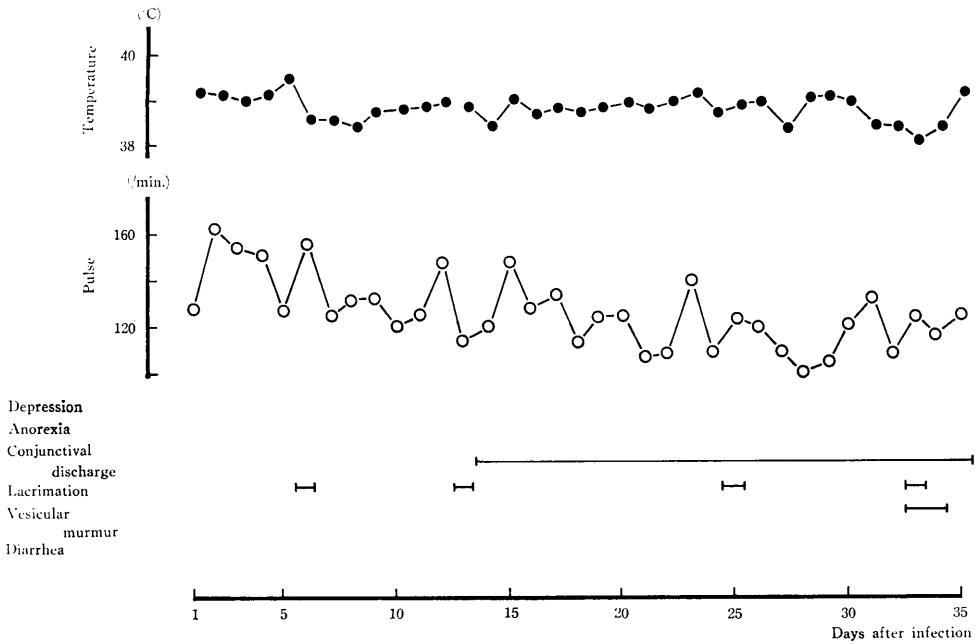


Fig. 2. Clinical symptoms (Dog No. 2).

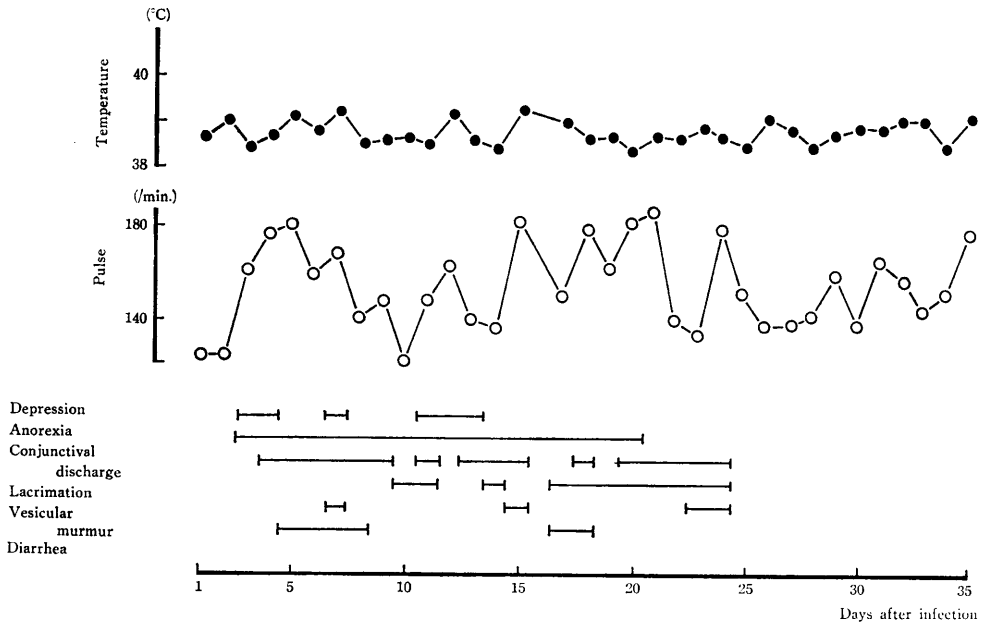


Fig. 3. Clinical symptoms (Dog No. 3).

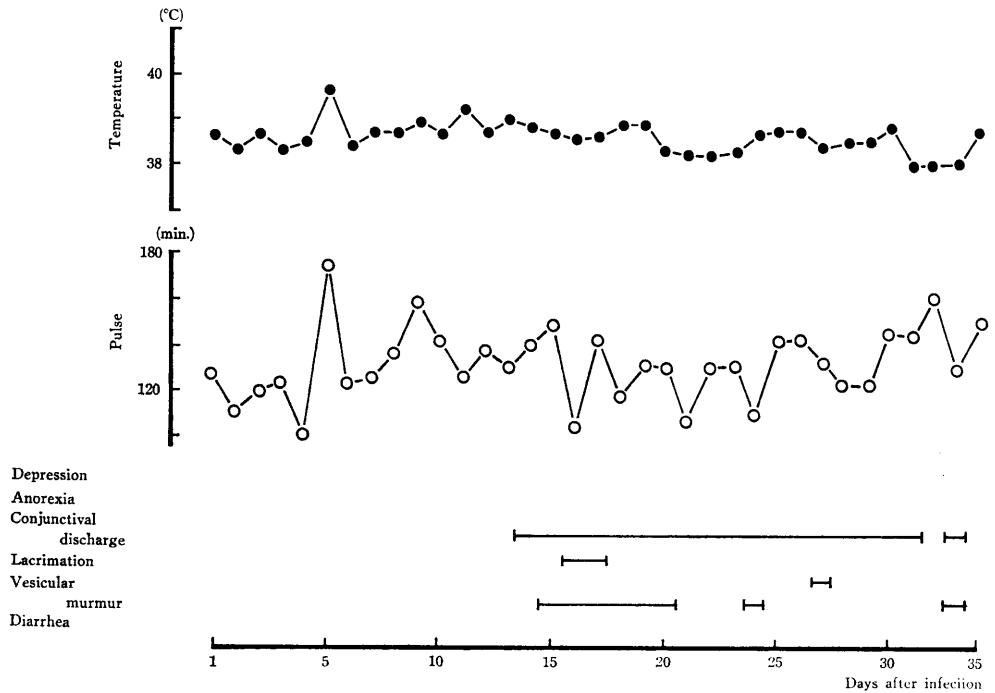


Fig. 4. Clinical symptoms (Dog No. 4).

上昇があった。さらに No. 1 は第 25 病日から 3 日間再び 40°C 前後の発熱がみられた。心拍数に大きな変化はみられなかった。接種例では第 4 病日以降、断続的に眼やに、流涙が観察された。No. 1 および 2 は第 5 病日以降、時に肺胞音が粗朧となった。また、No. 3 は第 3 病日より、No. 4 は第 15 病日より断続して下痢が観察された。

対照例では、No. 5 で第 15 病日より 3 日間、No. 6 で第 8 病日より 3 日間下痢がみられたが他の所見はみられなかった。

2. 血液学的所見

ヘマトクリット値は接種例では平均 33.9~39.3%、対照例では平均 32.0~39.0% で、共に正常範囲内を推移した (Fig. 5)。

白血球数は接種例では漸次減少し、第 9 病日には平均 6200/μl となり、その後漸増した (Fig. 6)。白血球数とその百分比からリンパ球を算出した結果、接種前平均 3100/μl あった

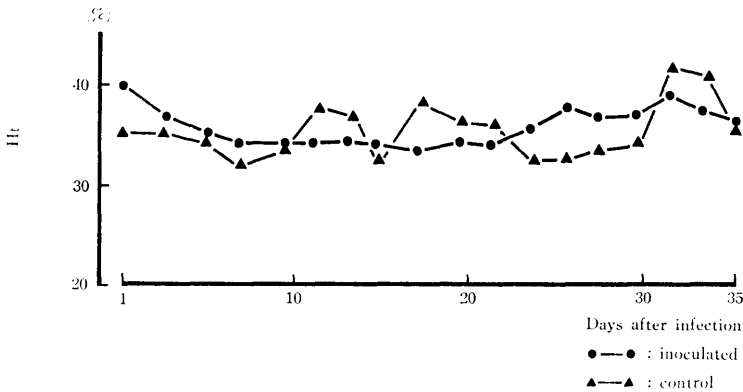


Fig. 5. Findings of Hematocrit.

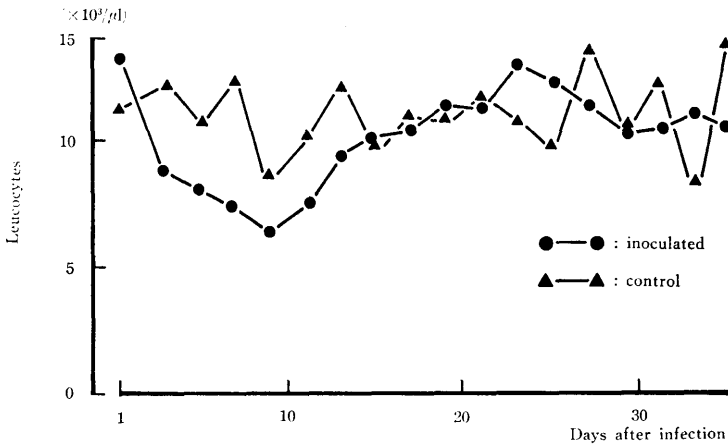


Fig. 6. Leucocyte counts.

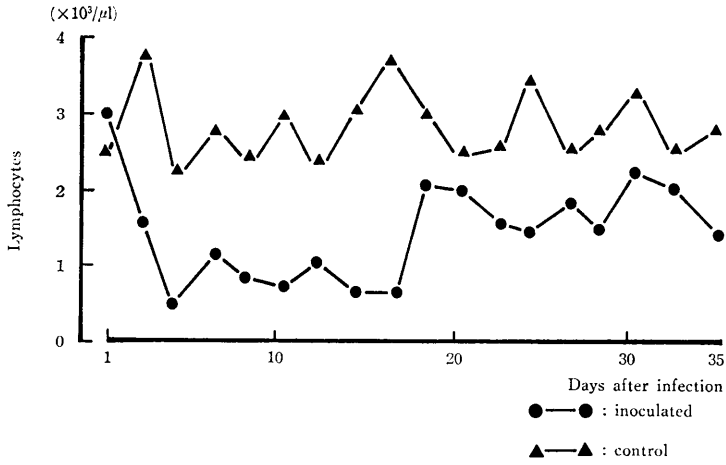


Fig. 7. Peripheral blood lymphocyte counts.

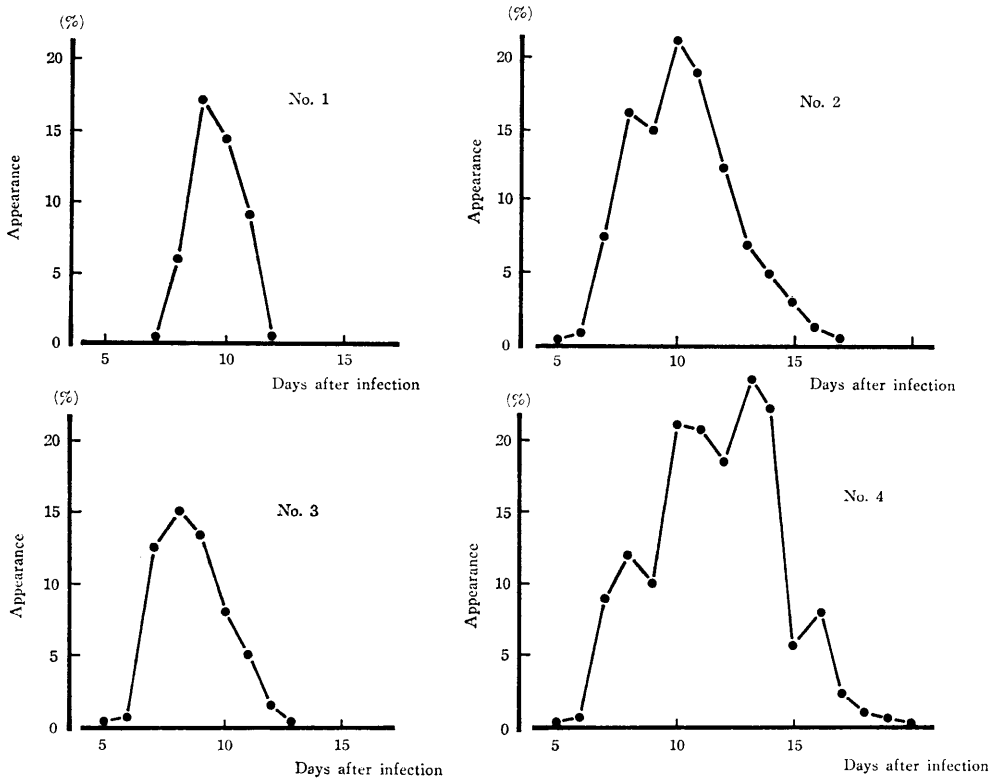


Fig. 8. Peripheral blood lymphocyte counts contained inclusion bodies.

リンパ球数は第5病日には平均 $560/\mu\text{l}$ と激減した (Fig. 7)。その後やや増加し第31病日には平均 $2300/\mu\text{l}$ と上昇したが、対照例のそれを上回ることにはなかった。

buffy coat の塗抹を Giemsa 染色した結果、接種例全例のリンパ球の細胞質内に、自然例で観察されたのと同様の封入体を検出した。封入体は $2.0 \times 3.0 \mu\text{m}$ の楕円形を呈するものが主体で、色彩は赤紫色であった。1個のリンパ球内の封入体の数は多くの場合1個であった。接種全例についてそれぞれ200個のリンパ球内封入体の出現率を百分比であらわした (Fig. 8)。図にみられるように No. 1 では第8病日にリンパ球の6.0%に封入体が出現し、第9病日には17.0%と最高値を示し5日後に消失した。また、No. 2, 3 および4では第6病日にそれぞれリンパ球の0.5%、1.0 および1.0%に封入体が検出された。No. 2では第10病日の21.0%を最高に11日間出現した。No. 3では第8病日に15.0%、No. 4では第13病日に24.5%の陽性率を示し、それぞれ7日間と14日間継続して証明された。

血清総蛋白量は、対照例で明瞭な増加傾向が見られなかったが、接種例では漸増する傾向にあった。γ-グロブリン量は接種例で第11病日以後急増し、第35病日には平均 $0.22 \text{ g}/100 \text{ ml}$ となった。対照例では第23病日より漸増し、第35病日には平均 $0.10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ となった。

3. 電子顕微鏡による所見

接種犬のリンパ球の細胞質内に自然例で観察されたのと同様の封入体が観察された (Photo.)。封入体は、ひも状物の集塊で $1.3 \sim 2.3 \times 2.3 \sim 3.2 \mu\text{m}$ の楕円形のもものが主体であった。2個以上の封入体をもつものはまれで、細胞質内小器官は封入体の領域には存在

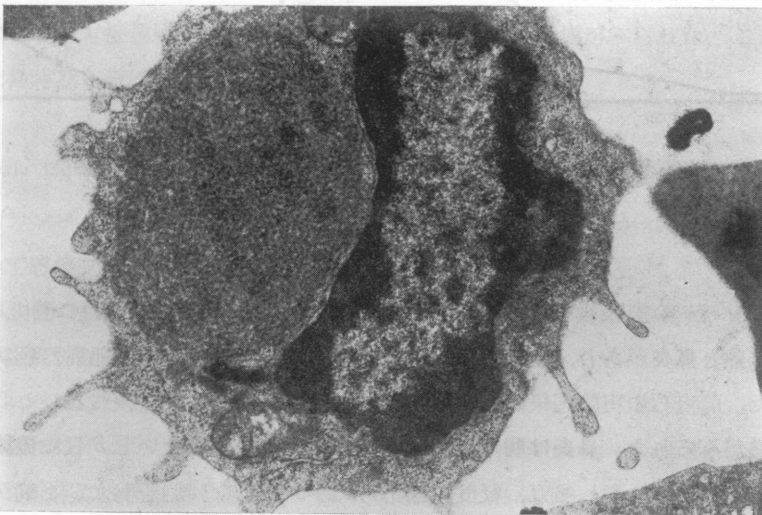


Photo. Lymphocyte involved inclusion body.

しなかった。また、核内封入体はいずれの細胞にも観察されなかった。

4. 蛍光抗体法による観察

接種犬のリンパ球の細胞質内に、楕円形あるいは三日月状の明るい特異蛍光が観察された。この所見は対照犬のリンパ球には認められなかった。

5. 血清の中和抗体価 (Fig. 9)

No. 1 および 3 では第 2 週より抗体価の上昇がみられ、第 5 週にはともに 1:376 となった。No. 2 および 4 では第 3 週から抗体価が上昇し、それぞれ 1:100 および 1:250 となった。対照例のそれは第 5 週においても 1:10 以下であった。

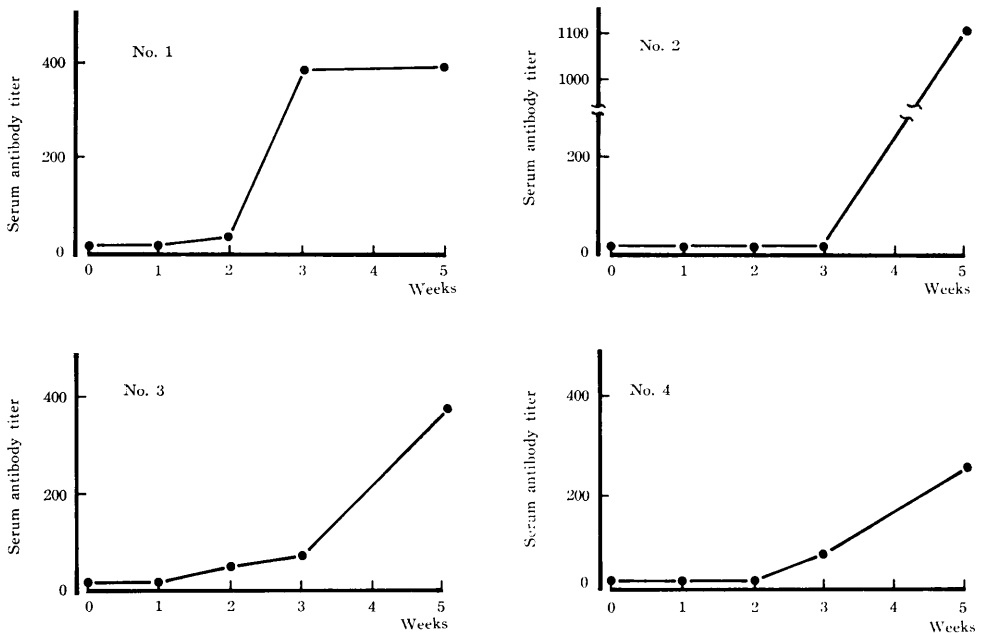


Fig. 9. The development of antibodies produced by canine distemper virus.

考 察

犬ジステンパーの実験感染において Dunkin and Laidlaw⁵⁾ は、4 日間の潜伏期間の後、一過性の発熱と鼻炎があり、それに続く再度の発熱と胃腸障害および呼吸器症状を本症の特徴とした。著者らの実験感染における観察でも 1 例を除いて接種後 4 ないし 5 日間に一過性の発熱がみられた。鼻炎は明らかでなかったが、接種後 2 ないし 5 日に流涙あるいは眼やにの付着がみられた。また、軽度ではあったが、粗励な肺胞音および下痢が観察された。これらの症状は一般にいわれている犬ジステンパーの症状^{2,6,7,11,13,15)} であった。

血液学的観察で、接種犬全例の観察期間中、重度のリンパ球減少症と接種後5ないし7日目にリンパ球の細胞質内に封入体が検出された。このリンパ球細胞質内封入体は出現後急増したが、急減し消失した。犬ジステンパーにおけるリンパ球減少症については Krakowka and Koestner¹³⁾ および Reihart and Reihart¹⁶⁾ による観察が、またリンパ節の組織障害が Krakowka et al.¹²⁾, Lauder et al.¹⁴⁾ および Tajima et al.¹⁸⁾ によって報告されている。犬ジステンパーウイルスの感染によるリンパ球減少症は T および B cell に関係なく起こり^{12,13)} in vitro でリンパ球の有系分裂が抑制されると報告されている¹³⁾。Appel¹⁾ は蛍光抗体法により感染後6日目にリンパ節でウイルス抗原の増加を観察したが、中和抗体価が1:100以上となったものでは、14から16日目にはほとんどウイルス抗原を検出していない。著者らの観察でも接種例のリンパ球内封入体の消失時期は個々の接種犬の血清中の中和抗体の出現時期と一致し、中和抗体価は1:100を超えて耐過した。これらのことから接種後速やかにリンパ組織に達したウイルスは4ないし5日間リンパ組織にとどまる。その間、リンパ球の分裂は抑制され、末梢血中のリンパ球数は激減する。リンパ組織のリンパ球内で増殖したウイルスのヌクレオカプシッドは5ないし7日目にはリンパ球内封入体として末梢血中に出現する。リンパ組織におけるウイルスの増殖はさらに末梢血中での封入体含有リンパ球の出現率を増加させるが、中和抗体の出現とともにウイルスの増殖は抑制され、末梢血中の封入体含有リンパ球は減少する。中和抗体の出現をみないか、若しくはその出現が遅いものでは骨髄においてもウイルスの増殖が起こり、自然例でみられたような封入体の出現がみられるのであろう。

犬ジステンパー中和抗体の主要部分は γ -グロブリン分画にあるとされており²⁾、今回の接種例においても接種後10日目以後に γ -グロブリン量の急増がみられた。これは中和抗体価の上昇時期とほぼ一致している。

要 約

犬ジステンパーにおける封入体検出の臨床診断上の意義を明らかにする目的で、6例の犬を用いて感染試験を行ない以下の成績を得た。

1. 自然例の血液を接種した4例では、接種後4ないし5日目から発熱、眼やに、流涙、下痢および粗励な肺胞音が観察された。
2. リンパ球に好酸性の細胞質内封入体が接種後5ないし7日目に出現し、5ないし11日間観察された。
3. 中和抗体は接種後第2週あるいは第3週から上昇がみられ、第5週には1:250から1:1100となった。

以上の結果から、リンパ球内封入体の検出は犬ジステンパー症の早期臨床診断に有用であることが確認された。

文 献

- 1) Appel, M. J. G., 1969. Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.*, **30**: 1167-1182.
- 2) Bruner, D. W. and J. H. Gillespie, 1973. 犬ジステンパー, 牛パラインフルエンザ, 牛疫, ニューカッスル病および他のパラミクソウイルス. 家畜感染症 (椿原彦吉, 大島 憲監訳), 1011-1063, 医歯薬出版, 東京.
- 3) Cello, R. M., J. E. Moulton and S. McFarland, 1959. The occurrence of inclusion bodies in the circulating neutrophils of dogs with canine distemper. *Cornell Vet.*, **49**: 127-146.
- 4) Coffin, D. L. and C. Liu, 1957. Studies on canine distemper infection by means of fluorescein-labeled antibody. II. The pathology and diagnosis of the naturally occurring disease in dog and the antigenic nature of the inclusion body. *Virology*, **3**: 132-145.
- 5) Dunkin, G. W. and P. P. Laidlaw, 1926. Studies in dogdistemper. II. Experimental distemper in the dog. *J. Comp. Pathol. Ther.*, **39**: 213-221.
- 6) Farrow, B. R. H., 1980. Canine distemper, in "Current Veterinary Therapy" (R. W. Kirk, ed.), 1284-1286, W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- 7) Gillespie, J. H. and L. E. Carmichael, 1975. Distemper, in "Canine medicine" (E. J. Catcott, ed.).
- 8) Goss, L. W., C. R. Cole and H. Engel, 1948. Inclusion bodies, with special application to clinical diagnosis of canine distemper. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, **112**: 236-237.
- 9) 一条 茂・東野 貢・加藤軍四郎・小西辰雄, 1963. 犬ジステンパー封入体に関する臨床的観察, I. 自然感染犬での眼結膜, 鼻および口唇粘膜における封入体の検索, *日獣会誌*, **16**: 168-173.
- 10) 小林弘之・其田三夫・高橋清志・黒沢 隆・天野武志・渡辺誠治・磯貝礼二, 1985. 犬ジステンパー血球内封入体の研究. I. 自然感染犬における観察, *小動物臨床*, **4**(2): 16-21.
- 11) 小西信一郎, 1970. 犬ジステンパー, 最新家畜伝染病 (越智勇一 編), 139-150, 南江堂, 東京.
- 12) Krakowka, S., R. J. Higgins and A. Koestner, 1980. Canine distemper virus: Review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.*, **41**: 284-292.
- 13) Krakowka, S. and A. Koestner, 1977. Comparison of canine distemper virus strains in gnotobiotic dogs: Effects on lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.*, **38**: 1919-1922.
- 14) Lauder, I. M., W. B. Martin, E. B. Gordon, D. D. Lawson, R. S. F. Campbell and A. M. Watrach, 1954. A survey of canine distemper (part II). *Vet. Rec.*, **66**: 623-631.
- 15) 本橋常正・岸 茂・田島正典・中村稔治, 1961. 犬ジステンパーに関する実験的研究. I. 犬及びミンクに於ける野外材料感染実験, *日獣誌*, **23**: 133-143.
- 16) Reihart, O. F. and H. W. Reihart, 1968. Disease of blood and blood-forming organs, in "Canine Medicine" (E. J. Catcott, ed.), 339-386, American Veterinary Publications Inc., Wheaton.
- 17) Rich, L. J. 1976. 赤血球の異常. 犬猫の血球形態学 (黒川和雄・長谷川篤彦 訳), 22-27, 学窓社, 東京.
- 18) Tajima, M., M. Itabashi and T. Motohashi 1971. Light and electron microscopic studies of lymph node of mink exposed to canine distemper virus. *Am. J. Vet. Res.* **32**: 913-924.
- 19) Watson, A. D. J. and R. G. Wright. 1974. The ultrastructure of cytoplasmic inclusions

in circulating lymphocytes in canine distemper. *Res. Vet. Sci.* **17**: 188-192.

- 20) Watson, A. D. J. and R. G. Wright. 1974. The ultrastructure of inclusions in blood cells of dogs with distemper. *J. Comp. Pathol.* **84**: 417-427.

Summary

Six dogs were studied for clarification of the clinical diagnostic significance on the inclusion bodies in blood cells of dogs affected with canine distemper.

1. In four inoculated dogs, fever, conjunctival discharge, lacrimation, diarrhea and vesicular murmur were observed since the 4th day after inoculation.

2. The lymphocyte containing eosinophilic inclusion bodies began to appear during the 5th to 7th day after inoculation in 4 dogs, and they were observed during five to eleven days.

3. The antibody titers of the inoculated dogs were from 1:250 to 1:1100 on the 5th week after inoculation.

Therefore, it was reconfirmed that the detection of inclusion bodies in lymphocyte was useful for early clinical diagnosis on canine distemper.