

原著

ばんえい競馬場在厩馬に流行した 馬コロナウイルス感染を疑う事例

成田雅子^{1)†} 信本聖子²⁾ 竹田 博¹⁾ 森山友恵³⁾
森田美範⁴⁾ 中岡祐司⁵⁾

- 1) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-6)
2) 北海道胆振家畜保健衛生所 (〒059-0462 登別市富浦町4-3)
3) 十勝農業共済組合西部事業所 (〒089-0103 上川郡清水町字清水第1線50-41)
4) エムズパートナー十勝ドラフトホースクリニック (〒080-0023 帯広市西13条南9-1)
5) 北海道根室家畜保健衛生所 (〒086-0214 野付郡別海町別海緑町69)

(2010年3月3日受付・2011年1月24日受理)

要 約

北海道帯広市のばんえい競馬場で2004年12月から翌年3月、191頭の重種馬（在厩馬の約3割）に発熱と食欲不振の症状がみられた。発症馬21頭中14頭の発症時と回復時の組血清で牛コロナウイルスに対する中和抗体価の有意な上昇が認められ、発症馬の糞便から馬コロナウイルスNC99株の遺伝子ときわめて相同性の高い遺伝子が検出された。一方発症馬の鼻汁と糞便からコロナウイルス以外の既知病原体と遺伝子は検出されず、発症馬21頭の血清学的検査で馬ヘルペスウイルス1型、馬インフルエンザウイルス、ゲタウイルス、馬ロタウイルス、馬鼻炎Aウイルス、馬アデノウイルス、馬動脈炎ウイルス、腺疫、馬パラチフスに対する有意な抗体価の上昇は認められなかった。以上のことから今回集団発生した疾病は馬コロナウイルスの感染により起こされたことが疑われた。

—キーワード：ばんえい競馬場，馬コロナウイルス，重種馬，集団発生。

----- 日獣会誌 64, 535～539 (2011)

これまで、海外において下痢を発症した子馬の糞便からコロナウイルス様粒子が電子顕微鏡により検出され、培養細胞で分離されている [1-3] が、馬のコロナウイルスの性状を明白にしたのは、Guyら [1] が培養細胞で継代できる馬コロナウイルス (ECV) NC99株を分離した報告のみである。それによると、ECVは牛コロナウイルス (BCV) と同じ血清群 (2群) に属し、抗原的にBCVと交差し、遺伝子学的にも高い相同性を有すると報告されている。また、これまで子馬の下痢便からコロナウイルスが検出あるいは分離されていることから、ECVは子馬に下痢症を起こす病原体であると考えられている [1-3]。しかし感染実験などの報告はなく、ECVがどのような病気を起こすのかについては明らかにされていない。

わが国ではウイルス検出の報告はないが、日本各地の

馬が比較的高率にBCVに対する中和抗体を保有していることが報告されており [4, 5]、また競走馬の発熱疾患にコロナウイルスが関与していることも示唆されている [6]。

今回ばんえい競馬場で流行した発熱性疾患について調査した結果、この疾病にECVが関与していることが示唆されたので、その概要を報告する。

材料及び方法

発症状況調査：2004年12月から翌年3月に、北海道帯広市内のばんえい競馬場在厩中の重種馬に発熱疾患の流行があったため、発症状況及び臨床症状を調査した。

検査血清：2004年12月3日～11日に38.6～41.3℃の発熱と食欲不振を呈した競馬場在厩馬21頭（2頭は下痢を併発）の発症時と回復時の組血清を用いた。ま

† 連絡責任者：成田雅子（北海道十勝家畜保健衛生所）

〒089-1182 帯広市川西町基線59-6

☎0155-59-2021 FAX 0155-53-4121

E-mail : narita.masako@pref.hokkaido.lg.jp

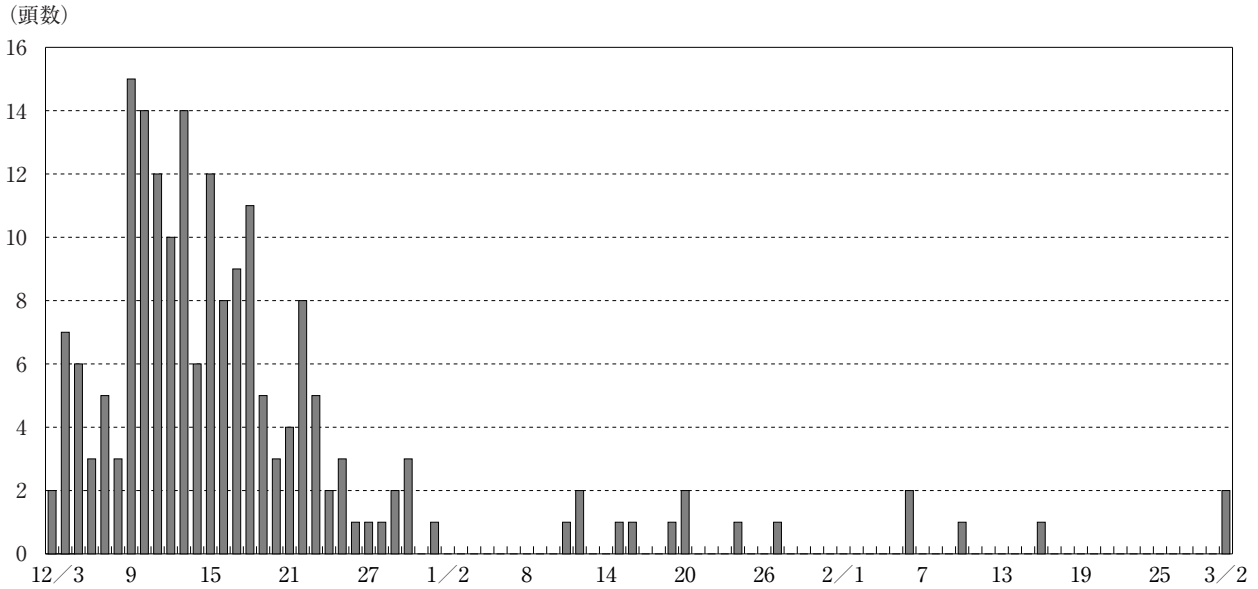


図1 ばんえい競馬場における発熱性疾患の新規発生頭数の推移

た、流行後期の2005年2月まで在厩していた非発症馬10頭、流行終了後の同年3月に新規入厩した5頭の血清を用いた。

病原検査材料：2004年12月13日～2005年3月2日の期間に38.8～41.3℃の発熱を呈した10頭の発症馬（これらのうち1頭は下痢を併発）から鼻汁8検体と糞便10検体が採取された。これらの発症馬からの採取月は12月4頭、1月3頭、2月1頭、3月2頭であった。

抗体検査：BCVに対する中和抗体価の測定は、既報[4, 5]に準じてBCV掛川株と人大腸癌由来株化(HRT18)細胞を用いて実施した。また、腺疫のELISA法[7]、馬バラチフスの試験管凝集反応[8]、馬ヘルペスウイルス(EHV)1型のCF反応及び型特異的gG-ELISA法[9]、馬インフルエンザウイルスのHI反応[10]を既報に従って実施した。ゲタウイルス、馬ロタウイルス、馬鼻炎Aウイルス(旧称：馬ライノウイルス1型)、馬アデノウイルス及び馬動脈炎ウイルスのCF反応はそれぞれのウイルス抗原を用いて常法に従って実施した。

ウイルス分離：鼻汁及び糞便の10%乳剤を馬胎子腎細胞、牛腎臓由来株化(MDBK)細胞、ウサギ腎臓由来株化(RK13)細胞、サル腎臓由来株化(Vero)細胞及びHRT18細胞に接種し、3代盲継代してCPEの有無により判定した。特にコロナウイルスについては培養後に培養上清を用いて遺伝子検査[1]を、また細胞中のウイルス抗原を調べるために、抗BCV(Mebus株)モノクローナル抗体マウス血清による免疫染色を実施した。

細菌検査：鼻汁については羊血液寒天培地とDHL寒天培地を、糞便材料については上記培地に加えテトラチ

オネート液体培地を用いて培養検査を実施した。

電子顕微鏡検索：糞便の10%乳剤を、30%ショ糖液で密度勾配遠心(35,000rpm/2時間)し、得られたペレットをPBS200μlに浮遊し、2%リンタンゲステン酸でネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。

遺伝子検査：発熱馬の鼻汁及び糞便の10%乳剤を用い、N蛋白遺伝子領域を標的としたECVのRT-PCR[1]と、EHV[11]のPCR及び馬ロタウイルス[12]、馬インフルエンザウイルス[13]のRT-PCRを実施した。検体からのDNAはDNA抽出キット(インスタジーンDNA精製マトリクス、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株、東京)を、RNAはRNA抽出キット(QIAamp Viral RNA Mini Kit、株キアゲン、東京)を使用し、各試薬・キットの使用説明書に従って抽出した。EHVのPCRはDNA Polymerase(HotStart Taq DNA Polymerase、株キアゲン、東京)を、ECV、馬ロタウイルス、馬インフルエンザウイルスのRT-PCRにはRT-PCRキット(QIAGEN OneStep RT-PCR Kit、株キアゲン、東京)を用いて実施した。PCR、RT-PCRの反応条件は各論文に従った。PCR産物の確認はアガロースゲル電気泳動法にて実施した。

ダイレクトシーケンス：ECVのPCR産物を、DNA精製キット(MiniElute PCR Purification Kit、株キアゲン、東京)を用いて精製し、Guyら[1]の報告にあるプライマー(ECVf, ECVr, ECVmid)とシーケンスキット(BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit、アプライドバイオシステムズ、ライフテクノロジー ジャパン株、東京)を用いたシーケンス反応を実施した。シーケンス産物は、精製キット(DyeEx 2.0 Spin kit、株キアゲン、東京)を用いて精製し、泳

表1 発症馬の組血清 (A)、非発症馬 (B) 及び新規入厩馬 (C) の牛コロナウイルスに対する中和抗体価

(A) 発症馬の組血清 2004年12月3日～11日発症馬					(B) 流行後期の非発症馬			
馬番号	年齢	症 状		中和抗体価		馬番号	年齢	中和抗体価
		体温℃	下痢	発症時	回復期			
1	3	41		16	64	1	5	1024
2	4	41		32	1024	2	9	256
3	2	39.6		<2	<2	3	6	32
4	2	39.1		64	1024	4	5	1024
5	3	41.2	有	<2	<2	5	7	128
6	2	40.2		<2	16	6	6	256
7	2	41.2		2	1024	7	8	32
8	6	40.1		<2	512	8	5	4
9	6	40.1		<2	64	9	5	256
10	5	38.6		<2	8	10	8	128
11	2	39	有	<2	<2	陽性GM値(倍)		128.0
12	2	40.8		<2	<2	陽性率(%)		100
13	2	38.8		4	2048	(C) 流行後に新規入厩した馬		
14	4	40		<2	<2	馬番号	年齢	中和抗体価
15	4	40		<2	256	1	2	2
16	7	40.2		<2	256	2	2	64
17	3	40.7		<2	<2	3	2	64
18	2	39		128	4096<	4	2	<2
19	2	38.4		256	4096<	5	2	<2
20	2	40.2		2	2048	陽性GM値(倍)		20.1
21	2	39.5		<2	<2	陽性率(%)		60.0
陽性GM値(倍)				64.0	767.1			
陽性率(%)				38.0	66.6			

体温は発症時の最高体温

No. 1～21の検査材料は組血清のみ

動装置 (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, (株)アプライドバイオシステムズ, ライフテクノロジーズジャパン (株), 東京) により泳動し塩基配列を決定した。塩基配列の比較及び系統樹解析は, 決定した塩基配列と GenBank の塩基配列データベースに登録されている各コロナウイルスの塩基配列データについて, ソフトウェア (GENETYX-Mac, (株)ゼネティックス, 東京) を用いて実施した。系統樹解析は隣接結合法 (NJ 法) により実施した。

成 績

発生状況の概要: 北海道帯広市内のばんえい競馬場で, 2004年11月14日から入厩していた重種馬において, 同年12月3日から翌年3月2日にかけて38.6～41.3℃の発熱と食欲不振を伴う疾病の流行があった。発生初日は全36厩舎のうち2厩舎で発生があり, 17日目には全厩舎にまん延した。厩舎ごとの発生頭数は1頭から半数以上とさまざまであった。図1で示したように発熱疾患の発生頭数のピークは12月9日(7日目)で, その後発生は減少傾向を示したが, 最終発生日の3月2日まで散発的に継続した。発生頭数は在厩馬651頭(2005

年1月23日時点)中191頭(29.3%)に達した。また15頭(発症馬の7.8%)は発熱とともに下痢(1頭は水様性, 他は軟便程度)を併発したが, 鼻汁, 発咳などの呼吸器症状はみられなかった。発症馬は数日で回復し予後は良好であった。

抗体検査: 表1-Aに発症馬21頭のBCVに対する中和抗体価の推移を示した。発症時の陽性率は38.0%で, 陽性GM値は64.0倍であった。一方回復期の陽性率は66.6%で, 陽性GM値は767.1倍まで上昇しており, 発症馬21頭中14頭に有意な抗体価の上昇が認められた。なおBCV以外の前述のウイルス及び細菌すべてに対して組血清間で有意な抗体価の上昇は認められなかった。

非発症馬と新規入厩馬のBCVに対する中和抗体保有状況(表1-B, C)は, 流行後期に採血された非発症馬10頭のすべてが抗体(抗体価は4倍から1024倍)を保有しており, 陽性GM値は128.0倍であった。一方, 流行後に競馬場に新たに入厩した5頭の抗体価は2倍未満から64倍で, 陽性率は60.0%, 陽性GM値は20.1倍であった。

ウイルス分離: 鼻汁及び糞便材料を接種した前述の5種の細胞すべてにCPEは認められず, HRT18細胞3代

表2 コロナウイルス遺伝子のN蛋白遺伝子の塩基及び推定アミノ酸の部分配列の相同性 (%)

	ECV (NC99) [AF251144]	BCV (Mebus) [U00735]	BCV (LY-138) [AF058942]	HCV (OC43) [NC005147]	MHV (A59) [AY700211]
塩基配列	99.0	92.8	93.5	92.5	76.2
推定アミノ酸配列	99.0	92.2	93.1	91.2	76.9

発症馬から検出されたコロナウイルス遺伝子とその他の2群コロナウイルスを比較した。

HCV：人呼吸器コロナウイルス MHV：マウス肝炎ウイルス

[] 内は各配列のGenBank Accession number

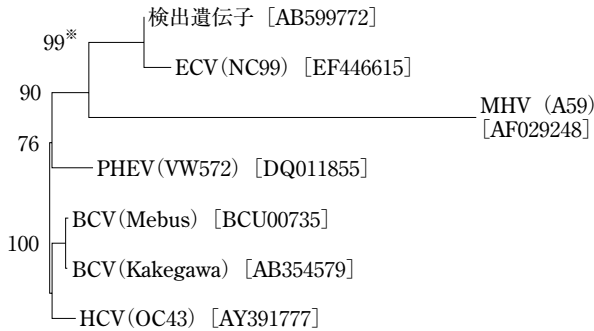


図2 N蛋白遺伝子部分配列の比較による検出遺伝子と既知の2群コロナウイルスの系統樹解析 (NJ法)
PHEV：豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルス
[] 内は各配列のGenBank Accession number
※数値はブートストラップを100回行った値を示した。

考 察

明瞭な発熱を呈した発症馬21頭中14頭(65%)においてBCVに対する有意な抗体上昇が認められた。また発症馬10頭中5頭の糞便からコロナウイルス遺伝子断片が検出され、さらにシーケンスを含む詳細な遺伝子検査により、それらはECV NC99株と99%の相同性のあることが明らかとなった。一方、血清学的検査では今回の発症馬が既知7種のウイルスと2種の細菌に感染していた可能性は否定された。さらに糞便と鼻汁を用いた遺伝子検査、電子顕微鏡検査、分離による病原検査から今回の発症馬がコロナウイルス以外の病原体に感染していた証拠は認められなかった。これらの一連の成績から、今回ばんえい競馬場で発生した発熱性疾患にECVが関与していたことが強く示唆された。

既報[1-3]では、発熱と激しい下痢を呈した子馬からコロナウイルスが検出、分離されているが、本事例のコロナウイルスは、成馬に40℃前後の発熱と一部に軽度の下痢を起こすと考えられた。また、非発症馬でもBCVに対する高い抗体価を保有していたことから、今回の流行では不顕性感染したものも多数あったことが示唆された。

流行後に入厩した5頭のBCVに対する中和抗体価が低かったことから、他にも入厩時の抗体価が低かった馬群があった可能性が考えられた。競馬場では多少の馬の出入りはあるが比較的閉鎖的な環境であり、そこに長期間在厩することで、在厩馬群の抗体価が低下していったのではないかと推察された。このことが今回の疾病が流行した要因の一つになったかもしれないと考えられた。

稿を終えるにあたり、遺伝子検索及び抗体検査に協力いただいた、日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所の関係各位及び、検出遺伝子のデータベース登録及び系統樹解析に協力いただいた、動物衛生研究所ウイルス病研究チームの村上賢二上席研究員、同研究所北海道支所の菅野徹主任研究員に深謝する。

引 用 文 献

- [1] Guy JS, Breslin JJ, Breuhaus B, Vivrette S, Smith LG : Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal, J Clin Microbiol, 38, 4523-4526 (2000)
- [2] Huang JCM, Wright SL, Shipley WD : Isolation of coronavirus-like agent from horses suffering from

盲継代培養上清のコロナウイルス遺伝子検査と抗BCV抗体による免疫染色も陰性であった。

細菌検査：検査したすべての鼻汁及び糞便材料から病原菌は分離されなかった。

電子顕微鏡検査：検査したすべての糞便材料の電子顕微鏡観察ではウイルス様粒子は認められなかった。

遺伝子検査：遺伝子検査した発症馬10頭の糞便において5頭(糞便採取月と頭数：12月1頭, 1月2頭(うち1頭は下痢), 2月1頭, 3月1頭)の糞便から、コロナウイルスのN蛋白遺伝子領域を標的としたRT-PCRによって1.5kbの遺伝子断片が増幅され、さらにシーケンスが決定された。このN蛋白遺伝子の塩基配列及び推定アミノ酸配列の比較において、糞便から検出された遺伝子(Accession number: AB599772)は、ECV NC99株と99%の相同性を示したのに対し、牛、人のコロナウイルスとは90%程度、マウスとは約76%の相同性であった(表2)。また、この検出遺伝子は系統樹解析でもECV NC99株ときわめて近縁であることが示された(図2)。なお、シーケンスは検出された5例の遺伝子断片のうち2例について実施し、それらの遺伝子配列の相同性は同じであった。

一方、遺伝子検査したすべての鼻汁及び糞便材料からEHV、馬ロタウイルス、馬インフルエンザウイルスの遺伝子は検出されなかった。

- acute equine diarrhoea syndrome, *Vet Rec*, 113, 262–263 (1983)
- [3] Mair TS, Taylor FGR, Harbour DA, Pearson GR : Concurrent cryptosporidium and coronavirus infections in an Arabian foal with combined immunodeficiency syndrome, *Vet Rec*, 126, 127–130 (1990)
- [4] Imagawa H, Fukunaga Y, Kamada M : Detection of neutralizing antibody against calf diarrheal coronavirus in horse serum, *Bull Equine Res Inst*, 27, 25–30 (1990)
- [5] Sato K, Inaba Y, Miura Y, Tokuhisa S, Akashi H, Shinozaki T, Matumoto M : Neutralizing antibody to calf diarrheal coronavirus in various animal species in Japan, *Microbiol Immunol*, 25, 623–625 (1981)
- [6] 今川 浩 : SARS コロナウイルスと馬コロナウイルスについて, *馬の科学*, 40, 292–301 (2003)
- [7] Hobo S, Niwa H, Anzai T : Proline–glutamic acid–proline–lysine peptide set as a specific antigen for the serological diagnosis of strangles, *Vet Rec*, 159, 629–632 (2006)
- [8] 安齊 了, 鎌田正信, 中村政幸, 山本孝史, 伊佐山康郎 : 馬パラチフス試験管凝集反応法の改良, *日獣会誌*, 48, 945–948 (1995)
- [9] Yasunaga S, Maeda K, Matsumura T, Kai K, Iwata H, Inoue T : Diagnosis and sero–epizootiology of equine herpesvirus type 1 and type 4 infections in Japan using a type–specific ELISA, *J Vet Med Sci*, 60, 1133–1137 (1998)
- [10] Imagawa H, Fukunaga Y, Kamada M, Nanbu M, Kitamura M : Distribution of HI antibody titers against 3 vaccine strains of equine influenza virus in light–breed horses in Japan, *Jpn J Equine Sci*, 4, 31–38 (1993)
- [11] Lawrence GL, Gilkerson J, Love DN, Sabine M, Whalley JM : Rapid, single–step differentiation of equid herpesviruses 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus–specific primers, *J Virol Methods*, 47, 59–72 (1994)
- [12] Tsunemitsu H, Imagawa H, Togo M, Shouji T, Kawashima K, Horino R, Imai K, Nishimori T, Takagi M, Higuchi T : Predominance of G3B and G14 equine group A rotaviruses of a single VP4 serotype in Japan. *Arch Virol*, 146, 1949–1962 (2001)
- [13] Newton JR, Daly JM, Spencer L, Mumford JA : Description of the outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 2003, during which recently vaccinated horses in Newmarket developed respiratory disease, *Vet Rec*, 158, 185–192 (2006)

Prevalence of Disease with Inference of Equine Coronavirus Infection Among Horses Stabled in a Draft–Horse Racecourse

Masako NARITA^{*†}, Kiyoko NOBUMOTO, Hiroshi TAKEDA, Tomoe MORIYAMA, Yoshinori MORITA and Yuji NAKAOKA

** Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center, 59–6 Kisen, Kawanishicho, Obihiro-shi, 089–1182, Japan*

SUMMARY

An outbreak of equine disease with pyrexia and anorexia occurred from December 2004 to March 2005, affecting 191 heavy horses (about 30 percent of stabled horses) at the draft–horse racecourse in Obihiro City, Hokkaido, Japan. Neutralization antibody titers to bovine coronavirus rose significantly in 14 paired sera out of 21 diseased horses. A highly homologous gene to that of equine coronavirus (NC99) was detected in fecal samples from the diseased horses. However, known pathogens and genes excluding the coronavirus were not detected from any pituita or fecal samples from the diseased horses. In addition, the antibody titers did not rise significantly in the serological tests of 21 diseased horses for equine herpes virus type 1, equine influenza virus, getah virus, equine rotavirus, equine rhinitis A virus, equine adenovirus, equine arteritis virus, strangles, and equine paratyphoid. From these facts, it was inferable that the outbreak of the disease was caused by infection with equine coronavirus.

—Key words : draft–horse racecourse, equine coronavirus, heavy horse, outbreak.

† Correspondence to : Masako NARITA (Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center)

59–6 Kisen, Kawanishicho, Obihiro-shi, 089–1182, Japan

TEL 0155–59–2021 FAX 0155–53–4121 E-mail : narita.masako@pref.hokkaido.lg.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 535 ~ 539 (2011)