

北海道における馬コロナウイルスの血清学的調査

尾宇江 康 啓^{1)†} 菅 野 徹²⁾

- 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) 国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 北海道研究拠点
 (〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘4)

(2016年10月15日受付・2017年1月17日受理)

要 約

馬コロナウイルス (ECoV) の血清学的調査を、1989～2009年に北海道十勝管内で採材した馬の血清560検体について中和試験を用いて実施した結果、各年の抗体陽性率は2004年を除き84.4～100%と高く、1989年には十勝管内の馬群にECoVが広く浸潤していたと考えられた。また、過去にECoV病の流行がみられた競馬場在厩馬6頭分18検体の血清について、2株のECoVと牛コロナウイルスを抗原に用いて中和試験を実施した結果、ECoVを抗原とした方が抗体陽性率と抗体価が高くなった。ECoVを抗原に使用した場合でもウイルス株が異なれば抗体価も異なる検体がみられたため、ECoVの株間でも抗原性は異なるものと考えられた。

—キーワード：馬コロナウイルス、中和試験、血清学的調査。

-----日獣会誌 70, 224～227 (2017)

馬コロナウイルス (ECoV) は牛コロナウイルス (BCoV) とともにベータコロナウイルス1群に属するウイルスで、抗原性もBCoVと交差する [1-3]。症状は発熱と食欲不振、一部で消化器症状がみられ、致死率は低いという報告が多い [2, 4-7]。一方、糞便からECoV遺伝子が検出されたミニチュアホース15頭のうち、4頭が死亡もしくは安楽死処分されたという報告がある [8]。集団発生例は国内外で報告されており、アメリカでは2011～2012年 [6] 及び2013年 [8] にECoVによる集団発生の報告がある。一方、北海道では帯広競馬場の重種馬群において2004年12月 [4]、2009年6月 [2]、2012年2月 [7] にECoVによる集団発生がみられ、2009年6月の発生ではECoV Tokachi09株が、2012年2月の発生ではECoV Obihiro12-1株及びObihiro12-2株が分離されている。なお、ウイルス分離例は上記2例のほか、1999年にアメリカでECoV NC99株が分離されている [9]。ECoVの血清学的調査に関しては、過去にBCoVを用いた中和試験の結果が報告されているが [10, 11]、おもにサラブレッド種馬群が対象の抗体調査であり、重種馬やポニーなどのサラブレッド種以外の馬群におけるECoVの浸潤状況は明らかにされていない。そこで今回、帯広競馬場の集

団発生時に分離されたECoVを用いた中和試験により、北海道十勝管内のサラブレッド種以外の馬群におけるECoV抗体保有状況の調査を行うとともに、ECoVの株間及びBCoVの抗原性の比較を行ったのでその概要を報告する。

材料及び方法

農場飼養馬血清を用いた調査：1989～2009年に北海道十勝管内の馬飼養農場で採材した重種、北海道和種、ポニー種などの馬血清560検体 (各年14～48検体) を用い、ECoV Tokachi09株を抗原とした血清中和試験を実施した。中和試験はマイクロプレート法により、血清を56℃で30分間非働化後2倍階段希釈し、各希釈液0.05mlに200TCID₅₀に調整したウイルス液を等量加えて37℃で1時間感作後、 2.5×10^5 /mlに調整したHRT18G細胞を各ウェルに0.1ml加え、5%炭酸ガス存在下で37℃5日間培養して細胞変性効果 (CPE) の出現を観察した。なお、細胞の培養、検査血清及びウイルス液の希釈には5%牛胎子血清を含むダルベッコ変法イーグル培地を使用した。CPEを抑制した血清の最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とし、中和抗体価2倍以上を抗体陽性とした。

† 連絡責任者 (現所属)：尾宇江康啓 (北海道宗谷家畜保健衛生所)

〒098-5738 枝幸郡浜頓別町緑ヶ丘8-3

☎ 01634-2-2106 FAX 01634-2-4340

E-mail : one.yasuhiro@pref.hokkaido.lg.jp

競馬場在厩馬血清を用いた調査：2009年8月，2010年8月，2012年3月に採材した帯広競馬場在厩馬の血清6頭分18検体について，ECoV Tokachi09株，ECoV Obihiro12-1株，BCoV Kakegawa株を抗原として，農場飼養馬由来血清と同様の方法で血清中和試験を実施した。

成 績

農場飼養馬血清を用いた調査：抗体陽性率は2004年は31.6%であったが，それ以外の年では84.4～100%であった。各年の幾何平均抗体価（GM値）は2.9～25.4倍であった（表1）。

競馬場在厩馬血清を用いた調査：ECoV Tokachi09

表1 農場飼養馬血清のECoV中和試験成績

採材年	頭数	抗体陽性率	GM値
1989	24	87.5%	7.1
1990	24	95.8%	10.8
1991	26	88.5%	8.8
1992	27	100.0%	11.9
1993	26	100.0%	19.5
1994	22	100.0%	14.3
1995	30	93.3%	7.3
1996	31	100.0%	19.1
1997	27	96.3%	25.4
1998	32	90.6%	11.0
1999	41	87.8%	6.7
2000	14	85.7%	7.6
2001	15	100.0%	14.9
2002	15	93.3%	8.4
2003	31	90.3%	10.6
2004	19	31.6%	2.9
2005	32	84.4%	6.9
2006	48	87.5%	5.2
2007	26	88.5%	7.7
2008	22	100%	9.5
2009	28	89.3%	7.7
計（平均）	560	90.4%	9.3

株を抗原とした中和試験では，いずれの採材時期においても抗体陽性率は100%であり，GM値は90.5倍，40.3倍，2,048倍であった。ECoV Obihiro12-1株を抗原とした中和試験では，抗体陽性率は66.7%，83.3%，100%であり，GM値は40.3倍，16.0倍，2,048倍であった。BCoV Kakegawa株を抗原とした中和試験では，抗体陽性率は50.0%，50.0%，83.3%であり，GM値は10.1倍，2.8倍，16.0倍であった（表2）。

考 察

農場飼養馬血清を用いた調査では，1989年以降，2004年を除くと84.4～100%と高い抗体陽性率を示しており，1989年にはすでにECoVは北海道十勝管内の馬群に広く浸潤していたものと考えられた。なお，2004年の抗体陽性率は31.6%と低値を示したが，2004年12月に帯広競馬場でECoV病が流行しており[4]，馬群の抗体陽性率の低下がECoV病の流行の一因となった可能性が考えられる。

これまで，BCoVを抗原とした抗体検査による馬のコロナウイルス浸潤状況調査が実施されており，Satoら[11]は1975～1977年に日本国内で採材した馬血清（品種は不明）20検体中18検体で抗体陽性であったことを報告している。また，Imagawaら[10]は1988年に北海道，栃木県，宮崎県のサラブレッド種馬群について抗体検査を実施した結果，抗体陽性率は3%，19%及び54%であったと報告している。これらの報告はサラブレッド種を中心とした調査であったが，今回の結果からサラブレッド種以外の馬群においてもECoVが浸潤しているものと考えられる。

競馬場在厩馬血清を用いた調査では，BCoVを抗原とした場合とECoVを抗原とした場合を比較すると，ECoVを抗原とした場合の方が抗体陽性率及びGM値とも高い数値を示した。BCoVとECoVは交差するとされており，上記のようにBCoVを抗原に用いた抗体検査が行われた経緯があるが，BCoVを抗原とした場

表2 競馬場在厩馬血清のECoV及びBCoV中和試験成績

中和抗原	採材年月	中和抗体価						抗体陽性率	GM値
		馬1	馬2	馬3	馬4	馬5	馬6		
ECoV Tokachi09	2009.8	512	4	1,024	32	512	16	100.0%	90.5
	2010.8	64	16	256	16	32	32	100.0%	40.3
	2012.3	2,048	2,048	4,096	2,048	512	4,096	100.0%	2,048.0
ECoV Obihiro12-1	2009.8	512	<2	1,024	<2	256	32	66.7%	40.3
	2010.8	32	2	128	<2	32	64	83.3%	16.0
	2012.3	4,096	1,024	4,096	4,096	256	4,096	100.0%	2,048.0
BCoV Kakegawa	2009.8	32	<2	256	<2	128	<2	50.0%	10.1
	2010.8	4	<2	32	<2	4	<2	50.0%	2.8
	2012.3	2	4	64	128	<2	256	83.3%	16.0

合、すべての抗 ECoV 抗体を検出できなかったものと考えられる。

また、ECoV の株間の GM 値を比較すると、2009 年 8 月及び 2010 年 8 月採材血清は ECoV Tokachi09 株を抗原とした方が高い GM 値を示し、2012 年 3 月採材血清に対して ECoV Tokachi09 株と ECoV Obihiro12-1 株の GM 値は同値を示した。2009 年 8 月及び 2010 年 8 月は、ECoV Tokachi09 株が分離された 2009 年 6 月の集団発生後かつ ECoV Obihiro12-1 株が分離された 2012 年 2 月の集団発生前の材料であることから、前者の発生原因である ECoV Tokachi09 株に対して強く反応したと思われる。筆者ら [2] はアメリカで分離された ECoV NC99 株と ECoV Tokachi09 株の株間において交差中和試験を実施したところ、抗原性に差異があったことを指摘しているが、今回の結果から ECoV Tokachi09 株と ECoV Obihiro12-1 株の株間でも抗原性は若干異なっていた。したがって、ECoV の株間でも、BCoV と同様に抗原性に差があるものと思われる [12]。今後ワクチン開発を視野に入れた本病防疫対策のためにも、さらに詳細な株間の抗原性解析が必要である。

引用文献

- [1] Adams MJ, Carstens EB : Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses, *Arch Virol*, 157, 1411-1422 (2012)
- [2] Oue Y, Ishihara R, Edamatsu H, Morita Y, Yoshida M, Yoshima M, Hatama S, Murakami K, Kanno T : Isolation of an equine coronavirus from adult horses with pyrogenic and enteric disease and its antigenic and genomic characterization in comparison with the NC99 strain, *Vet Microbiol*, 150, 41-48 (2011)
- [3] Zhang J, Guy JS, Snijder EJ, Denniston DA, Timoney PJ, Balasuriya UB : Genomic characterization of equine coronavirus, *Virology*, 369, 92-104 (2007)
- [4] 成田雅子, 信本聖子, 竹田 博, 森山友恵, 森田美範, 中岡祐司 : 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, *日獣会誌*, 64, 535-539 (2011)
- [5] Nemoto M, Oue Y, Morita Y, Kanno T, Kinoshita Y, Niwa H, Ueno T, Katayama Y, Bannai H, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T : Experimental inoculation of equine coronavirus into Japanese draft horses, *Arch Virol*, 159, 3329-3334 (2014)
- [6] Pusterla N, Mapes S, Wademan C, White A, Ball R, Sapp K, Burns P, Ormond C, Butterworth K, Bartol J, Magdesian KG : Emerging outbreaks associated with equine coronavirus in adult horses, *Vet Microbiol*, 162, 228-231 (2013)
- [7] Oue Y, Morita Y, Kondo T, Nemoto M : Epidemic of equine coronavirus at Obihiro racecourse Hokkaido Japan in 2012, *J Vet Med Sci*, 75, 1261-1265 (2013)
- [8] Fielding CL, Higgins JK, Higgins JC, McIntosh S, Scott E, Giannitti F, Mete A, Pusterla N : Disease associated with equine coronavirus infection and high case fatality rate, *J Vet Intern Med*, 29, 307-310 (2014)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] 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)
- [12] Fukutomi T, Tsunemitsu H, Akashi H : Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrheal and their antigenic and biological diversities, *Arch Virol*, 144, 997-1006 (1999)

Serological Survey of Equine Coronavirus Infection in Horses in Hokkaido, Japan

Yasuhiro OUE^{1)†} and Toru KANNO²⁾

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

2) *Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health, 4 Hitsujigaoka, Toyohira, Sapporo, 062-0045, Japan*

SUMMARY

For the serological survey of equine coronavirus (ECoV) infection, 560 equine serum samples collected from the Tokachi area, Hokkaido, Japan from 1989 to 2009 were examined using virus neutralization tests. The results revealed a high prevalence rate (84.4%-100%) of antibodies against ECoV in each year except 2004, indicating that ECoV has been prevalent among horses in the Tokachi area at least from 1989. In addition, a total of 18 serum samples, collected three times from six horses in the stables of the racetrack where the ECoV outbreak had occurred in the past, were examined against two ECoV strains (isolated during the outbreaks at this racetrack) and bovine coronavirus (BCoV) using a neutralization test. The prevalence rate and geometric mean titers of antibodies against ECoV were higher than those of antibodies against BCoV. Furthermore, antigenic differences were also observed between ECoV strains in the neutralization tests.

— Key words : equine coronavirus, neutralization test, serological survey.

† *Correspondence to (Present address) : Yasuhiro OUE (Hokkaido Soya Livestock Hygiene Service Center)*

8-3 Midorigaoka, Hamatonbetsu-cho, Esashi-gun, 098-5738, Japan

TEL 01634-2-2106 FAX 01634-2-4340

E-mail : one.yasuhiro@pref.hokkaido.lg.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 70, 224 ~ 227 (2017)