

## —日本における競走馬医療の現状 (XI)—

## 馬インフルエンザについて

山中隆史<sup>†</sup> (特)日本中央競馬会競走馬総合研究所分子生物研究室主任研究役)

## 1 はじめに

馬インフルエンザ (EI) とは、オルトミクソウイルス科インフルエンザウイルス A 属に分類されるインフルエンザウイルスの感染により引き起こされる馬の急性呼吸器疾患の総称である [1]。飛沫感染により伝染し、その力は非常に強く、短時間の内に多数の馬が感染する。そのため、集約的に飼養管理されている馬群にウイルスが侵入した場合には、競馬開催や馬術競技大会の中止等の大きな被害をもたらす [2, 3]。

A 型インフルエンザウイルスは、エンベロープ表面のスパイク蛋白質であるヘマグルチニン (HA) 及びノイラミニダーゼ (NA) の抗原性状により、亜型に分類される。現在のところ、馬から分離された A 型インフルエンザウイルスは、すべて H7N7 あるいは H3N8 の亜型に分類されている [1]。H7N7 は、1956 年に東欧で初めてウイルスが分離され、それ以降、世界各地で流行した。しかし、最後の馬からのウイルス分離記録は 1978 年であり、現在では、世界の馬群から消失したと考えられている [4]。一方、H3N8 は 1963 年に米国で分離され、それ以降、わずかな例外 (アイスランドやニュージーランド) を除き、世界中の馬群の間で流行を引き起こしながら現在も流行し続けている [5]。現在のところ、馬インフルエンザウイルス (EIV) と呼ばれている亜型は、上記の H7N7 と H3N8 のみである [1, 5]。

## 2 病原体

## (1) H7N7

1956 年にチェコスロバキアで流行した際に、馬から分離されたもの (A/equine/Prague/1/1956) が最初の分離株であり、それ以降、世界中のさまざまな国地域で流行したことが知られている。しかし、1960 年代後半から 1970 年代にかけて、その流行は減少し、1978 年を最後にウイルスは分離されていない。このことから、現在では、H7N7 は馬から消滅したであろうと考えられている [4]。

## (2) H3N8

H3N8 は 1963 年に米国で初めて分離された (A/equine/Miami/1/1963) [6]。それ以降、H3N8 は速やかに北米大陸や欧州の馬の間に伝播し、わずかな例外 (アイスランド及びニュージーランド) を除いて、世界中の馬群の間で流行を引き起こし、現在も流行し続けている。

また、1989 年に中国において、約 30,000 頭の馬が H3N8 に感染し、それらの内、数百頭が死亡したことが報告されている [7]。その流行分離株 (A/equine/Jilin/1/1989) の抗原性状及び遺伝子学的性状の解析によると、先に示した A/equine/Miami/1/1963 由来のものではなく、流行の直近に鳥類から馬に伝播した H3N8 であると考えられている [7, 8]。しかし、幸いなことに、本ウイルス株の馬における流行は 1989 年以後報告されていない。

## 3 感染様式

感染馬が咳嗽などにより、EIV が飛沫状に空気中へ排泄され、それを他の健康な馬が吸い込むことにより感染は拡大する [9]。この際、馬の痰に含まれるムコ多糖類や糖蛋白質に、EIV の HA が結合した場合は、その EIV は痰とともに再び外部に排出される。これに対して、EIV は自身の NA により痰中のムコ多糖類や糖蛋白質を分解し、痰から逃れることが可能である。痰から逃れた EIV は、HA を上皮細胞膜上に存在するシアロ糖鎖からなる受容体に結合させ、その後、宿主細胞側のエンドサイトーシスにより細胞質内に取り込まれる [1, 10, 11]。その後、エンドソーム膜とエンベロープは融合し、ウイルスの遺伝子が細胞質内に放出され、宿主細胞の核内に移動し、ウイルスの蛋白質合成に必要な遺伝子 (メッセンジャー RNA) 及びウイルス自身の RNA が合成される。合成された蛋白質及びウイルス自身の RNA は宿主の細胞膜の近くへ移動し、ウイルスの構造を組み立てて、細胞膜をエンベロープとして出芽し、他の感染可能な宿主細胞へと向かうか、咳嗽などにより外気中へ排泄される。

<sup>†</sup> 連絡責任者：山中隆史 (特)日本中央競馬会競走馬総合研究所分子生物研究室)

〒 329-0412 下野市柴 1400-4 ☎ 0285-44-0090 FAX 0285-40-1064 E-mail : yamanaka@equinst.go.jp

この際、ウイルスのNAは、ウイルスと細胞膜上の受容体との結合を外すことによって、出芽を容易にする働きを担う。ウイルスの複製・出芽サイクルは感染後1～3日以内に行われるとされ、鼻腔からウイルスが排泄され始めるのは感染2～3日後からである [9]。以上に示したウイルスの感染・増殖を受けた呼吸器上皮細胞は、変性壊死を起し、気道や肺胞では蛋白質に富む滲出液が増えるとともに線毛の凝集がみられるようになる [9, 10]。このような線毛構造の破壊は、気道表面のクリアランス能を減じさせ、上部気道の日和見常在菌の下部気道への侵入を容易にし、気管支肺炎などの重篤な合併症を招く原因となる [9, 10, 12]。

#### 4 臨床症状

本症の最も顕著な特徴として、馬群内における有症状馬の急速な増加があげられる。迅速な病原検出法が開発される以前は、この急速な有症状馬の増加が、暫定的な診断の根拠とされてきた [9, 13]。典型的症状は、急な発熱を伴う鼻漏や咳嗽などの呼吸器症状であり、重篤度や有症状期間は、EIVの暴露量、飼養管理及びワクチンや過去の感染による中和抗体の有無により影響を受ける [9, 13]。最初に認められる症状は、通常、発熱であり、本症の潜伏期間は、1～3日間である。鼻汁へのウイルス排泄を認め始める時期は、症状の顕在時期とおおむね一致する。発熱が4日間以上継続した場合や、粘稠性を帯びた鼻汁を認めた場合には、二次的な細菌感染を疑う必要がある [9]。また、発熱中には食欲低下や元気消失がみられる。この食欲低下は、発熱によるものだけでなく、咽頭部の疼痛によるところも大きい。咳嗽は、特に摂食中に発作的に認められることが多く、また、咽頭部を刺激することによっても容易に誘発できる [9]。中和抗体を保有している馬が感染した場合は、症状が軽減するか、あるいは無症状に耐過する [9, 13, 14]。しかし、無症状の馬でも、鼻汁中にEIVを排泄する可能性があることに注意する必要がある [15, 16]。また、死に至ることはほとんどない [9]。この中和抗体を誘導する目的で使用するのが、後述する不活化ワクチンである [17, 18]。

#### 5 診断

##### (1) 臨床診断

上述したとおり、馬群中において、発熱、鼻漏及び咳嗽などの症状を示す個体が、急速に増加することが本症の特徴である。しかし、伝染性の強さでは劣るものの、腺疫、馬ウイルス性動脈炎あるいは馬鼻肺炎などの他の伝染性呼吸器疾患と類似する症状も多く [9, 13]、確定診断のためには、以下に示す病原学的あるいは血清学的診断が必須である。

##### (2) 病原学的診断

EIVは呼吸器で増殖し、鼻腔より馬体の外に排出されることから、鼻腔や鼻咽頭部のスワブを診断材料とすることが一般的である。EIVは熱、乾燥や雑菌による腐敗の影響を受けやすいため、採材直後に輸送培地（例：ブイヨン及び抗生物質を加えたリン酸緩衝液）に浸して、氷等で冷却保存することが重要である。また、臨床症状のところでも述べたように、症状の顕在時期とウイルスの排泄時期が、おおむね一致することから、発症後速やかにスワブ材料を採取することが望ましい。

最近では、人体用インフルエンザウイルス診断キットとして、多くの簡易検査キットが認可・市販されている [19-21]。これらキットのEI診断への応用は、操作の簡便性及び結果が最短で20分程度で得られるという点において、迅速な防疫対応に貢献する。これらのキットのほとんどは、ウイルスの核蛋白質を抗原抗体反応により検出するものであり、A型とB型を区別して判定する。EIVはA型インフルエンザウイルスの1つであり、理論的には、それらキットで検出できるはずである。しかし、それらキットが採用している抗原の捕捉抗体によっては、著しくEIVに対する感度が低い、あるいは皆無といったものもある。それらのキットは、あくまでも人体用に薬事承認を受けたものであり、獣医療において使用することは、いわゆる適応外使用となる。したがって、事前に、いずれのキットが最近のEIV流行株に対して感度が高いのかを調べ、感度や特異度を把握しておくことが重要である。また、たとえEIVの検出限界が最も低いキットであっても（つまり感度が高い）、遺伝子検査（例：RT-PCR、リアルタイムRT-PCR及びRT-LAMP）に比較して、その検出限界は10倍以上高い [19]。さらに、得られる情報が単に陽性か陰性のみであることから、陽性の結果が得られた場合には、速やかに該当馬の隔離などの防疫措置を講じるとともに、遺伝子性状や抗原性状などの詳細な解析のために専門の検査機関に検体を送付することが推奨される。

##### (3) 血清学的診断

本診断は、当該馬の急性期と慢性期における組血清を採取し、血清中の抗体価の上昇をもって感染の証拠とするものである [22]。また、上述した分離ウイルスの同定にも応用される。本診断による組血清間での抗体価の上昇は、感染の証拠となるが、最短でも2週間は空けて組血清を採取する必要がある。EIVの急速な流行拡大には対応できないことが欠点である。EIVの血清学的診断法としては、血球凝集抑制試験、ウイルス中和試験及び一元放射溶血試験などがある [22]。

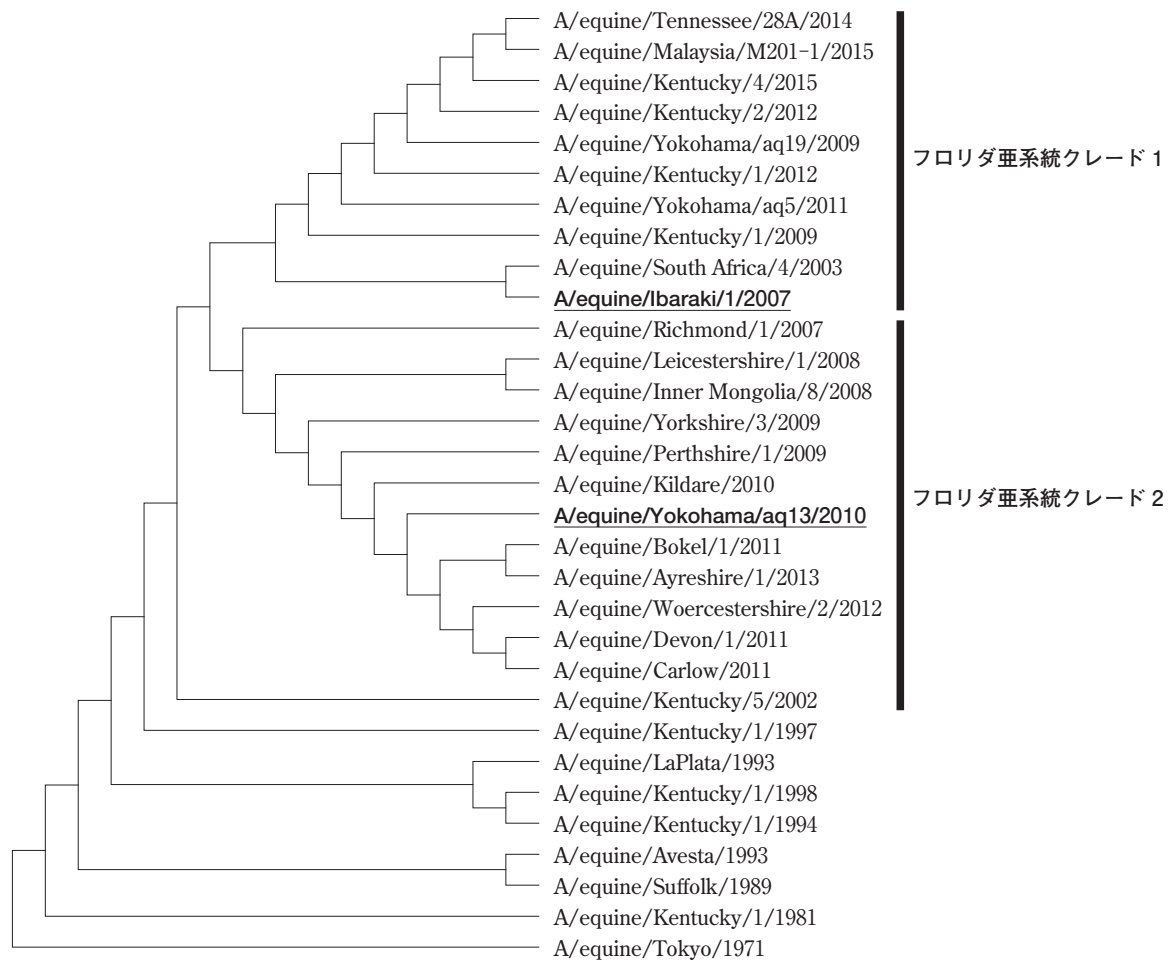


図 過去10年以上、フロリダ亜系統に分類されるEIVのみが分離されており、クレード1はアメリカ大陸及びクレード2はユーラシア大陸を中心に流行している。日本製不活化ワクチンは、両クレードのEIV株（下線付）を含む2価ワクチンである [25]。

## 6 治療

対症療法がほとんどであるが、長期間の発熱や粘稠性を帯びた鼻汁の漏出を認めた場合は、細菌感染の可能性を考慮して抗生物質を投与すべきである。鎮咳薬の投与は、滲出液の気道からの排泄を阻害するおそれがあり禁忌とされている。また、よく換気された塵埃の少ない環境で休養させることが望ましい。人体用として医療用に認可されているNA阻害薬（オセルタミビルやペラミビル）の投与が、臨床症状の軽減及びウイルス排泄期間の短縮に寄与することが実験的に示されているが [23, 24]、現在のところ、一般的とはいえない。

## 7 予防（ワクチン接種）

日本において入手可能なEIワクチンは、ホルマリンにより不活化された全粒子ワクチンである [25, 26]。不活化されたEIV粒子を皮下（筋肉内）に注射することにより、馬体内でEIVに対する中和抗体が産生される。中和抗体のほとんどを占めるものは、ウイルスの血

球凝集（HA）反応を阻害する抗体であり血球凝集抑制（HI）抗体と呼ばれている [27]。EIVの感染防御や症状の程度は、EIVへの暴露時に、馬が保有している中和抗体の有無により変化する [28]。したがって、あらかじめワクチン接種で馬に中和抗体を賦与させておくことで、EIVの暴露を受けた際の馬体への影響を減少させることが可能となる。しかし、ワクチン接種により無症状に耐過する馬であっても、鼻腔よりEIVを排泄する可能性があることに注意が必要である [14, 15]。

EIワクチンは、特に若齢馬において免疫原性が低く、十分な免疫を獲得させるためには頻回の接種が必要である [29]。そこで日本では、1歳の1～3月に1カ月間隔での基礎接種、そして5～6月頃に1回目の補強接種、それ以後6カ月ごとに補強接種を実施する方法が、軽種馬防疫協議会により推奨されている [26]。また、約6カ月齢までは、ワクチンを接種しても、残存している母馬からの移行抗体により、中和抗体の産生が阻害されることが知られており注意が必要である [29]。

EIVは他のA型やB型インフルエンザウイルスと同

様に、自身の遺伝子を複製する際に必要な RNA ポリメラーゼの複製エラーの頻度が高い [1, 30]. このことから、宿主動物が中和抗体を保有するようになると、RNA 遺伝子に抗体の圧力から逃れるような変異をもつ子ウイルスが選択され、親ウイルスに置き換わる. このような現象は、抗原変異と呼ばれ、ワクチン接種の効果を減少させる原因となる [30]. このことから、ワクチン効果を維持するためには、常に流行株とワクチン株との抗原性について調査し、必要に応じてワクチン株を変更する必要がある. 日本では、1972 年の EI ワクチンの使用開始以降、5 回、ワクチン株の組成が変更されてきた [25, 31]. 日本の場合、1971~1972 年及び 2007~2008 年の 2 回、EI の流行を経験してきたが、現在は清浄国の一つである (2017 年 5 月時点). 清浄国の中には、豪州やニュージーランドのように、ワクチンを接種しない国も存在する [32]. しかし、日本は、EIV が流行している欧州や北米大陸より馬を頻繁に輸入しており、2000~2008 年にかけての日本での流行以降にも、しばしば、EIV が動物検疫所において摘発されている [33]. このことは、日本への EIV の侵入リスクが現在も継続していることを示しており、今後も海外からの EIV の侵入に備えた国内馬へのワクチン接種の必要性を示唆している.

海外では、毎年、国際獣疫事務局 (OIE) のリファレンスラボラトリーが、各国 (地域) のデータを持ち寄り、当該年のワクチン製造用推奨株の選定について議論している (Expert Surveillance Panel on Equine Influenza, 以下 ESP) [34]. 一方、日本では、ESP で議論された内容や日本独自のデータをもとに、以下に述べる動物用インフルエンザワクチン株選定委員会において、日本製ワクチンの株選定に関する議論が行われている [31]. 2010 年より以前においては、馬用を含む動物用インフルエンザワクチンの株変更には、動物用生物学的製剤基準に基づく長期間にわたる試験及び手続きを要し、迅速な株変更が困難であった. しかし、2011 年に「動物用インフルエンザワクチン国内製造用株選定委員会」(事務局：農林水産省動物医薬品検査所) が立ち上げられ、製造用株の決定・開発から市場への供給までの期間が短縮されている [31]. 現在 (2017 年 5 月時点) の日本製不活化ワクチンに含まれている株 (A/equine/Ibaraki/1/2007 及び A/equine/Yokohama/aq13/2010) を遺伝子系統樹により示す (図). ちなみに、フロリダ亜系統クレード 2 に分類される A/equine/Yokohama/aq13/2010 は、動物検疫所において、ベルギーから輸入された馬から得られたものである [33].

## 8 終わりに

日本は、四方を海に囲まれており、検疫を経ずして海

外から馬が移動してくることは考えにくい. しかし、過去に 2 回、それをすり抜けて、国内における EI の流行を経験していることは事実である. 一義的には、感度の高い診断法により水際で侵入を阻止することが重要である. また、さらに、侵入を許した場合においても、被害を最小限にとどめるため、ワクチン接種を励行し、最新の流行株に対する有効な中和抗体を、あらかじめ国内の馬群に賦与しておくことも重要である. これらのためには、流行地域における EI 流行株の性状について、最新の情報を収集し、国内で採用されている診断法やワクチン製造用株が、どの程度機能するのかを定期的に見直しおくことが不可欠である.

## 参 考 文 献

- [1] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y : Evolution and ecology of influenza A viruses, *Microbiol Rev*, 56, 152-179 (1992)
- [2] Yamanaka T, Niwa H, Tsujimura K, Kondo T, Matsumura T : Epidemic of equine influenza among vaccinated racehorses in Japan in 2007, *J Vet Med Sci*, 70, 623-625 (2008)
- [3] Powell DG, Watkins KL, Li PH, Shortridge KF : Outbreak of equine influenza among horses in Hong Kong during 1992, *Vet Rec*, 136, 531-536 (1995)
- [4] Webster RG : Are equine 1 influenza viruses still present in horses?, *Equine Vet J*, 25, 537-538 (1993)
- [5] Cullinane A, Newton JR : Equine influenza—A global perspective, *Vet Microbiol*, 167, 205-214 (2013)
- [6] Wilson JC, Bryans JT, Doll ER : Recovery of influenza virus from horses in the equine influenza epizootic of 1963, *Am J Vet Res*, 26, 1466-1468 (1965)
- [7] Guo Y, Wang M, Kawaoka Y, Gorman O, Ito T, Saito T, Webster RG : Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China, *Virology*, 188, 245-255 (1992)
- [8] Webster RG, Guo YJ : New influenza virus in horses, *Nature*, 351, 527 (1991)
- [9] Wilson WD : Equine influenza, *Vet Clin North Am Equine Pract*, 9, 257-282 (1993)
- [10] Muranaka M, Yamanaka T, Katayama Y, Niwa H, Oku K, Matsumura T, Oyamada T : Time-related pathological changes in horses experimentally inoculated with equine influenza A virus, *J Equine Sci*, 23, 17-26 (2012)
- [11] Muranaka M, Yamanaka T, Katayama Y, Hidari K, Kanazawa H, Suzuki T, Oku K, Oyamada T : Distribution of influenza virus sialoreceptors on upper and lower respiratory tract in horses and dogs, *J Vet Med Sci*, 73, 125-127 (2011)
- [12] Sarasola P, Taylor DJ, Love S, McKellar QA : Secondary bacterial infections following an outbreak of equine influenza, *Vet Rec*, 131, 441-442 (1992)
- [13] van Maanen C, Cullinane A : Equine influenza virus infections: an update, *Vet Q*, 24, 79-94 (2002)
- [14] Yamanaka T, Nemoto M, Bannai H, Tsujimura K,

- Kondo T, Matsumura T, Gildea S, Cullinane A : Assessment of antigenic difference of equine influenza virus strains by challenge study in horses, *Influenza Other Respir Viruses*, 10, 536–539 (2016)
- [15] Newton JR, Townsend HG, Wood JL, Sinclair R, Hannant D, Mumford JA : Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8), *Equine Vet J*, 32, 65–74 (2000)
- [16] Gildea S, Fitzpatrick DA, Cullinane A : Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010–2012), *Influenza Other Respir Viruses*, 7 Suppl 4, 61–72 (2013)
- [17] Mumford J, Wood JM, Scott AM, Folkers C, Schild GC : Studies with inactivated equine influenza vaccine. 2. Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Newmarket/79 (H3N8), *J Hyg (Lond)*, 90, 385–395 (1983)
- [18] Wood JM, Mumford J, Folkers C, Scott AM, Schild GC : Studies with inactivated equine influenza vaccine. 1. Serological responses of ponies to graded doses of vaccine, *J Hyg (Lond)*, 90, 371–384 (1983)
- [19] Yamanaka T, Nemoto M, Bannai H, Tsujimura K, Kondo T, Matsumura T, Gildea S, Cullinane A : Evaluation of twenty-two rapid antigen detection tests in the diagnosis of Equine Influenza caused by viruses of H3N8 subtype, *Influenza Other Respir Viruses*, 10, 127–133 (2016)
- [20] Chambers TM, Shortridge KF, Li PH, Powell DG, Watkins KL : Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay, *Vet Rec*, 135, 275–279 (1994)
- [21] Yamanaka T, Tsujimura K, Kondo T, Matsumura T : Evaluation of antigen detection kits for diagnosis of equine influenza, *J Vet Med Sci*, 70, 189–192 (2008)
- [22] Chambers TM, Reedy SE : Equine influenza serological methods, *Methods Mol Biol*, 1161, 411–422 (2014)
- [23] Yamanaka T, Tsujimura K, Kondo T, Hobo S, Matsumura T : Efficacy of oseltamivir phosphate to horses inoculated with equine influenza A virus, *J Vet Med Sci*, 68, 923–928 (2006)
- [24] Yamanaka T, Bannai H, Nemoto M, Tsujimura K, Kondo T, Muranaka M, Hobo S, Minamijima YH, Yamada M, Matsumura T : Efficacy of a single intravenous dose of the neuraminidase inhibitor peramivir in the treatment of equine influenza, *Vet J*, 193, 358–362 (2012)
- [25] Gamoh K, Nakamura S : Update of inactivated equine influenza vaccine strain in Japan, *J Vet Med Sci*, 79, 649–653 (2017)
- [26] Yamanaka T, Bannai H, Nemoto M, Tsujimura K, Kondo T, Matsumura T : Antibody responses induced by Japanese whole inactivated vaccines against equine influenza virus (H3N8) belonging to Florida sublineage clade2, *J Vet Med Sci*, 73, 483–485 (2011)
- [27] Wilson JC : Comparison of HI antibody response in horses vaccinated with vaccines prepared with A-2-equi-Alfort-65 and A-2-equi-Miami-63 influenza viruses, *Cornell Vet*, 59, 29–34 (1969)
- [28] Mumford JA, Wood JM, Folkers C, Schild GC : Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Miami/63 (H3N8) provided by inactivated whole virus vaccines containing homologous virus, *Epidemiol Infect*, 100, 501–510 (1988)
- [29] Cullinane A, Weld J, Osborne M, Nelly M, McBride C, Walsh C : Field studies on equine influenza vaccination regimes in thoroughbred foals and yearlings, *Vet J*, 161, 174–185 (2001)
- [30] Elton D, Cullinane A : Equine influenza: antigenic drift and implications for vaccines, *Equine Vet J*, 45, 768–769 (2013)
- [31] Gamoh K, Nakamura S : Introduction of an update system for vaccine strains of veterinary influenza vaccines in Japan, *Biologicals*, 43, 150–152 (2015)
- [32] Gilkerson JR : Equine influenza in Australia: a clinical overview, *Aust Vet J*, 89 Suppl 1, 11–13 (2011)
- [33] Motoshima M, Okamatsu M, Asakura S, Kuribayashi S, Sengee S, Batchuluun D, Ito M, Maeda Y, Eto M, Sakoda Y, Sodnomdarjaa R, Kida H : Antigenic and genetic analysis of H3N8 influenza viruses isolated from horses in Japan and Mongolia, and imported from Canada and Belgium during 2007–2010, *Arch Virol*, 156, 1379–1385 (2011)
- [34] OIE, OIE Expert Surveillance Panel on Equine Influenza Vaccine Composition, Office International des Epizooties Bulletin, 2, 44–45 (2013)