

## 馬 コロナ ウ イ ル ス 感 染 症

根本 学<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査)

## 1 はじめに

馬と馬コロナウイルス (Equine coronavirus : ECoV) に関する報告は1975年が初めてである [1]. この報告では40頭以上の子馬が下痢を発症し、そのうち3頭の馬の糞便を電子顕微鏡で調べたところ、コロナウイルス様粒子が検出されている。しかしこの報告以降、長期間に亘って ECoV の流行はなく、また馬へのコロナウイルスの感染は疑われるものの、病気への関与を強く示唆する報告はなかった。2000年に Guyら [2] は、アメリカのノースカロライナ州の子馬の下痢便から初めて ECoV NC99 株の分離に成功し、ECoV が下痢に関与することを報告した。この報告以降、日米で ECoV 感染症の流行がいくつか報告されている。日本においては3回、そしてアメリカにおいては2011年以降多くの流行が発生している。本稿では、ECoV 感染症の各国の発生状況、症状や診断法等について解説する。また最後に、中東を中心に大きな問題となっている中東呼吸器症候群コロナウイルス (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus : MERS-CoV) の馬への感染について、最近の知見を簡単にまとめる。

## 2 病 原 体

ECoV は、エンベロープを持つ、プラス鎖の RNA ウィルスであり、*Coronaviridae* 科、*Betacoronavirus* 属、*Betacoronavirus 1* に分類される [3]。同じグループには牛コロナウイルス、ヒトコブラクダコロナウイルス HKU23、豚血球凝集性脳脊髄炎ウイルスなどが分類される。コロナウイルスは RNA ウィルスの中でも長いゲノムを持ち、これまでに分離されている4株は30,782~30,992bpである [4, 5]。なお後述する MERS-CoV は、*Betacoronavirus* 属ではあるが、ECoV とは別の種に分類される。系統樹解析からわかるように、ECoV はほかの *Betacoronavirus 1* のウィルスから独立したクラスターを形成しており (図1)、馬固有のコロナウイ

ルスであるといえる。

## 3 臨 床 症 状

日米の ECoV 感染症の流行で認められたおもな臨床症状は、発熱、食欲不振、元気消失及び消化器症状であり、消化器症状は発熱等の症状を示した馬の1~3割で観察された (図2) [6-8]。感染実験においても上記の症状が再現されている [9]。ECoV は年齢に関係なく感染し、1~29歳までの馬が症状を示した [6-8]。日本では2012年流行時に発熱馬9頭中7頭において白血球減少症が観察され [7]、またアメリカでは73頭の有症状馬のうち、25%で白血球減少症、66%で好中球減少症、そして72%でリンパ球減少症が観察されている [10]。感染実験において、症状を示した個体では炎症マーカーである血清アミロイド A が症状に合わせて上昇し、また白血球減少症を示す個体もいた [9]。以上より、血清アミロイド A 及び白血球数は病態把握に有用であると考えられる。予後は基本的に良好であり、対症療法によりほとんどの馬が発症後2~4日で快復した [7]。しかしアメリカにおいて、ECoV 感染馬がび慢性壊死性腸炎や高アンモニア血症に伴う脳症を示す、死亡率の高い流行が報告されており、注意が必要である [11, 12]。

感染馬は糞便中に大量のウィルスを排出し、感染実験では9日間以上 [9]、またアメリカでの野外感染例では、最長25日間糞便中からウィルス遺伝子が検出された [10]。糞便中にウィルスを大量に、かつ長期間に亘り排出することから、糞便が感染源として重要であり、感染ルートは糞口感染であると考えられる。さらに、感染実験で症状を示さなかった個体でも、発症馬と同程度の量及び期間、ウィルスを排出していたことから、不顕性感染馬も感染源として重要である [9]。

<sup>†</sup> 連絡責任者：根本 学 (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 : nemoto\_manabu@equinst.go.jp

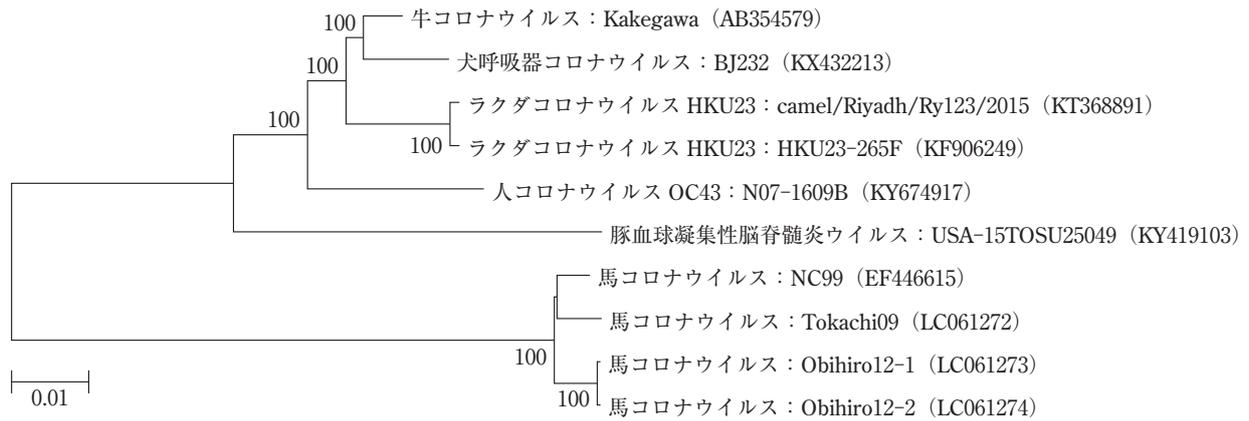


図1 馬コロナウイルスを含めた *Betacoronavirus 1* の全ゲノム配列を用いた系統樹解析. 解析は MEGA7 を用いて [27], 近隣結合法にて実施した.



図2 2012年日本での流行時に観察された消化器症状

#### 4 各国の発生状況

##### (1) 日本

日本では、これまでにばんえい競馬場の重種馬群において ECoV の流行が3回報告されている。各流行時期は、2004年12月～2005年3月 [13], 2009年6～8月 [6], 及び2012年2～4月 [7] であった。3回の流行において症状を示した馬は、競馬場在厩頭数の2～3割 (132～204頭) であり ECoV の伝染力は強い。2009年流行時には1株 (Tokachi09株), 2012年流行時には2株 (Obihiro12-1 及び Obihiro12-2株) が分離されている。ウイルス遺伝子の解析により、p4.7～p12.7 遺伝子領域においてウイルス株間で多様性が認められた [4-7]。アメリカで分離された NC99 株の同遺伝子領域と比較して、Tokachi09 株では 185bp の欠失, Obihiro12-1 及び Obihiro12-2 株では 40bp の欠失が確認されている。この結果より、2009年と2012年の流行は異なる ECoV が原因であったと考えられる。

上述したように、重種馬群において ECoV 感染症の流行の報告はあるものの、これまでにサラブレッド馬群

における流行の報告はない。近年のサラブレッド馬群における疫学状況は不明であったことから、北海道日高地方の子馬の直腸スワブを用いた疫学調査が実施されている [14]。リアルタイム RT-PCR 法及び RT-LAMP 法にて ECoV 遺伝子の検出を行ったところ、2012～2014年に消化器症状を示した子馬から採取された337検体すべてが陰性、そして2012年に健康馬から採取された120検体中3検体 (2.5%) が ECoV 遺伝子陽性であった。以上のことから、2012～2014年の北海道日高地方のサラブレッド子馬において、ECoV はまん延しておらず、かつ ECoV が消化器症状を引き起こしていないことが明らかとなった。しかし、競走期のサラブレッド馬群における疫学状況は不明のため、今後の調査が必要である。

##### (2) アメリカ

ECoV は全米各地で検出されており、新興感染症として注目されている。アメリカにおける3カ所の検査施設の結果から、2010年以降陽性数が増えており、特に10月から4月の寒い時期に陽性数が多いことが明らかと

なっている [10]. 2011年11月～2014年12月にかけて少なくとも16回の流行が確認され、406頭中122頭(30%)が症状を示した. 上述したように、ECoV感染症の流行時の死亡率は一般的に低いが、ECoV陽性馬15頭中4頭(27%)が死亡または安楽殺となった死亡率が高い流行も報告されている [11, 12]. この流行は、管理馬がテキサス州で開催されたミニチュアホースショーに参加後、カリフォルニア州またはアイダホ州の牧場に戻り、それぞれの牧場でECoV感染症の流行が発生した. この流行で死亡した4頭中2頭(1頭はロバ)では、病理組織学的検索により、び慢性壊死性腸炎が観察された. 3頭目は発熱、痙攣、食欲不振に加え、神経症状を示し、死亡した. この馬は高アンモニア血症を示し、大脳皮質において高アンモニア血症によって引き起こされたと考えられるアルツハイマーII型グリアが確認された. 4頭目はヘマトクリット値が急激に減少し、口腔粘膜及び舌に潰瘍を認め、死亡した. これらの死亡例から、ECoVがび慢性壊死性腸炎及び高アンモニア血症に伴う脳症と関連していると考えられる. 他の流行と比較して死亡率が高かった理由は不明であり、原因ウイルスの詳細な解析が望まれる.

サラブレッド生産で世界的に有名なケンタッキー州中央部において、サラブレッド子馬(2日齢～17週齢)の糞便を用いた疫学調査成績が報告されている [15]. この報告では消化器症状を示した馬から採取された51検体、及び健康馬から採取された37検体を用いている. リアルタイムRT-PCR法にてECoV遺伝子の検出を行ったところ、消化器症状を示した馬の15検体(29%)、及び健康馬の10検体(27%)がECoV遺伝子陽性であり、症状の有無による有意差はなかった. ECoV陽性であった有症状馬の検体からはECoV以外に、*Cryptosporidium* spp., 馬ロタウイルス、サルモネラ等の消化器症状と関連する病原体も、全15検体から検出された. 一方、ECoV陽性であった健康馬の検体10検体中8検体からはECoV以外の病原体は検出されなかった. 以上のことから、ECoVは単独ではなく他の病原体と共感染、相互作用し、子馬に病気を引き起こすのかもしれない. またこの報告から、日本の主要なサラブレッド生産地である日高地方とは異なり、ケンタッキー州中央部ではECoVが広くまん延していると考えられる.

ECoVと近縁な牛コロナウイルスは、消化器症状に加え、呼吸器症状も引き起こすことから、ECoVも呼吸器症状と関連することが考えられる. そこでPusterlaらは、発熱または呼吸器症状を示した馬から採取された2,437検体の鼻汁を用いて、リアルタイムRT-PCR法にてECoV遺伝子検出を行った [16]. その結果、わずか17検体(0.7%)がECoV遺伝子陽性であった. 後述するフランスでの調査においても、呼吸器検体からの

ECoV陽性率は非常に低いことから(0.5%)、ECoVは牛コロナウイルスとは異なり呼吸器へは感受性が低く、呼吸器症状との親和性が低いと考えられる.

### (3) フランス

欧州では、フランスにおける疫学調査の報告がある [17]. 2011～2012年冬季に採取された395検体の糞便、及び200検体の呼吸器検体を用いて、リアルタイムRT-PCR法にてECoV遺伝子の検出を試みている. 検体は呼吸器症状や消化器症状を示した馬から採取されたものであった. 結果、糞便395検体中11検体、呼吸器検体200検体中1検体が陽性であった. この調査によって欧州においてもECoVが存在することが確認されたが、ECoVの流行はこれまで報告されていない.

### (4) サウジアラビア及びオマーン

サウジアラビア及びオマーンにおいて、2014年2月～2015年1月にかけて1歳以上の臨床上健康な馬から306検体の鼻腔スワブ及び315検体の直腸スワブが採取され、ECoVを含むコロナウイルスを広く検出するRT-PCR法、及びMERS-CoVを検出するRT-PCR法が実施された [18]. その結果、サウジアラビアで採取された5検体の直腸スワブがECoV陽性であり、直腸スワブ及び鼻腔スワブそれぞれ1検体がヒトコブラクダに感染するHKU23陽性であった. また鼻腔及び直腸スワブはすべてMERS-CoV陰性であった. なおオマーンで採取された検体はすべてコロナウイルス陰性であった. HKU23が検出された農場では、馬がラクダ、ヒツジ等と頻繁に接触していた. HKU23が馬に感染するか、それともラクダとの接触により馬から偶発的に検出されたのかについては、今後検討の必要がある. この調査によってオマーンではECoVが確認されなかったが、サウジアラビアにおいてはECoVが循環していることが明らかとなった.

以上のように数は少ないものの、各国の疫学調査から、国・地域によってECoVの浸潤状況が大きく異なることが明らかとなっている. 今後さまざまな国・地域で疫学調査が実施され、ECoVの浸潤状況がさらに明らかになることを期待したい.

## 5 診 断 法

ECoVの診断法には、ウイルス分離、電子顕微鏡による観察、血清診断法、及び遺伝子診断法がある. ウイルス分離は人直腸ガン由来のHRT-18G細胞を用いて実施されるが、これまでに4株しか分離報告がないように非常に難しい. 電子顕微鏡による観察は、直接ウイルスを観察できることから有用であるが非常に高価な機

器を必要とする。以上のことから、ウイルス分離及び電子顕微鏡による観察は一般的な診断法とはならない。また血清診断法として、中和試験法及びELISA法があげられる。ELISA法は近年開発され、アメリカにおいて多検体を用いたサーベイランスに用いられている [19, 20].

遺伝子診断法には、リアルタイム RT-PCR法 [8, 17], 電気泳動が必要な通常の RT-PCR法 [6], 及び RT-LAMP法 [21] がある。これら3つの遺伝子診断法の検出感度は、リアルタイム RT-PCR法, RT-LAMP法, そして通常の RT-PCR法の順に高感度である [21]。ウイルス分離等の診断法と比較し、高感度及び簡便であることから遺伝子診断法が用いられることが多く、特にリアルタイム RT-PCR法が ECoV の検出に用いられることが多い。

## 6 MERS-CoV と馬

MERS-CoV は2012年にサウジアラビアで発生が報告された新興感染症であり、人が感染すると重い呼吸器症状を示し、致死率が高い [22]。ヒトコブラクダがウイルスの感染源として重要と考えられており、ヒトコブラクダから人へ感染することが報告されている [23]。ヒトコブラクダ以外の動物が感染源となる可能性があるため、精力的に研究されており、馬についても研究されている。以下に述べるこれまでの研究から、馬は MERS-CoV に対して感受性が低く、感染源にはならないと考えられる。

これまでに MERS-CoV の馬への感染実験が2つ報告されている [24, 25]。Adneyらは4頭に対して  $1.4 \times 10^6 \sim 1.9 \times 10^6$  plaque-forming units 量のウイルスを、Vergara-Alertらは8頭に対して  $10^7$  50% tissue culture infectious dose 量のウイルスを経鼻接種したが、どちらも顕著な臨床症状を示さず、かつ抗体価の上昇も観察されなかった。後者の実験ではウイルス接種4日後の鼻腔呼吸上皮を組織学的に検索しているが、免疫組織化学及び *in situ* ハイブリダイゼーション法ともに MERS-CoV 陰性であった。

また野外調査は、UAE 及びスペインにおける血清疫学調査 [26], 及び上述したサウジアラビア及びオマーンにおいて臨床検体を用いたウイルス遺伝子検出が試みられている [18]。血清疫学調査は、UAE における MERS-CoV 流行地域及び非流行地域の成馬から採取された 192 検体、及びスペインの馬、ロバ及びラバから採取された 861 検体を用いて行われた。その結果、UAE 及びスペインにおいて、過去に MERS-CoV にウマ科動物が感染した証拠は得られなかった。繰り返しになるが、サウジアラビア及びオマーンにおいて採取された 306 検体の鼻腔スワブ及び 315 検体の直腸スワブに

ついては、すべての検体が MERS-CoV 陰性であった。以上の研究結果より、馬は MERS-CoV に対して感受性が低いと考えられる。

## 参 考 文 献

- [1] Bass EP, Sharpee RL : Coronavirus and gastroenteritis in foals, *Lancet*, 2, 822 (1975)
- [2] 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)
- [3] de Groot RJ, Baker SC, Baric R, Enjuanes L, Gorbaleyna AE, Holmes KV, Perlman S, Poon L, Rottier PJM, Talbot PJ, Woo PCY, Ziebhunhr J : *Coronaviridae*, Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses, King AMQ, et al., eds, 806-828, Elsevier Academic Press, London (2011)
- [4] Zhang J, Guy JS, Snijder EJ, Denniston DA, Timoney PJ, Balasuriya UB : Genomic characterization of equine coronavirus, *Virology*, 369, 92-104 (2007)
- [5] Nemoto M, Oue Y, Murakami S, Kanno T, Bannai H, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T : Complete genome analysis of equine coronavirus isolated in Japan, *Arch Virol*, 160, 2903-2906 (2015)
- [6] 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)
- [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] 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)
- [9] 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)
- [10] Pusterla N, Vin R, Leutenegger C, Mittel LD, Divers TJ : Equine coronavirus: An emerging enteric virus of adult horses, *Equine Vet Educ*, 28, 216-223 (2015)
- [11] 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 (2015)
- [12] Giannitti F, Diab S, Mete A, Stanton JB, Fielding L, Crossley B, Sverlow K, Fish S, Mapes S, Scott L, Pusterla N : Necrotizing enteritis and hyperammonemic encephalopathy associated with equine coronavirus infection in equids, *Vet Pathol*, 52, 1148-1156 (2015)

- [13] 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)
- [14] Nemoto M, Oue Y, Higuchi T, Kinoshita Y, Bannai H, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T : Low prevalence of equine coronavirus in foals in the largest thoroughbred horse breeding region of Japan, 2012-2014, *Acta Vet Scand*, 57, 53 (2015)
- [15] Slovis NM, Elam J, Estrada M, Leutenegger CM : Infectious agents associated with diarrhoea in neonatal foals in central Kentucky: a comprehensive molecular study, *Equine Vet J*, 46, 311-316 (2014)
- [16] Pusterla N, Holzenkaempfer N, Mapes S, Kass P : Prevalence of equine coronavirus in nasal secretions from horses with fever and upper respiratory tract infection, *Vet Rec*, 177, 289 (2015)
- [17] Miszczak F, Tesson V, Kin N, Dina J, Balasuriya UB, Pronost S, Vabret A : First detection of equine coronavirus (ECoV) in Europe, *Vet Microbiol*, 171, 206-209 (2014)
- [18] Hemida MG, Chu DKW, Perera RAPM, Ko RLW, So RTY, Ng BCY, Chan SMS, Chu S, Alnaeem AA, Alhammad MA, Webby RJ, Poon LL, Balasuriya UBR, Peiris M : Coronavirus infections in horses in Saudi Arabia and Oman, *Transbound Emerg Dis*, 64, 2093-2103 (2017)
- [19] Kooijman LJ, Mapes SM, Pusterla N : Development of an equine coronavirus-specific enzyme-linked immunosorbent assay to determine serologic responses in naturally infected horses, *J Vet Diagn Invest*, 28, 414-418 (2016)
- [20] Kooijman LJ, James K, Mapes SM, Theelen MJ, Pusterla N : Seroprevalence and risk factors for infection with equine coronavirus in healthy horses in the USA, *Vet J*, 220, 91-94 (2017)
- [21] Nemoto M, Morita Y, Niwa H, Bannai H, Tsujimura K, Yamanaka T, Kondo T : Rapid detection of equine coronavirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, *J Virol Methods*, 215-216, 13-16 (2015)
- [22] Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA : Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia, *N Engl J Med*, 367, 1814-1820 (2012)
- [23] Azhar EI, El-Kafrawy SA, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Hashem AM, Madani TA : Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus, *N Engl J Med*, 370, 2499-2505 (2014)
- [24] Adney DR, Brown VR, Porter SM, Bielefeldt-Ohmann H, Hartwig AE, Bowen RA : Inoculation of goats, sheep, and horses with MERS-CoV does not result in productive viral shedding, *Viruses*, 8, 230 (2016)
- [25] Vergara-Alert J, van den Brand JM, Widagdo W, Muñoz M 5th, Raj S, Schipper D, Solanes D, Cerdón I, Bensaid A, Haagmans BL, Segalés J : Livestock susceptibility to infection with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, *Emerg Infect Dis*, 23, 232-240 (2017)
- [26] Meyer B, Garcia-Bocanegra I, Wernery U, Wernery R, Sieberg A, Muller MA, Drexler JF, Drosten C, Eckertle I : Serologic assessment of possibility for MERS-CoV infection in equids, *Emerg Infect Dis*, 21, 181-182 (2015)
- [27] Kumar S, Stecher G, Tamura K : MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol Biol Evol*, 33, 1870-1874 (2016)