

## 学 位 論 文 要 旨

氏名：上林 義範

題 目：**Studies on the Epidemiology and Clinicopathology of Equine Coronavirus Infection**  
(ウマコロナウイルス感染症の疫学及び臨床病理学的性状に関する研究)

論文要旨：

Equine coronavirus (ECoV) causes fever, anorexia, lethargy, and diarrhea in horses. ECoV is shed in the feces of infected horses and transmitted via the fecal-oral route. Since 2000, several outbreaks of ECoV infection have been reported around the world. In Japan, three ECoV outbreaks among draft horses have been reported so far. However, to the best of my knowledge, there has been no report involving other equine breeds such as Thoroughbreds. Although one study shows the prevalence of ECoV among Thoroughbred foals in Japan, the prevalence among Thoroughbred yearlings and racehorses has not been reported. Previous pathological studies have shown that ECoV has a strong intestinal tropism, while the distribution of the virus through the intestinal tracts in infected horses has not been studied. Moreover, whether ECoV infects the respiratory tract like other coronaviruses (CoVs) is still unclear. Thus, the knowledge of epidemiological and pathological characteristics of ECoV infection has not been well established, especially in Thoroughbreds in Japan. This series of studies was conducted to elucidate them, and the following findings have been obtained.

In CHAPTER 1, the author describes an outbreak of ECoV infection that occurred in 41 riding horses comprised of various breeds including Thoroughbreds. In this outbreak, 15 horses were affected, but they recovered within a few days. The virus neutralization test showed that all horses in this premise were infected with ECoV. qPCR showed that the longest viral shedding period was 98 days, which was recorded in a horse without clinical signs. There was also a significant difference in the viral shedding period between Thoroughbreds and non-Thoroughbreds. These results suggest that subclinical horses can play an important role as spreaders of ECoV and that there may be a potential difference in the persistence of ECoV among horse breeds. A genome sequence analysis showed that the nucleotide length from *p4.7* to *p12.7* genes or the length of *NS2* of the current virus differed from those of previously detected ECoVs, suggesting that this outbreak was caused by a different virus from that of previous outbreaks in Japan.

In CHAPTER 2, serosurveillance of ECoV was performed in the population of Thoroughbred yearlings and racehorses in Japan using series of sera collected at intervals of several months. The ECoV infection in the yearlings occurred predominantly during the first few months after introduction to the farm, which might be due to the close contact of the

horses in their pastures. In the racehorses, the infection rate was significantly higher between November and the following May than between the preceding April/May and November. Since racehorses do not have the same opportunities as yearlings for close contact with other horses, this result should reflect the seasonal nature of ECoV. Several of the infected yearlings developed a fever during the estimated period of infection, while only one infected racehorse presented with fever. This study shows that ECoV is commonly prevalent in the Japanese Thoroughbred population and that ECoV infection is more likely to spread during cold months. In addition, the relatively high morbidity rate in the yearlings suggests an association of ECoV infection with pyretic cases to some extent, whereas this was not the case in the racehorses. However, no diseased horses were severely affected in either population, therefore, the potential risk of ECoV infection to the equine industry in Japan is considered low.

In CHAPTER 3, the infection site of ECoV and pathological findings in the intestinal and respiratory tissues were investigated in four horses that were experimentally infected with ECoV. Two horses showed fever but were not severely affected, and no horses presented with diarrhea. The histological evaluation showed villous atrophy, detachment of epithelial cells and accumulation of macrophages in the small intestine. ECoV RNA was detected in the wide range of the small intestine and colon by qPCR. ISH also showed that ECoV-positive cells were broadly distributed in the luminal surface of the intestinal tracts, corresponding with the results of qPCR. These results suggest that ECoV can infect all sections of the intestine. ECoV RNA was also detected in nasal swabs in a few horses and in the lung tissue of one horse. However, these results were not indicative of respiratory infection with ECoV because they may have been caused by a secondary contamination with feces containing ECoV, or viremia. In both the clinical and pathological findings, this experimental study reproduced the naturally infected cases that showed mild clinical signs or were asymptomatic.

In conclusion, this thesis demonstrates that ECoV is commonly prevalent in Thoroughbred populations in Japan, but the potential risk of ECoV infection to the horse industry is considered low because all cases in these studies showed mild clinical signs or were asymptomatic. Nevertheless, it should be recognized that ECoV can be the causative agents of fever in horses and is easily transmitted to other horses. The halt of training due to fever, even temporary, can lead to economic loss in competition horses including Thoroughbred racehorses. Therefore, it is important to control the spread of ECoV infection appropriately.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	上林 義範
審査委員	主査：山口大学 教授 早坂 大輔
	副査：山口大学 教授 西垣 一男
	副査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副査：山口大学 教授 木村 透
	副査：JRA 競走馬総合研究所 研究役 坂内 天
題目	Studies on the Epidemiology and Clinicopathology of Equine Coronavirus Infection (ウマコロナウイルス感染症の疫学及び臨床病理学的性状に関する研究)
審査結果の要旨： ウマコロナウイルス (ECoV) 感染症は、ウマで発熱、食欲減退、元気低下および下痢を引き起こす疾患である。感染馬は糞便中にウイルスを数日から数週間排出し、糞口感染によってウイルスは伝播する。2000 年以降、ECoV 感染症の流行が世界各国で報告されており、日本では過去に 3 回、重種馬における流行が報告されている。しかし、サラブレッドなど他のウマの品種における ECoV 感染症の流行は日本国内ではこれまで報告されていない。また、日本国内ではサラブレッドの仔馬を対象とした ECoV 感染症の疫学調査が一つ報告されている。しかし、1 歳馬や現役の競走馬を対象とした疫学調査はこれまで報告されていない。ECoV 感染症の病理に関して、ECoV は腸に強い指向性を示すとされているが、ウイルスが腸のどの領域に感染しうるのかという点については十分に調べられていない。さらに、ECoV は他の一部のコロナウイルスのように呼吸器組織に感染するのかという点についても解明されていない。このように、ECoV 感染症に関して、主に日本国内における疫学あるいは臨床病理学的な性状については未だ不明な点が多いのが現状である。今回の一連の調査・研究はこれらの点について解明することを目的として実施した。  第 1 章では、サラブレッドを含む複数のウマの品種から成る 41 頭の乗用馬群で発生した ECoV 感染症の流行事例について報告する。今回の流行では集団内の 15 頭のウマが罹患したが、いずれも数日のうちに快復した。ペア血清を用いて実施したウイルス中和試験の結果、馬群内の全頭が ECoV に感染していたことが明らかとなった。糞便を材料とした qPCR の結果、ウイルス検出期間は最長で 98 日に及び、これは無症状のウマで認められた。このことから、無症状の感染馬が集団内でのウイルスの感染拡大に寄与する可能性が示唆された。	

また、非サラブレッド群 (n=25)におけるウイルスの検出期間はサラブレッド群 (n=16)と比較して有意に長かったことから、品種によって ECoV の体内での残存性に差がある可能性が示された。qPCR 陽性糞便をサンプルとして実施した遺伝子解析の結果、非構造タンパクコード領域である p4.7 から p12.7 領域にかけての塩基配列や NS2 領域の塩基配列に関して、他の ECoV 株との間に明瞭な差が確認されたことから、今回の流行の原因となったウイルスは過去に日本で ECoV 感染症の流行を起こしたウイルスとは異なるウイルスであると考えられた。

第 2 章では、日本国内のサラブレッドの 1 歳馬および競走馬を対象に、ECoV 感染症の血清疫学調査を実施した。1 歳馬では、8 月に牧場に新規導入されてから最初の数ヶ月のうちに全体の 60%程度のウマが感染していた。これは、集団放牧を通じて密接に接触する機会が多かったことによるものと考えられた。一方、競走馬では、11 月から 5 月と比較的寒い期間でのみ感染が確認された。競走馬は完全に個別飼育されており、1 歳馬のように互いに接触する機会はほとんどなかったことから、この結果は ECoV 感染の季節的な特徴を表しているものと考えられた。また、推定感染時期に発熱が認められた 1 歳馬の割合は 40%であった一方で、競走馬では 4%であった。本研究より、日本国内のサラブレッドの馬群において ECoV は常在し循環していることが明らかとなった。また、感染は飼養環境の変化の影響を受けて増加することがあり、さらに冬季に感染が拡大する傾向があることが示唆された。ECoV 感染症は 1 歳馬の発熱にはある程度影響している可能性が示されたが、ECoV 感染による罹患が疑われたいずれのウマも軽症であったことから、現時点では ECoV 感染症が日本国内の競馬産業に与えるリスクは低いと考えられた。

第 3 章では、ECoV 陽性糞便をサラブレッドに経鼻投与することで実験感染モデルを複製し、消化器や呼吸器における ECoV の感染部位について調査した。それぞれの感染馬は投与後 3, 5, 7, 14 日目に安楽殺した。感染馬 4 頭のうち 2 頭が投与後に一過性の発熱を示した。消化器症状や呼吸器症状を示したウマは 1 頭もいなかった。HE 染色の結果、いずれのウマの小腸においても腸絨毛の軽度萎縮、腸上皮細胞の剥離あるいはマクロファージの蓄積が観察された。組織を材料に実施した qPCR の結果、ECoV 遺伝子は十二指腸から直腸に至るまで腸管の広範囲で検出された。また、ECoV の N 遺伝子をターゲットに実施した *in situ hybridization* では、qPCR と概ね同じ範囲の組織において管腔表面で陽性細胞が確認された。これらの結果から、ECoV は腸の一部だけではなく、全体に広く感染することが明らかとなった。一方、数頭のウマの鼻腔スワブあるいは 1 頭のウマの肺組織から qPCR により ECoV 遺伝子が検出された。しかし、これらは ECoV を含む糞便による鼻道内の汚染あるいはウイルス血症の結果検出されたものと推察され、ECoV の呼吸器組織への感染を示唆するものではないと考えられた。

今回の一連の研究により、ECoV は日本国内のサラブレッドの馬群で広く蔓延していることが明らかとなったが、今回の調査および研究で確認された感染例はいずれも軽症か無症状であったことから、ECoV 感染症が国内の競馬産業に与えるリスクは現状では低いと考えられた。しかし、ECoV がウマで発熱の原因となり、水平的に伝播しやすいという点には留意が必要である。発熱による調教の休止は、たとえ一時的であっても、競走資源の確保とい

(別紙様式第 10 号)

う観点では幾らかの影響を及ぼし、経済的損失につながることもある。そのため、ECoV 感染による症状は軽度であることがほとんどであるものの、ECoV の感染拡大はコントロールすべきと考えられた。

以上により、本論文は博士（獣医学）の学位論文として妥当であると判定された。