

ニホンザル血小板減少症の原因ウイルスの特定と病態再現
～マカカ属サル由来レトロウイルスの種間伝播による新規致死性感染症の発生～

<要旨>

岡本宗裕 霊長類研究所教授、宮沢孝幸 ウイルス研究所准教授らの研究グループは、大阪大学微生物病研究所、東海大学医学部、京都府立大学医学部、国立感染症研究所、予防衛生協会、医薬基盤研究所と共同で、ニホンザル血小板減少症の原因がサルレトロウイルス 4 型によるものであることを特定しました。

京都大学霊長類研究所において、2001 年から 2011 年の間に 2 回、甚急性の血小板減少症を呈してニホンザルが相次いで死亡する事例がありました。2001 年から 2002 年においては 7 頭が発症し 6 頭が死亡しました。また 2008 年から 2011 年においては、43 頭が発症し、42 頭が死亡しました。発症サルに抗生物質の効果がなかったことや、炎症性反応を示す兆候が見られないことから、この疾病は細菌性ではなくウイルス性であることが推測されていました。霊長類研究所を主体とした疾病対策チームは、大阪大学微生物病研究所、国立感染症研究所、予防衛生協会などに協力を依頼し、同疾病とベータレトロウイルス属に分類されるサルレトロウイルス 4 型 (SRV-4) の感染の有無に相関があることを見いだしました。その結果を受けて、ウイルス研究所の研究チームは、血小板減少症を呈するニホンザルから SRV-4 を分離、ニホンザルに実験感染させることで血小板減少症が短期間のうちに誘導されることを見いだしました。さらに、遺伝的に単一の SRV-4 の感染によっても血小板減少症が誘導されることを見だし、ニホンザル血小板減少症が SRV-4 単独感染で引き起こされる疾病であることを証明しました。また、SRV-4 が感染する際に必要なウイルス感染受容体、ニホンザルにおけるウイルスの増殖部位を明らかにし、発症メカニズムの一端を明らかにしました。SRV-4 は国内で飼育されているカニクイザルにも感染していますが、カニクイザルでは重篤な疾病を起こしません。弱病原性の霊長類由来レトロウイルスが、交雑が起こるほど近縁な霊長類に新たに感染して重篤な疾病を引き起こすことは、これまで知られていませんでした。本研究は、霊長類由来レトロウイルスの種間伝播による新興レトロウイルス感染症の発生機構の解明に役立つと考えられます。

本研究成果は、2015 年 4 月 1 日付の国際学術雑誌「*Journal of Virology*」ならびに 2015 年 3 月 6 日付の国際学術雑誌「*Scientific Reports*」に掲載されました。



図 ニホンザル (*Macaca fuscata*) (左) とカニクイザル (*Macaca fascicularis*) (右)。SRV-4 はカニクイザルには重篤な疾病を引き起こしませんが、ニホンザルには重篤な血小板減少症を引き起こします。

<研究の背景>

ニホンザルは、日本固有のマカク属サルであり、北限の霊長類としても知られています。ニホンザルは学習能力が高く好奇心旺盛で、穏やかな気質をもっているため、研究用の動物として大変適した特性を有しています。そのため、脳研究をはじめとした様々な実験に使用されており、京都大学霊長類研究所においても、800 頭以上を飼育・繁殖しています。その京都大学霊長類研究所で飼育しているニホンザルにおいて、原因不明の血小板減少症が流行し、多数のニホンザルが死亡しました。本疾病が初めて観察されたのは、2001 年 7 月のことで、その年に 2 頭、翌 2002 年に 5 頭が発症し、うち 6 頭が死亡しました。その後 6 年の間において、2008 年 3 月に再び発症個体が発見され、2011 年 2 月までの間に 43 頭が発症し、42 頭が死亡しました（予後不良と判断して安楽殺した個体を含む）。発症した個体は、顔面蒼白、鼻粘膜・歯茎・皮下の出血、褐色の粘血便等を呈し、一旦発症すると致死率は極めて高いという特徴がありました。血小板数の激減、白血球並びに赤血球数の低下が発症個体に共通してみられ、死亡時にはほとんどの場合、血小板数はほぼゼロになっていました。発症の前日においても元気消失は認められず、発症の予兆はまったく認められませんでした。本疾病はニホンザル以外の霊長類では発生しておらず、世界的にみても同様の報告はありませんでした。私たちは、複数の研究機関に協力を依頼し、相互に連携して様々な手法を用いてこの疾患の原因を探りました。

<研究手法と成果>

発症個体では、初診時には、既に血小板、白血球、赤血球数に著しい減少が見られ、極度の貧血状態となっていました。特に、血小板数はほとんどゼロまで減少しており、皮下出血、粘血便、歯茎からの出血等の臨床症状は、この血小板の減少に起因すると考えられました（図 1）。



図 1 発症個体でみられる症状。鼻出血（左）および皮下出血（右）。

図 2 は、発症個体と同室で飼育されていたニホンザルの血液データをモニタリングしていたのですが、発症 2 週間前から 10 日前までは、血小板数は 1μ リットルあたり 10 万以上で維持されていましたが、それ以降急激に減少していました。

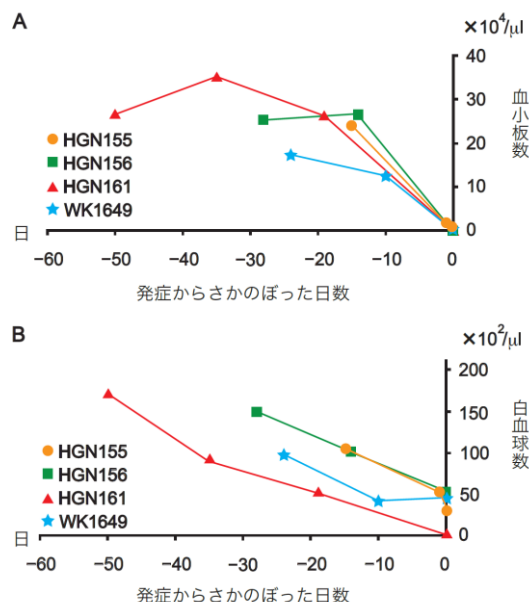


図 2 発症したニホンザルの血小板数 (A) と白血球数 (B) の推移

炎症の際に増加するとされている CRP はいずれの発症個体でも増加していないこと、白血球数が減少すること、抗生物質の投与がまったく無効なことから、ウイルス感染が疑われました。

さまざまな方法で原因の究明にあたった結果、霊長類研究所で発生したニホンザルの疾病は、サルレトロウイルス 4 型 (simian retrovirus type 4; SRV-4) と深い関連があることがわかりました。症状を呈したニホンザルの血漿中には、レトロウイルス様の形態をもつウイルス粒子が多数存在することが電子顕微鏡解析で明らかとなりました (図 3)。すべての発症ザルの血漿中に SRV-4 のウイルス RNA が検出され、血漿、糞便、骨髄等から SRV-4 が分離されました。一方、発症したサルとまったく接点のない第 2 キャンパスで飼育されていたサルでは、SRV-4 ウイルス RNA はまったく検出されませんでした。さらに、RDV 法 (【補足 1】参照) やメタゲノム解析 (【補足 2】参照) というウイルス遺伝子を網羅的に検出する方法を用いても、発症個体からは SRV 以外の候補病原体は見つかりませんでした。

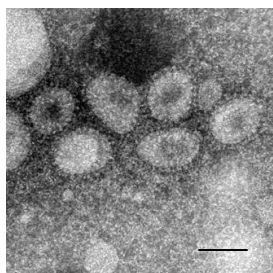


図 3 発症ニホンザルの血漿中にみられたウイルス粒子。
太線は 100 nm を示す。

SRV-4 とニホンザルで見られた疾病に関連があることが強く疑われたため、ウイルスの感染実験を行いました。まず、発症個体から SRV-4 を分離し、PRI-172 株と命名しました。分離された PRI-172 株を 4 頭のニホンザルに接種したところ、接種後 37 日以内に 4 頭とも血小板が激減しました (図 4A, B)。さらに、PRI-172 株の感染性分子クローン (pSR415 と命名) (【補足 3】参照) を作出し、遺伝的に均一な SRV-4 を準備し、2 頭のニホンザルに接種したところ、接種後 31 日で 2 頭とも血小板が激減しました (図 4C, D)。SRV-4 を接種したニホンザルの血液、骨髄、糞便からは、SRV-4 が再分離できました。剖検時には、歯肉からの出血や皮下出血が認められました。SRV-4 は様々な組織に感染していましたが、特に小腸や胃などの消化器系器官に良く感染していました。さらに私たちは、SRV-4 が細胞に感染する際の受容体が、ASCT2 というアミノ酸トランスポーターであることを見いだしました。各組織での ASCT2 の mRNA の発現とウイルスの感染度合いには正の相関が認められました。以上の結果から、ニホンザル血小板減少症が SRV-4 の単独感染で引き起こされる疾病であること、SRV-4 が ASCT2 を受容体として様々な組織に感染すること、主に糞便を介して感染が広まった可能性が高いことが分かりました。

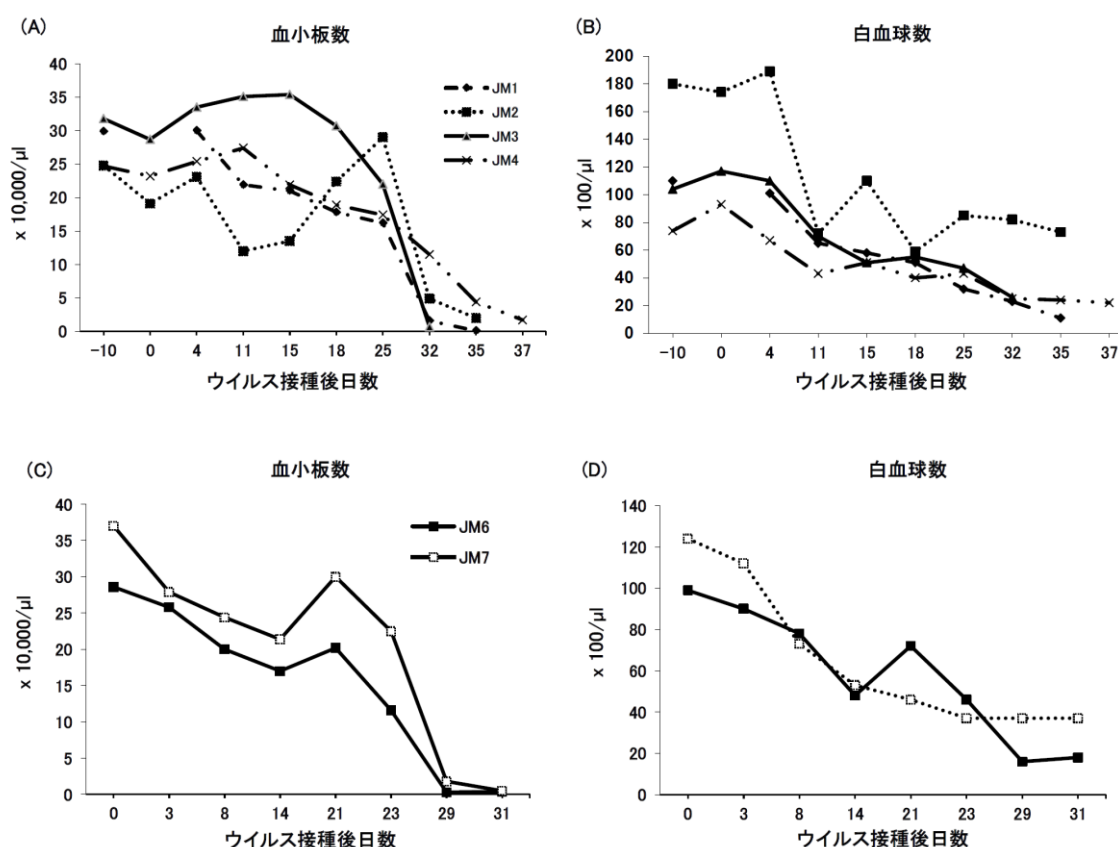


図 4 SRV-4 PRI-172 株 (A, B) ならびに感染性クローン由来ウイルス (SR172) (C, D) を接種したニホンザルの血小板数と白血球数の推移。

SRVはレトロウイルス科ベータレトロウイルス属に分類されるウイルスです(図5)。SRVは血清型から1型から7型まで分類されていて、6型を除いてマカク属のサルに感染していることが知られています。しかし、野生のニホンザルからはどの血清型のSRVの感染は報告されていません。SRV-4は、実験動物として飼育されているカニクイザルで感染が確認されています。SRV-4がカニクイザルに感染してもほとんどの場合無症状なのですが、免疫抑制による慢性の下痢や個体によっては軽度の血小板減少症を呈することがあります。しかし、カニクイザルにおける血小板減少症は必然的な病態ではなく、進行も慢性的に経過します。他の血清型のSRVでも様々な病態が観察されていますが、ニホンザルでみられたような急性の血小板減少症を起こした例はありません。私たちは、SRV-4がマカク属の同じ *fascicularis* グループに属しているカニクイザルからニホンザルに伝播し、血小板減少症を引き起こしたと推測しています。霊長類研究所では、カニクイザルを含む数種のマカク類を所外から導入し飼育しており、これらの動物がSRV-4を研究所に持ち込んだ可能性が考えられました。

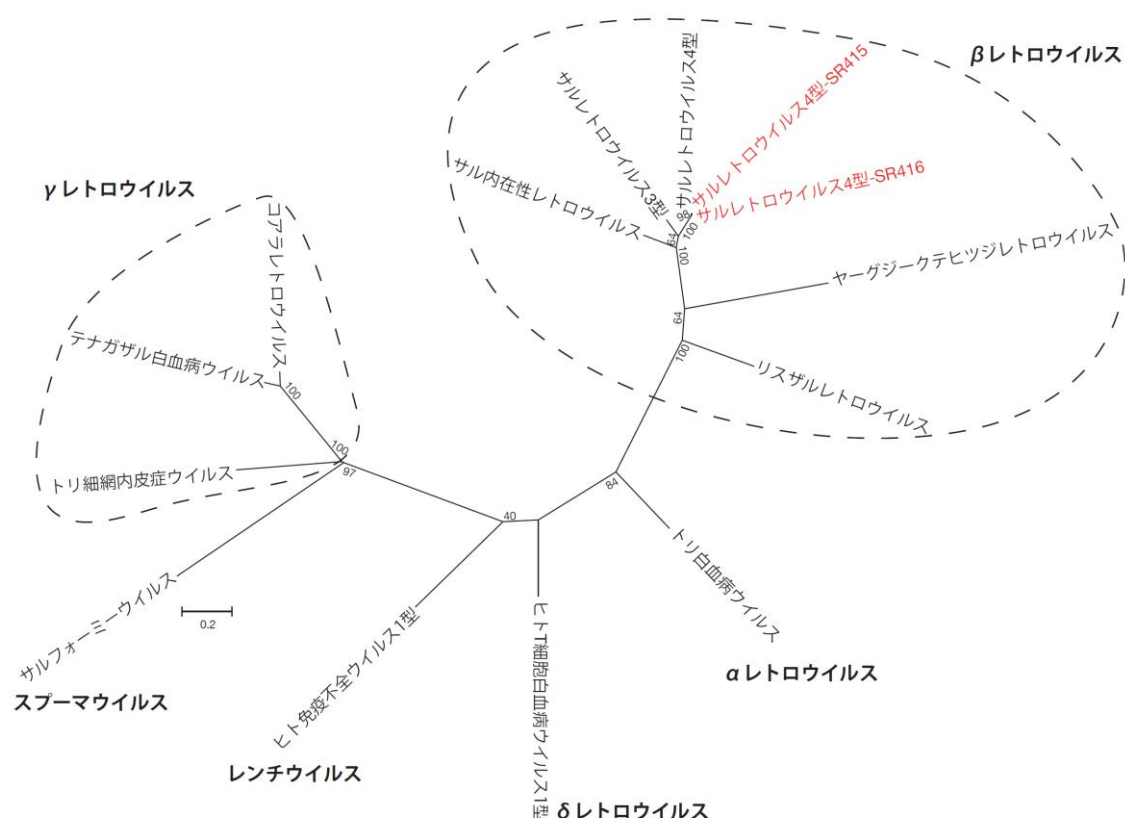


図5 *gag-pol* 遺伝子領域の配列を元に作成したレトロウイルスの系統樹。SRVはベータレトロウイルスに属する。今回分離されたウイルス株を赤で示す。

＜波及効果＞

今回、非病原性あるいは弱病原性であるレトロウイルスが、遺伝的に近縁な動物に新たに感染して、極めて重篤な疾病を誘導しうることを明らかにしました。新興ウイルス感染症は、ウイルスが本来の宿主とは異なる宿主に新たに感染した際に発生することが多いのですが、レトロウイルスでこれほどまでに短期間で死に至らしめる疾病を誘導したことはありませんでした。本研究は新興ウイルス感染症の発生機序を解明する貴重なモデルになると考えられます。

我が国では、毎年 5,000 頭以上のカニクイザルを輸入していますが、輸入の際はエボラ出血熱とマールブルグ病を対象とした検疫のみ実施しています。また、既に国内で飼育されているカニクイザルの検査は義務化されていません。本疾病は、日本固有の霊長類であるニホンザルにとって脅威であり、自然集団への伝播を阻止する対策を講じる必要があります。本研究が、我が国の霊長類に対する検査体制見直しの契機となると考えられます。

＜今後の予定＞

今後は、本疾病の発症機序、自然宿主の解明とともに、カニクイザルとニホンザルの遺伝的差違を調べ、病態を決定する決定要因を明らかにする予定です。

また、SRV-4 に感染したニホンザルでは抗 SRV-4 抗体が検出されないことがあり、他の疾病の診断でよく利用されている抗体検査は必ずしも有効とは限りません。特に、ウイルス血症となっている個体では抗体がまったく検出されないため、抗体検査だけを実施した場合、ウイルスを排出している感染動物を見逃す可能性があります。一方、現在私たちが実施している遺伝子検査法は、十分な感度と特異性をもっていますが、検査手技が煩雑で費用もかかるため、多数のサルを対象としたスクリーニング検査には不向きです。今後は、輸入サル等にも対応できる簡便で感度の高い診断法の開発にも取り組む予定です。

<書誌情報>

[DOI] 10.1128/JVI.03611-14.

Rokusuke Yoshikawa, Munehiro Okamoto, Shoichi Sakaguchi, So Nakagawa, Tomoyuki Miura, Hirohisa Hirai, and Takayuki Miyazawa

Simian retrovirus 4 induces lethal acute thrombocytopenia in Japanese macaques.

Journal of Virology, 2015, 89(7): 3965-3975.

[DOI] 10.1038/srep08850.

Munehiro Okamoto, Takayuki Miyazawa, Shigeru Morikawa, Fumiko Ono, Shota Nakamura, Eiji Sato, Tomoyuki Yoshida, Rokusuke Yoshikawa, Kouji Sakai, Tetsuya Mizutani, Noriyo Nagata, Jun-ichiro Takano, Sachi Okabayashi, Masataka Hamano, Koji Fujimoto, Takaaki Nakaya, Tetsuya Iida, Toshihiro Horii, Takako Miyabe-Nishiwaki, Akino Watanabe, Akihisa Kaneko, Akatsuki Saito, Atsushi Matsui, Toshiyuki Hayakawa, Juri Suzuki, Hirofumi Akari, Tetsuro Matsuzawa, and Hirohisa Hirai

Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host.

Scientific Reports, 2015, 5: 8850.

<用語説明>

【補足 1】

RDV 法：RNA ウイルスをより短時間で網羅的に検出・同定することが可能な方法。**Rapid Determination System of Viral RNA Sequence** の略。RDV 法では、ウイルス特異的なプライマーを必要とせず、非特異的な増幅により遺伝子断片を増幅する。2~3 日で RNA ウイルスを網羅的に解析でき、これまで RDV 法を用いることにより、様々な新規ウイルスが検出・同定されている。

【補足 2】

メタゲノム解析：環境中から直接収集・抽出される微生物の遺伝情報（メタゲノム）についての解析。従来、ある特定の微生物を単離・培養し、そのゲノムの解析が行われていたが、近年、塩基配列を解析するシーケンサーの能力が飛躍的に向上したため、環境中の微生物の膨大な遺伝情報を直接かつ網羅的に解析できるようになり、未知のウイルスや細菌、未知の遺伝子の発見などに役立てられている。

【補足 3】

感染性分子クローン：ウイルスの全ゲノムの cDNA が組み込まれたプラスミドで、トランスフェクション法によりウイルス感受性細胞に導入すると、感染性のウイルスが産生されるものを「感染性分子クローン」と呼ぶ。感染性分子クローンを用いることにより、リバーシジェネティックス（逆遺伝学）によるウイルス遺伝子の機能解析が可能となる。