

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300153

研究課題名(和文)レトロウイルス関連ニホンザル血小板減少症の発症機序と感染持続メカニズムの解明

研究課題名(英文) Onset and persistent mechanism of retrovirus induced thrombocytopenia in Japanese macaques.

研究代表者

岡本 宗裕 (OKAMOTO, Munehiro)

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：70177096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：発症個体から分離したSRV-4、またはその分離株から作製した感染性クローン由来のSRV-4をニホンザルに摂取したところ、どちらの場合も接種後37日以内に血小板が激減した。SRV-4を接種したニホンザルでは歯肉からの出血や皮下出血が認められ、血液、骨髄、糞便から、SRV-4が再分離できた。また、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が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We isolated SRV-4 strain PRI-172 from a Japanese macaque showing severe thrombocytopenia. When inoculated into four Japanese macaques, the isolate induced severe thrombocytopenia in all within 37 days. We then constructed an infectious molecular clone of strain PRI-172, and inoculated the clone-derived virus into two Japanese macaques. These animals also developed severe thrombocytopenia in just 31 days after inoculation, and the virus was re-isolated from blood, bone marrow and stool. At necropsy, we observed bleeding from gingiva, and subcutaneous bleeding in all animals. SRV-4 infected various tissues especially in digestive organs including colon and stomach. We identified the SRV-4 receptor as ASCT2. ASCT2 mRNA was expressed in various tissues and the distribution of SRV-4 proviruses correlated well with the expression levels of ASCT2 mRNA. From these results, we conclude that the causative agent of hemorrhagic syndrome in Japanese macaques was SRV-4, and its receptor is ASCT2.

研究分野：分子感染症学

キーワード：ニホンザル 血小板減少症 SRV-4 発症機序 感染実験

## 1. 研究開始当初の背景

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る。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る。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・繁殖している。そのニホンザルに特異的に発生する血小板減少症が、この10年間で2回京都大学霊長類研究所(京大霊長研)において発生した。2001-2002年の約1年間(第1期)に7頭発症して6頭死亡し、6年間において、2008年3月からの現在までの3年半(第2期)で43頭発症して42頭が死亡(安楽死の処置を施した個体を含む)した。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。発症個体では血小板数は激減し、それに続く赤血球ならびに白血球(特に顆粒球)の低下が発症個体全頭に共通して見られる。このような疾病はニホンザルを含む他の霊長類からは過去に報告が無く、霊長研疾病対策委員会による報告(霊長類研究26, 69-71)が最初のものである。この論文を発表した2010年7月の時点では、原因については全く不明であったため、Nature誌(Nature 466, 302-303)や新聞各紙に掲載されるなど、社会に大きな衝撃を与えた。

ニホンザルの血小板減少症は京大霊長研のみで発生している疾病と考えられていたが、自然科学研究機構の繁殖施設でも類似の疾病がみられることが明らかになった。現在我が国では、ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)が進行中であり、霊長類に関しても、京大霊長研と自然科学研究機構が、日本全国の脳研究に関連する研究者にニホンザルを提供している。この疾病のため、霊長研では平成22年度の供給を中止した。また、自然科学研究機構のニホンザルは、供給のための中間施設まで移送した後、下記病因ウイルスに感染していることが発覚し、感染個体の淘汰と検査のため、ユーザーへの供給が大幅に遅延した。

## 2. 研究の目的

次世代シーケンサーによる網羅的なゲノム解析やウイルス配列を網羅的に増幅するPCR法など、最先端のウイルス検索法を駆使することにより、原因究明を進めた結果、霊長研で発生していたニホンザルの病気はサルレトロウイルス4型(SRV-4)、自然科学機構で発生した病気はサルレトロウイルス5型(SRV-5)と深い関連があるという証拠が複数得られてきている。しかし、これらのウイルスが単独で同症を引き起こすのか、また同症がどのような機序で発症するのか発症機序については、依然として

不明のままである。本研究は、可及的すみやかに本疾病の流行を終息させるため、発症機序と持続感染メカニズムの解明を目的としている。また本研究は、ベータレトロウイルスが新しい宿主に感染した場合の、病原性発現機構を研究する上での新しいモデルを提供すると考えられる。

## 3. 研究の方法

### 感染実験

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った。発症個体から分離した株とその株から作製した感染性クローンを未感染のニホンザルに感染させ、経過をおった。

### 感染経路の推定

霊長研では、入荷時に必ず血液検査を実施しており、その血清等は長期間にわたり保存されている。また、年に一回の定期検診、そのた獣医学的処置の際に採取した血液も保存されている。そこで、これらの血液サンプルについて、PCRによるプロウイルス検査、RT-PCRによるウイルス検査を実施した。

### ウイルスの変異の確認

発症個体、非発症個体のウイルス遺伝子、プロウイルス陽性個体のウイルス遺伝子の塩基配列を調べ、遺伝子の変異と発症・非発症の関連を検討した。また、保存サンプルから検出されたウイルス遺伝子の配列と近年分離された遺伝子の配列を比較した。

### 宿主因子の検討

宿主のMHC、ウイルス抑制因子と発症の関係を検討した。

### 免疫抑制による発症の誘発

プロウイルスのみが陽性の個体、抗体のみが陽性の個体に対して、種々の免疫抑制を施し、ウイルス血症を起こすかどうか、さらに発症するかどうかを調べた。

## 4. 研究成果

### 感染実験

発症個体からSRV-4を分離し、PRI-172株と命名した。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た。さらに、PRI-172株の感染性分子クローン(pSR415と命名)(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た。SRV-4を接種したニホンザルの血液、骨髄、糞便からは、SRV-4が再分離できた。剖検時には、歯肉からの出血や皮下出血が認められた。SRV-4は様々な組織に感染していたが、特に小腸や胃などの消化器系器官に良く感染していた。さらに、SRV-4が細胞に感染する際、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明らかとなった。

#### 感染経路の推定

過去の保存サンプルを調べたところ、発症しないままウイルス血漿が持続していた個体が複数存在していたことが明らかとなった。これらの個体の移動経路、他個体との関連を検討したところ、ほとんど全ての発症個体はこれら非発症のウイルス血症個体から SRV-4 に感染したことが確認された。このような長期ウイルス血症の個体は、ニホンザル、カニクイザルとも下痢等の症状を呈するものが多く、入院室での治療が病気の伝播の一因となっていることが明らかとなった。また、霊長研へ SRV-4 を持ち込んだのは、1991 年に企業から導入されたカニクイザルで、その後 10 年の間、カニクイザルの間でウイルスが維持されていたことが明らかとなった。

#### ウイルス変異の検討

発症個体、非発症個体のウイルス遺伝子、プロウイルスの遺伝子について、複数全塩基配列を決定し、病態との関連を調べた。その結果、多少の変異はみられるが、特定の変異と病態の関連は認められなかった。

#### 宿主因子の検討

宿主の MHC、APOBEC 等のレトロウイルス抵抗性因子の発現と感染、発症の関連を調べたが、一定の関連を見出すことはできなかった。

#### 免疫抑制による発症の誘発

プロウイルスのみが陽性の個体に対して、種々の免疫抑制を施したが、ウイルス血症に移行することはなかった。また、抗体のみが陽性の個体に同様の免疫抑制を施したが、ウイルス遺伝子、プロウイルス遺伝子とも検出されなかった。以上より、免疫抑制処置により発症を誘発することはできなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Okamoto M, Miyazawa T, Morikawa S, Ono F, Nakamura S, Sato E, Yoshida T, Yoshikawa R, Sakai K, Mizutani T, Nagata N, Takano J, Okabayashi S, Hamano M, Fujimoto K, Nakaya T, Iida T, Horii T, Miyabe-Nishiwaki T, Watanabe A, Kaneko A, Saito A, Matsui A, Hayakawa T, Suzuki J, Hirofumi Akari H, Matsuzawa T, Hirai H (2015) Emergence of infectious malignant thrombocytopenia in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) by SRV-4 after transmission to a novel host. *Scientific Reports* 5: 8850, 査読有.

[DOI] 10.1038/srep08850.

Yoshikawa Y, Okamoto M, Sakaguchi S,

Nakagawa S, Miura T, Hirai H, Miyazawa T. (2015) Simian Retrovirus 4 Induces Lethal Acute Thrombocytopenia in Japanese Macaques. *Journal of Virology* 89(7), in *Journal of Virology* 89(7): 3965-3975, 査読有.

[DOI] 10.1128/JVI.03611-14.

Yoshikawa R, Nakagawa S, Okamoto M, Miyazawa T. (2014) Construction of an infectious clone of simian foamy virus of Japanese macaque (SFVjm) and phylogenetic analyses of SFVjm isolates. *Gene*. 2014. September 548(1):149-54, 査読有.

[DOI] 10.1016/j.gene.2014.07.025.

岡本宗裕, 2014 実権動物感染症の現状「サルレトロウイルス、その後」. 実験動物学ニュース 63, 6-8, 査読なし.

Togami H, Shimura K, Okamoto M, Yoshikawa Y, Miyazawa T and Matsuoka M. (2013) Comprehensive In Vitro Susceptibility Analysis of Simian Retrovirus Type 4 to Antiretroviral Agents. *Journal of Virology* 87, 4322-4329, 査読有.

[DOI] 10.1128/JVM.03208-12.

#### 〔学会発表〕(計 5 件)

岡本宗裕, サルレトロウイルスによるニホンザル血小板減少症、第 124 回関西実権動物研究会 (招待講演) 2014/12/5, 京都大学

佐藤英次、兼子明久、齋藤暁、山中淳史、鈴木樹理、渡邊朗野、吉田友教、吉川禄助、斉藤波子、牧野瀬恵美子、道家由美子、塩澤裕子、安江美雪、森本真弓、宮沢孝幸、明里宏文、岡本宗裕 (2013) サルレトロウイルス 4 型持続感染ニホンザルにおける免疫学的役割の解明、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013/11/10、神戸市

佐藤英次、鈴木樹理、渡邊朗野、兼子明久、吉川禄助、吉田友教、山中淳史、齋藤暁、斉藤波子、坂口翔一、明里宏文、宮沢孝幸、岡本宗裕 (2013) ニホンザルにおけるサルレトロウイルス 4 型の臓器特異性の調査、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013/9/20、岐阜市

岡本宗裕, ニホンザル血小板減少症について、第 156 回日本獣医学会学術集会 (招待講演) 2013/9/20, 岐阜市

吉川禄助、岡本宗裕、宮沢孝幸 血小板減少を呈したニホンザルからのサルレトロウイルス 5 型の分離と感染性クローンの作製、2012/9/14、盛岡市

岡本宗裕 ニホンザル血小板減少症、第 59 回日本実権動物学会総会 (招待講演)、2012/5/24, 別府市

#### 〔図書〕(計 0 件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡本宗裕 (OKAMOTO Munehiro)  
京都大学・霊長類研究所・教授  
研究者番号：70177096

### (2)研究分担者

明里宏文 (AKARI Hirofumi)  
京都大学・霊長類研究所・教授  
研究者番号：20294671

### (3)連携研究者

伊佐 正 (ISA Tadashi)  
生理学研究所・生命化学研究科・教授  
研究者番号：20212805

鈴木樹理 (SUZUKI Juri)  
京都大学・霊長類研究所・准教授  
研究者番号：10175408

松岡雅雄 (MATSUOKA Masao)  
京都大学・ウイルス研究所・教授  
研究者番号：10244138

宮部貴子 (MIYABE Takako)  
京都大学・霊長類研究所・助教  
研究者番号：10437288

早川敏之 (SUZUKI Juri)  
京都大学・霊長類研究所・助教  
研究者番号：80418681

吉田友教 (YOSHIDA Tomoyuki)  
京都大学・霊長類研究所・助教  
研究者番号：00451948

佐藤英次 (SATO Eiji)  
京都大学・霊長類研究所・助教  
研究者番号：90623918