

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ～ 2011
 課題番号：20500372
 研究課題名 (和文) マカクを用いたガンマヘルペスウイルス関与リンパ腫モデル作成の基礎研究
 研究課題名 (英文) Macaques as animal model for gamma-herpesvirus associated lymphomas
 研究代表者
 鈴木 樹理 (SUZUKI JURU)
 京都大学・霊長類研究所・准教授
 研究者番号：10175408

研究成果の概要 (和文) : 過去に死亡したニホンザルとタイワンザルの血液試料を用いてガンマヘルペスウイルス (γ HV) 感染状況の把握を行うと同時に同一個体のホルマリン液漬標本の病理学的検索によるリンパ腫発生状況の把握を行った。その結果、sEBV 感染個体数に比して腫瘍発生例数が低いことが確認された。また、sEBV 関与 NK/T リンパ腫のニホンザル 1 例とその可能性のあるタイワンザルの 1 症例を発見した。今回の研究によって両種がヒト γ HV 関与リンパ腫モデルの作出に適していることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文) : We surveyed for the prevalence of gamma-herpes virus (γ HV) or sEBV and 2) found out possible malignant cases caused by the γ HVs infection retrospectively in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) and Taiwanese macaques (*M. cyclopis*). We found that the incidence of the lymphoma was very low compared to the high prevalence of sEBV in those macaque species. Two cases suffering from NK/T-cell lymphoma associated with sEBV in Japanese macaques and Taiwanese macaques were detected. Those results suggest that both two species are suitable for an animal model for human lymphoma associated with γ HV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：ガンマヘルペスウイルス、疾患モデル、マカク、リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、ヒトリンパ腫の発症に

Epstein-Barr Virus (EBV) が従来知られていた以上に広く深くかかわっていることが

明らかになっている。今までEBV関与リンパ腫はBリンパ腫やバーキットリンパ腫との関連で研究が行われていた (Straus, SE et al.: Ann Intern Med 118: 45-58 (1993) & Zur Housen, H et al.: Nature 228: 1056-1058 (1970))。しかし、ヒトではEBV関与によるリンパ腫は必ずしもBリンパ球由来ではなく、Tリンパ球やNK細胞でも起こることが明らかになっている (Flavell, KJ and Murray, PG: J Clin Pathol: Mol Pathol 53: 262-269 (2000) & Gaal K et al.: Am J Surg Pathol 24: 1511-1517 (2000))。

(2) 一方サル類の悪性腫瘍の中ではリンパ腫が最も多い (Beniashvili, DA: J Med Primatol 18: 423-237 (1989)) が、サルEBV (sEBV) 単独関与によるリンパ腫発症の報告は今まで無かった。

(3) 申請者らは、飼育下のニホンザルでsEBVの血中抗体陽性率が高いことを明らかにし (Ishida T, Suzuki J, Yamamoto K: Folia Primatol 61: 228-233 (1993))、今回初めてヒト同様にsEBV関与によるNK/Tリンパ腫例をニホンザルで発見し報告した (Suzuki J, Ishida T et al.: Experimental Animals 54 (1): 101-105 (2005))。更に、カニクイザルの形質細胞腫発症例を発見し分析したが、EBVの関与は不明であった。しかしながら、この形質細胞腫の発症にもEBVが関与していることがヒトで明らかになっており、サルの形質細胞腫発症に関しても、ヒトと同様に γ HVの関与が想定される。ニホンザルの最も近縁種であるタイワンザルにおいてもリンパ腫症例の存在が明らかとなった (私信、台北動物園J. S. C. Chin氏)。霊長類研究所に飼育されているタイワンザルでもsEBV血中抗体陽性率が高いことから、台湾の飼育施設の個体でも同様であろうと推測される。即ち、タイワンザルもニホンザル同様に γ HV関

与リンパ腫発症の可能性が高い。

(4) 京都大学霊長類研究所は開所以来一貫して、病死した個体のホルマリン液漬標本作製し保存してきた。同時に毎年1回定期健康診断を実施し、ほとんどの個体の血液試料を保存している。台北動物園も相当数のホルマリン液漬病理標本および血液資料を保存している。過去に遡って病理及び血液試料から疫学的調査による検討が可能であることから本研究の立案に至った。サルでは腫瘍による死亡例は少ないが、ヒトで無症状あるいは前癌病変状態の個体例が存在するならば、サルでも同様である可能性が高い。過去に病死した個体の標本を再度詳細に検討することによって、ニホンザルおよびタイワンザルにおけるリンパ腫発症に関する疫学的基礎データを一新することが期待できると同時に得られた病理学的、細胞生物学的な新たな知見を基にサルモデル作出の検討が可能となる。

(5) 本研究の特色は、腫瘍細胞検索にリンパ節ではなく肝臓を中心に行うところである。ヒトEBV関与リンパ腫では、リンパ節が腫大する典型的な症状が無くても肝臓に腫瘍細胞の集ぞくが見られることが報告されているが、サルでこの点に着目して行われた研究は皆無であった。ヒトと同様にサルでも肝臓病変の存在する可能性が期待され、既にsEBV陽性Tリンパ腫および形質細胞腫を発見しているので、無症状あるいは前癌病変状態だった個体を見つけだせる可能性が高い。これによって、ニホンザルおよびタイワンザルにおける γ HV関与リンパ腫の実態を正確に把握することができる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的はニホンザルを中心としたマカクのリンパ腫発症におけるサルガン

マヘルペスウイルス関与の実態を明らかにし、マカクを用いたヒトガンマヘルペスウイルス (γ HV) 関与リンパ腫モデル作出を検討することである。1. 背景で述べたように、タイワンザルもニホンザル同様に γ HV 関与リンパ腫発症の可能性が高い。

そこで、本研究によって、ニホンザルおよびタイワンザルがヒトの γ HV 関与リンパ腫の最も有力なモデル候補となる可能性を検討する。

(2) 過去に病死した個体の標本を再度詳細に検討することによって、ニホンザルおよびタイワンザルにおけるリンパ腫発症に関する疫学的基礎データを一新することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 病理組織学的検索：京都大学霊長類研究所および台北動物園に保有されているニホンザル／タイワンザル病理液漬標本を対象に肝臓を初めとして、他の主要臓器（肺、腎臓、脾臓）、臓器周囲のリンパ節および体表リンパ節のパラフィン切片を作成し、リンパ腫細胞を検索する。

(2) 免疫組織化学的検索：(1) でリンパ腫細胞が存在した個体・臓器のパラフィン切片を用いて腫瘍細胞がどのリンパ球クローンに由来するのか、また腫瘍細胞が単一のクローンから成るのか複数のクローンからなのかを明らかにするために、細胞表面のサブセット抗体を用いた免疫組織染色を行う。使用抗体は抗ヒト抗体のなかでサルリンパ球と反応することをあらかじめ確かめたものを用いる。

(3) 細胞生物学的検索：①(2)と同様に、リンパ腫細胞が存在した個体・臓器のパラフィン切片を用いて腫瘍細胞におけるsEBVを確認するために、in situ hybridizationによってsEBV-encoded early RNA transcript

s (sEBERs)の検出を行う。②(2)同パラフィン切片を用いて、免疫組織化学的手法によってlatencyを調べる。③リンパ腫細胞が存在した個体・臓器のパラフィン切片のもとになったパラフィン包埋臓器からDNAを抽出してゲノム特性を調べる。④sEBERsが検出された個体の死亡直前の定期健診時の血液試料を用いて、体内においてEBVの活動状況を把握するために、抗sEBV VCA抗体および抗sEBV early antigen (sEA)の抗体価の測定を行う。⑤④の個体中EAが高かったものの血液試料について時間を遡って抗EBV VCA抗体およびEAの抗体価を調べ、感染成立およびEBV活性化時期を特定し、EBV感染成立から活性化を経てリンパ腫発症までの経過を明らかにする。

4. 研究成果

(1) ニホンザルを対象とした病理および血液試料の検索

①京都大学霊長類研究所に保存されているニホンザルのホルマリン液漬標本を対象とした病理組織学的検索では、期待された肝臓における腫瘍細胞集ぞく状況を見いだすことはできなかった。

②京都大学霊長類研究所で2009年度に悪性貧血を伴う敗血症を起こし安楽殺した個体において、腋窩及び単径リンパ腫の腫大や脾腫などの所見と病理組織学的検索から肝臓に腫瘍細胞集ぞく像が認められた。免疫組織学的検索によってT/NK細胞リンパ腫であることが明らかになった。更にsEBERsが検出されたことから本例もsEBV関与によるNK/Tリンパ腫例であることが確かめられた。尚、本症例はJournal of Comparative Pathology投稿しacceptされた。

③以上のように、ニホンザルはsEBV感染個体数に比して腫瘍発症例数が低いことが確認された。しかしながら、複数のsEBV関与

による NK/T リンパ腫例が存在することから、ニホンザルはマカクの中でも γ HV 関与リンパ腫発症の可能性が高いことが示唆された。

(2) タイワンザルを対象とした病理および血液試料の検索

①平成 23 年度に、タイワンザルについて台湾の台北動物園および近隣研究施設に飼育されている約 50 個体の血液試料を対象に、抗 EBV VCA 抗体および EA の抗体価を測定したところ、潜伏 sEBV の再活性化を示唆するデータが得られた。

②京都大学霊長類研究所で 2010 年度に全身性の衰弱により安楽殺した個体において、全身のリンパ節腫大及び脾腫などの所見が NK/T 細胞リンパ腫のニホンザル例の所見と類似していた。現在免疫組織学的検索および細胞生物学的検索による確認作業を行っている。

③これらの結果から、タイワンザルがニホンザル同様に γ HV 関与リンパ腫発症の可能性が高いことが示唆された。

(3) その他のマカクを対象とした病理および血液試料の検索

①台北動物園に飼育されているカニクイザルの血液試料を対象に抗 EBV VCA 抗体および EA の抗体価を測定したところ、抗 EBV VCA 抗体のみほとんどの個体で検出された。

②2008 年度にインドネシアボゴール農科大学霊長類センターにおいて、飼育下のブタオザルでのリンパ腫症例について現地調査を行ったところ、 γ HV 関与リンパ腫例ではない可能性が示唆された。

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 13 件)

①Eguchi K, Ohsawa K, Fuse Kiyono M, Suzuki J, Kurokawa K, Yamamoto T, Short

communication: epidemiological evidence that simian T-lymphotropic virus type 1 in *Macaca fuscata* has an alternative transmission route to maternal infection, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 査読有, 27(2), 2011, 113-114

②Sakai T, Mikami A, Tomonaga M, Matsui M, Suzuki J, Hamada Y, Tanaka M, Miyabe-Nishiwaki T, Makishita H, Nakatsukasa M, Matsuzawa T, Differential prefrontal white matter development in chimpanzees and humans, *Current Biology*, 査読有, 21, 2011, 1397-1402

③Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A, Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates, *Immunogenetics*, 査読有, 63, 2011, 417-428

④Miyabe-Nishiwaki T, Kaneko A, Nishiwaki K, Watanabe A, Watanabe S, Maeda N, Kumazaki K, Morimoto M, Hirokawa R, Suzuki J, Ito Y, Hayashi M, Tanaka M, Tomonaga M, Matsuzawa T, Tetraparesis resembling acute transverse myelitis in a captive chimpanzee (*Pan troglodytes*): long-term care and recovery, *Journal of Medical Primatology*, 査読有, 39(5), 2010, 336-346

⑤Saechan V, Settheetham-Ishida W, Kimura R, Tiwawech D, Mitarnun W, Ishida T, Epstein-Barr virus strain defined by LMP1 sequence characterizes Thai ethnic groups, *Journal of General Virology*, 査読有, 2010, 91, 2054-2061

⑥Yamamoto R, Teramoto M, Hayasaka I, Ikeda K, Hasegawa T, Ishida T, Reactivation of lymphocryptovirus (EBVcmp) and the dominance in chimpanzees,

Journal of General Virology, 査読有, 2010, 91, 2049-2053

⑦Sri Kantha S, Suzuki J, Primate species in Darwin's major books on evolution, Current Science, 査読有, 97(5), 2009, 715-718

⑧Sri Kantha S, Koda H, Suzuki J, Owl monkey vocalizations at the Primate Research Institute, Inuyama, Neotropical Primates, 査読有, 16(1), 2009, 43-46

⑨Sri Kantha S, Suzuki J, Hirai Y, Hirai H, Behavioral sleep in captive owl monkey (*Aotus azarae*) and squirrel monkey (*Saimiri boliviensis*), Acta Neurobiologiae Experimentalis, 査読有, 69, 2009, 537-544

⑩Nishimura T, Oishi T, Suzuki J, Matsuda K, Takahashi T, Development of the superlaryngeal vocal tract in Japanese macaques: Implications for the evolution of the descent of the larynx, American Journal of Physical Anthropology, 査読有, 135, 2008, 182-194

⑪Tiwawech D, Srivatanakul P, Karaluk A, Ishida T, Association between *EBNA2* and *LMP1* subtypes of Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma in Thais, Journal of Clinical Virology, 査読有, 2008, 42, 1-6

⑫Tiwawech D, Chindavijak S, Karalak A, Ishida T, Detection of IgA antibody against Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in nasopharyngeal carcinoma patients by ELISA, Thai Cancer Journal, 査読有, 2008, 28, 83-92

⑬Nakajima T, Ohtani H, Satta Y, Uno Y, Akari H, Ishida T, Kimura, A, Natural selection in the TRL-related genes in the

course of primate evolution, Immunogenetics, 査読有, 2008, 60, 727-735
〔学会発表〕(計 4件)

①鈴木樹理、明里宏文、岡本宗裕、吉田友教、岡林佐知、SRV-4の関与が疑われる血小板減少症、第20回サル疾病ワークショップ、2011年7月2日、神奈川

②Suzuki J, Yamamoto H, Matsuda A, Ishida T, LiT-C, Takeda N, Health management of macaque outdoor colonies with focus on hepatitis E infection, International Primatological Society 23rd Congress Kyoto 2010, 2010/9/12-18, Kyoto

③Suzuki J, Yamamoto H, Matsuda A, Ishida T, LiT-C, Takeda N, Natural hepatitis E virus infection in macaque colonies, The 3rd International Workshop of Asian Society of Zoo and Wildlife Medicine & 1st Meeting of Korean Society of Zoo and Wildlife Medicine, 2009/8/18, Seoul, Korea

④Suzuki J, Kato A, Kaneko A, Takao S, Ishida T, Isowa K, Malignant lymphoma (plasma cell neoplasm) in a long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*), Joint meeting of the 3rd international meeting on Asian Zoo/ Wildlife Medicine and Conservation (AZWMC 2008), 2008/8/20, Bogor, Indonesia

〔図書〕(計 2件)

①吉川泰弘、宇根有美、後藤俊二、小野文子、鈴木樹理 他、予防衛生協会、サル類の疾病カラーアトラス、2011、63、88、99

②鈴木樹理、講談社、新しい霊長類学「人を深く知るための100問100答」、2009、235-238、244-246

〔その他〕

総説

①鈴木樹理、霊長類のストレスを測る、生き物たちのつづれ織り、査読無、3、2010、132-136

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

石田 貴文 (ISHIDA TAKAFUMI)
東京大学・理学系研究科・准教授
研究者番号：20184533