

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04283

研究課題名(和文)ニホンザル血小板減少症の発症・非発症機序の解明とマカク類のリスク評価法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the onset and persistent mechanism of retrovirus induced thrombocytopenia in macaques and evaluation of their risks.

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：発症個体から分離したSRV-5の分離株から作製した感染性クローン由来のSRV-5を4頭のニホンザルに投与したところ、2頭は急性の血小板減少症を発症した。残りの2頭は、血中のウイルス濃度は発症個体と同程度まで上昇したが発症せず、高いウイルス濃度を維持したまま生存した。この2頭に、免疫抑制剤を投与したが、ウイルス濃度、血小板ともに変化はみられなかった。現在、これらの個体の病理学的検査を実施している。また、SRV-4感染に対するペプチドELISAを開発した。このペプチドELISAは、高感度であるが、非特異反応が認められた。これは、内在型レトロウイルスの発現が関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We isolated SRV-5 from a Japanese macaque showing thrombocytopenia and constructed an infectious molecular clone. When the clone-derived virus were inoculated into four Japanese macaques, two of them develop sever thrombocytopenia. Although remaining two macaques also became viremia, they didn't develop thrombocytopenia and survive for a long term. Then they were inoculated with an immunosuppressive drug. However they have never developed thrombocytopenia. Now we are examining the pathological changes in those macaques. We have developed the ELISA system using peptides. Although this ELISA is very sensitive, non-specific reactions were sometimes found. It seems that it was due to the expression of endogenous retrovirus.

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 SRV-5 感染実験 発症機序

## 1. 研究開始当初の背景

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(霊長研)において発生している。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2011年2月までの3年間に(第2期)43頭が発症して42頭が死亡(安楽死の処置を施した個体を含む)した。発症個体では血小板数は激減し、それに続く赤血球数ならびに白血球数の低下が発症個体全頭に共通して見られた。いったん発症すると致死率は極めて高い。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。

ニホンザルの血小板減少症は当初、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。両機関はNBRPニホンザルの供給期間であり、同疾病はNBRP事業に多大な影響を与えた。次世代シーケンサー等の最先端のウイルス検索法を駆使することにより、霊長研で発生していた血小板減少症はサルレトロウイルス4型(SRV-4)と、自然科学機構で発生した同症はサルレトロウイルス5型(SRV-5)と深い関連があることが明らかとなった。これらの経緯については、実験動物関連のニュースレターに掲載すると共に、研究会等で報告した。また、現在学術雑誌に関連論文を投稿中である。さらに、最近実施したニホンザルへのSRV-4投与実験において、血小板減少症の病態を再現することに成功しており、その成果も論文として学術雑誌に投稿中である。発症したニホンザルでは血小板が減少し始めてから2週間程度というきわめて短期間にほとんどゼロになり、末期には全身性の出血がみられる。感染実験では、ウイルス関連血球貪食性症候群様の病態が観察されたが、自然発症個体の病理像とは必ずしも一致しておらず、どのような機序で血小板が減少するのかは、不明のままである。

霊長研ではRT-PCRによりウイルスゲノムを、RCRによりプロウイルスを、検査を実施している。これらの方法を用い、飼育している全マカク類、約1100頭について、SRV-4の検査を行ったところ、発症個体以外でもウイルス血症となっている個体が多数発見された。我々は当初、これらは発症予備軍と考えていたが、これらの個体では血小板の減少はごくわずかであり、その後隔離して飼育を続けてもそのほとんどすべてが発症しなかった。つまり、これらの個体は無症候性のキャリアと考えられた。

一般に、抗体検査はウイルス感染の発見に有効であるが、本疾病場合、発症した個体、ウイルス血症になっている個体では抗体は検出されない。しかし、発症個体と同室で飼育されていた個体では、市販のキットで抗

SRV抗体陽性の個体が多数認められる。これら抗体陽性個体の多くは、ウイルス、プロウイルスとも陰性であった。このことから、発症には免疫系が深く関与していると考え、ウイルス血症個体に種々の免疫抑制剤を与えたが、どの処置によっても発症しなかった。また、ウイルス、プロウイルス共に陽性個体が全く見つかったことがない第2キャンパスの個体で抗体陽性例が散発した。感染、感染の維持、発症に免疫系が重要な役割を果たしていると考えられるが、現在使用している市販の抗体検査キットは必ずしも適切とは言えない。

このように、血小板減少症の研究は確実に進んでいるが、上述の様に不明な点、問題点が数多く残されている。

## 2. 研究の目的

発症ニホンザルでは、血小板は2週間程度という、きわめて短期間にほとんどゼロになる。SRV-4の感染実験例では、骨髄においてウイルス性血液貪食症候群(VAHS)と考えられる病理像が認められた。しかし、自然発症例では骨髄にはほとんど変化がなかったり、逆に増殖像がみられたりする例もある。また、SRV-5に起因すると思われる発症例では、骨髄性の疾病ではなく、播種性血管内凝固症候群(DIC)を疑わせる病態の個体も複数認められている。このように、発症個体における病理像は千差万別で、どのような機序で血小板が減少するのか、そしてその減少にSRVがどのように関与しているのかについては、全く分かっていない。ウイルス血症になっても発症しない無症候性のキャリアが多数存在し、それらが病気の伝播に深く関与していたことが明らかとなっている。霊長研での流行では、1期2期を通じて2個体が生き残ったが、驚いたことにこれらの2個体はウイルス血症のまま生存し続けた。本研究の第一の目的は、どのような機序で血小板減少症を発症するのか、言い換えるならどのような条件なら持続感染するのかについて明らかにすることにある。これらは、今後SRVをコントロールしていく上で、きわめて重要な情報と考えられる。

霊長類研究所で行っているRCR法、RT-PCR法による検査は十分な感度と特異性を有しており、SRVの検査法として有用と考えている。しかし、両法は煩雑である上、熟練した技術が必要であり(非常にコンタミしやすい)汎用性に乏しい。現在、日本で飼育されているマカク類で、同検査が実施されているのは霊長研と自然科学研究機構の飼育個体のみである。過去のサンプルを調べることにより、霊長類研究所にこのウイルスを持ち込んだのは、1991年に導入されたカニクイザルであることが明らかとなっている。カニクイザルは、現在でも年間5000頭以上が輸入されており、これらのサルの実確な診断が、野生ニホンザルを守るためには必須と

考えられる。SRV 感染を検出できる迅速かつ簡便な診断法の開発がもう一つの目的である。

### 3. 研究の方法

#### 感染実験

SRV-5 については、感染実験による病原体の確定を行っていなかったため、H27 年度は SRV-5 の感染実験を行った。我々は、すでに感染実験を実施し、ニホンザルへの SRV-4 のみの投与により、血小板減少症の病態を再現できることを確認している。その実験では、病態を再現することに重点を置いていたため、発症個体より分離したウイルスを、大量に投与した。SRV-5 についても同様の実験を行い、病原性を確認した。

#### ウイルス学的検討

我々は、発症個体から SRV-4 と SRV-5 を分離し、感染性クローンを作るとともにそれらの全塩基配列をすでに決定している。しかし、ウイルス血症になっていても発症しない個体、プロウイルスだけが検出される個体が多数確認されている。また、カニクイザルやアカゲザルでは血小板減少症はみられない。発症個体のウイルスは、何らかの変異を起こして強毒化している可能性がある。そのため、非発症個体、カニクイザル、アカゲザルから分離したウイルスと発症個体のウイルスの遺伝子を比較した。また、最初の感染源と思われる 1991 年のカニクイザルの血漿や第一期に発症した個体の血漿が保存されているので、それらのウイルスの塩基配列を比較した。

#### 宿主要因の検討

発症ニホンザルでは、血中に抗 SRV 抗体が認められない。感染実験においても、最後まで抗 SRV 抗体は確認できなかった。しかし、発症していない感染個体では抗 SRV 抗体が検出されており、非発症カニクイザルでも抗 SRV 抗体の存在が確認されている。そこで、これらの動物がもつ抗体の中和活性を比較することにより、抗体が発症の抑制に関与しているかどうかを調べる。

サルには、TRIM5、APOBEC、BST2 等のレトロウイルス増殖抑制因子が存在することが明らかとなっており、アカゲザルやカニクイザルではこれらの因子の遺伝子はすでにクローニングされている。これらの因子は、サル種によって抑制するレトロウイルスが異なっている。また、TRIM5 では、同種内でも個体によってそのアミノ酸配列が異なっており、ウイルス抑制効果に差があることが知られている。これらのレトロウイルス増殖抑制因子が、SRV の感染はその後の発症に関与している可能性がある。そこで、発症ニホンザル、非発症ニホンザル、アカゲザル、カニクイザルの TRIM5、APOBEC、BST2 をクローニングし、発症との因果関係を解析した。

#### 抗体検査法の開発

SRV の抗体検査に関しては、市販のキット

による ELISA を行ってきたが、ELISA キットのロット間でのバラツキが大きく、非特異的の反応により判定が困難な場合もしばしば認められた。また、トリコンビナント蛋白を用いたウェスタンブロットも同様で、安定した検査法ではなかった。そこで、合成ペプチドを用いて抗原エピトープを特定し、より高感度で特異性の高い抗体検査法の開発を行った。

#### 病理学的検討

霊長研での発症個体と感染実験個体について (SRV-4 に感染) および自然科学研究機構において発症した個体について (SRV-5 に感染) について、各種臓器はホルマリン固定されて保存してある。そこで、それらの病理学的検査を実施した。また、これまでの研究で、PCR により、全身の臓器からプロウイルス DNA が検出されているが、ウイルスそのものの局在については、今のところ情報はない。そこで、ウサギを用いて SRV に対する免疫抗体を作製し、その抗体をもちいて全身の組織の免疫染色を実施した。

### 4. 研究成果

#### SRV-5 の感染実験

自然科学研究機構関連の飼育施設で発症したニホンザルから SRV-5 を分離した。この SRV-5 をニホンザルへ投与し、SRV-5 と同症の関連を調べた。発症個体から分離した SRV-5 を invitro 培養し、2 頭のニホンザルの静脈内および腹腔内に投与した。また、分離ウイルスから作製した感染性クローンも同様に 2 頭のニホンザルに投与した。投与後、血中の血小板数、ウイルスの有無を経時的に調べると共に一般性状、出血等を観察した。その結果、SRV-5 ウイルス RNA は投与後 8 日目から確認され、その後実験終了までウイルス血症が持続した。血小板数は 15 日目まではほぼ正常値を維持していたが、それ以降培養ウイルスおよび感染性クローンを投与した各 1 頭で急激に減少し、24 日目には 1 万以下となったため安楽殺した。発症個体の PBMC、血漿及び骨髓からウイルスが再分離できた。また 1 頭は、22 日目から血小板数が漸減し 47 日目には 2 万 5 千まで低下したが、その後回復し 50 日目以降はほぼ正常値で推移した。残りの 1 頭は、実験期間を通して血小板数の減少は認められなかった。

そこで 71 日目より、生存中の 2 頭に対し免疫抑制剤としてデキサート 2mg/kg を毎日筋肉内投与した。しかし、感染後 100 日まで血小板数の減少やその他の臨床症状は認められなかった。以上より、ニホンザル血小板減少症は SRV-5 の単独感染で引き起こされることが確認された。一方で、感染個体の半数は無症候性のキャリアとして生存し、免疫抑制をかけても発症しなかったことから、発症・非発症には複数の宿主要因が複雑に絡み合っていると考えられた。現在、SRV-5 の感染実験で得られたサンプルについて、遺伝学

的解析、病理学的解析を進めている。特に、高レベルのウイルス血症が持続していたにも変わらず発症せず、さらに免疫抑制剤を投与しても症状の変化がみられなかった2個体については、詳細な検討を実施する。

#### ウイルス学的検討

霊長類研究所における血小板減少症発症個体、ウイルス血症にはなっていたが発症しなかった個体（無症候性キャリア）、ウイルス DNA のみが陽性だった個体から感染 SRV-4 の全塩基配列を決定した。得られたウイルスの塩基配列には、多少の変異がみられ、アミノ酸の置換を伴う非同義置換も認められたが、発症やキャリア化と関連のある変異は確認できなかった。

#### 宿主要因の検討

血中には SRV-4 は確認できないが、DNA 検査で陽性となっている個体で、抗 SRV 抗体が認められた。しかし、それらの抗体に中和活性は認められなかった。また、発症二ホンザルと非発症二ホンザルにおいて、TRIM5、APOBEC、BST2 等のレトロウイルス増殖抑制因子の遺伝子を比較したが、両者の間に差はみられなかった。

#### 抗体検査法の開発

開発したペプチド ELISA は高感度であるが、全く感染個体の見つからない第2キャンパスの二ホンザルの一部に陽性となる個体が認められ、特異性に問題があることが明らかとなった。二ホンザルの内在性レトロウイルスについて解析したところ、二ホンザルには SRV に類似した内在性レトロウイルスがあることが明らかとなり、非特異反応には内在例レトロウイルスが関与していることが示唆された。

#### 病理学的検討

全身の組織について、病理学的検討を行ったが、発症個体においても骨髄以外では特に病変は認められなかった。血小板減少という共通した病態がみられる以上、霊長研での発症個体と自然科学研究機構での発症個体には共通した病理変化が認められると考えられた。しかし、両者間はおろか SRV-4 による発症個体の間でも骨髄の病理変化は様々で、血小板減少症と直接結びつく病理変化は確定できなかった。ウイルスの局在については、骨髄に加え、胃粘膜上皮、腸管上皮で多くのウイルス抗原が確認された。SRV-5 の局在に関しては、現在滋賀医科大学の中村准教授の協力のもと、解析中である。

#### 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 3 件)

Yoshikawa R, Okamoto M, Sakaguchi S, Nakagawa S, Miura T, Hirai H, Miyazawa T. Simian retrovirus 4 induces lethal acute

thrombocytopenia in Japanese macaques. *J Virol.* 89, 2015, 3965-3975  
10.1128/JVI.03611-14.

Sato K, Misawa N, Yoshikawa R, Takeuchi J S, Miura T, Okamoto M, Yasunaga J, Matsuoka M, Ito M, Miyazawa T, Koyanagi Y. Experimental evaluation of the zoonotic infection potency of simian retrovirus type 4 using humanized mouse model. *Sci. Rep.* 5, 2015, 14040.  
10.1038/srep14040

宮沢孝幸, 岡本宗裕, 京都大学霊長類研究所における二ホンザル血小板減少症流行のその後, *LABIO21*, 65, 2016, 15-19

#### [学会発表](計 4 件)

・岡本宗裕, 宮沢孝幸, 吉川祿助, 鈴木樹理, 宮部貴子, 佐藤英次, 吉田友教, 兼子明久, 森本真弓, 前田典彦, 橋本直子, 明里宏文, サルレトロウイルス4型による二ホンザル血小板減少症, 第31回日本霊長類学会大会, 2015年

・吉川 祿助, 坂口 翔一, 中川 草, 中村 紳一朗, 三浦 智行, 岡本 宗裕, 宮沢 孝幸, サルレトロウイルス5型感染による二ホンザル血小板減少症, 第159回日本獣医学会学術集会, 2016年

・岡本宗裕, 吉川祿助, 阪脇廣美, 鈴木樹理, 坂口翔一, 兼子明久, 中村紳一朗, 三浦智行, 宮沢孝幸, サルレトロウイルス5型 (SRV-5) の二ホンザルへの感染実験, 第32回日本霊長類学会, 2016年

・Hashimoto A, Yoshikawa R, Nakagawa S, Okamoto M, Miyazawa T. Dual infection of two simian foamy virus serotype in Japanese macaques. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年

#### 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

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

・宮沢孝幸 (MIYAZAWA Takayuki)  
京都大学・ウイルス再生医科学研究所・准教授  
研究者番号: 80282705

##### (3) 連携研究者

・芳田 剛 (YOSHIDA Takeshi)  
京都大学・霊長類研究所・研究員  
研究者番号: 00727521

・東濃 篤徳 (HIGASHINO Atsunori)  
生理学研究所・生命科学研究科・研究員  
研究者番号：30470199  
・伊佐 正 (ISA Tadashi)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：20212805

(4)研究協力者

・中村紳一郎 (NAKAMURA Shin-ichiro)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
・新美幸 (NIIMI Sachi)  
京都大学・霊長類研究所・技能補佐員  
・兼子明久 (KANEKO Akihisa)  
京都大学・霊長類研究所・技術専門職員  
・吉川禄助 (YOSHIKAWA Rokusuke)  
京都大学・ウイルス再生医科学研究所・博士  
過程  
・下出紗弓 (SHIMODE Sayumi)  
京都大学・ウイルス再生医科学研究所・博士  
過程  
・坂口翔一 (SAKAGUCHI Syoichi)  
京都大学・ウイルス再生医科学研究所・博士  
過程