

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770234

研究課題名(和文)大型類人猿の疾病と人獣共通感染症

研究課題名(英文)Zoonotheses and Great Ape-specific diseases

研究代表者

郡山 尚紀(KOORIYAMA, Takanori)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：50416278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンザニアマハレ山塊国立公園にて、野生チンパンジーの観光客が持ち込む病原体への曝露状況を調べた。2回の調査時において感染症の症状はチンパンジーに見られなかった。寄生虫の検索において、これまでに報告した線虫、条虫、原虫が検出されたが、ヒト由来種は検出されなかった。次に、飼育下のチンパンジーのデータを参考に、ヒト由来呼吸器系病原体に対する糞中抗体の検出、並びに病原体遺伝子の検索を行った結果、ヘルペスウイルス科、百日咳菌およびパラインフルエンザウイルス1/2/3に陽性を示すものが検出された。以上のことから、マハレのチンパンジーにおいてこれまで報告のなかったヒト由来人獣共通感染症の感染歴が示された。

研究成果の概要(英文)：We performed serological examinations using coprologic antibodies in the Mahale Mountains National Park, Tanzania, to determine if chimpanzees were infected with zoonotheses. After two field surveys, we found no clinical signs of infection. Based on parasitological surveys, chimpanzees were not infected with human-borne pathogenic parasites, but were infected with nematodes, cestodes, and protozoa, as has been previously demonstrated. We detected antibodies against Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus, Varicella-zoster virus, Bordetella pertussis, and Parainfluenza virus 1/2/3 based on faecal antibody analysis. Human Herpes virus 6 DNA was detected in total DNA extracted from chimpanzee faeces. Overall, our results elucidate the infection history of human-borne zoonotic pathogens in wild chimpanzees in Mahale. Antibody detection based on faecal samples is a useful tool for revealing infectious disease through non-invasive sampling.

研究分野：野生動物学

キーワード：人獣共通感染症 チンパンジー 寄生虫 ウイルス 細菌 野生 糞中抗体 野生動物保護

1. 研究開始当初の背景

野生動物保護を目的として設立された国立公園は、エコツーリズムを推進し、観光客からの観光収入をすることで円滑な公園維持と保護を行うことができると考えられてきた。しかし、観光客の人数が増加するとともに、特に大型類人猿において人間から感染したと考えられる病原体（ポリオ、麻疹など）が既に報告されており、ごく最近ではチンパンジーの間で原因不明の流行性感冒によりそのグループ全体の10%前後が死亡したのではないかという報告がある (Takenoshita 2005, Kondgen 2008, Hanamura 2008)。このように大型類人猿の保護にヒトから大型類人猿への人獣共通感染症対策が必要である事が新たな課題となっている。現在、大型類人猿の住む国立公園ではマスクの使用が義務づけられたり、観察時間の制限を行うところも出てきた。そういった初期の対策が効率的に行われ始めたその一方で大型類人猿がどれだけヒトの疾病に関して感受性を持っているのか、あるいはこれまでの地域住民との接触や観光客との接触によりどれだけヒトの疾患に対して免疫を獲得しているのか調べる必要がある。現在日本には約400頭のチンパンジーが飼育されており、それらを用いればヒトから霊長類への共通感染症も感染実験を行うことでより正確な回答を得ることができると考えられるが、実験用チンパンジーの使用禁止の世界的な動向を考えるとその使用は難しいと考えられる。現状で考えられる最前手段はフィールドで地道に観察とサンプル採取を行い、チャンスを伺う努力を怠らない事である。フィールドにおいても飼育下においても疾患原因を探るには死亡個体や罹患個体から病原体を分離する事が最も近道であるが、野生下において死亡した動物は緻密な食物連鎖の中ですぐに腐敗してしまい、大量死した場合や運に恵まれなければ良い状態での発見は望めない。そのチャンスを待っている間にできる事は大型類人猿およびその周りに住む野生動物から非侵襲的に得られるサンプルを収集し、病原体の基礎データを構築しその環境からのリスクを調べる事である。大型類人猿および同じ環境下に生活している動物の寄生虫学的、細菌学的、ウイルス学的感染状況について調べた後、その結果から同種の病原体が検出された場合には異種の野生動物間で共通感染症が発生しているという新たな知見が得られる事になる。近年、SARS (Taguchi 2003)、鳥インフルエンザ (Odagiri 2006)、エボラウイルス (Morikawa 2003) など新興再興感染症の流行で野生動物から人への人獣共通感染症が世界的な問題となっているが、アフリカの野生チンパンジーもその対照であろう。アフリカの野生ゴリラやチンパンジーにおいてエボラウイルスによる死亡が報告されて

いる (Bermejo, 2006; Walsh, 2003, Formenty 1999)。

<参考文献>

Taguchi F, Uirusu. 2003 Dec; 53(2):201-9.
Odagiri T, Uirusu. 2006 Jun; 56(1):77-84.
Morikawa S, Nippon Rinsho. 2003 Mar; 61 Suppl 3:544-9.
Takenoshita Y, Primate Res. 2005 21:47-63
Walsh PD, 2003. Nature 422:611-614.
Kondgen S, 2008. Curr Biol 18:1-5.
Formenty P, 1999. J Infect Dis 179:S120-S126.
Bermejo M, 2006. Science 314:1564.
Hanamura S, 2008. Primates 49:77-80.
Kaur T, 2008. Am J Primatol 70:755-765.
郡山, 2007. 第16回サル類疾病国際ワークショップ、つくば国際会議場

2. 研究の目的

タンザニア共和国マハレ山塊国立公園においてチンパンジーのフィールド調査を行い、大型類人猿および生活圏内にいる他の野生動物とくに霊長類の腸内寄生虫学的感染状況、糞便内における病原性原虫、細菌の保有状況の検索あるいはウイルスの検出はサンプルを不活化処理後日本へ持ち帰り糞中抗体の検索および遺伝子学的解析を行ってウイルスの保有状況を明らかにする。得られたデータを元に野生動物間での病原体の伝播の状況、ならびにヒトからの感染症の移入の可能性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) チンパンジーの健康モニタリングとサンプル採取：調査地ではまずチンパンジーを彼らの行動パターンやコール（鳴き声）を頼りに集合場所を特定する。発見後から追跡を開始するがまず初めに行うことは彼らの行動に異常がないか、また臨床症状を示していないか獣医学的な観察である。その後彼らが排泄した糞や尿をキャンプに持ち帰りサンプルの直接観察並びに培養などを行う。通常野生動物はヒトを見ると逃げてしまうが、タンザニアマハレではチンパンジーが人を見ても驚いて逃げる事はほとんどなくさらに個体識別がされておりどの個体が排泄したサンプルであるか識別が可能である。これまでチンパンジーでは乾期から雨期への季節の移行時期に感冒の症状を示す事が報告されており、咳くしゃみ鼻水などのサンプルが採取できる可能性がある (西田 2007)。もちろん新鮮な死体に行き当たる事ができればいろいろな病原体の採取が可能であるが、そのためには少しでも長い時間フィールドで調査を続ける事が重要になってくる。大型類人猿の生活圏に生息する他の動物、特に霊長類に関して個体識別などはあまりやられてこなかったので不特定多数の糞サンプルを回収する事を

目標とする。大型類人猿の中でもチンパンジーは肉食を行うためその際に何らかの病原体を獲得する可能性は高く肉食対照動物から得られた結果との比較は特に期待される。

2) 寄生虫学的解析：糞便中に成虫が見られた場合にはそれ自体をエタノール固定して保存しておき、帰国後標本を通常の観察用標本に処理した後種を同定する。現地においても顕微鏡を持ち込み、蠕虫卵の形態と寸法からその属を特定する。また寄生虫をビニール培養法で培養し、線虫についてその属を形態学的特徴から虫卵のデータと比較し結果の信頼性を高める。さらに培養した線虫をエタノール固定して持ち帰り、リボソームおよびミトコンドリア DNA から種を特定する。

3) 細菌およびウイルス学的解析：ウイルスによっては糞や尿中に排泄されるものがあるので、糞や尿を FTA カード、RNAlater にて不活化保存した後日本へ持ち帰りウイルス特異的プライマーを用いてウイルス遺伝子を特定する。また、現地においてトータル DNA を抽出し、持ち帰った後、病原体特異的プライマーを用いて検出を試みた。これらの病原体の解析結果は、フィールドで観察した臨床所見と組み合わせられ、より正確な分析を行う。

4. 研究成果

タンザニアマハレ山塊国立公園（マハレ）における調査は、2012 年度においては 2013 年 2 月、2014 年度には 2014 年 8 月に行った。マハレにおいて M グループと呼ばれる 60 頭ほどの群れを対象として、ヒトからチンパンジー (*Pan troglodytes*) に感染し、その生命を脅かすヒト由来人獣共通感染症について検索を行った。非侵襲的にチンパンジーの糞を採材し、その中に排出される抗体を取り出し、病原体特異的抗体の有無を調べることで感染歴を明らかにした。さらに糞中に含まれるすべての DNA を取り出し、さらに病原体ゲノムを特異的に増幅させることによって、感染の有無を調べる。それらの結果をもとに、その病原体への感受性及びグループ内あるいは家族内での伝播の強さについて分析を行った。

1) チンパンジーの健康モニタリング：チンパンジーたちの健康状態はこの時期において特に風邪の徴候やそのほか感染症を疑わせるような症状は発見されなかった。ただ、2013 年 10 月において、チンパンジーたちが鼻水を垂らし、くしゃみといった風邪の症状を示したことが現地の国立公園ガイドの話から分かった。今回のサンプリングにおいてその時の風邪の原因となる病原体の抗体を検出できるのではないかと考えた。

チンパンジーの内部寄生虫の検出

2) 寄生虫の検索：まず、これまでに採取した糞サンプルについて顕微鏡下でその形態から内部寄生虫の同定を行った。その結果 *Oesophagostomum* spp., *Strongyloides* sp., *Trichuris* sp.), *Entamoeba coli*, and *Entamoeba* spp. *Bertiella studeri*, *Probstmayria gombensis*, *Troglocorys cava*, *Troglodytella abressarti* が検出された (Kooriyama et al., 2012)。また、ヒト由来の人獣共通感染性を示す寄生虫は見つからなかった。さらに、それらの糞についてトータル DNA を抽出したのについては線虫類の中で腸結節虫 (*O. stephanostomum*) と原虫の中でアメーバ属 (*Entamoeba* spp.) について確認するために、遺伝子の検出を試みた。その結果、結果、8.3% の個体からのみそれぞれ検出することができた。これはすでに報告されている結果から比べると低い割合であった。

3) 糞中抗体を用いたヒト由来病原体に対する感染歴の検索 (Table. 1): 追跡して採取した糞は乾燥させて保存されていたが、まず、含まれている IgA を抽出した。IgA が確実に回収できたかについて ELISA 法を用いて調べた結果、22 頭中 9 頭の糞から IgA の存在が確認された。分析は、2013 年 2 月のものと本年度 2014 年 8 月に採材したものをを用いて比較検討を行った。ELISA 法を用いて測定した IgA の回収率は 2 月と 8 月で 60% ~ 85% で、IgG は 2 月と 8 月で 62.5% ~ 80% の回収率であった。

続いて、継続して行って来た飼育下チンパンジーにおけるヒト由来病原体に対する暴露状況の探索についてまとめた (Kooriyama et al. 2012)。この結果を参考にし、病原体に対する抗体の検出を試みた。ヘルペスウイルス科の主要なウイルスである、単純ヘルペスウイルス (HSV 1&2)、EB ウイルス (EBV)、帯状疱疹水痘ウイルス (VZV)、サイトメガロウイルス (CMV) ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV6) について、抗体保有率を ELISA 法によってスクリーニングを行った。その結果、ヘルペスウイルス科においては EBV と CMV および VZV において抗体の上昇が確認されたが、HSV 1&2 について抗体は検出されなかった。また、ヘルペスウイルス科以外の病原体についても検索を行った。RS ウイルス (RSV) 百日咳菌 (*B. pertussis*) およびパラインフルエンザウイルス 1,2,3 (PIV1,2,3) エンテロウイルス (ENTV) において調べた結果、それぞれにおいて抗体が検出された。*B. pertussis* においては 5 頭において陽性を示し、そのうち 1 頭の抗体価は高い値であった。PIV1,2,3 においては 8 頭で陽性を示し、7 頭において高い値を示した。その結果、呼吸器系感染症の中では百日咳菌が 25 ~ 88% 陽性であり、パラインフルエンザウイルスでは時期によって 3 ~ 94% の感染率

であった。これらは小児で問題となるが、野生チンパンジーにおいては初めての報告である。

Table. 1 チンパンジー糞中抗体陽性率

	HSV	EBV	VZV	CMV	HHV6	ENTV	RSV	<i>B. pertussis</i>	PIV
IgA									
2月	0%	49%	0%	0%	ND	ND	ND	41%	43%
8月	0%	28%	0%	62%	ND	0%	0%	15%	0%
IgG									
2月	0%	0%	43%	0%	0%	ND	ND	65%	3%
8月	ND	0%	18%	ND	0%	ND	ND	ND	54%

4) 糞中 DNA を用いた細菌およびウイルス遺伝子の検出: 糞のトータル DNA を用いて、ヘルペスウイルス科の 6 種類 (HSV1/2, EBV, VZV, CMV, HHV6) のウイルスにおいては、ヒトヘルペスウイルス 6 についてのみ 2% が検出され、アデノウイルス科については検出できなかった。ウイルス感染の場合、免疫によりウイルスの排除が起っていた可能性があり、症状を示した個体が見られなかったことと一致している。こういった場合には糞中の抗体を調べるやり方が大変有効になってくるが、粘膜免疫と血液中の液性免疫において、その相同性はウイルス種によっても異なることがわかっている。今回、現地で行った DNA の抽出がうまくいっていなかったか、もしくは抽出条件の調整が悪かった可能性も考えられる。ただ、遺伝子の抽出はできていたことは確認できているため、今後さらに PCR の条件を検討することによって、検出できる可能性も残される。

マハレに生息している野生チンパンジーにはその種特異的と思われる EBV および CMV の感染が認められたのと同時に、人由来感染症である *B. pertussis* および PIV1/2/3 に感染している可能性が示唆された。HSV1&2 において 0% の陽性率があり、CMV では 0~100%、EBV では 46~100%、VZV では 0~80% 陽性であった。季節や抗体のタイプにおいて陽性率が異なっていたが、これは糞中に排出される抗体の分泌様式が影響していると考えられた。ヒトとチンパンジー由来のヘルペスウイルス科のウイルスは抗原が似ているため、今回のウイルスがチンパンジー由来の可能性が残された。ただ、チンパンジー VZV は報告されていないため、ヒト由来の可能性もある。しかし、飼育下チンパンジーにおける陽性率と合わせて考えると、チンパンジー由来の可能性は否定できない。

5) 糞中抗体の母子間の比較 (Table. 2-1, 2): 糞中抗体の結果を母子間で比較した結果、EBV、CMV において母子ともに陽性であったが、EBV の 2 回目の調査時に採材したサンプルでは母子それぞれ、もしくは両方という結果になった。それ以外の VZV、*B. pertussis*、PIV1/2/3 においても採材の

タイミングにおいて母子の陽性率が変化していることが分かった。これは IgG もしくは IgA の違いにおいて一定の傾向は見られなかった。これらのウイルスは通常水平感染を起こすものであり、出生前は感染していないものと思われる。しかし、特に EBV などは唾液中に排出されるため、その後ほとんどの個体が陽転する。さらに、再感染の有無や持続感染の違い、および産生される抗体濃度による検出限界以下の場合が考えられた。

Table. 2-1 チンパンジー糞中抗体陽性率、母子間比較

IgA	EBV		CMV	<i>B. pertussis</i>		PIV
	2月	8月	8月	2月	8月	2月
n*	3	3	3	2	2	2
両方	100%	33%	100%	50%	0%	50%
親のみ	0%	33%	0%	50%	50%	50%
子のみ	0%	33%	0%	0%	50%	0%

*n は母子で比較できた組数

Table. 2-2 チンパンジー糞中抗体陽性率、母子間比較

IgG	VZV	<i>B. pertussis</i>		PIV
	2月	8月	2月	8月
n*	3	2	7	4
両方	67%	0%	57%	50%
親のみ	33%	50%	43%	50%
子のみ	0%	50%	0%	0%

*n は母子で比較できた組数

本研究において、飼育下チンパンジーのヒト病原体に対する罹患歴について報告した研究において明らかにされた病原体の中から、いくつかの病原体 (VZV, *B. pertussis*, PIV1/2/3) に対する抗体が検出された。今後も抗体の検出のみならず、病原体の分離や遺伝子検索も並行して行うべきであると考えられた。マハレのチンパンジーは中でも M グループが最も人に接近しており、ヒトからの感染の機会が多い。マスクを着用し、10m 離れるといったルールが設定されているが、人間の社会のようにそれらは不十分である場合もある。よって、今後も、啓蒙活動を行ってチンパンジーを観察する場合や、そうでない場合においても環境に配慮したエコツーリズムが望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, Akari H, Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki, Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. T. Primates. 査読有 2013 Jan; 54(1):89-98.

<http://link.springer.com/journal/10329>
Nakamura M, Corp N, Fujimoto M, Fujita

S, Hanamura S, Hayaki H, Hosaka K, Huffman MA, Inaba A, Inoue E, Itoh N, Kutsukake N, Kiyono-Fuse M, Kooriyama T, Marchant LF, Matsumoto-Oda A, Matsusaka T, McGrew WC, Mitani JC, Nishie H, Norikoshi K, Sakamaki T, Shimada M, Turner LA, Wakibara JV, Zamma K. Ranging behavior of Mahale chimpanzees: a 16 year study. Primates. 査読有 54 (2), 2013, 171-182.

<http://link.springer.com/journal/10329>
Kooriyama T, Hasegawa H, Shimozuru M, Tsubota T, Nishida T, Iwaki T., Parasitology of five primates in Mahale Mountains National Park, Tanzania. Primates. 査読有 2012 Oct;53(4):365-75.

<http://link.springer.com/journal/10329>
郡山尚紀, 研究紹介 人と動物の関係・人間活動と動物生態の関係, 北海道獣医師会誌 査読無, 2013, 57, 25-32, ISSN 0018-3385

<http://www.hokkaido-juishikai.jp/magazine/date/2015/>

郡山尚紀, 外国文化に親しむ - 私たちの国はこんな所 - (8) 【タンザニア連合共和国】観光地開発と野生動物保全のはざまに立つタンザニア, 酪農ジャーナル, 査読無, 2013, 66, 44-45, ISSN 0916-3360, <http://www.rakuno-journal.jp/top.htm>

〔学会発表〕(計 1件)

郡山尚紀, 伊藤葉子 P-15 野生チンパンジーと飼育かチンパンジーのヒト由来病原体への暴露に関する血清学的研究, 第20回野生生物と社会学会大会, 犬山, 2014

〔図書〕(計 1件)

MICHIO NAKAMURA, KAZUHIRO HOSAKA, NORIKO ITOH, KOICHIRO ZAMMA, Mahale Chimpanzees 50 Years of Research, Cambridge University Press, 2015

〔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

<http://laboratory.rakuno-ac.jp/lab0-376.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

郡山尚紀 (KOORIYAMA, Takanori)

酪農学園大学・獣医学群獣医保健看護学類・准教授

研究者番号: 50416278