

比較すると、後者は前者とほぼ同等であった (図 2)。

2) CCHFV-Vero E6 細胞 IFA と IgG ELISA: CCHF 患者血清 13 検体のうち 12 検体が 400 倍稀釈血清のカットオフ値 ($OD_{410}: 0.21$) に照らして陽性を示した。96 名の日本人血清は同カットオフ値によるとすべて CCHFV NP 抗体陰性と判定された (表 2)。精製された CCHFV NP を抗原とした IgG ELISA の CCHFV-Vero E6 細胞 IFA に比較した感度と精度は、それぞれ 93% と 100% であった。被験血清の CCHFV-Vero E6 細胞 IFA による抗体価と IgG ELISA の 400 倍稀釈における OD_{05} 値の関係を図 3 に示した。

3) WB 法による抗原性提示部位の同定: 抗 CCHFV NP ウサギ血清、2 検体のヒト患者血清が反応する部分蛋白を WB 法により検討したところ、すべての血清は GST-CCHFV NP3 にのみ反応したことから、CCHFV NP (482 アミノ酸) のほぼ中央部 (アミノ酸 201-306 番目) に強いエピトープ領域が存在することが明らかとなった。

D. 考察

CCHFV-Vero E6 細胞 IFA で陽性を示した血清の 90% 以上が組換え CCHFV NP を抗原とした IFA や IgG ELISA で陽性を示し、また、CCHFV-Vero E6 細胞 IFA で陰性を示した血清のほぼ 100% が同 IFA や IgG ELISA で陰性を示した。このことは、組換え CCHFV NP を抗原とした IgG 抗体検出システムの CCHF の診断および血清疫学的研究に有用であることを示している。BSL-4 実験室の稼働が許されていない我が国においては、組換え CCHFV NP を抗原とした IgG 検出システムをウイルス学的診断法のひとつとして用いることが可能であろう。我々が開発した IgG 抗体検出システムは、抗原作製時に CCHF ウイルスに感染する恐れがなく、しかも、高い精度と感度を有していることから、安全にしかも抗原を準備でき血清疫学的研究に応用される。今後、このシステムを用いて詳しい CCHF ウイルスに関する疫学的研究を行う予定である。

CCHFV NP の抗原性は、ほぼ中心部の 100 アミノ酸からなる領域にのみ存在することが明らかになった。この領域は、CCHFV の株

間で非常に保存されているため (、我々の作製した抗体検出系は、すべての CCHFV 抗体を検出可能であると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Ksiazek TG, Meyer RF, Peters CJ, Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1-7, 2001

2) Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Immunofluorescent method for detection of Ebola virus immunoglobulin G, using HeLa cells which express recombinant nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 776-778, 2001

3) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Miranda ME, Morikawa S. Ebola viral antigen-detection enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody to nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology*, in press.

4) 倉根一郎, 西條政幸, 新倉昌浩, 森川茂. クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの組換え核蛋白を用いた抗体検出システムの開発. 厚生科学研究費生活安全総合研究事業「侵入動物及び侵入ベクターのサーベイランス構築に関する研究. 平成 11 年度研究成果報告書, p70-74, 2000

2. 学会発表

1) 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. 蛍光抗体法によるエボラウイルスに対する抗体検出システム (感度と精度の評価). 第 74 回日本感染症学会総会, 福岡, 2000

2) 西條政幸, 新倉昌浩, 森川茂, 倉根一郎. エボラウイルスとマールブルグウイルスの組換え核蛋白を用いた抗体検出システム. 第 2 回日本検疫学会, 東京, 2000

3) 新倉昌浩, 池上徹郎, 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. NP 蛋白に対する単クローン性抗体を用いたエボラウイルス抗原検出 ELISA 系. 第 48 回日本ウイルス学会学術総会, 津, 2000

- 4) 西條政幸, 新倉昌浩, 池上徹郎, 緒方もも子, 森川茂, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) ウイルスの組換え核蛋白を用いた CCHF ウイルス感染症診断法の開発. 第 48 回日本ウイルス学会学術総会, 津, 2000
- 5) 池上徹郎, 新倉昌浩, 西條政幸, 緒方もも子, 森川茂, 倉根一郎, 吉川泰弘. エボラウイルスレ斯顿株自然感染サルの病理組織学的研究. 第 48 回日本ウイルス学会学術総会, 津, 2000
- 6) 池上徹郎, 森川茂, 新倉昌浩, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 吉川泰弘. エボラウイルスレ斯顿株 NP, VP35, VP40, GP の塩基配列. 第 48 回日本ウイルス学会学術総会, 津, 2000
- 7) Morikawa S, Saijo M, Niikura M, Tang Q, Kurane I. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibody detection system using its recombinant nucleoprotein. 6th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Manila, The Philippine, 2001

表 1. 被験血清の CCHFV-Vero E6 細胞 IFA と HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA による CCHF ウイルス抗体の有無の判定.

| | | HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA | | 計 |
|-------------------------|----|----------------------|----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| CCHFV-Vero E6 細胞 IFA | 陽性 | 13 | 0 | 13 |
| | 陰性 | 0 | 96 | 96 |
| 計 | | 13 | 96 | 109 |

表 2. 被験血清の CCHFV-Vero E6 細胞 IFA と HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA による CCHF ウイルス抗体の有無の判定.

| | | IgG ELISA | | 計 |
|-------------------------|----|-----------|----|-----|
| | | 陽性 | 陰性 | |
| CCHFV-Vero E6 細胞 IFA | 陽性 | 12 | 1 | 13 |
| | 陰性 | 0 | 96 | 96 |
| 計 | | 12 | 97 | 109 |

図 1. CCHFV NP およびその部分蛋白のアミノ酸の位置による図解.

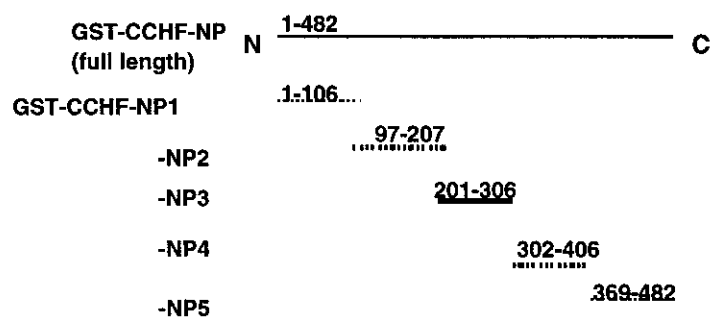


図 2. 被験血清の被験血清の CCHFV-Vero E6 細胞 IFA による CCHF ウイルス抗体価と HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA による抗体価の関係.

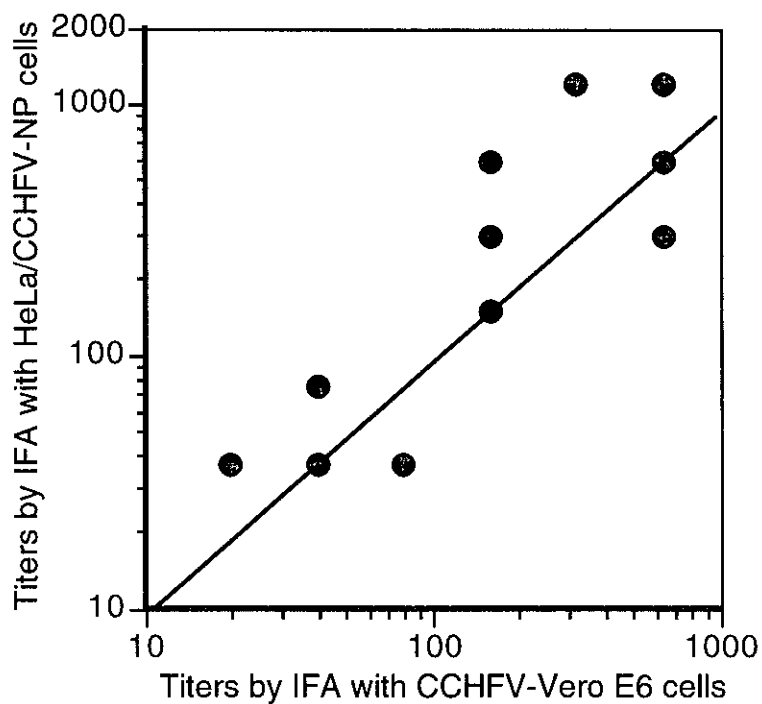


図 3. 被験血清の CCHFV-Vero E6 細胞 IFA による CCHF ウイルスに対する抗体価 IgG ELISA の 400 倍希釈における OD₄₀₅ 値の関係.

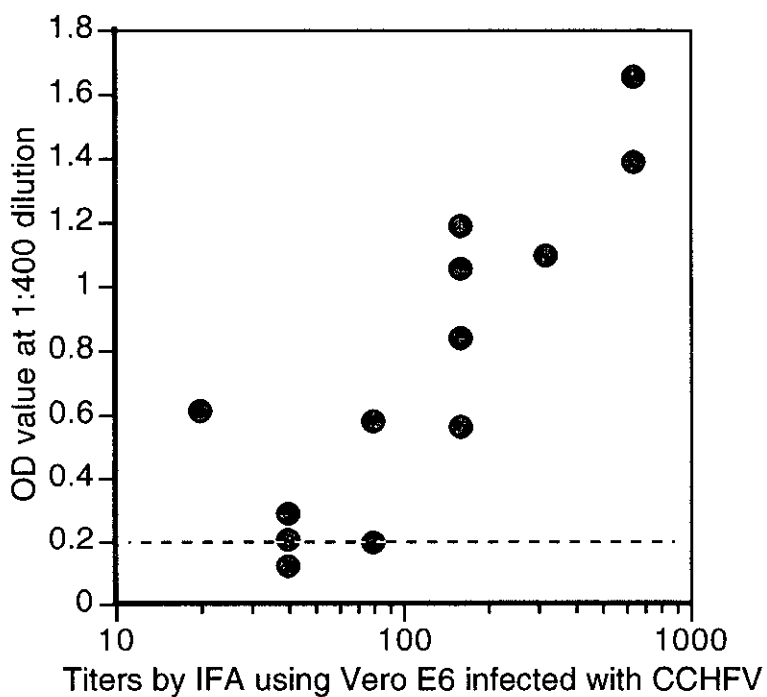


図 4. CCHFV 株間の NP エピトープ領域(201-306 アミノ酸)のアミノ酸配列の比較

| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 |
|-----------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 8402 | CREFVKGKYI | MAFNPPWGDI | NKSGRSGIAL | VATGLAKLAE | TEGKGVFDEA | KKTVEALNGY |
| 10200 | | | | |I..... | |
| 66019 | | | | | | |
| AP92 |I..... | | | |E.. |KD. |
| C68031 | | | | | | |
| DAK8194 | |V | | |E.. |KE. |
| Drosdov | | | | | | |
| HY13 | | | | | | |
| JD206 |M.. | | | | | |
| SPU415 | | | | | | |
| Uganda301 | | | | | |D..... |

| | 270 | 280 | 290 | 300 | 306 |
|-----------|-------------|-------------|------------|------------|--------|
| 8402 | LDKHKDEVDK | ASADNMITNL | FKHIAKAQEL | YKNLSALGAQ | GAQIDT |
| 10200 |R |S..... | L..... | ...S...R.. | S..... |
| 66019 | |T... | L..... | ...S...R.. | |
| AP92 |R..... | T.....V.S. | L..... | ...S...R.. | |
| C68031 | | | L..... | ...S...R.. | |
| DAK8194 | |S.V... | L...T..... | ...S...R.. | |
| Drosdov |R..... |S..... | L..... | ...S...R.. | |
| HY13 | | | L..... | ...S...R.. | |
| JD206 | |S..... | L..... | ...S...R.. | |
| SPU415 |R |S..... | L..... | ...S...R.. | |
| Uganda301 | |G.V... | L..... | ...S...LL. | |

研究テーマ：輸入動物由来人獣共通感染症の防疫対策としての狂犬病検査に関する研究

分担研究者：神山恒夫、国立感染症研究所、獣医科学部、人獣共通感染症室、室長
研究協力者：井上 智、同上 主任研究官

研究要旨

日本の狂犬病対策は検疫による狂犬病ウイルスの侵入防止とイヌのワクチン接種による狂犬病発症阻止が骨格である。日本では 1957 年に報告されたイヌの狂犬病を最後に動物における狂犬病の発生報告はない [11]。しかし、欧米ではイヌの狂犬病を制御した後に野生動物による狂犬病の流行が大きな問題となりこれまでに膨大な予算が野生動物の狂犬病対策に投入されている [12, 13]。一方、アジアの多くの国々ではイヌを中心とした狂犬病が現在も流行しており毎年 4-5 万人ものヒトが命を落としている [14, 15, 16]。日本では、狂犬病の制圧に成功して 40 年近く狂犬病の経験がない。しかしながら、いまだに多くの国々が狂犬病流行国である現状や毎年多くのヒトや物が容易に狂犬病流行国と行き交う日本の流通事情を考えると決して狂犬病の脅威から遠く離れているとは言い難い。このような状況下で、国内では感染症予防法の改正に伴う狂犬病予防法の改正が行われるところとなり 2000 年度から検疫の対象動物として新たにネコ、アライグマ、キツネ、スカンクが加えられるなど狂犬病の対策が強化されることとなった。狂犬病の国内への侵入と発生を阻止する方法として検疫やイヌに対する適切なワクチン接種の継続が大変重要なことは言うまでもない。一方で、狂犬病の感染が疑われた動物に対して適切な対応を行うためには正しい検査方法を確立しておくことが重要である。今回は、米国 CDC の協力を得て導入した野生動物を含めた狂犬病の検査方法について報告する。

A. B 研究目的と方法

人獣共通感染症対策の一つとして、野生動物を含めた狂犬病の検査方法を米国 CDC の協力により日本へ導入して確立することを行った。

【導入した検査方法と検査に使用した材料】

- (1) 直接蛍光抗体法。
- (2) ウイルスの遺伝子増幅方法 (RT-PCR 法)。
- (3) 感染組織からのウイルス分離方法。
- (4) 血清中のウイルス中和抗体価の検出方法。
- (5) 検査には CDC から分与をうけたウイルス株 (CVS 株) を使用した。
- (6) 感染材料には、BALB/c マウスと CDC から分与をうけたマウス神経芽腫細胞 (MNA 細胞) を使用した。
- (7) 野生動物に対する狂犬病検査方法の検討を北海道で野生化したアライグマ (*Procyon lotor*) の脳組織と血清を使用して行った。

研究の現状

米国 CDC で行われている狂犬病の検査方法の導入と確立を試みた。以下にこれまでに導入を行った検査方法の実験室内での試験成績を示す。また、国内で対応が迫られている輸入動物の狂犬病検査について野生化したアライグマ (*Procyon lotor*) を利用して検討を行った。導入した検査方法は (1) 直接蛍光抗体法、(2) RT-PCR 法、(3) 培養細胞によるウイルスの分離・増殖方法、(4) 血清中のウイルス中和抗体価測定方法 (RFFIT) である。野生化アライグマについては、直接蛍光抗体法、RT-PCR 法、RFFIT と間接蛍光抗体法による血中ウイルス抗体価の測定を行った。

検査の概要と注意点：

狂犬病の検査は主として感染が疑われた動物の脳組織について行う。狂犬病が疑われた動物は、安楽殺後速やかに頭部を切り離し検査可能な施設へ郵送する (郵送は万国郵便条約に準じた包装とする)。安楽殺後に外部寄生体を消毒剤等で除去しておく。検体の郵送はできるだけ冷蔵が望ましい。検査施設における脳の摘出は Laboratory techniques in rabies. Fourth edition. [1] の記載に準拠して行う。脳の摘出は周囲と区画された専用の部屋で行う。検査担当者は狂犬病ワクチンの接種が求められる。狂犬病に対する抗体価は 6 カ月ごとに測定を行い、値が最小許容抗体価 (0.5U/ml 国際単位もしくは 1:5 中和抗体価 (RIFFT)) を下回った場合に速やかに追加免疫を行う。脳の摘出に際しては感染組織の飛沫に十分注意を払う。脳の摘出後は全ての操作を安全キャビネット内で行うことが望ましい。脳摘出後の頭部は 2 重に重ねた専用の袋に密閉してウイルスの不活化処置を行い廃棄する。使用器具と部屋はオートクレーブ、1/4 アンモニウム不活化剤、45-70%アルコール、1%消毒剤、5-7%ヨウド剤等で十分にウイルスの不活化を行う。ウイルスの取り扱いに関する注意点は文献・資料 [2, 3, 4, 5] を参照。

検査担当者に求められる必要事項

- ・狂犬病ワクチンの接種
- ・病原微生物取り扱いに関する十分な経験と理解
- ・安全器具の正しい使用方法

検査時のウイルス暴露を防ぐための環境

- ・外部と十分に隔離された部屋
- ・バイオセーフティーキャビネットの使用

- ・オートクレーブ（汚染器具のウイルス不活化）の設置
- ・病原体の不活化剤（1/4アンモニウム不活化剤、45-70%アルコール、1%消毒剤、5-7%ヨウ素剤等）を常備
- ・専用の着衣（手袋（2重に使用）、着衣、マスク、ゴーグル、履き物等）を使用

国立感染症研究所病原体等安全管理規定（平成11年）では Rabies virus（街土毒、street strain）をバイオセーフティレベル3に分類している [5]。

<1> 直接蛍光抗体法：

直接蛍光抗体法による検査は、アンモン角、延髄、小脳、大脳の4箇所について同時に行う。直接蛍光抗体法は、簡便で感度のよい現在もっとも信頼度の高い狂犬病検査方法である。検査には米国CDCで使用されているモノクローナル抗体（Rabies FITC KIT/ CENTOCOR FITC anti-rabies monoclonal globulin、Fujirebio diagnostics,inc.）とポリクローナル抗体（BBL anti-rabies globulin/ Fluorescein labeled、Becton Dickinson Microbiology Systems）の2種類を使用した。

検査手技の概要（操作は安全キャビネット内で行う）：

- 1) 摘出した脳から海馬、延髄、小脳、大脳の組織をそれぞれ1cm角大に切り出す。
- 2) 各組織をスライドグラス（8穴、テフロンコーティング：HTC Super cured autoclavable）に2穴づつ圧片を行う。組織に付着している血液は非特異反応の原因となりやすいためできるだけ除く。厚い圧片標本では脳組織の自家蛍光や非特異反応などにより蛍光顕微鏡での観察が困難となりやすい。
- 3) キャビネット内で十分に風乾する。
- 4) 冷アセトンで固定（-20C、2時間以上）後に風乾（標本は-20Cで保存可能。長期間の保存は抗原性に影響するため注意する）を行う。
- 6) FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体（ポリクローナル抗体（BBL社）及びモノクローナル抗体（Centocor社）を20-30分間（37C）反応させる（使用抗体の希釈倍率は適時確認）。
- 7) PBS (-) にて10分間洗浄する（2回）。
- 8) スライドを蒸留水に2-3秒浸したのち風乾する。
- 7) グリセリン封入を行い蛍光顕微鏡下で狂犬病ウイルスの抗原を確認する。

陽性コントロール：固定毒（CVS株）を感染させたマウスの脳組織を圧片して作成する。

陰性コントロール：正常マウスの脳組織を圧片し

て作成する。

顕微鏡観察：通常200倍で観察。抗原量の少ない検体や蛍光の弱い検体では400倍で詳細な観察を行う。

参考：固定毒（CVS株）感染マウス脳で作成した圧片標本をモノクローナル抗体（CENTOCOR FITC anti-rabies monoclonal globulin）とポリクローナル抗体（BBL anti-rabies globulin/ Fluorescein labeled）で染色した場合の蛍光顕微鏡像を図1に示した。8穴スライドグラスは図3に示した。

<2> RT-PCR法：

RT-PCR法はウイルス抗原の検出が困難な事例に対して行われている。RT-PCR法による遺伝子検出は高感度である。目的遺伝子の重複汚染を防ぐためには実験環境と実験手技の十分な確立が求められる。ウイルス検出に使用するプライマーは核蛋白（N）とリン酸化蛋白（P）の翻訳開始領域を含む遺伝子配列から合成されたものである[6]。RT-PCR法の概要（ウイルスRNAの抽出は安全キャビネット内で行う）：

- 1) ウイルスRNAの抽出にはTRI-ZOL reagent（GibcoBTL社、No.15596）を使用した。RNA抽出の方法は添付された資料に記載されているので参照されたい。
- 2) 抽出RNAは50ulの蒸留水（RNase不活化処理をした）に溶解して使用直前まで-80Cに保存しておく。
- 3) RTプライマー（10g、10pmol）により逆転写反応を行う（Promega社、AMV reverse transcriptase、No.M5101）。試薬調整の詳細は添付された資料を参照されたい。
- 3) プライマー10g（10pmol）と304（10pmol）でPCR増幅を行う（TAKARA社、TaKaRa Ex Taq、No.RR001A）。試薬調整の詳細は添付された資料を参照されたい。
- 4) サーマルサイクラーにより遺伝子増幅を行う。
- 6) 増幅産物をアガロース電気泳動後、EtBr染色を行いUV照射によって目的遺伝子を確認する。

材料と反応条件：

逆転写用プライマー（PCRにも使用）：10g [CTA CAA TGG ATG CCG AC]

PCR用リバースプライマー：304 [TT GAC GAA GAT CTT GCT CAT]

RT：42C、45分 → 95C、5分

反応液（20ul）：10ul RNA、10pmol Primer、5xRB（Promega AMV-RT）、2.5mM dNTP、rRNasin（Promega AMV-RT）、DW

PCR：反応液（50ul）：各10pmolプライマー、TAKARA Ex Taq、10x Buffer、2.5mM dNTP、

DW

94C、1分----94C、30秒 40 37C、30秒--
--72C、90秒 72C、7分

参考：固定毒 (CVS 株) からウイルス RNA を抽出して行った RT-PCR の成績を図 2 に示した。

<3> ウイルスの分離方法：

狂犬病ウイルスの分離にはマウス神経芽種細胞 (MNA 細胞) を使用する方法を導入した。これまでウイルスの分離や病原性の確認には乳のみマウスが利用されてきたが、マウスの検査系では判定に長い日数 (一般に 21 日間の観察が必要) のかかることが欠点であった [1]。現在では培養細胞を利用した簡便な狂犬病ウイルス分離方法が幾つか開発されている。なかでも MNA 細胞 (NA-C1300) はヒトの神経細胞の特徴を多く持つことや神経細胞特有の膜蛋白、細胞内微細構造、酵素などを保持していることから大変有用と考えられている [1]。CDC では、マウスの試験系と MNA 細胞を使用した試験系を比較して両者間に差のないことを確認している。

ウイルスの分離方法の概要 (ウイルスの分離操作は安全キャビネット内で行う)：

1) Oリング付き 1.5ml 遠心チューブに 800ul の 10%ウシ胎児血清と抗生物質・抗カビ剤の入った培

養用培地 (EMEM-10) を準備する。

- 2) およそ 50mg の検体を遠心チューブに加えて 20% のホモゲナイズ液とする。
- 3) 遠心 (4C、1600 回転、10 分) を行い破碎した組織を沈殿させる。
- 4) 遠心上清を 1.5ml の培養細胞浮遊液 (およそ 2×10^6 個の MNA 細胞を 15ml コニカルチューブに浮遊したもの) に加える。
- 5) ウイルスと培養細胞の混和液を 37C で 1 時間培養を行う (15 分ごとに攪拌。1 時間以上の培養も可能)。
- 6) EMEM-10 をウイルス-培養細胞液に加えて 5ml に調整する。
- 7) ウイルス-培養細胞液を 8 穴のスライドに 1-2 滴滴下 (5ml ピペット使用) してスライド上で培養を行う (図 3)。残りのウイルス-培養細胞液 (およそ半量) は培養フラスコ (25ml フラスコ) で培養を行う。
- 8) 48 時間後に 8 穴スライドを PBS(-) で軽く洗いアセトン固定を行う。
- 9) FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体を用いて培養細胞内のウイルス抗原を確認する。

- ウイルス抗原の確認が困難な場合やウイルス感染が強く疑われている場合 -

10) 7) でウイルス-培養細胞液を播種した培

養フラスコの培地を新鮮な培地と交換してさらに 3 日か

ら 4 日間培養を継続する。

- 1) 培養の継続が終了したら、トリプシン処理を行って培養細胞を培養フラスコからはがす。
- 2) EMEM-10 を培養細胞液に加えて 5ml に調整する。
- 3) 8 穴のスライドに培養細胞液を滴下して細胞をスライドに固着させる (3 ないし 4 時間、もしくは翌日まで培養)。
- 4) アセトン固定後に FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体を用いて培養細胞内のウイルス抗原を確認する。
- 3) 判定、もしくはウイルスの回収。

<4> 血清中の中和抗体価 (RFFIT) の測定方法：

狂犬病ウイルスに対する中和抗体価の測定方法としてマウス神経芽種細胞 (MNA 細胞) を利用する RFFIT (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test) を導入した。マウスを用いたウイルスの中和試験方法が 1935 年に確立されて以来、世界中で広く行われている一般的な試験方法である [1]。1958 年に実験標準株である CVS (Challenge Virus Standard) 株が培養細胞で増殖可能なことが報告されると、培養細胞を利用した簡便で時間のかからないウイルスの実験方法が開発されるようになった [1]。現在、狂犬病ウイルスの感染を証明する方法として最も広く行われているのは蛍光標識された特異抗体を使用して感染細胞内のウイルス抗原を確認する方法である。CDC ではこの技術を使用して狂犬病ウイルスの中和抗体価測定方法 (RFFIT) をルーチンで行っている。彼らは、マウスの試験で得られた中和抗体価と RFFIT (MNA 細胞を使用) で得られた中和抗体価の成績比較を行い、RFFIT が信頼のおける方法であることを確認している。

RFFIT 法の概要 (ウイルスの操作は安全キャビネット内で行う)：

- 検査血清の準備 -

- 1) 被験血清を、56C で 30 分間加熱して非動化する。
- 2) 75ul の EMEM-10 に 50ul の被験血清を加えて十分に混和する。
- 3) 2) の混和液 25ul を 100ul の EMEM-10 に加えて血清を希釈する。
- 4) 3) の希釈液 25ul を 100ul の EMEM-10 に加えて順次段階希釈を行う。
- 5) 血清の希釈は 4 段階行う (希釈は直接チャンバースライド (図 3) で行うことも可能)。

- 被験血清によるウイルスの中和 -

__6) 段階希釈の終了した被験血清に 100ul のウイルス (感染価: 32-100FFD50) を加える。

7) ウイルスを加えた血清を 0.5%-CO₂ 条件下、35C で 90 分間培養を行う。

- 培養細胞への感染 -

8) 培養 3-5 日目の MNA 細胞を培養フラスコから回収する (使用細胞は Wistar Institute、Philadelphia

から CDC に分与されたもの; 類似の培養細胞は ATCC から購入可能 (CCL131))。

9) MNA 細胞を EMEM-10 (10%ウシ胎児血清、100U/ml ペニシリン、100ug/ml ストレプトマイシン、0.25ug/ml アンフォテリシン B、E-MEM 培地) に再浮遊して細胞数を 1-2x10⁶/ml に調整する。

10) 操作 7) で調整した 200ul の MNA 細胞液をチャンバースライドの各ウェルに加える。

11) ウイルスを吸着させた培養細胞は 0.5%-CO₂ 条件下、35C で 20 時間の培養を行う。

- 固定・染色と蛍光顕微鏡による被験血清の中和抗体価測定 -

12) 培養液をウイルス不活化液と混ぜて廃棄する。

13) チャンバーを外したスライドを PBS(-) で軽く洗い冷アセトン (-20C) で 10 分間以上の固定を行う。

14) スライドをキャビネット内で風乾する。

15) FITC 標識-抗狂犬病ウイルス抗体 (Centocor 社) を 20-30 分間 (37C) 反応させる。

16) PBS (-) で 10 分間、2 回の洗浄を行う。

17) スライドを蒸留水に 2-3 秒浸したのち風乾する。

18) グリセリン封入を行い蛍光顕微鏡下で狂犬病ウイルス抗原の分布を観察する。

- 中和抗体価の算出 -

19) 血清の中和抗体価 (FFD50: the focus-forming dose) は、蛍光顕微鏡で観察した 20 視野 (倍率

200 倍で観察) の半数 (50%) で視野内にウイルス抗原陽性の感染細胞が 1 個以上見られた時の血清

希釈倍率とする。

RFFIT の確認: 狂犬病ワクチン接種ヒト血清と非接種ヒト血清をそれぞれ陽性コントロールと陰性コントロールとして、RFFIT による中和抗体価の測定を試みた。

参考: 検査にもちいた MNA 細胞の培養方法、感染に利用した固定毒 (CVS 株) の増殖方法、感

染価の算出方法、50% 中和抗体価の算出方法は参考文献 (1) に詳しく記載されている。

<5> 北海道で野生化したアライグマを用いた検査成績:

狂犬病予防法の改正によって検疫の対象動物としてネコ、アライグマ、キツネ、スカンクが加えられることになった。そこで、野生動物を含めた狂犬病の検査方法を確立するために野生化したアライグマの脳組織と血液を検査材料として導入した方法を試みた。

検査の概要:

検査材料: 1999 年度に北海道野幌地域で捕獲された野生アライグマ (*Procyon lotor*) 22 頭の脳組織と血液を利用した。

検査:

直接蛍光抗体法 (1)、RT-PCR 法 (2)、血清中のウイルス中和抗体価の測定 (3) を <1> から <4> で示した方法にしたがって行った。

成績:

(1) 直接蛍光抗体法は脳の摘出が可能であった 15 頭について行った。検査したアライグマの脳組織はいずれも狂犬病ウイルス陰性であった (図 4)。陽性コントロールとして使用した固定毒感染マウスの脳組織はいずれも陽性であった。

(2) 直接蛍光抗体法を行った脳組織について RT-PCR 法を行った。標的の遺伝子はいずれの脳組織からも増幅されなかった。陽性コントロールとして使用した固定毒感染マウスの脳組織ではいずれも標的遺伝子が増幅された (図 5)。

(3) 採血の行われた 20 頭の血清についてウイルス中和抗体価の測定を行った。被験血清はいずれも溶血が著しかった。血清希釈 5 倍では MNA 細胞がチャンバースライドから脱落するなどの障害がみられていずれの血清も検査はできなかった。被験血清 20 例中 11 例は血清希釈 25 倍で中和抗体価陰性となった。残りの 9 例は血清希釈 25 ないし 50 倍で細胞障害が示されたため中和抗体価を求めることができなかった。同 9 例について血清のカオリン処置をして検査を再度行ったが、同様の理由により中和抗体価を求めることはできなかった。なお、被験血清はプロテイン A (蛍光色素標識) を利用した間接蛍光抗体法によりいずれも血清希釈 25 倍の値で抗狂犬病ウイルス抗体陰性であった (図 4)。

課題: 直接蛍光抗体法、RT-PCR 法、いずれの方法も狂犬病ウイルス (固定毒、実験株) の検出に成功した。今後は、野生ウイルス株に対する検討が必要と考えられた。野生アライグマの血清を用いた RFFIT では場合によって中和抗体価の測定ができないことが示された。野生動物の血清を用いた抗体検出系については検査方法について検討する必要があると考えられた。【CDC からのコメント: 野生動

物の血清は培養細胞に対する細胞毒性が強くしばしば成績が得られないことがある。可能であれば検査には新鮮かつ溶血の見られない血清を使用する。】

C. 考察・課題

米国 CDC で行われている狂犬病検査法を導入した。今後、国内で狂犬病検査を正しく行っていくためには以下に示した事柄についての検討が必要と考えられた。(1) 導入した検査方法の質をいかに維持するか。(2) 実験株ではなく、野外株についても導入した検査方法を同様に行えるか。

(3) 導入した検査方法をどのように普及するか。(4) CDC で検査される機会の少ないアジアなどの狂犬病ウイルスについて各検査の検出感度は十分であるか。(5) 野生動物の検査は該当動物ごとに検査系を検討する必要があると考えられる。

D. 研究発表

Inoue,S., Moriishi,K., Koura,M.and Kamiyama,T. The research on rabies and rabies-related virus in Japan to keep the rabies free situation. The Xth Annual Rabies in the Americas Meeting. November 14-19, 1999. San Diego California, USA.

参考文献：

・検査方法と狂犬病ウイルス取り扱いに関する資料

- (1) Laboratory techniques in rabies. Fourth edition. Edited by F.X Mesl in M.M. Kaplan, H.Koprowski WHO Geneva, 1996.
- (2) WHO / 8th Report if the WHO Expert Committee on Rabies. Technical Report Series, No.824, Geneva, 1992.
- (3) Rabies: Guidelines for Medical Professionals, Veterinary Learning systems, a division of MediMedia, 1999.
- (4) 4th Edition. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. CDC/NIH
- (5) 国立感染症研究所病原体安全管理規程
- (6) Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis. J.S.Smith, L.A.Orciari, P.A.Yager, H.D.Seidel, and C.K.Warner. J.Infect.Dis. 166:296-307. 1992.

・狂犬病の発生状況に関する資料

- (7) World Survey of Rabies No 33 for the year 1997. WHO/DCDSR
- (8) Viral Infections of Human. Epidemiology and Control. Rabies, 14th ed. P665-690. 1997.
- (9) Reprort of the 3rd International Symposium on Rabies in Asia, Wuhan, China, 11-15 Sep. 1996
- (10) WHO Rabnet Map
[<http://oms.b3e.jussieu.fr/rabnetS/>]

・狂犬病の概要に関して記載された資料

- (11) 特集・エマージングウイルス感染症-人類の新たな脅威となるウイルス病/狂犬病と狂犬病ウイルス井上 智. 企画: 倉田 毅. 生物の科学 遺伝: 53, 14-19. 1999年.
- (12) A review of the economics of the prevention and control of rabies. Part 1: Global impact and rabies in humans. M.I.Meltzer and C.E.Rupprecht. Pharmacoconomics. 14:365-383. 1998.
- (13) A review of the economics of the prevention and control of rabies. Part 2: Rabies in dogs, livestock and wildlife. M.I.Meltzer and C.E.Rupprecht. Pharmacoconomics. 14:481-498. 1998.
- (14) Rabies control in the republic of the Philippines: benefits and costs of elimination. D.B.Fishbein, N.J.Miranda, P.Merrill, R.A.Camba, M.Meltzer, E.T.Carlos, C.F.Bautista, P.V.Sopungco, L.C.Mangahas, L.M.Hernandez, M.M.Leoncio, D.Mercado, S.Gregorio, E.Salva, J.G.Dobbins and W.G.Winkler. Vaccine 9:581-587. 1991.
- (15) Rabies. T. Hemachudha. in Central Nervous System Infectious Diseases and Therapy. Ed by Karen L.Roos. Marcel Dekker, Inc., New York
- (16) Human Rabies Prevention - United States, 1999. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 48:RR1. 1997.

分担研究報告

コモンスザル *Saimiri sciureus* のトキソプラズマ症に関する研究

分担研究者：宇根 有美（麻布大学 獣医学部）

研究協力者：古田隆久、小村みづほ、松谷法子（東大医科研、麻布大学獣医学部）

研究要旨

国内の2カ所（A、B）のコモンスザル（*Saimiri sciureus*）飼育施設で大規模な致死性トキソプラズマ症が発生し、これを疫学および病理学的に検索した。また、感染経路の検討のため感染実験を試みた。両施設とも飼育頭数の約50%（76頭）がトキソプラズマ症を発症し、甚急性から急性の経過で死亡した。A、B施設間で病理学的所見に差はなく、肉眼的には肺水腫、肝腫、脾腫、腸間膜リンパ節の腫大、胸・腹水の貯留が目立った。病理組織学的検索では全身諸臓器に *Toxoplasma gondii*（Tg）のタキゾイトの増殖を伴う壊死性～肉芽腫性炎が観察され、特に肺と肝臓で顕著であった。感染個体の肝臓および肺からTgの遺伝子がnestedPCR法により検出された。Tg抗体検査の結果は、A施設の同居サル8頭はラテックス凝集法ですべて陰性。B施設ではラテックス凝集法0/15、ウエスタンブロットィング（WS）法10/15陽性であった。

Tg感染経路を検討するために、3頭のサルにTgME49株接種マウス脳を経口投与し、未接種サルを同居させた。その結果、接種サルのうち2頭は1週間目に斃死、この時点で残りの1頭も重篤な臨床症状を呈したため安楽死の処置をとった。接種サルの病理学的所見は自然発症例とほぼ同様であった。同居ザルの抗体価の推移をWB法で検索したところ、実験開始1週後に抗体が出現し、漸次3週まで抗体値が上昇した。また、これらのサルを3週目に安楽死し、肝臓と肺をnestedPCR法で検査したところ、Tgの遺伝子が検出された。以上のことから、リスザルはTgに対して感受性および致死率が高く、サル間で水平感染する可能性が示唆された。

A 研究目的

トキソプラズマ症は、猫を終宿主として広域な宿主域を有する原虫疾患で、人畜共通感染症として、良く知られており15)16)17)19)23)、最近では免疫不全患者における重要な日和見感染症の1つとして注目されている15)19)20)31)、。一般にリスザルを

含めて新世界ザルおよび原猿類のサルは、*Toxoplasma gondii*（Tg）に感受性が高いといわれ3)9)、国内・外でいくつかの報告がある2)6)7)14)22)。本研究では、国内の2つ施設で発生した今まで類をみないほどの大量死を招いたリスザルのトキソプラズマ症の疫学的、病理学的特徴を明らかにし、感染経路

を考察することを目的としている。

B 研究方法

1. 自然発生トキソプラズマ症

調査期間中 (A 施設 : 1995 年 6 月 ~ 1998 年 1 月、B 施設 : 1997 年 9 月 ~ 1998 年 11 月)、両施設で斃死した計 92 頭 (A 施設 70 頭、B 施設 22 頭) のサルを剖検し、うち A 施設の 6 頭と B 施設の 22 頭、合計 28 頭のリズザルを病理組織学的に検索した。病理組織学的検索はホルマリン固定後、常法に従ってパラフィン切片を作製し、HE 染色、必要に応じて PAS 染色を行った。3 頭については肺と脾臓でスタンプ標本を作製し、また 2 頭については胸水と腹水の塗抹標本を作製し、ギムザ染色を行った。

Tg に対する抗体検査は、ラテックス凝集法 (ヒトおよび動物用トキソチェック-MT, 栄研, 田辺製薬) と TgME49 株を抗原としたウエスタンブローティング法を用いて、A 施設の同居サル 8 頭 (1995 年 10 月、11 月集団発生後)、および B 施設では 3 回 (1998 年 6 月、7 月、10 月) 21 頭、延べ 51 頭の抗体検査を行った。

PCR 法による *Toxoplasma gondii* の証明は、A 施設の 2 頭と B 施設の 3 頭合計 5 頭のホルマリン固定の肝臓と肺から DNA を抽出し、トキソプラズマ増殖虫体に特異的な酵素である NTPase の遺伝子をコードするプライマーを用いて nestedPCR を行った。

2 *Toxoplasma gondii* 感染実験

健康な Tg 抗体陰性のコモンスザル 5 頭

(No.41 ♀ 2 歳、No.51 ♀ 2 歳以上、No.48 ♂ 2 歳、No.43 ♀ 2 歳、No.52 ♂ 1 歳) を用いた。これらのサルのうち、No.41、No.51、No.43 に、 $1 \sim 2 \times 10^3$ のシストを含む TgME49 株感染マウスの脳を経口投与した。同日、1 群として No.41 と No.51 接種サルに No.48 未接種サルを、2 群として No.43 接種サルに No.52 未接種サルを同居させた。抗体検査は同居 3 日後、1 週間後、2 週間後、3 週間後に採血し、ウエスタンブローティング法を用いて実施した。剖検時に、肝、肺、被毛を PCR 検査用に、肺洗浄液、全身諸臓器を病理検査用に採材した。

C 研究結果

1. 自然発生トキソプラズマ症

1) 発生状況

A 施設 : 1989 年に 74 頭 (♂14、♀60) のコモンスザルを南米から導入した。その後、大過なく飼育されていたが、1995 年 6 月 ~ 1998 年 1 月の 20 カ月の間に 70 頭が斃死した。このうち、1995 年 6 月 ~ 1996 年 6 月の 13 ヶ月間に相次いで死亡した 63 頭は、同一の症状と肉眼像を呈していた。発生状況は図に示すとおりである。1995 年 6 月 13 日、8 月 10 日、9 月 6 日、7 日に各 1 頭斃死。9 月 26 日 2 つの群 (61 頭と 19 頭) を混飼。9 月 28 日、10 月 1 日、2 日に各 1 頭。10 月 3 日 4 頭、4 日 5 頭、5 日 9 頭、6 日 13 頭、7 日 13 頭、8 日 3 頭が斃死し、連続した死亡は 10 月 8 日で一旦終息し、その後、翌 1 月までに散発的に 7 頭が斃死した。

臨床症状として、9 月 28 日 ~ 10 月 4 日ま

では何らの前兆なく、突然死の状態で見られるものが多く、10月5～8日の間では、群全体の食欲が低下し、黒色便の排泄が観察され、流涙、運動の低下や沈鬱を呈した個体のほとんどが斃死した。その経過は短く、発症より数時間～数日の経過で死亡した。治療として、10月2日セファム系抗生物質（全頭）、4日ゲンタマイシン（1頭）、5日ゲンタマイシン、テラマイシン、エンロフロキサシン（5頭）、6日スルファジメトキシナトリウム、エンロフロキサシン（21頭）、10～17日までスルファジメトキシナトリウム（4頭）の投与を行っているが効果はなく、死ぬものが死に尽くして発症が終息した感があった。死亡が集中した9月28日～10月8日の間に50頭が死亡し、致死率は59%に達した。

なお、リスザルが飼育されていたパドック内（檻内）に猫が侵入した形跡はなかったが、パドック内に1995年5月20日と7月19日の2回、土が搬入され、この土はパドックに搬入される以前、飼育施設内に放置されており、この土の付近に猫が徘徊しているところが確認されている。

B施設では1991年4月からコモンリスザル10頭からなる群の展示飼育を開始し、繁殖が進み1997年には飼育頭数は24頭となった。1997年9月突然2頭が斃死し、98年12月までに計22頭が死亡した。同施設において死亡個体の剖検を行い、病理学的所見から22頭中13頭がトキソプラズマ症と診断された。その発生状況は図に示すとおりである。1997年9月2頭、1998年6月2頭、7月1頭、11月6頭および12月2頭が斃死し

ている。発症後の経過は短く、突然死もあった。また、11月の集団発生では、飼育施設の暖房機の故障により、室温10℃以下の状態が1週間程度続いたのち15頭中6頭が発症した。また、12月の発生前には飼育機関の変更のため、長時間輸送が行われ、輸送の1週後に8頭中2頭が斃死した。なお、この施設では、猫を含め他の動物がリスザル舎に侵入することはなかったが、飛来した昆虫をリスザルが捕獲し食べていたことがあった。'98年9月にサルファ剤を飼料に混ぜて投与したがその後も発症が見られた。

両施設とも、餌として生肉は与えたことはなく、他の飼育動物にもトキソプラズマ症の発症はなかった。なお、飼育施設内に入る際に長靴をはきかえる習慣はなく、消毒槽は設置されていなかった。

2) Tg抗体検査

A施設の同居サル8頭（1995年10月16日3頭、12月25日5頭）について、動物用ラテックス凝集法を用いて抗体検査を行ったところ、すべて陰性であった。B施設では、表に示す内容で検査を行った結果、動物用とヒト用のラテックス凝集法では33例すべて陰性であった。WS法では、18例中11例陽性、2例弱陽性であった。ラテックス凝集法とWS法との相関はなかった。10月の抗体検査後、トキソプラズマ症で死亡したサル8頭中4頭がWS法陽性で、他は陰性であった。

3) 病理学的検索

病理学的に検索した28頭のうち、A施設

の6頭のうち3頭と、B施設の22頭のうち13頭がトキソプラズマ症と診断された。(各施設におけるトキソプラズマ症の発生状況の図は、トキソプラズマ症と診断されたサルのみを計上)

(1) 肉眼的所見

両施設のトキソプラズマ症に共通して、肺水腫、胸・腹水症、肺炎、腸間膜リンパ節の腫大、脾腫、肝腫、肝の褪色が観察され、他に小腸潰瘍、小腸の出血なども認められた。

特に肺は水腫性で著しく退縮不全で、肺気道洗浄液中に多数のタキゾイトを含むマクロファージが観察された。肝臓は著しく腫大、褪色し、小葉明瞭であった。リンパ装置はいずれも腫大していた。また、種々の程度の腔水症があり、高度のものでは、腹水が10mlを越え、多くのタキゾイトを含んでいた。

(2) 病理組織学的所見

病変の程度に差はあるものの、組織学的にはいずれの症例もほぼ同様の所見であった。肺では、肺胞壁の肥厚と巣状壊死、フィブリンを含む水腫液の貯溜、泡沫化した細胞質を有するマクロファージの肺胞内への滲出が認められた。Tg タキゾイトは、肺胞上皮細胞やマクロファージ内に集塊あるいは散在して観察された。肝臓では、小壊死巣や肉芽腫形成、門脈域のリンパ球浸潤があり、タキゾイトは、肝細胞、血管内皮細胞やクッパー星細胞内で増殖し、一部の肝細胞内にシスト形成が認められた。腸間膜リンパ節を主として壊死性リンパ節炎が頻発し、脾臓にも壊死巣、線維素析出、出血が観察された。ほとんどの例で、小腸絨毛は水腫性に腫大し、粘膜上皮

から固有層に多数の核破砕物を認められ、絨毛壊死、糜爛、潰瘍、リンパ小節の壊死などが観察された。少数ながら、タキゾイトは粘膜上皮細胞、固有層と血管内皮細胞にみられた。その他、症例によって様々であったが、タキゾイトは、脾臓、リンパ節、膵臓、筋、脳、心、腎などの実質細胞および血管内皮細胞にも観察された。

4) PCR法を用いたTgの検出

A施設2頭とB施設の3頭の肝および肺からDNAを抽出しPCR法によりTgの遺伝子の検出を試みたところ、Tgに特異的な275bpのバンドが観察された。

2. *Toxoplasma gondii* 感染実験

Tg接種サルは、接種後1週間で、2頭(No.41、No.43)は急死、No.51は発熱、体動を嫌い、沈鬱となり、安楽死せざるおえない状態におちいた。接種サルに見られた病理学的所見は、自然発生性のトキソプラズマ症とほぼ同様で、肺洗浄液中に多数のタキゾイトが観察された。同居サルは接種サルが斃死してから数日活力の低下があり、No.52にクシャミ、食欲低下、嘔声が見られたが、3週目には回復した。ウエスタンプロテイング法を用いて抗体の変化を検索したところ、No.52では実験開始1週後に抗体が出現し、漸次抗体価が上昇した。No.48では実験開始2週後に抗体が出現し、漸次抗体価が上昇した。また、同居サルを病理学的に検索したが、No.52に片側性の下顎リンパ節炎が認められたのみで、両例にTg感染を示唆する病理学

的所見はなかったが、肺、肝臓、被毛のPCR検査で、Tg 特異バンドが検出された。

D 考察

トキソプラズマ症は、猫を終宿主として広域な宿主域を有する原虫疾患で、人畜共通感染症として、良く知られた疾患である(15)16)17)19)23)。ヒトは Tg に対して抵抗性があり、後天性トキソプラズマ症のほとんどが不顕性であるが、近年、HIV 感染者、臓器移植など免疫抑制状態の患者の日和見感染症として重要視され、米国では、HIV 感染者の 15~40%がトキソプラズマ抗体を保有しており 1)、トキソプラズマ症の発症が AIDS 発症のメルクマールとなっている。

動物では、マウス、豚、カンガルーなどが *Toxoplasma gondii* (Tg) に高感受性であることが知られている。また、リスザルを含め新世界ザルは旧世界ザルと比較して Tg に対して感受性が高いとされ、新世界ザルにおけるトキソプラズマ症は致死的事であることが報告されている 3)9)。

今回、我々は、関連のない国内の2つのリスザル多頭飼育施設で、併せて76頭、飼育頭数の約50%が死亡するという致死的なトキソプラズマ症の集団発生に遭遇した。甚急性から急性の経過をとるといった個々の臨床症状や病理学的所見は、過去のリスザルのトキソプラズマ症 2)6)7)14)22)や一般に様々な動物の急性トキソプラズマ症で見られる病理学的所見 11)18)25)27)と一致していたが、A施設での発生状況のように、11日間に50頭が死亡し、致死率は59%に達するといった

大量死と高致死率を示した報告はなかった。

リスザルの Tg に対する感受性について、Cunningham らは 1992 年に感染経路として生肉が疑われたリスザルのトキソプラズマ症を報告しているが、同じ肉を旧世界ザルにも与えていたにも関わらず、トキソプラズマ症を発症せず、ヒトと同様に耐過したことから、リスザルの Tg 高感受性を指摘している 6)。また、リスザルのトキソプラズマ症は 1968 年に Mckissisk らによって初めて報告され 22)、その後も数々報告されているが慢性感染の報告はない 2)6)7)14)22)。新世界ザルが Tg に高感受性であるのは、新世界ザルが樹上生活をしている上に、南アメリカに棲息する猫科の動物が少ないために、進化の過程で Tg のオーシストと接触する機会が無く、Tg への免疫応答機構を欠いているからだという仮説がある。対して旧世界ザルは進化の過程で猫科の動物と接する機会が多々あり、抵抗性を獲得し、特別に免疫抑制をかけなければトキソプラズマ症を発症し死に至ることがないとされている 3)9)。加えて、リスザルは、IL-1 β 分泌がヒトの 1/100 である一方で、TGF- β の単核球からの分泌はヒトの 4 倍であるとされている 12)。また、リスザルでは血清コルチゾール値がヒトやその他の旧世界ザルに較べて 10 倍も高値を示すといわれており 5)、これらがリスザルの高 Tg 感受性と関連しているのかも知れない。

今回の事例では、短期間に多数のリスザルが発症している。ヒトでは、エイズウイルス感染がトキソプラズマ症のトリガーとなるが 19)20)21)、今回の発生に関して、免疫抑制

あるいは Tg に対して易感染性を誘発する可能性のある感染症は見出せなかった。しかし、A 施設では展示パドックに土を搬入した後、トキソプラズマ症による死亡が見られ始め、その 4 ヶ月後、2 つの群を混ぜてから短期間に多数のサルが死亡した。また、B 施設では、施設の不都合で、熱帯に棲息するリスザルが不適切な温度下で飼育された後、および長期の輸送のあとに集団発症が起きた。このように Tg により飼育環境が汚染され、感染個体のうち弱いものが散発的に死亡していた所に、2 つの群の混飼や寒冷、輸送など多くの個体の免疫力を低下させる様々なストレスが加わり、トキソプラズマ症の集団発症が起きたと思われた。一般に生体がストレス下におかれると、炎症を抑制する副腎皮質ホルモンの分泌が亢進することから免疫抑制状態となり、様々な病気を発症しやすくなる 13)。

寺尾らは心理的あるいは社会的ストレスがサル類の神経・免疫・内分泌相関（クロストーク）に及ぼす影響について研究している 26)。彼らによれば集団での生活が中心となる多くのサル類で、ヒトと同様に他個体との関係調節が個体の生存にとって必須の社会的行為であり、近親個体との別離や未知の他個体との遭遇は著しい心理的・社会的ストレスとなる。サル類を用いたストレスモデルについては 80 年代初頭から様々報告されており、実験的なストレス負荷モデルとして母子分離、同胞分離、社会的隔離、群形成、群導入、社会的順位、優劣関係、社会的競合などの様々な手続きが使われている。これらにより抑鬱、恐れ、回避行動のようなストレス関連行動が

多発する。特に群形成のような社会的順位の形成を伴う手続きでは低レベルだが持続するストレスを招き、サル類の免疫機構に変化が起きると述べている。さらに、マウスの実験では寒冷感作によってマクロファージの数が減少し、その機能も抑制されることが知られている。機能が抑制されたマクロファージは貪食した T. g タキゾイトを死滅させることが出来ない。さらに寒冷によって Tg に対するバリアーとして重要な IFN γ の産生も減少するといわれている 4)。

Tg はマウスに対する病原性の強さによって様々な株に区別され、代表的なものに病原性の強い RH 株、病原性の弱い ME49 株がある。RH 株をマウスに実験的に感染させると多量接種の場合には急性症状を呈して 4、5 日で死亡するため、シスト形成は認められない。一方マウスに ME49 株を感染させた場合には慢性感染し、脳にシストを形成する。今回、2 つの施設で流行した Tg の病原性に関して、詳細に検討はしていないが、TgME49 株をリスザルに感染させたところ 7 日目に斃死した。また、B 施設由来の Tg をマウスに接種し 6 カ月以上経過を追ったが、マウスは発症・死亡せず、脳に多数のシスト形成が見られたことから、今回、サルから分離された Tg の病原性はそれほど強くないものと推察され、やはり、リスザルの Tg 高感受性が支持する結果となった。

感染源に関して、以前の報告では、Tg シストを含む肉の給餌が原因であったといえるものが多い 6)10)。しかし、今回の例ではリスザルに肉を与えた事実はなく、猫が直接施設

内に侵入することもなかった。しかし、A 施設では猫の徘徊が観察された場所の土を搬入した後、トキソプラズマ症が流行したことから、搬入した土がオーシストに汚染されていた可能性が最も高かった。また、リスザルは好んで昆虫を捕食するが、両施設のリスザルともにオープンスペースでの飼育で、外界とは金網での仕切のみであり、昆虫を捕食する機会があった。ゴキブリやハエといった昆虫が Tg やコクシジウムのオーシストを機械的に媒介する事が知られている (24)。同様に、汚染された履き物での飼育施設内へのヒトの立ち入りが Tg を媒介する可能性もあったが、B 施設に関して、感染源はまったく不明であった。

Tg 感染の最も一般的な経路はオーシストおよびシストの経口感染である。Tg は中間宿主に経口的に接種された後、オーシストおよびシストが胃酸により融解され、小腸で破裂してタキゾイトとなる。遊離したタキゾイトは腸粘膜に侵入し腸間膜リンパ節にて増殖後、マクロファージに食食されて、血管を介して全身諸臓器へ広がる (15)(16)(17)(19)(23)。このことからトキソプラズマ症が再燃した個体での腸病変よりも、経口的に初めて感染が成立した個体での腸病変が高度となると推察される。今回、トキソプラズマ症で死亡したリスザルのうち 7 頭で腸管にタキゾイトが観察されたため、これらの個体は慢性感染のトキソプラズマが再燃したのではなく、初めて経口的に感染が成立した個体である可能性が高いと考えられた。しかし、腸管病変の有無の関わらず、ともにシスト形成に乏しく、体

内での病変分布にも差がないように感じられた。

今回、リスザルにおける Tg の水平伝播の可能性を検討するため、感染実験を行った。その結果、実験的にトキソプラズマに感染させた個体と同居させた個体では、実験感染後病理組織学的に病変の形成は認められなかったものの、ウエスタンブロッティング法により 1 週間から 2 週間の間に抗体が発現し、漸次上昇した。また、実験開始 3 週間後に、同居個体の肝臓と肺について nestedPCR をおこなってなった結果トキソプラズマの遺伝子が検出された。抗体価は通常感染 1~2 週間から上昇すると言われているため、これらの事実は実験の初期に、感染個体から非感染同居個体へ水平感染が起こったことを示している。自然発症個体も実験感染個体もともに、肺病変が高度で、多数の肺胞マクロファージ内にタキゾイトが観察されたことから、肺胞マクロファージ内のタキゾイトが体外に放出され、これにより水平伝播が起こったのではないかと考えている。今回の事例においても、何例かは、一次感染個体から、同じ群の個体へ水平伝播により二次的に Tg 感染が広がった可能性があったと考えた。また、飼育施設からの報告書によると外景検査で 3 頭に外傷が認められ、このうち一頭は他の個体に前肢一側、後肢一側を喰いちぎられた傷であった。この事から、T. g 感染個体から非感染個体へ噛み傷を通してタキゾイトの感染が伝播した可能性も考えられた。

トキソプラズマ症の診断法として、例えば豚や人における診断法としては手技が容易で

手軽なラテックス凝集反応のキットが普及している。これは間接赤血球凝集反応の赤血球の代わりに原虫抗原が付着したラテックス球を使用した方法である (15)16)17)19)23)。リスザルについても当初、ヒト用と動物用それぞれのラテックス凝集反応キットを用いて診断を試みているが全頭陰性の結果が得られている。一方、同じ血清を用いてウエスタンブロットリング(WB)法を行ったところ、15 頭中 10 頭が陽性であった。さらに、トキソプラズマ症を発症した 8 頭のうち、発症の 1 か月前の抗体調査では、WB 法で 4 頭のみが抗体陽性であった。検査から発症までの間、新たに Tg に暴露された形跡はなく、発症もストレス感作の後、短期間に起きており、Tg 再燃の可能性が高かったにも関わらず、抗体は確認されていない。このことから、リスザルのトキソプラズマ症の診断にラテックス凝集法は有効でないと推察された。今のところ、リスザルの Tg 抗体確認に関して WB 法が有用かも知れないが、B 施設での状況を鑑みると、1) 診断抗原とサル由来 Tg の抗原性が異なる 2) リスザル IgG と二次抗体の交差性が低い、3) リスザルは Tg 抗体産生能が低い。ないしは抗体価が長期維持されないなどの可能性があり、これらの問題を解明する必要があった。リスザルは環境の変化や様々なストレス要因によってトキソプラズマ症を発症しやすく、免疫抑制を誘発するような実験を行えば容易にトキソプラズマ症を発症し死亡すると考えられる。急性期の個体の胸水及び腹水ではタキゾイトが検出されトキソプラズマ症の診断に役立つ事があり、今回我々

が検索した個体でも 5 頭中 2 頭で胸腹水の塗抹標本によってタキゾイトが観察された。しかし胸水や腹水が見られた例でもそこに常にタキゾイトが存在するわけではない。簡単に実施できる確実な診断法が現在のところない上に、非常に急性の経過をとって死亡し特徴的な臨床症状にも乏しいことで、生前の診断は甚だ困難である。ペットや展示動物として、そして実験動物としてリスザルを購入する際に、T. g にフリーであることを事前に確認することが必要である。このため、正しく評価でき、かつ簡単に行える生前診断法の確立が求められている。

この数年で、日本におけるペットの飼育頭数は激増しており、人獣共通感染症の重要性が増している。T. g は古くから危険度の高い人獣共通感染症として注目されてきた。伴侶動物として犬と並び最も一般的な動物であるネコは、かなり高率に T. g に感染している。ヒトでは古くから先天感染による死産、新生児の知能障害、後天性感染における網脈絡膜炎による視覚障害が重要であったが (15)16)17)19)23)、近年ではこれらに加えて HIV 患者の重要な日和見感染症の一つとして注目され (15)19)20)21)、更に今後臓器移植を行う機会が増加するに従ってますます T. g 感染を予防する重要性は増すと予想される。

リスザルは小型で愛らしい容姿と温和な性質の為にペットとしても普及しており、また動物園においては触れ合いコーナーが設けられるなどヒトと接する機会が非常に多い。実験動物としても普及しており、脳神経学や行動学の分野の他、医学生物学の広い範囲にわ

たって利用されている 8)。ヒトでの後天的な T. g の感染ルートとしてはシスト、オーシストの経口摂取が主なものであるが、リスザルも含め、急性期の個体の唾液や炎症性滲出物中にはタキゾイトが存在し、粘膜、皮膚の創傷からタキゾイトが侵入し感染が成立することもある 16)。つまりこの様なルートからもペット、動物園動物、そして実験動物としてのリスザルから、ヒトへ T. g の感染が広がる可能性があり、さらに飛沫感染も含め経気道感染の可能性も考えられる。この様な背景から、人への T. g の感染経路の一つとしてリスザルは重要であると思われた。

文献

- 1) 味澤 篤 トキソプラズマ症 1998 臨床と微生物 25 : 305-307
- 2) Anderson, D. C. and McClure, H. M. 1982. Acute disseminated fatal toxoplasmosis in a squirrel monkey. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181:11.
- 3) Araujo, F. G., Wong, M. M., Theis, J. and Remington, J. S. 1973. Experimental *Toxoplasma gondii* infection in a non-human primate. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 22:465-469.
- 4) Banerjee, S. K., Aviles, H., Fox, M. T. and Monroy, F. P. 1999. Cold stress-induced modulation of cell immunity during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Parasitol.* 85(3):442-447.
- 5) Chrousos, G. P., Loriaux, D. L., Tomita, M., Brondon, D.D., Renquist, D., Albertson, B. 1986. The New World primates as animal models of glucocorticoid resistance. *Advance. Experimental. Medicine and Biology.* 196:129-144.
- 6) Cunningham, A. A., Buxton, D. and Thomson, K. M. 1992. An epidemic of toxoplasmosis in captive colony of squirrel monkey (*Saimiri Sciureus*). *J. Comp. Path.* 107:207-219.
- 7) Dickson, J. and Fry, J. 1983. Epidemic toxoplasmosis in captive squirrel monkey (*saimiri sciureus*). *Vet. Rec.* 112:302
- 8) 板垣慎一 実験動物の特性Ⅱ C. 霊長目 pp186
: 実験動物学—比較生物学的アプローチ—第二版
土井邦雄・林正信・高橋和明・佐藤博・二宮博義・板垣慎一著
文永堂(東京) 1995.
- 9) Draper, C. C., Killick-Kendrock, R., Hutchison, W. M., Siim, J. Chr. and Garnham, P. C. C. 1971. Experimental Toxoplasmosis in chimpanzees. *Br. Med. J.* 2:375-378.
- 10) Dreesen, D. W. 1990. *Toxoplasma gondii* infections in wildlife. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:274-276.
- 11) Hessler, J. R., Woodard, J. C. and Tucek, P. C. 1971. Lethal toxoplasmosis in

- a
wooly monkey. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 159:1588-1594.
- 12) Hinze-selch, D., Muller-preuss, P. and Zhang, Y. 1997. Cytokine secretion in squirrel monkey. *Psychoneuroendocrinology*. 22:311-323
- 13) 広重力 J. ACTH-副腎皮質ホルモン pp797-807
: 標準生理学 第2版 本郷利憲・広重力・豊田順一・熊田衛編集
医学書院 (東京) 1990.
- 14) Inoue, M. 1997. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys. *J. Vet. Med. Sci.* 59:593-595.
- 15) 神原広二 第二章原虫類 原虫総論 pp23
姫野國祐 第二章原虫類 トキソプラズマ pp74-79
: 標準医動物学 第二版 石井明、鎮西康雄、太田伸生編集
医学書院 (東京) 1998.
- 16) 石井俊雄 各論 1. 原虫類 トキソプラズマ pp84-95
: 獣医寄生虫学・寄生虫病学① 総論／原虫 第一版
講談社サイエンティフィック (東京) 1998.
- 17) 板垣博・大石勇 III原虫類 3.胞子虫類 3.2 トキソプラズマ症 pp283-290
: 新版家畜寄生虫学 第十二版 朝倉書店 (東京) 1995.
- 18) Itakura, N. and Nigi, H. 1968. Histopathological observations on two spontaneous cases of toxoplasmosis in the monkey (*Lemur catta*). *Jap. J. Vet. Sci.* 30:341-346.
- 19) 竹内勤 6-III 寄生虫感染と免疫不全 pp126-129.
鈴木守 ⑤トキソプラズマ症 pp247-252.
: NEW 寄生虫病学 第一版 小嶋壯明編集 南江堂 (東京) 1993.
- 20) Luft, B. and Remington, J. S. 1992. AIDS commentary; toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15:211-222.
- 21) Luft, B. J., Brooks, R. G., Conley, F. K., McCabe, R. E. and Remington, J. S. 1984. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J. Am. Med. Assoc.* 252:913-917.
- 22) Mckissick, G. E., Ratcliffe, H. L. and Koestiner, A. 1968. Enzootic toxoplasmosis in caged squirrel monkeys *Saimiri sciureus*. *Path. Vet.* 5:538-560.
- 23) 森下哲夫 第三章胞子虫亜門 トキソプラズマ pp50-52
: 新寄生虫病学 第十版 森下哲夫監修 南山堂 (東京) 1984.
- 24) Saitoh, Y. and Itagaki, H. 1990. Dung Beetles, *Onthophagus* spp., as potential transport hosts of feline coccidia. *Jpn.*