

域を用いた。

3. PCR-Microplate・Hybridization法：  
PCR-Microplate・Hybridization法は、図2.、  
3. に示した本藤らの方法に準じて実施した。  
PCRによるゲノムの検出にはE領域を、ビオチン  
標識・DNAプローブの作製には、HSVと相同性が  
低く特異性の高いC領域のPCR増幅DNA断片を用  
いた。

4. in situ Hybridization法と免疫染色法：  
その概要を表2. に示した。①検体は、  
PCR-Microplate・Hybridization法によりゲノム  
を検出できた、A群カニクイザルの三叉神経  
節・6検体(2R, 2L, 6R, 7L, 9R, 10R)のホル  
マリン固定パラフィン包埋組織を用いた。②  
SHBVのDNA・プローブは、plasmid-DNA  
(pBlueSK+2.6kbp)を鋳型として、A, C 領域での  
PCR産物(295bp, 641bp)にビオチン(Biotin  
-11-dUTP)を結合し、精製して実験に用いた。  
③抗体は、HSV-1, 2型共通のポリクローナル抗  
体を用い、常法により免疫染色を行った。

5. 塩基配列の解析：解析領域は、検出株間  
で多型を示す、SHBVゲノム上のUs領域内に局在  
するC領域をターゲットにした。蛍光標識Dye  
primerを用いて、その637bpについてサイク  
ルシーケンシング法で塩基配列を決定した。

○倫理面への配慮：実験に用いたカニクイザル  
の解剖には麻酔による安楽死で配慮した。

## C. 研究結果

### 1. 初感染後の三叉神経節への潜伏感染

SHBVの初感染による三叉神経節への潜在性  
を、SHBV感染症例(抗体陽性のカニクイザ  
ル)、A群10頭、B群20頭の左右三叉神経節で  
の成績を基に解析した。その結果、Bウイルス  
の感染により三叉神経節への潜伏感染が、35%  
(B群)から50%(A群)の確率で、両側、片側  
の様式により成立することが判明した。また、  
その潜在ウイルスの再活性化により、口腔領域  
に分泌され主要感染源となり得るのは、多くて  
も感染ザルの約50%であることが示唆された。  
(表3、4)

### 2. 潜伏感染・三叉神経節の感染病理像とそ の再活性化

ヒト・ヘルペスウイルス(HSV, VZV)では、そ

の潜伏ウイルスの再活性化により、組織上での  
Cowdry A型封入体、抗原やウイルス・ゲノムが  
検出される。また、遊離ウイルスがリンパ球や  
単核球細胞に結合して末梢血に移行することが  
知られている。

SHBV感染症例、A群10頭の左右三叉神経節の  
ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて、  
その病理組織像(HE染色法)、抗原(免疫化学  
染色法)、ウイルス・ゲノム(in situ  
Hybridization法)の検出および末梢血・パフイ  
コートからのSHBVゲノムの検出を試みた。その  
結果、全症例が陰性で、Bウイルス感染による  
三叉神経節・潜在ウイルスの再活性化は認めら  
れなかった(図4、5.)。

以上の結果により、本疾患の再活性化頻度  
は、低い可能性が示唆された。感染によるリス  
クを評価する上で意義あるものと考ええる。

### 3. SHBV感染の分子疫学

SHBV感染症例、A群10頭の三叉神経節から検  
出した特異ウイルス・ゲノムについて、検出株  
間で多型を示すC領域(641bp)の塩基配列を決  
定して、その点変異による相同性、欠損と挿入  
の局在の比較から分子進化的感染様式の解析を  
試みた。その結果を図6.、表5. に示した。  
各同一サル種・群内の株間では高い相同性  
(98-99%)でその近似性が示された。また、カ  
ニクイザル種の異なる群の株間では73-76%の相  
同性で約25%の距離があり遺伝子型が2群に区別  
された。以上の結果により、本ウイルスの感染  
様式は、各同一サル種および群別間における一  
つの感染環の維持によることが判明した。

以上、初感染による三叉神経節への潜伏感染  
とその再活性化に関する状況を明らかにした。  
本疾患の感染防御とリスク評価基準の上でも重  
要な知見と考える。

## D. 考察

SHBVの自然感染は東南アジア産のマカク属の  
サルが主で、ニホンザルも含まれている。SHBV  
感染ザルの多くは不顕性感染の経過をとり、ヘル  
ペスウイルスの特性から後根神経節に潜伏感  
染を起こし、ストレスや免疫低下などの要因に  
より再活性化を繰り返す。この過程で口腔内粘  
膜、唾液、結膜などからウイルスが分泌され、  
咬傷や引っかき傷などの接触感染によって伝播  
すると考えられている。感染ザルでは軽症(不

顕性感染、口腔内潰瘍)であるが、ヒトに感染すると致死的な脳脊髄炎症状を引き起こし、致死率は約50%である。

今回、初感染後の三叉神経節への潜伏感染に関する解析により、SHBV感染カニクイザル2群の30頭の中国産カニクイザルでは、両側および片側による三叉神経節での潜伏感染が35%から50%潜在することが明らかになった。この事実は、SHBVに感染したサルで三叉神経節に潜伏感染を起し得る確率は、ただしウイルスが自然界の棲息サル群において異なる感染環を形成しておりその潜在率も異なるが、単純計算で35%から50%であると推測できる。従って、三叉神経節に潜伏感染を起しているサルで、その再活性化により、ヒトへの感染源となり得る確率が多くても約50%と推察され、意義のある成績が得られた。

ヒト・ヘルペスウイルス(HSV, VZV)では、その潜伏ウイルスの再活性化により、病理組織上でCowdry A型封入体、抗原やウイルス・ゲノムが検出される。また、遊離ウイルスがリンパ球や単核球細胞に結合して末梢血に移行することも知られている。

三叉神経節・潜在SHBVにおける再活性化についても、その状況を明らかにすることは口腔領域におけるウイルスの分泌に関連した感染源としての要因の動態を知ることで重要な事である。今回、SHBVの潜伏感染症例(A群10頭)の末梢血・バフィコートおよびSHBVゲノムの検出された左右三叉神経節のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて、その病理組織像、免疫化学染色による抗原の検索、in situ Hybridization法による組織上でのゲノムの局在および末梢血・バフィコートからのPCR-Microplate・Hybridization法によるSHBVゲノムの検出を試みた結果では、全症例が陰性で、SHBV感染による三叉神経節・潜在ウイルスの再活性化は認められなかった。従って、本潜伏ウイルスの再活性化頻度は非常に低いことが示唆され、ヒト・ヘルペスウイルスのVZV(水痘・帯状疱疹ウイルス)の動態と類似した、強度のストレスや免疫抑制剤の投与などの誘因により再活性化が起し得るものと考えられる。感染のリスクを評価する上で意義ある結果と考える。

SHBV感染症例の三叉神経節から検出した特異ウイルス・ゲノムについて、検出株間で多型を

示すC領域(641bp)の全塩基配列を決定して、そのゲノム構造の特性による比較解析から分子進化的感染様式の解析を試みた結果では、各同一サル種および群別間で一つの遺伝子グループを形成し、ゲノム構造の異なるウイルスで感染環を維持していることを見いだした。また、解析に用いた多型を示すC領域(641bp)が分子進化的感染様式の解析に有用な領域であることも実証できた。今後さらに症例を蓄積して、感染の様式に関する解析を進める予定である。

## E. 結論

1) 今回の解析により、SHBV感染ザル(A群10頭、B群20頭)において、両側および片側による三叉神経節での潜伏感染が35%から50%潜在することが明らかになった。この事実は、潜伏感染を起しているサルが、その再活性化により感染源となり得る確率を知る意味で重要なことである。

2) 潜伏感染を起した三叉神経節の感染病理像、免疫組織化学的解析および末梢血・バフィコートにおけるウイルスゲノムの検出による解析から、三叉神経節・潜在ウイルスの再活性化頻度は低く、強度の誘因により再活性化が起し得ることが推測された。

3) 塩基配列の決定による潜伏ウイルスゲノム構造の比較解析から、各同一サル種および群別間で一つの遺伝子グループを形成し、ゲノム構造の異なるウイルスで感染環を維持していることを見いだした。

以上、三叉神経節・潜伏感染の状態を明らかにしたことは、潜伏ウイルスの再活性化を含めた感染様式の解析およびヒトへの感染頻度におけるリスクを評価する上で意義ある成績と考える。

## F. 健康危険情報

諸外国における本感染症のヒトでの発生状況をみると、現在までに少なくとも30数例が報告されている。そのなかには潜伏ウイルスの再活性化とみられる再発症例や2次感染例も含まれている。現在まで、本邦での感染症の発生例は報告されていないが、ウイルス感染等の実験にサル類の使用が増加していることに加えて、最近ではペットや動物園などの展示サルからヒトへ

の感染なども懸念されていることで、その類別診断法の確立と感染様式の解析が重要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kouichi HIROSHIGE, Minoru IKEDA and Ryo HONDO. Detection of Varicella Zoster virus DNA in Tear fluid and saliva of patients with Ramsay Hunt Syndrome. *Otology & Neurotology (USA)* 23, 602-607 (2002)
- 2) Yuzuru ABIKO, Minoru IKEDA and Ryo HONDO. Secretion and dynamics of Herpes simplex virus in tears and saliva of patients with Bell's palsy. *Otology & Neurotology (USA)* 23, 779-783 (2002)
- 3) 山田文也、植田富貴子、望月眞理子、生嶋昌子、河橋幸恵、小笠原邦敏、本藤良。*Listeria monocytogenes*の非貪食性細胞侵入能に関する基礎的研究。感染症学雑誌76、臨時増刊号p.137 (2002)
- 4) 保坂三継・落合由嗣、矢野一好・眞木俊夫。多摩川におけるクリプトスポリジウムオーストとジアルジアシストの汚染実態調査。用水と廃水44 (4)、23-31 (2002)
- 5) Mariko MOCHIZUKI, Ryo HONDO, Kiichi KUMON, Rei SASAKI, Hironori MATSUBA and Fukiko UEDA. Cadmium contamination in wild birds as an indicator of environmental pollution. *Environmental Monitor Assessment (USA)* 73, 229-235 (2002)
- 6) Fukiko UEDA, Miho SUGAMATA, Miki AOTA, Mariko MOCHIZUKI, Fumiya YAMADA and Ryo HONDO. Swift and definite serotyping for isolated *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiologica (Italy)* 25, 165-171 (2002)
- 7) Mariko MOCHIZUKI, Rei SASAKI, Yuko YAMASHITA, Mayumi AKINAGA, Nana ANAN, Sakura SASAKI, Ryo HONDO and Fukiko UEDA. The distribution of Molybdenum in the tissues of wild ducks. *Environmental Monitor Assessment (USA)* 77, 155-161 (2002)
- 8) Mariko MOCHIZUKI, Ryo HONDO and Fukiko UEDA. Simultaneous analysis for multiple heavy metals in contaminated biological samples. *Biological Trace Element Research (USA)* 87, 212-223 (2002)
- 9) 本藤良。「日本獣医畜産大学120周年記念寄付講座 牛海綿状脳症(BSE)はまだ増えるか？」スモールワールド学術文庫 ARchiTect Inc. 2002年 (<http://www.smallworld.co.jp>)
- 10) 本藤良他。(第8回ヘルペス感染症フォーラム編)「ヘルペス感染症」ヘルペス感染症研究会 2002年(分担部分：Bウイルス感染症におけるDNA診断とその応用 p.25-31)
- 11) 本藤良他。(日本動物看護学会教科書編集委員会編)「動物看護学(+各論)」2002年(分担：動物看護公衆衛生学 p.252-266)
- 12) 本藤良。Bウイルス感染症のPCR-Microplate・Hybridization法による診断。「Herpes Management」ヘルペス感染症研究会編、p6, Vol.6(3) (2002)
- 13) 本藤良。人獣共通感染症の基礎知識。ハッピー・トリマーvol.01、24-26 (緑書房) 2002.9.1
- 14) Fukiko UEDA, Reiko ANAHARA, Fumiya YAMADA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* contamination in marketed Japanese meat. *Microbiologica* (submitted).
- 15) Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI, Fukiko UEDA, Tetsutaro SATA and Ryo HONDO. Evaluation of the assay for cell invasion of *Listeria monocytogenes* using

- the cell lines of Caco-2 and Vero cells. Archive of Microbiology (submitted).
- 18) Fukiko UEDA, Miho SUGAMATA, Miki AOTA, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes*, serovar 4b: Relation among the strains isolated from a patient and marketed Japanese meat. Food Protection (submitted).
- 19) Fukiko UEDA, Kyoko YUGAMI, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes*, serovar 1/2a: Relation among the strains isolated from a patient and marketed Japanese meat. Food Protection (submitted).
- 20) Chika OYA, Yoshitsugu OCHIAI, Fukiko UEDA. Specific detection and genetic differentiation of B virus by PCR · Hybridization. Arch. Virol. (submitted).
2. 学会発表
- 1) 本藤良。牛の海綿状脳症はまだ増えるか。日本獣医畜産大学創立120周年記念市民講座 2002.1
- 2) 青田実生、菅又美穂、望月眞理子、小笠原邦敏、山田文也、植田富貴子、本藤良。*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究(4)食肉とヒト由来血清型4b株における*iap*遺伝子の比較解析。第133回日本獣医学会。2002.3.28~30。(講演要旨集 p.129)
- 3) 秋永真由美、望月眞理子、植田富貴子、本藤良。野鳥の重金属汚染に関する疫学調査(5)野鳥におけるタリウム汚染。第133回日本獣医学会。2002.3.28~30。(講演要旨集p.?)
- 4) 阿南奈那、望月眞理子、植田富貴子、本藤良。野鳥の重金属汚染に関する疫学調査(8)重金属元素による海鳥汚染のモニタリング。第133回日本獣医学会2002.3.28~30。
- 5) 高野 貴士、谷内 洋次郎、大屋 智香、植田富貴子、本藤 良、吉川 泰弘。Bウイルス感染のDNA診断と分子疫学に関する基礎的研究(4) 輸入カニクイザル・三叉神経節由来Bウイルスゲノムの構造解析。第133回日本獣医学会2002.3.28~30。
- 6) 谷内洋次郎、高野貴士、大屋智香、本藤良、吉川泰弘。Bウイルス感染のDNA診断と分子疫学に関する基礎研究(3) 輸入カニクイザル・三叉神経節におけるBウイルスの潜伏感染。第133回日本獣医学会2002.3.28~30。
- 7) 植田富貴子、菅又美穂、青田実生、山田文也、小笠原邦敏、望月眞理子、落合由嗣、本藤良。本邦における*Listeria monocytogenes*の常在汚染に関する分子疫学的考察。第23回食品微生物学会 2002.5
- 8) 山田文也、植田富貴子、望月眞理子、生嶋昌子、河橋幸恵、小笠原邦敏、本藤良。*Listeria monocytogenes*の非貪食性細胞侵入能に関する基礎的研究。第76回日本感染症学会総会 2002.5。
- 9) 小笠原邦敏、植田富貴子、落合由嗣、望月眞理子、山田文也、青木秀夫、南俊作、本藤良。輸入食肉由来*Listeria monocytogenes*株における*iap*遺伝子のゲノム構造の解析。第134回日本獣医学会 2002.9.19~21。(講演要旨集p.199)
- 10) 望月 眞理子、植田 富貴子、落合 由嗣、本藤 良。野鳥の重金属汚染に関する疫学調査(7) カドミウム汚染の性差についての解析。第134回日本獣医学会 2002.9.19~21。
- 11) 本藤 良、大屋智香、落合由嗣、植田富貴子、吉川泰弘。Bウイルス感染カニクイザルの三叉神経節における潜伏感染に関する解析。第50回日本ウイルス学会 2002.10.16-18 (講演要旨p75)
- 12) リステリア脳幹脳炎と分離株のゲノム解析。中尾栄男、今泉登史宏、藤本浩、三浦夕美

- 子、綾部光芳、庄司紘史、本藤良、植田富貴子。第7回日本神経感染症学会。2002.10.4～5（学術集会・抄録集p.47）
- 13)本藤良。「食」に潜む危険；「食」の安全のために。平成14年度日本獣医畜産大学教養講座 2002.10.05
- 14)植田富貴子。「食」の安全を脅かす環境要因。平成14年度日本獣医畜産大学教養講座 2002.10.26
- 15)本藤良。Bウイルス感染のDNA診断と分子疫学。第13回東北動物実験研究会 2002.10.25
- 16)植田富貴子。危険な食品から家族を守るサプリメントの落とし穴。第16回日本毛髪学会（教育講演：2003.02.17）
- 17)本藤良。狂牛病は日本から消えるか。～今後牛肉は食べていいか～。第16回日本毛髪学会（教育講演：2003.02.17）
- 18)勇上恭子、小笠原邦敏、山田文也、庄司紘史、落合由嗣、植田富貴子、本藤良。  
*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究（4）食肉とヒト由来血清型1/2a株におけるiap遺伝子の構造解析。第135回日本獣医学会(2003.3予定)
- 19)今泉登史宏、中尾栄男、藤本浩、三浦夕美子、綾部光芳、庄司紘史、本藤良、植田富貴子、落合由嗣 リステリア脳幹脳炎・髄膜炎からの2分離株のゲノム解析。日本神経学会（2003.5予定）

# 表1

材料と方法 (1)

## 検体：SHBV・抗体陽性カニクイザル

1) 輸入カニクイザルの概要

### A群

No.	個体番号	性別	体重 (kg)
1	C933697	♂	4.67
2	C938179	♂	4.99
3	C948031	♂	4.01
4	C943501	♂	3.85
5	C943901	♂	4.22
6	C937954	♀	3.59
7	C937992	♀	3.24
8	C950488	♀	2.96
9	C950654	♀	3.53
10	C967140	♀	3.25

解剖日時：1999年11月1日実施

- 検体採取：三叉神経節・右(R)、左(L)
- 検体DNA：左右三叉神経節から各常法によりDNAを抽出

### B群

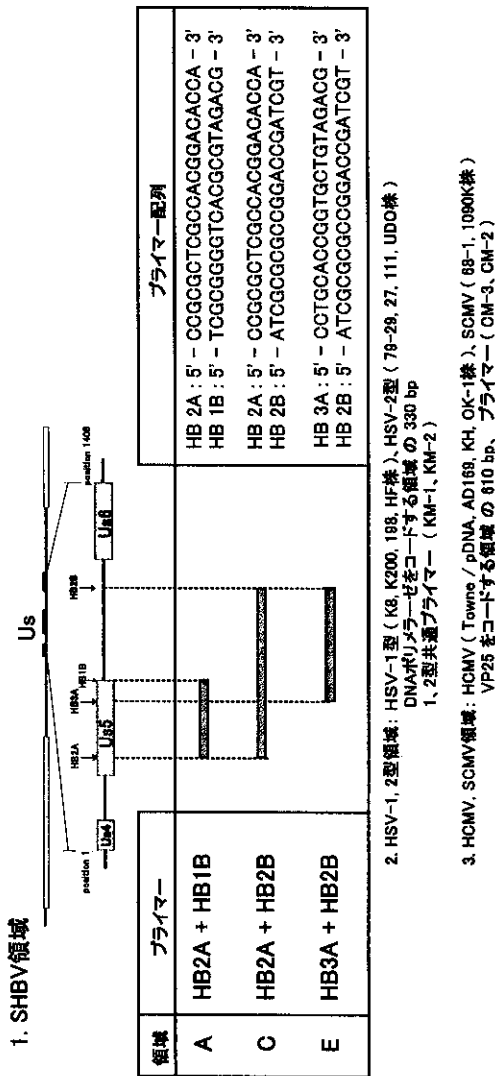
No.	個体番号	性別	体重 (kg)
1	96CO819	♂	3.65
2	96CO527	♂	2.90
3	97CO123	♂	3.05
4	96CO389	♂	2.45
5	97CO633	♂	2.50
6	96CO129	♂	3.30
7	96CO627	♂	3.20
8	96CO743	♂	2.85
9	96CO115	♂	3.10
10	96CO558	♀	3.00
11	96CO576	♀	3.15
12	96CO220	♀	2.90
13	96CO304	♀	2.60
14	96CO384	♀	2.60
15	96CO306	♀	2.35
16	96CO296	♀	2.65
17	C965546	♀	3.00
18	C967547	♀	2.55
19	C965285	♂	3.05
20	C965411	♂	3.25

解剖日時：2000年9月11日実施

# 図1

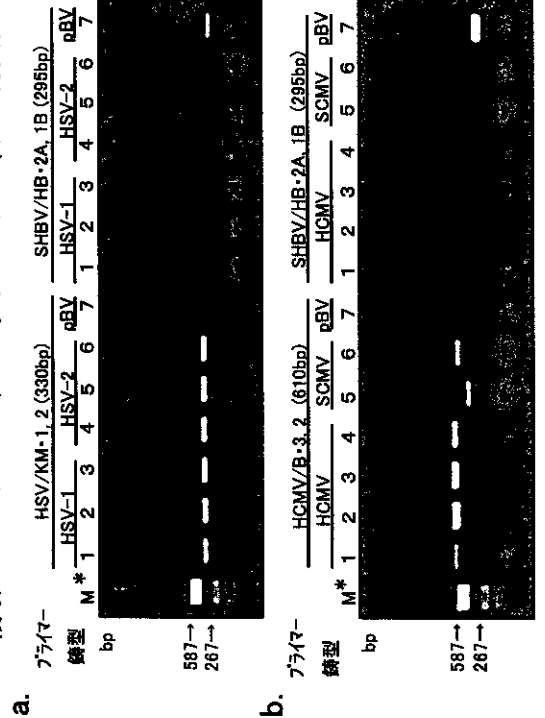
## 材料と方法 (2)

### PCR - Microplate - Hybridization 法のターゲット領域



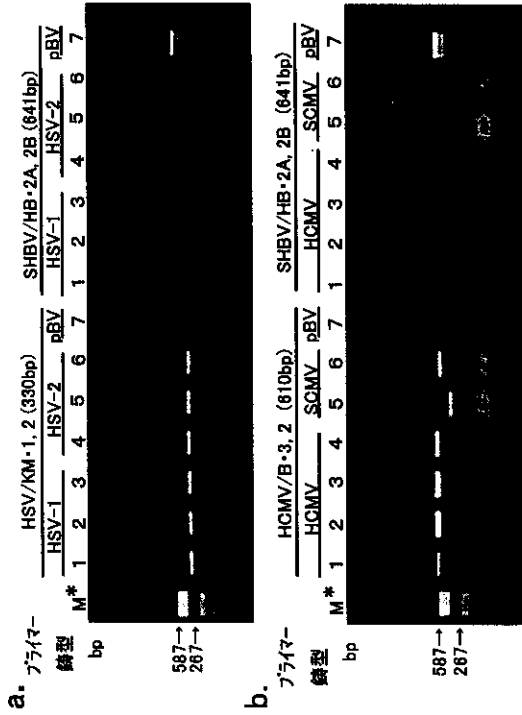
### PCR 法による Bウイルスゲノムの検出 A, C, E 領域の特異性

#### A領域: SHBV/HB・2A, 1Bプライマー (295bp) の特異性

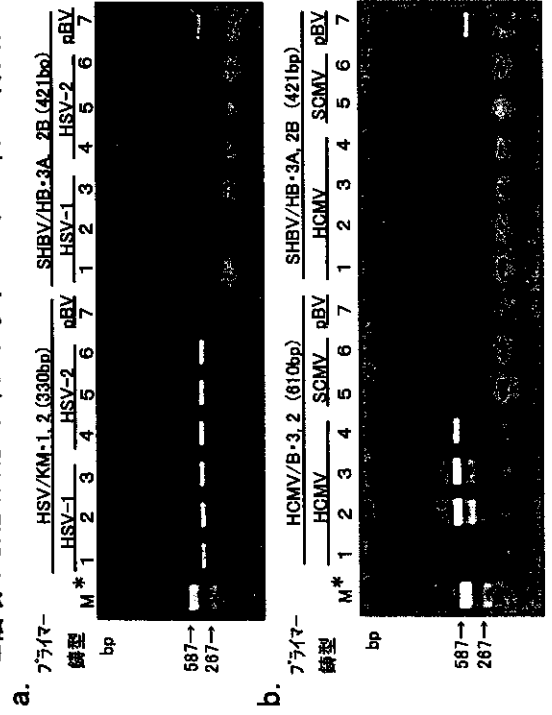


- a. HSV-1, 2型との特異性:  
 HSV-1-DNA/1 (K8), 2 (K200), 3 (195)  
 HSV-2-DNA/4 (79-29), 5 (27), 6 (111)  
 pBV (pBlueSk-2.6Kbp)/Bウイルス・プラスミドDNA/7
- b. HCMV, SCMVとの特異性:  
 HCMV-DNA/1 (Towne/pDNA),  
 2 (AD169), 3 (KH), 4 (OK-1)  
 SCMV-DNA/5 (88-1), 6 (1090K)  
 pBV (pBlueSk-2.6Kbp)/Bウイルス・プラスミドDNA/7
- \*M: サイズマーカー
- PCRの条件: 1) 熱変性: 94°C 2分,  
 2) アニールング: 55~58°C 3分,  
 3) 伸張: 72°C 4分,  
 4) サイクル: 30回

#### C領域: SHBV/HB2A, 2Bプライマー (641bp) の特異性



#### E領域: SHBV/HB・3A, 2Bプライマー (421bp) の特異性

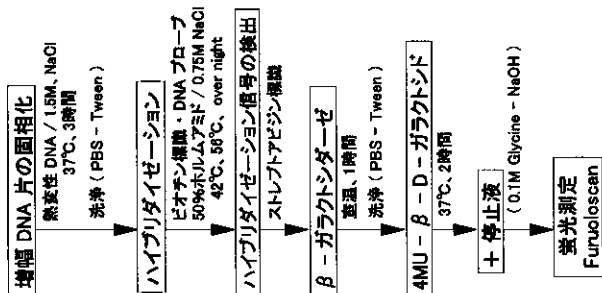


**図2**

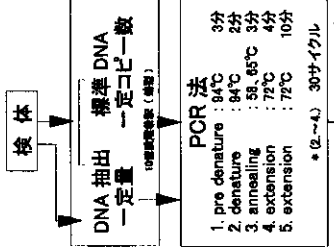
材料と方法 (3)

PCR - Microplate - Hybridization 法

B. マイクロプレート  
ハイブリダイゼーション法



A. PCR法

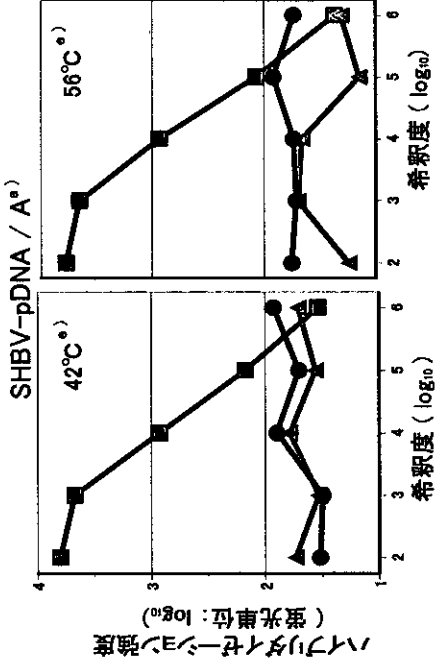


- a. ビオチン標識・DNAプロローブ (PCR法)
- 1) 標置: C領域 PCR増幅 DNA断片: 500ng
  - 2) ビオチン結合ヌクレオチド: 30μM Biotin-11-dUTP
- 3) PCR: 10~30サイクル
- b. ビオチン標識効果の検定
- 1) 直接プレート吸着法
  - 2) 蛍光単位測定値

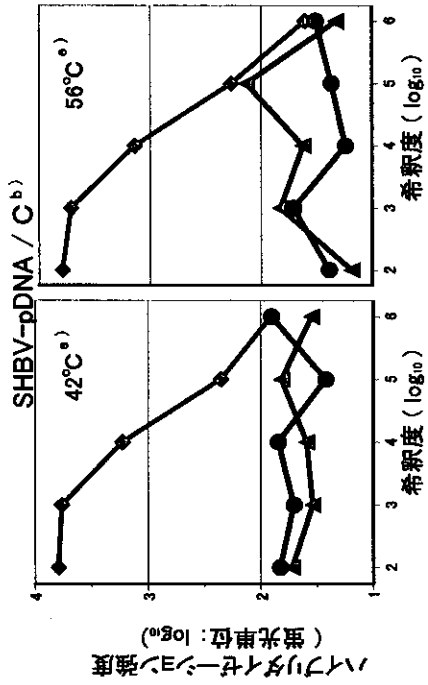
\* Hondo, Jpn. J. Med. Sci. Biol., 46, 1995

**図3**

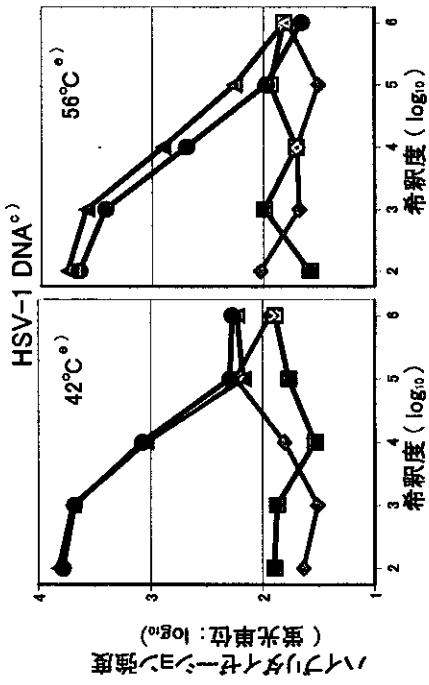
Bウイルスの PCR - Microplate - Hybridization HSV -1, 2 型との同源性



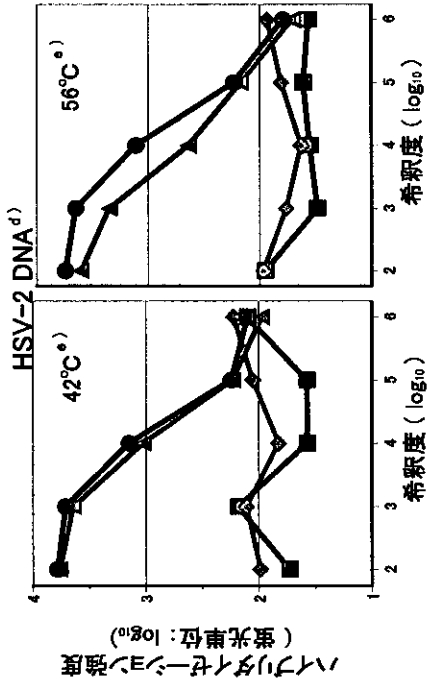
- a) A 領域 PCR 産物 (295 bp)
- b) C 領域 PCR 産物 (641 bp)
- c) HSV-1 型 PCR 産物 (330 bp)
- d) HSV-2 型 PCR 産物 (330 bp)
- e) Hybridization 温度: 42°C, 56°C



ハイブリダイゼーション温度 (蛍光単位: log<sub>10</sub>)



ハイブリダイゼーション温度 (蛍光単位: log<sub>10</sub>)



ハイブリダイゼーション温度 (蛍光単位: log<sub>10</sub>)



表2

## 1. *in situ* Hybridization法と免疫染色法

- 1) 検体：ゲノム検出・カニクイザル三叉神経節（6検体）  
① 2R、② 2L、③ 6R、④ 7L、⑤ 9R、⑥ 10R  
（ホルマリン固定パラフィン包埋組織）
- 2) SHBV・DNA probe（Biotin - 11 - dUTP）  
① 鋳型：plasmidDNA（pBlueSK + 2.6 kbp）  
② A, C領域（Us5:gD）PCR産物（641bp, 295bp）
- 3) 抗体：HSV-1, 2型ポリクローナル抗体

## 2. 塩基配列の解析

- 1) 領域：C(637bp)領域(Us5:gD)
- 2) サイクルシーケンス法

表3

A群：三叉神経節からの  
 潜伏SHBV・ゲノムの検出  
 PCR - Microplate -  
 Hybridization法

No.	個体番号	性別	体重(kg)	SHBV・検出 PCR Hybridization
1	C933697	♂	4.67	右：(-) (-) 左：(-) (-)
2	C938179	♂	4.99	右：(+) (+) 左：(+) (+)
3	C948031	♂	4.01	右：(-) (-) 左：(-) (-)
4	C943501	♂	3.85	右：(-) (-) 左：(-) (-)
5	C943901	♂	4.22	右：(-) (-) 左：(-) (-)
6	C937954	♀	3.59	右：(+) (+) 左：(-) (-)
7	C937992	♀	3.24	右：(-) (-) 左：(+) (+)
8	C950488	♀	2.96	右：(-) (-) 左：(-) (-)
9	C950654	♀	3.53	右：(+) (+) 左：(-) (-)
10	C967140	♀	3.25	右：(+) (+) 左：(-) (-)

表4

B群：三叉神経節からの潜伏SHBV・ゲノムの検出  
PCR - Microplate - Hybridization法

No.	個体番号	性別	体重(kg)	SHBV・検出 PCR Hybridization	No.	個体番号	性別	体重(kg)	SHBV・検出 PCR Hybridization
1	96CO819	♂	3.65	右：(-) (-) 左：(-) (-)	11	96CO576	♀	3.15	右：(-) (-) 左：(-) (-)
2	96CO527	♂	2.90	右：(+) (+) 左：(+) (+)	12	96CO220	♀	2.90	右：(-) (+) 左：(-) (-)
3	97CO123	♂	3.05	右：(-) (+) 左：(-) (-)	13	96CO304	♀	2.60	右：(-) (-) 左：(-) (-)
4	96CO389	♂	2.45	右：(+) (+) 左：(-) (-)	14	96CO384	♀	2.60	右：(-) (+) 左：(-) (+)
5	97CO633	♂	2.50	右：(-) (-) 左：(-) (-)	15	96CO306	♀	2.35	右：(-) (-) 左：(-) (-)
6	96CO129	♂	3.30	右：(-) (-) 左：(-) (-)	16	96CO296	♀	2.65	右：(+) (+) 左：(+) (+)
7	96CO627	♂	3.20	右：(-) (-) 左：(-) (-)	17	C965546	♀	3.00	右：(-) (-) 左：(-) (-)
8	96CO743	♂	2.85	右：(-) (-) 左：(-) (-)	18	C967547	♀	2.55	右：(-) (-) 左：(-) (-)
9	96CO115	♂	3.10	右：(-) (+) 左：(+) (+)	19	C965285	♂	3.05	右：(-) (-) 左：(-) (-)
10	96CO558	♀	3.00	右：(-) (-) 左：(-) (-)	20	C965411	♂	3.25	右：(-) (-) 左：(-) (-)

図4

末梢血・パフイコートからのSHBV・ゲノムの検出  
PCR-Microplate-Hybridization法

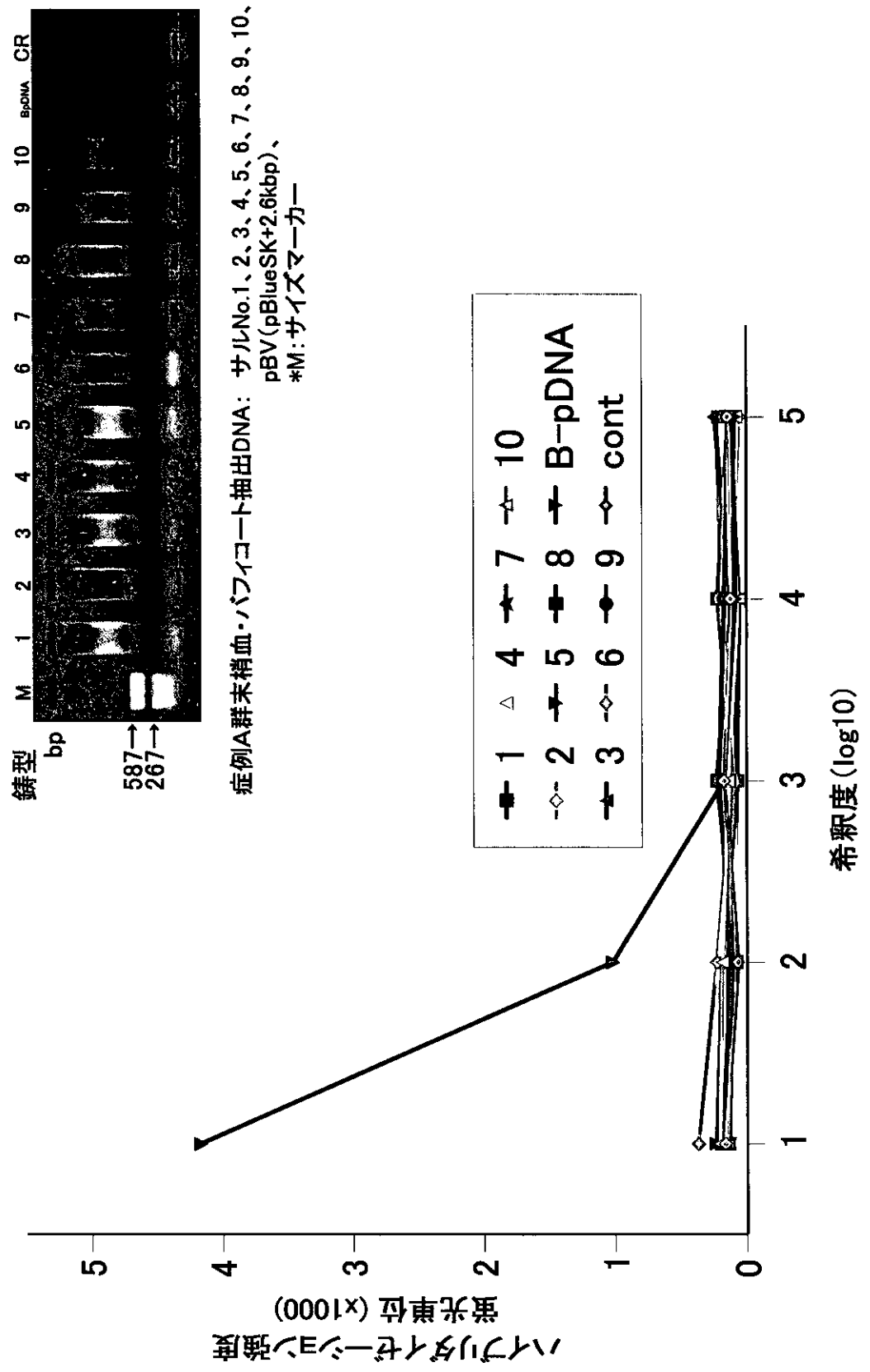
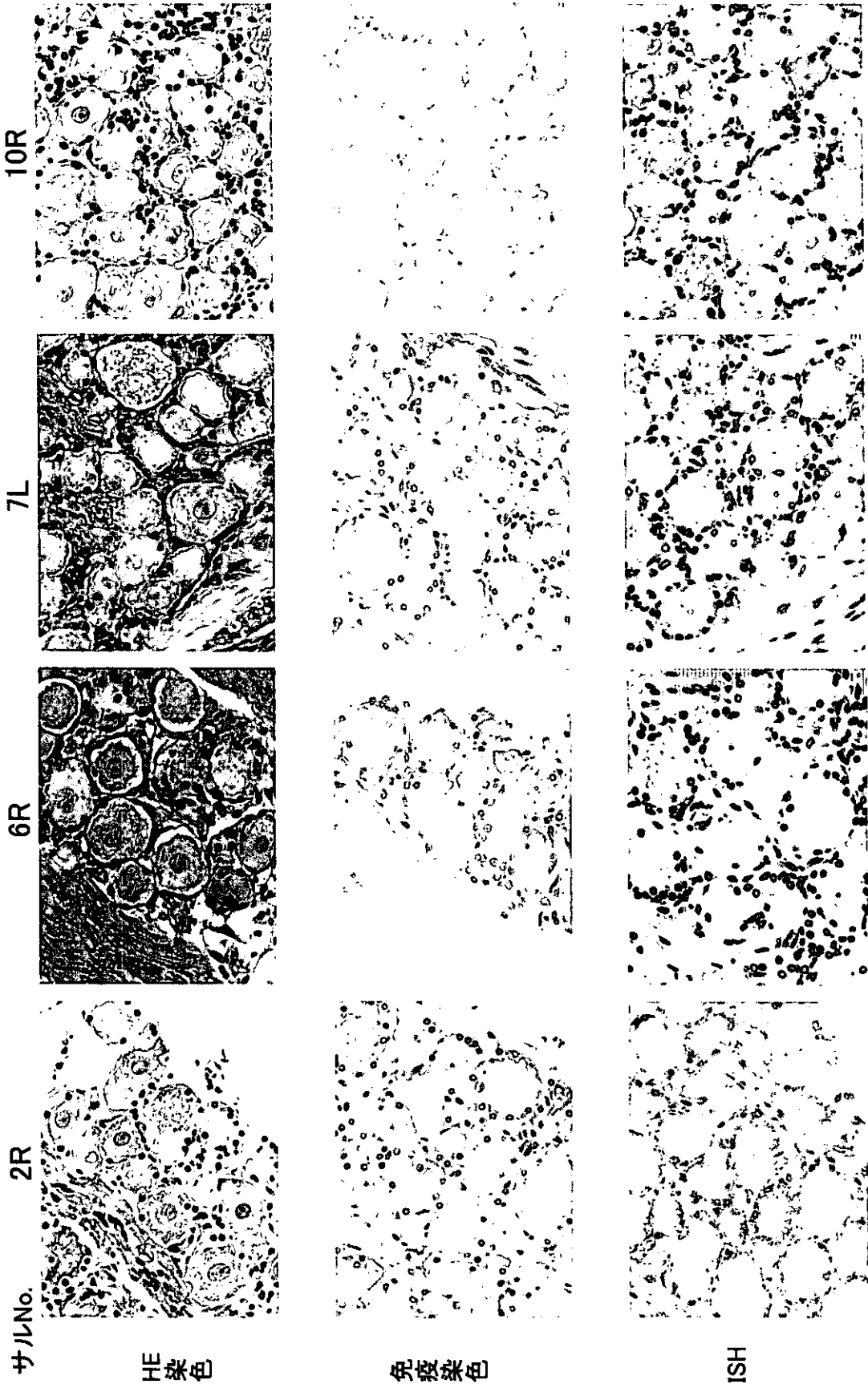


図5

カニクイザル三叉神経節におけるBウイルス感染の病理学的解析



\* R: Right, \* L: Left, \* DNProbe: A(295bp)、ISH: *in situ* Hybridization



表5

SHBV株間におけるC領域での相同性

	アカゲザル		カニクイザル		ブタオザル		カニクイザル	
	E2490	SMHV	E90-136	1504-11	Kumquat	SHBV-6R	SHBV-7L	
E2490		77%	78%	67%	68%	78%	77%	
SMHV			99%	70%	71%	76%	76%	
E90-136				71%	70%	73%	74%	
1504-11					98%	73%	74%	
Kumquat						70%	70%	
SHBV-6R							98%	
SHBV-7L								

相同性(点変異)

	アカゲザル		カニクイザル		ブタオザル		カニクイザル	
	E2490	SMHV	E90-136	1504-11	Kumquat	SHBV-6R	SHBV-7L	
E2490		33	29	91	102	278	291	
SMHV	12		0	73	86	263	279	
E90-136	12	4		73	86	267	281	
1504-11	17	20	15		14	248	250	
Kumquat	15	20	15	1		225	246	
SHBV-6R	41	49	51	71	60		3	
SHBV-7L	40	49	47	73	61	4		

欠損

挿入

## リスザルのエルシニア症 (*Yersinia pseudotuberculosis* 感染症)

分担研究者 : 宇根 有美 1(麻布大学獣医学部病理学研究室)

協力研究者 : 磯部 杏子 1、馬場 智成 1、林谷 秀樹 2、野村 靖夫 1

### 研究要旨

*Yersinia pseudotuberculosis* は、種々の動物とヒトに感染し疾病を生じる人畜共通感染症の病原体である。この総説では、国内の6つのリスザル施設におけるエルシニア症の集団発生を紹介する。

*Yersinia pseudotuberculosis* is a zoonotic infectious agent causing disease in various animals and man. In this review, we describe outbreaks of yersiniosis experienced in squirrel monkeys of six facilities in Japan.

*Yersinia pseudotuberculosis* squirrel monkeys outbreak Japan.

### A. エルシニア属菌の概要

腸内細菌科に属する通性嫌気性グラム陰性桿菌で、4°C以下でも発育可能な低温発育性を有し、11菌種に分類されている。病原性をもつエルシニア属菌としては、以下の3菌種がよく知られており、*Y. pestis* はペストの原因菌で、現在日本には存在しない。*Y. enterocolitica* と *Y. pseudotuberculosis* はともに、ヒトと動物に急性腸管感染症を引き起こし、後者は動物の肝臓や脾臓に結核結節に類似した病変を形成する仮性結核の原因菌として知られている。一般にエルシニア症は *Y. enterocolitica* および *Y. pseudotuberculosis* によっておこる感染症を意味する。両菌種は、哺乳類、鳥類および爬虫類など75種以上の動物から検出されている。*Y. pseudotuberculosis* は、齧歯類や鳥類に不顕性に感染し、腸管内で増殖して糞便とともに環境中に排泄され、食物や飲水を汚染する。これを介して経口的に感染す

ることが最も多い。ヒトの感染例の多くは、沢水や井戸水の飲水によって生じているが [8, 10, 18, 27, 31]、これは、本菌が、冷たい、きれいな水の中では、長期間生息可能で、感染性を保持し続けることに関係している。

ヒトおよび動物のエルシニア症の発生には、保菌動物が深く関わっており、欧米では、ノウサギ、齧歯類および鳥類が注目されており、実際、21種類もの野鳥から分離されたという報告や [17]、フランスやイギリスでは、野鳥の糞によって汚染された野菜による感染も報告されている [17]。日本では、鳥類から分離されることは少なく、渡り鳥のアオジとハクセキレイからの分離例 [11]、259羽の野鳥を対象として4羽 (2.8%) のカモ類からの分離例 [27] および東京都内に生息するカラス145羽を対象として7羽 (4.8%) から分離した報告があるのみである [21]。哺乳類における分離率



は、ブタ 2.3%、イヌ 1.8%、ネコ 3.2%、ネズミ 1.8%で [27]、島根県で行われた野ネズミを除く狩猟対象哺乳類 610 頭を対象とした調査では、タヌキ 14.1%、シカ 3.7%、テン 2.9%、ノウサギ 1.4%の割合で検出されている [9]。また、最近、イノシシ 131 頭を対象とした調査では 5 頭 4%から本菌が分離されており、先述の野生動物に加え、イノシシの保菌動物としての可能性が指摘されている [12]。

*Y. pseudotuberculosis* は O 抗原により、1～15 の血清群に型別され、さらに血清群 1、2、4 および 5 はさらに数亜群に分けられており、現在までのところ、21 血清群がある。このうち、血清群 1～6 群および 10 群がヒトに病原性を示し、分離される血清型が地域によって異なる [10、27]。ヨーロッパでは 1a 型が最も多く、アメリカ、カナダとニュージーランドでは 1 型と 3 型が多く、ほとんどが 1、2 と 3 型に限られる。しかし、我が国では種々の血清型が分離されており、その割合は、ヒトでは、4b 型 43%、5b 型 21%、5a 型 11%、1b 型 9%、2b 型 5%、2a 型 5%、3 型 3%が、動物では、3 型 30%、4b 型 22%、1b 型 22%、5b 型 5%、5a 型 4%、2b 型 3%であった [27]。このように保菌動物から分離される血清型とヒト感染例から分離される血清型の割合に違いがあるが、Fukushima et al. は島根県下の野生動物から分離される血清型の分布とヒトより分離される血清型の分布が一致するとして、保菌動物としての野生動物の重要性を示唆している [9]。

#### B. サル類のエルシニア症

サル類は *Y. pseudotuberculosis* に対して感受性が高く、アメリカ、ヨーロッパおよび日本において、多くの集団発生が報告されている。その種類は多岐にわたっており、原猿類のショウガラゴ [5] から各種の新世

界ザルや旧世界ザル、類人猿のテナガザルやチンパンジーにもみられる [1-4、7、13、15-17、19-20、22-26、28、30-31]。多くは動物園での発生であるが、アメリカでは霊長類研究センターでも流行して、問題となった [3、24]。マカカ属の発生が 1 事例 [7] しかないことを除けば、日本でも状況は同じで、ロリス科ショウガラゴ [20]、オナガザル科サバンナモンキー [19]、スーティマンガベアー [19]、ブラッザモンキー [20]、パタスモンキー [13、7]、マンドリル [7]、クロザル [7]、オマキザル科フサオマキザル [19]、リスザル [25、31]、テナガザル科シロテナガザル [20]、フクロテナガザル [7]、オラウータン科チンパンジー [28] の報告がある。これらの中ではリスザルの報告が多いが、これは飼育施設数と頭数が多いことや飼育状況によるものかも知れない。なお、集団発生の規模からすると 1974 年に報告された 9 年間連続発生した 41 頭のパタスモンキーの事例が最も大規模であった。また、サル類の *Y. pseudotuberculosis* 感染症 (以下エルシニア症と略す) の報告は、今のところ関東以西に限られているが、保菌動物の分布やヒトのエルシニア症の発生状況 [14] からすると、どの地域であっても発生の可能性がある。サル類より分離される *Y. pseudotuberculosis* の血清型は、欧米ではヒトや他の動物から分離される血清型と同様で 1 型と 2 型がほとんどで、少数例が 3 型であった。日本では、パタスモンキー、クロザル、ブラッザモンキー、チンパンジーから 3 型が、サバンナモンキー、スーティマンガベアー、フサオマキザルから 1b 型、チンパンジーから 6 型が分離されている。自験例を含めてリスザルでは、4b が最も多く 3 施設、1b 型と 6 型が各 1 施設から分離されている。

#### C. リスザルのエルシニア症

サルの種類によって、個々の発生状況、臨床症状や病理像に大して違いはないが、我が国では、リスザルにおけるエルシニア症の発生件数および死亡頭数が格段に多く、動物衛生および公衆衛生上、十分に注意すべき疾患と考えられるため、リスザルのエルシニア症について、自験例を中心として解説する。

## 1. 発生状況

前触れなく突発的に発生する場合と毎年あるいは周期的に反復して発生がみられる場合とがあった。臨床症状としては突然死、食欲・活力の低下、消化器症状（下痢、粘液便、粘血便、ときに嘔吐や血便）、被毛の汚染や死産などが観察されている。以上の臨床症状は特異性に乏しく、また多くの場合多頭飼育されているため、異常に気が付かず、かなり重篤な状態でみつかることがほとんどで、治療の猶予のない場合が多い。年齢としては、若齢動物の感受性がより高く、かつ重篤になりやすく、経過も早い。しかし、年齢に関わらず発症して死に至る事例もあった。今回、ここに紹介するA、B、C、D、E、Fの6施設のうち、A～D施設は20頭前後のリスザルを飼育し、EとF施設はそれ以上の多数のリスザルを飼育している施設である。

1) A施設での発生状況 この施設ではA～Eまでの5つのケージが並んでおり、このうち、図1のようにC、D、Eの3つのケージにリスザルが飼育されていた。Cケージに5頭、Dケージには4頭、計9頭と1頭の個別飼育のリスザルがいた。4月21日を初発として、7月6日までの約3ヶ月間にCとDのケージの9頭中5頭が、図に示す間隔で、前兆もなく死亡し、死亡率は55%となった。死亡したリスザルの年齢は5歳以上が2頭、2～3歳が3頭であった。

2) B施設での発生状況 22頭のリスザル

を飼育する施設。10年前に潰瘍形成性の末端回腸炎により数頭のリスザルが死亡した。その際の細菌学的検査では *Y. enterocolitica* が分離された。最近になって8月21日と28日に老齢個体が死亡し、10月に入ってから、さらに約3歳のリスザル1頭が横臥し意識混濁の状態で見られ、翌日死亡した。この症例の実質臓器から血清型4bが分離された。

3) C施設での発生状況 約15頭のリスザルを飼育する施設。ここ数年、図2に示すように死産が続き、生まれた子ザルも6ヵ月齢までにすべて死亡し、2回の繁殖シーズンの子ザルの死亡率は100%に達した。子ザルの肝臓、脾臓、腎臓、肺、腸間膜リンパ節から血清型1bが分離された。なお、成獣には、発症例や死亡例はみられなかった。

4) D施設での発生状況 この施設では、図3に示すように1つの大きなケージに15頭のリスザルが飼われ、別の場所に3頭のリスザルが個別飼育されていた。群飼育の15頭中5頭が、約2週間の間に次々に斃死した。死亡した4頭目のリスザルが病性鑑定によってエルシニア症と診断されたため、直ちに同居サルに抗生剤の筋肉注射と経口投与を行い、他のサルの発症を抑えたため、死亡率は33%に留まった。死亡したリスザルの臓器及び同居リスザルの直腸スワブから血清型4bが分離された。

5) E施設での発生状況 1985年頃リスザルにエルシニア症が集団発生し、その後、断続的に発生している。あまりにも多数のサルが死亡するため、定期的に抗生剤の投与を行っている。図4は最近の抗生剤の投与とエルシニア症発生との関連を図示したものである。1999年12月まで定期的に抗生剤投与を継続していたが、投与を中止した3ヶ月後の2000年3月と6月にエルシニア症が発生した。直ちに抗生剤の投与が再

開され、発生は治まったが、抗生剤の投与中止後の12月から3月にかけて発生がみられた。

6) F施設での発生状況 17年間に図5に示すように各種動物に5回のエルシニア症の発生があり、最近の4年間はリスザルで発生している。この施設では、剖検所見に基づき疑似エルシニア症と診断すると全頭に抗生剤を投与し、流行を抑えている。最近、死亡したリスザルの臓器から血清型4bが分離・培養され、一部のリスザルについて、*Y. pseudotuberculosis* の菌体外蛋白

(YOPs) に対する抗体価をエライザ法で検査したところ、対照としたリスザルの抗体価の10倍以上の高値を示した。なお、図に記載しなかったが、他に肉眼的にエルシニア症を疑うものの、菌の分離ができなかった例もあったことから、ここに示した以上に流行が繰り返されていたと考えられる。

エルシニア症は、冬から春にかけて多く発生するとされ、これは、寒冷ストレスによる動物の抵抗性の低下や、低温下でも生存可能な *Y. pseudotuberculosis* の特性に関連するといわれている [1, 3, 15, 17]。今回提示した事例においても、1月から4月に発生した施設が多かったが、必ずしも、この季節に限定されていなかった。特に本菌が定着しているであろう施設では、季節を問わず発生していた。なお、いずれの施設においても感染源を特定するに至っていない。しかし、タヌキ、イノシシ、イヌ、ネコなどは、滅多にリスザル施設内に侵入しないこと、ノネズミやカラスなどの野鳥は、都市部の施設においても生息しており、施設内に侵入可能であることを考えあわせると、やはり小型齧歯類や野鳥が感染源であった可能性が高い。

## 2. 病理学的所見

病変は主に腸、脾臓、肝臓にみられ、壊

死性・偽膜性小腸炎(図6、7)ときに結腸炎、腸間膜リンパ節や脾臓の腫大や脾臓と肝臓の多発性結節形成(肉芽腫、壊死巣

(図8)が認められる。*Y. pseudotuberculosis* は、小腸パイエル板のM細胞を介して粘膜下組織に侵入し、局所及び腸間膜リンパ節内で増殖する。このため、腸管の病変はパイエル板の発達した小腸下部において顕著で、パイエル板の腫大、パイエル板に一致する潰瘍形成、偽膜形成、ときに結節を形成するなど種々の程度の変化が認められた。高度な例では、腸穿孔も起きる(図7)。エルシニア症と同じく急性経過をたどるリスザルの重要な感染症としてトキソプラズマ症が挙げられるが [6]、トキソプラズマ症では、エルシニア症のように腸病変は高度でなく、大型の壊死巣、肉芽腫、膿瘍形成は滅多に認められず、肺水腫や腔水腫がしばしば観察される。

組織学的には、病変は消化管では、パイエル板などのリンパ装置に一致して認められることが多く、腸上皮の壊死、脱落、リンパ濾胞の壊死が認められ、各所に菌塊が認められる(図9)。リンパ節では、菌塊を含む壊死巣が多発する(図10)。肝臓や脾臓では、様々な大きさの菌塊を含む壊死巣や肉芽腫が認められた(図11、12)。この他、菌塊が骨髓腔にもみられることがある。なお、C施設では、死・流産が高率に発生していたが、胎子、新生子および母ザルを病理学的に検査できなかったため、どのような機序により生じた死・流産か確認できなかった。しかし、カニクイザルにおいて羊水から *Y. pseudotuberculosis* が分離されたり [3]、リスザルにおいても流産した母ザルに子宮内膜炎が確認されたり、斃死母ザルの子宮や流産胎子の大腸内容から本菌が分離された事例があり [4]、本菌はサル類においても死・流産を起こすことが知られており [24]、C施設における死・流産にも

本菌が深く関わっていたものと推察された。

### 3. 診断

動物では、特徴的な臨床症状を示さない。剖検により、小腸下部を中心とする壊死性、潰瘍性、偽膜性腸炎、リンパ節、脾臓などのリンパ装置の腫大、肝臓、脾臓の針頭大～小豆大の多発性灰白色ないしは白色結節形成が観察されたら、エルシニア症を疑う。組織学的にはリンパ装置、肝臓などの種々の臓器における菌塊形成、壊死巣、肉芽腫を確認する。糞便、腸内容ないしは臓器から *Y. pseudotuberculosis* を分離する。菌の分離および同定は次のように行う。被検材料を滅菌 PBS とともに乳剤にし、*Yersinia* selective agar base に irgasan と novobiocin を加えた培地 (IN 培地) に塗布する。25°C で 48 時間培養し、赤色で辺縁部透明の *Yersinia* と思われるコロニーを釣菌し、純培養後、グラム染色を行うとともに生化学性状を調べ、同定する。さらにウサギ抗血清を用いて血清型別を行い、自己凝集性ならびにカルシウム依存性の病原性状について検討する。糞便中の菌を増菌培養する場合、*Yersinia* は他の菌のような増菌培地がないため、10 倍量の PBS に糞便を接種後、4°C で 4～8 週間低温培養する (低温増菌法)。なお、37°C、24 時間で培養・判定する場合、*Yersinia* 属菌は発育速度が遅く、この条件下では、コロニーは非常に小さく観察し難い上に、被検材料に他の細菌が含まれている場合、通常で増殖する他の細菌のコロニーがさらに観察を困難にするため、判定には十分な注意が必要である。また、37°C で培養すると病原性プラスミドが脱落することが多々あり、このため、通常 25～32°C の範囲で分離培養をすることが肝要である。また、*Y. pseudotuberculosis* に感染すると 5～10 日で抗体が出現する。一般に抗体価の測定は O 抗原に対する試験管

凝集反応が用いられる。

### 4. 治療と予防

*Y. pseudotuberculosis* は、セフェム系、ペニシリン系、テトラサイクリン系、アミノグルコシド系の抗生物質に感受性があり、これらの筋肉注射と経口投与が有効である。マクロライド系抗生物質とサルファ剤には耐性がある。エルシニア症が発生した場合、発症個体の隔離、重篤化していない発症個体に高用量の抗生物質の筋肉注射や脱水の改善をすると回復する。飼育環境の消毒を徹底し、同居サルには、発症の阻止と感染予防のために抗生物質を筋肉注射あるいは経口投与すると良い。セフェム系抗生物質 (セフトキシムナトリウム) 50～100mg/kg を筋注、ホスホマイシン 40mg/頭、経口投与 10 日間で効果が得られている。他にセフボドキシム・プロキシチルなども経口投与に使用できる。

施設内の清浄化の徹底、保菌動物の侵入および汚染物質 (保菌動物の糞、糞に汚染された食物や水) の混入の阻止をする。*Y. pseudotuberculosis* 死菌を用いたワクチネーションが試みられているが [1]、現在のところ効果は期待できない。

#### D. 公衆衛生上の問題点

エルシニア症の発生には保菌動物との何らかの直接的あるいは間接的な接触が必要で [10、18、27、31]、愛玩用として室内で飼育されているリスザルに発生する確率は非常に低い。しかし、多くの報告があることからわかるように [1-4、7、13、15-17、19-20、22-26、28、30]、動物園で発生する確率が高い。なぜならば、動物園などの展示施設では、通常、夜間や冬期を除いて、リスザルは放飼場内で飼育されている。これらの放飼場の多くは屋外あるいは半屋外に設置されていて、小型の鳥類や齧歯類の