

平成 17 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症対策研究事業）

研究班研究課題：輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に関する研究

分担者研究課題：輸入動物 ー特に爬虫類、鳥類、食肉類、霊長類由来感染症に関する研究ー

分担研究報告書：

リスザルの *Yersinia pseudotuberculosis* ワクチンの臨床実験に関する研究

分担研究者：宇根有美 麻布大学獣医学部病理学研究室

研究協力者 林谷秀樹 東京農工大学獣医衛生学研究室

国内展示施設ではエルシニア症が散発あるいは集団発生しており、自験例だけでも 15 施設、65 例の発生がある。動物のエルシニア症の原因菌である *Yersinia pseudotuberculosis* (Y. p) は人獣共通感染性の病原体で、サル類に強い病原性を示し、リスザルでの流行が目立つ。このため、展示施設におけるリスザルのエルシニア症の発生を抑えることを目的として、Y. p 死菌ワクチンを作製し、その有効性を臨床実験で検討した。2003? 2006 年の 4 年間、10 施設、延べ 905 匹のリスザルを対象として、抗体検査とワクチン接種を行った。その結果、ワクチンを接種したリスザルには、1 匹もエルシニア症の発生が認められなかった。よって、今回用いたワクチンはリスザルにおけるエルシニア症発生阻止に有効であると結論づけた。

A. 背景

I 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℃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、これは本菌が、冷たく、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いる。実際、21 種類もの野鳥から分離されたという報告や、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。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、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。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、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。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。

II サル類の *Y. pseudotuberculosis* 感染症 (以下エルシニア症と略す)

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。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。マカカ属の発生が1事例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、オナガザル科サバンナモンキー、スーテイマンガベ、ブラッザモンキー、パタスモンキー、マンドリル、クロザル、オマキザル科フサオマキザル、リスザル、テナガザル科シロテナガザル、フクロテナガザル、オラウータン科チンパンジーの報告がある。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環境によるものと考えられる。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、サル類のエルシニア症の報告は、現在のところ、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から考えると、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に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、スーテイマンガベ、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型が最も多く3施設、1b型と6型が各1施設から分離されている。

III リスザルのエルシニア症

サルの種類による個々の発生状況、臨床症状および病理像に大きな相違は認められないが、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、諸外国と比較して、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。ここに、リスザルのエルシニア症について、自験例を中心として述べる。

B. 発生状況

リスザルのエルシニア症は、これまで発症の見られない場所に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)、下痢による被毛の汚染や死流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、発症個体の異常に気が付かずに、かなり重篤な状態でみつかることがほとんどであり、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、かつ経過が早く重篤になりやすい。しかし、年齢に関わらず発症して死に至る事例もみられた。

C. 研究の目的

人獣共通感染症であるエルシニア症が国内の数多くの展示施設の動物間、特にリスザルで流行し、そのコントロールに困難を極めていることから、本研究は、展示施設におけるリスザルのエルシニア症の発生、流行を阻止する方法の確立、特にワクチン開発を目的として臨床実験を行った。

D. 材料と方法

国内の展示施設のうち、エルシニア症の発生経験をもつ施設あるいは発生する可能性がある施設で、最低年1回の捕獲、検査に協力可能な施設にワクチン接種の臨床実験を依頼し、承諾の得られた10施設において調査を行った。対象としたリスザルはコモンリスザル461匹とボリビアリスザル444匹で、2003年127匹、2004年155匹、2005年337匹、2006年286匹、延べ905匹である（表1）。

調査は、冬期にサルを獣舎に収容する施設が多いこと（捕獲が容易）、繁殖期、出産期および育児期に捕獲すると事故が起きやすいことなどから、毎年1月から3月にかけて実施した。

作業内容/手順

関東に位置する大学近隣のK0とTHと採血技術を有する獣医師が常駐しているHCとH0(2006年のみ)の4施設を除き、以下の作業は、予め備品および消耗品を送付し、現地でおこなった。

- 1) 捕獲、個体（マイクロチップを判読）・性別の確認
- 2) 吸入麻酔（イソフルラン）
- 3) 体重測定
- 4) 外景検査（特に削瘦、下痢の有無など）
- 5) 採血（幼体1ml、成体2ml程度）、血清分離
- 6) 直腸スワブの採取（シードスワブ1号）
- 7) ワクチン皮下接種（0.2ml/匹）
- 8) マイクロチップの装着（装着がされていない個体について）
- 9) 覚醒

ワクチンの作成法

Yersinia pseudotuberculosis 血清型4bを液体培地に接種し、37°Cで24時間培養する。培養後、1%の濃度になるようにホルマリンを加え、1晩静置して死菌液とする。その後、培養液を5000rpmで10分間遠心した後、上清を捨て沈査を滅菌生理食塩水に浮遊させる作業を3回繰り返し、菌体を洗浄する。そして、最終的に菌体を

10 倍量の滅菌生理食塩水に浮遊させたものを接種用ワクチンとした。

抗体価の測定

リスザルの血清を用いて、ELISA 法によりエルシニア菌体外蛋白 (Yops) に対する血中抗体の吸光度を測定した。抗原としては Yops を用いた。

〈方法〉

1. Yops を抗原として 1.0mg/ml でプレートに分注し、4°C で 24 時間静置。
2. 1%牛血清アルブミン (BSA) (KPL) をプレートに分注し、室温で 15 分静置。
(反応液を捨て、使用時まで 4°C 保存)
3. 非動化 (56°C、30 分) した被験血清を 80 倍希釈してプレートに分注し、25°C で 60 分静置。
4. Wash Solution (KPL) で 3 回洗浄。
5. ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 F(ab')₂ (CooperBiomedical, Inc.) を 6000 倍希釈してプレートに分注し、25°C で 60 分静置。
6. Wash Solution で 5 回洗浄。
7. ABTS 溶液 (KPL) をプレートに分注して 25°C で 20 分静置した後、マイクロプレートリーダー (コロナ社) を用いて吸光度を測定。

病性鑑定

調査協力機関で、観察期間中(ワクチン接種から次のワクチン接種までの期間)死亡したリスザルのうち、死因が明らかにエルシニア症でない場合を除いて、全てのリスザルを病理学のおよび微生物学的に検索した。

E. 結果

調査協力機関におけるエルシニア症の発生状況とワクチン接種の効果

1) GS 施設

この施設では、1つの大きなケージに 15 匹のリスザルが飼われ、別の場所に 3 匹のリスザルが個別飼育されていた。2002 年 4 月群飼育の 15 匹中 5 匹が、約 2 週間の間に次々と斃死した。4 匹目に死亡したリスザルが病性鑑定により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。エルシニア症と確定診断されたのは、2002 年のこの事例のみであったが、稟告によると、以前から数年おきに生まれた子ザルのほとんどが死亡していた。剖検を行った展示施設の獣医師によると、これらの子ザルには、今回の事例と類似の肉眼病変が観察されていた。

この施設におけるワクチン接種は 2003 年より 2005 年までの 3 年間に (2006 年は 3 月に実施予定) 3 回実施されており、これまでエルシニア症の発生はない。

2) KO 施設

この施設では 3 つのケージに分けて 9? 21 匹飼育していたが、そのうちの 1 ケージにおいて 2003 年 11 月繁殖ローンにより導入して間もない、ワクチン未接種の成体サル 2 匹が 4 日間という短期間にエルシニア症で死亡した。しかし、同居していたワ

クチン接種、亜成体サル2匹は発症しなかった。また、他のケージでも、2004年9月に生まれたサルが同年の12月（ワクチン接種前）にエルシニア症で死亡した。これらの死亡したサルからはいずれも血清型4bが分離された。同居のワクチン接種サルでの発症はみられなかった。

3) TH 施設

この施設では、リスザルのエルシニア症の発生はないが、サンショクキムネオオハシが血清型4bで、少なくとも2羽死亡している。この2羽が病性鑑定によりエルシニア症と診断される以前に同居飼育の3羽も死亡しており、サンショクキムネオオハシは全滅した（2003年）。ワクチン接種は、2006年の1回のみで、現在までにエルシニア症の発生はないが、観察期間が短いため、有効性については不明である。

4) FU 施設

23年間に表2に示すように、細菌検査によってエルシニア症と確定された事例はリスザルを含む各種動物において、過去6回発生しており、最近の5年間はリスザル事例のみである。表の下段の合計数は、エルシニア症と確定されたものと肉眼的にエルシニア症（疑似）と診断されたものの合計で、21年間毎年流行が繰り返されていると推察される。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。この施設では、以前から血清型4bが分離されていたが、2003年に死亡したリスザルの臓器からは血清型7が分離されている。

この施設における調査は2003年から開始され、2003年は抗体調査のみ、2004年よりワクチン接種を始めた。毎回全頭から抗体価測定のために採血し（延べ435匹）、ワクチン接種は前年の抗体調査で抗体価の低い動物あるいは前年に生まれたリスクの高い動物を対象として延べ180匹に実施した。全頭に投与しないのは、1回のワクチン製造量に約70匹と限界があるためである。調査を始めてからのエルシニア症の発生は、2003年1月を最後に、2004年以降発生していない。なお、2005年に非病原性エルシニアである *Y. kristensinni* による致死例が1例あった。

5) HC 施設

リスザル11匹を飼育する施設で、2003～2004年にかけてエルシニア症が発生して、直腸スワブの細菌検査で *Y. p* 血清型4bが4匹から分離され、うち2匹が死亡した。2005年からワクチン接種を開始した。その後、エルシニア症の発生はない。

6) H0 施設

1990年にエルシニア症の発生があったが、最近では発生がない。2005年よりワクチン接種を開始した。その後、今日までエルシニア症の発生はない。

7) NB 施設

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が、以下のように抗生剤の休薬後に流行が起きている。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2001年3月にかけて発生がみられた。その後、2005年の調査の際にも、エルシニア症の集団発生があり、その際に採取した直腸スワブ46検体のうち8匹（17%）から血清型1bが分離され、ワクチン接種や抗生物質の甲斐なく、うち2匹

がエルシニア症で死亡した。この事例はワクチン接種のその時にすでにエルシニア症の集団発生が起きていた希有な事例である。この施設では、2005年ワクチン接種後に生まれた8匹の子ザルのうち6匹が死亡しており、剖検が実施できた子ザル全てが、肉眼的にはエルシニア症と診断された。この施設では、10月頃からエルシニア症の発生があるものと考えられ、ワクチン接種時期を早める必要がある。

8) ST 施設

Y. p によるエルシニア症の発生は記録されていないが、2002～2003年にかけて45匹中5匹が死亡あるいは *Y. enterocolitica* 08 の集団発症を経験している。2004年よりワクチン接種を開始した。その後、今までエルシニア症の発生はない。

F. まとめ

展示施設におけるリスザルのエルシニア症の流行を抑えることを目的として、Y. p 死菌ワクチンを作製し、その有効性を臨床実験で検討した。2003? 2006年の4年間、10施設、延べ905匹のリスザルを対象として、抗体検査とワクチン接種を行った。その結果、ワクチンを接種したリスザルには、1匹もエルシニア症の発生がなかった。よって、今回用いたワクチンはリスザルにおけるエルシニア症発生阻止に非常に有効であると結論づけた。

今後の課題としては、以下のような項目について検討する必要がある。

1) ワクチン接種方法：現在用いている免疫原は皮下接種によって、有効な免疫を賦与している。しかし、皮下接種では、捕獲、保定が必要で、完全放し飼いのリスザル（捕獲の出来ないリスザル）には利用できない。また、たとえ捕獲可能であっても、捕獲時にサルが外傷を負ったり、ショックなどの事故が起きる可能性がある。さらに、野生動物を扱うために、時として保定等の作業をする人間に事故が起きることがある。このため、将来的には、サルにも人間にも負担のない方法、すなわち、経口投与可能なワクチンの開発が望まれる。

2) 免疫原の検討：上記で述べたように経口投与でも効果のある免疫原を開発する必要がある。また、現在の免疫原の生産には、多くの時間と労力が必要で、1回にリスザル約70匹分の免疫原しか生産できない。皮下接種の場合、個々の動物に確実に免疫原を接種できるが、経口投与は皮下接種に比べて、確実性が劣るため、免疫原を大量に用意する必要がある。よって、これまでよりも効率よく、大量に生産できる技術が求められる。

Y. pseudotuberculosis は、リスザルのみならず、多くのサル類に病原性を示し、また大型のサルの捕獲・保定はかなり困難で、サルにも人間にも非常に危険が伴う。これらの事から、1)、2)の課題が達成されると、大型サルへの応用も容易に可能となる。

3) ワクチン接種間隔の検討（抗体価の半減期）：現在、用いている免疫原の皮下接種で、得られた抗体がどの程度持続するのか、まだ検討が済んでいない。現在、野外での臨床実験では、年1回の接種で効果が得られている。野外では、ブースターとして働く、病原性エルシニア属細菌の暴露が起きている可能性もあり、そのため、効果が持続している事も考えられるが、その詳細を明らかにする必要がある。

表1 対象としたリスザルの内訳

	2006	2005	2004	2003	合計
GS		14	13	15	
KO	13	21	11	9	
TH	13	10			
FU	113	113	106	103	
HC	8	7			
HO	5	5			
OP	70	93			
NB	34	46			
ST	30	27	25		
OK		11			
	286	347	155	127	915

表2. FU施設におけるエルシニア発生状況

1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	真性Yp症数	Ypリスザル数	Yp合計(含疑似)	'83	'85	'90	'95	'00	'01	'02	'03	'04	'05	
			キヤピバラ									7	1	1	2	2	11	4	3	1	1	1	3		
												1	1	1	2	8	5	5	3	1	4	1	3	0	
												8	1	2	9	16	16	10	5	2	5	1	3	0	
												'83	'85	'90	'95					'00	'01	'02	'03	'04	'05

合計：真性および疑似エルシニア症の合計
 リスザル数：エルシニア症で死亡したリスザル数
 Vac: ワクチン接種

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症 研究事業）

輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に対する研究（吉川班）

B ウイルスの潜伏感染に関する血清疫学的研究

（Ⅱ） α -ヘルペスウイルス感染における血清疫学的解析

分担研究者 本藤 良 日本獣医畜産大学獣医学部 教授
協力研究者 植田富貴子 日本獣医畜産大学獣医学部 助教授
大森 優紀 日本獣医畜産大学獣医学部・獣医学科
古賀 敦子 日本獣医畜産大学獣医学部・獣医学科
吉川 泰弘 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

研究要旨

展示集団飼育チンパンジー 77 頭を対象に、 α -Herpesvirus の Simian herpes B virus (SHBV) および Herpes simplex virus-1,2 (HSV-1,2) 型における感染状況を血清疫学およびその家系系統樹から解析した。

- 1) HSV-1 型感染では、1.3%が抗体陽性で、HSV-1 型単一感染の実態を明らかにした。感染様式では、展示集団飼育環境下でのヒトからの感染が示唆された。
- 2) HSV-2 型感染では、47%が陽性で、HSV-2 型単一感染の実態を明らかにした。♂が 56%、♀が 44%で、雄に高い傾向がみられた。また、HSV-2 型が本対象群内での主要を占め、群内における水平感染が示唆された。
- 3) HSV-1,2 型重複感染では、1.3%が陽性でチンパンジー集団群において重複感染が起こり得ることを明らかにした。また、本対象群内での水平感染による重複感染であることが示唆された。
- 4) SHBV と HSV-2 型複合感染では、2.6%が陽性で、複合感染の起こり得ることを明らかにした。また、野生での SHBV 感染の後に、飼育環境下での水平感染による HSV-2 型感染であることが示唆された。

A. 研究目的

α -Herpesvirus の Simian herpes B virus (SHBV) 感染の血清学的確定診断は、近縁ヘルペス、特に Herpes simplex virus-1,2 (HSV-1,2) 型との抗原交叉性が高いことから、両者ウイルスの複合感染の場合、その確定診断が困難とされていた。平成 16 年度の本研究班における報告書において、SHBV および HSV-1,2 型の構造糖蛋白 (gD, gG) を抗原とした蛍光 ELISA 法により、各特異抗体の検出による血清学的診断法を確立した。本研究では、その実用性を視点において、展示集団飼育環境下におけるチンパンジーを対象に、 α -ヘルペスウイルスの感染状況の把握を目的として、血清疫学的解析を試みた。

B. 研究方法

1. 方法：平成16年度の本研究報告書で明らかにした蛍光 ELISA 法で実施した。 β -D-ガラクトシダーゼと 4MUG（基質）を用い、Fluoroscan で、その反応産物である 4MU の蛍光単位を測定した。
2. 抗原：表 1. に示した、 α -ヘルペスウイルスゲノム上の gD、gG 遺伝子領域の塩基配列の相同性およびアミノ酸配列の相同性を解析して、各ウイルス構造発現糖蛋白を抗原として用いた。SHBV 抗原は、SHBV-gD (Tanabayashi k, et al: J.Clin.Microbiol.39,3025,01) 抗原、および HSV-1,2 型抗原は、HSV-1,2-gG (ABI 社) 抗原を用いた。
3. 抗血清：SHBV 感染アカゲザルおよび HSV-1,2 型感染免疫ウサギ血清。第二次反応抗体は、ビオチン標識抗ヒト (AQI 社)、抗サル (RKL 社)、抗ウサギ IgG (CMN 社) 血清を用いた。
4. 検体：S・展示集団飼育チンパンジー、77 頭の血清を用いた。チンパンジーの由来は、野生由来 41 頭、展示飼育場由来 (F1/F2) 36 頭。年齢層は、0-9 歳 (5 頭)、10-19 歳 (28 頭)、20-29 歳 (35 頭)、30 歳以上 (9 頭)。

○倫理面への配慮：チンパンジー血清については、提供団体が研究目的に対応した紙上公表しているもので、倫理面を配慮して採血されたものである。

C. 研究結果

1. 第二次抗体の特異性

チンパンジー血清における蛍光 ELISA 法での第二次抗血清の至適使用条件をチンパンジー血清と抗サル IgG 抗体および抗ヒト IgG 抗体を用いて、各濃度における Box tests で検討した。その結果を図 1. に示した。

各使用濃度に依存し、各抗血清の希釈度に対比した蛍光単位の標準反応曲線が得られた。抗サル IgG 抗体よりも抗ヒト IgG 抗体での反応系が約 2 倍の高感度で、その相同性の高いことが示唆された。これにより、抗ヒト IgG 抗体の至適濃度条件を用いることで各特異性の高い抗体価をもとめ得ることが可能となった。

2. HSV-1,2 型の gG 抗原の特異性

使用、HSV-1,2 型の各 gG 抗原における HSV-1,2 型間および SHBV 間との特異性の検討を試みた。その結果を、図 2-A、図 2-B、図 3-A に示した。

SHBV 感染サル血清および HSV-1,2 型感染免疫血清において、各抗原間とでの交叉反応もなく、HSV-1,2 型および SHBV 特異抗体の検出が可能であった。これにより、HSV-1,2 型の重複感染例および SHBV との複合感染例も特異的に識別が可能となった。

3. SHBV の gD 抗原の特異性

使用、SHBV における gD 抗原の特異性の検討を試みた。その結果を、図 3-B、に示した。SHBV-gD 抗原は、HSV-1,2 型感染免疫血清、ウサギ正常血清およびサル正

常血清との反応では血清希釈濃度の高いところで対照正常抗原（vero 細胞調製）と同等の低非特異反応が起こり得るが、特異反応蛍光値との差は大きいことから、SHBV 特異抗体の検出が可能であり、実用的である結果が得られた。

4. α -Herpesvirus 感染の血清疫学

展示集団飼育チンパンジー 77 頭を対象に、 α -Herpes virus の SHBV および HSV-1,2 型における感染状況を血清疫学のおよび家系系統樹的に解析した。その結果を、表 2.、図 4.、表 3.、図 5.、表 4.、図 6.、および図 7, 8, に示した。

1) HSV-1 型感染では、1.3%が抗体陽性で、HSV-1 型単一感染が示唆された。また、陽性事例は、展示飼育場由来（F1/F2）の 7 歳齢雄の若いチンパンジーで、展示集団飼育環境下でのヒトからの感染が示唆された。

2) HSV-2 型感染では、47%が陽性で、HSV-2 型単一感染が示唆された。♂が 56%、♀が 44%で、雄に高い傾向がみられた。また、野生および F1/F2 由来間においては有意差はみられなかったが、野生由来チンパンジーでは 21 歳齢以上の中高齢層における抗体陽性で、HSV-2 型が本対象群内での主要を占め、群内における水平感染によることが示唆された。

3) HSV-1,2 型重複感染では、1.3%が陽性でチンパンジーにおいても重複感染が起こり得ることが明らかになった。また、陽性事例は、F1/F2 由来の 12 歳齢雄の若いチンパンジーで、本対象群内での水平感染による重複感染であることが示唆された。

4) SHBV と HSV-2 型複合感染では、2.6%が陽性で、複合感染の起こり得ることを明らかにした。野生由来の雄・雌、各 1 頭で、23 歳齢以上の中高齢層で陽性であった。また、その感染様式は野生での SHBV 感染の後に、集団飼育環境下での水平感染による HSV-2 型感染であることが示唆された。

D. 考 察

α -Herpesvirus における 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、そ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による接触感染の主要感染源になり得ると考えられている。また、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も懸念されている。一方、HSV-1,2 型は、ヒトの主要ヘルペスウイルスで、1型は口唇ヘルペス、2型は陰部ヘルペスの主要起因ウイルスとされている。HSV-1,2 型感染者においてもその後根神経節における潜伏感染と再活性化により終生ウイルスを保有することになる。従って、各ウイルスの特異抗体の保有調査は、確定診断と感染様式の解析を行う上で重要である。

α -Herpesvirus の SHBV 感染の血清学的確定診断は、近縁ヘルペス、特に HSV-1,2 型との抗原交叉性が高いことから、両者ウイルスの複合感染の場合、その確定診断が

困難とされていた。平成16年度の本研究班の報告書において、SHBV および HSV-1,2 型の構造糖蛋白 (gD,gG) を抗原とした蛍光 ELISA 法により、各特異抗体の検出による血清学的診断法を確立し、輸入アカゲザルにおいて SHBV と HSV-1,および 2 型の複合感染の起こり得ることを明らかにした。この事実は、サル類の飼育環境下において、ヒトヘルペスの主要ウイルス、HSV-1,2 型がサル類に感染を起こすことにより、その確定診断を行う上で誤診を伴う可能性があることで重要な知見である。

従って、本研究では、その実用性を視点において、展示集団飼育環境下におけるチンパンジーを対象に、 α -Herpesvirus の感染状況の把握を目的として、血清疫学および家系系統樹的解析を試みた。本研究で重要なことは、展示集団飼育環境下におけるチンパンジーにおいて、HSV-1 型、2 型の単一感染、HSV-1,2 型の重複感染、および SHBV 感染の野生由来チンパンジーに、展示集団飼育環境下において水平感染と考えられる HSV-2 型の複合感染を示唆する結果が得られたことである。また、その伝播様式の詳細は不明であるが、チンパンジーの集団生活の習性と α -Herpesvirus の特性および抗体陽性チンパンジーの家系系統樹解析から、最初にヒトから飛沫感染によりチンパンジーに HSV 感染を起こし、それが水平感染を主として集団群内に拡散感染を起こし得たものと考えられる。

本研究は、潜伏感染 SHBV および HSV の再活性化によるヒトへの感染、あるいはヒトからサルへの HSV 感染が起こり得た場合の確定診断およびその血清疫学的な感染様式を解析する上で今後重要な基礎的知見となり得るものと考えられる。

E. 結 論

SHBV の構造糖蛋白 (gD) および HSV-1,2 型の構造糖蛋白 (gG) を抗原とした、蛍光 ELISA 法により、高感度で各特異抗体の検出可能な血清学的診断法を確立し、その実用性を視点に、展示集団飼育環境下におけるチンパンジーを対象に、 α -Herpesvirus の感染状況を血清疫学および家系系統樹から解析を試みた。

HSV-1 型、2 型の単一感染、HSV-1,2 型の重複感染、および SHBV 感染の野生由来チンパンジーに、展示集団飼育環境下において水平感染と考えられる HSV-2 型の複合感染の実態を明らかにした。今後、血清疫学的な感染様式を解析する上で重要な基礎的知見となり得るものと考えられる。

F. 健康危険情報

諸外国における SHBV 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 30-40 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重要視されている。従って、 α -Herpesvirus の SHBV と近縁で特に抗原交叉性が高いとされる HSV-1,2 型との血清学的類別診断法の確立と血清疫学的な感染様式の解析は重

要課題の一つである。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Kazue Uchida, Michiyo Shinohara, Shin-ichi Shimoda, Uykari Segawa, Rei Doi, Atushi Gotoh and Ryo Hondo. Rapid and sensitive detection of Mumps virus RNA Directly from Clinical Samples by Real-Time PCR. *Journal of Medical Virology* 75: 470-474, 2005.
2. Fukiko UEDA, Kyoko YUGAMI, Mariko MOCHIZUKI, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Akikazu FUJIMA, Hiroshi SHOJI and Ryo HONDO. Comparison of genomic structures in the serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* isolated from meats and listeriosis patients in Japan. *Japanese Journal of Infectious Disease* 58(5), 289-293, 2005.
3. Fukiko UEDA, Kunitoshi OGASAWARA and Ryo HONDO. Analysis of molecular evolution of *Listeria monocytogenes* isolated from Japanese meats and environment. *Japanese Journal of Infectious Disease* 58(5), 320-322, 2005.
4. Mariko MOCHIZUKI, Makoto MORI, Mayumi AKINAGA, Kyoko YUGAMI, Chika OYA, Ryo HONDO and Fukiko UEDA. Thallium contamination in wild ducks in Japan. *Journal of Wild Disease* 41(3), 664-668, 2005.
5. Fukiko UEDA, Reiko ANAHARA, Fumiya YAMADA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu Ochiai and Ryo HONDO. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. *International Journal of Food Microbiology* 105(3), 455-462, 2005.
6. Fukiko UEDA, Kunitoshi OGASAWARA and Ryo HONDO. Characteristic of *Listeria monocytogenes* isolated from Imported meat in Japan. *Japanese Journal of Infectious Disease* 59(1), 54-56, 2006
7. Fumiya Yamada, Fukiko Ueda, Yoshitsugu Ochiai, Mariko Mochizuki, Hiroshi Shoji, Kiyoko Ogawa-Goto, Tetsutaro Sata, Kunitoshi Ogasawara, Akikazu Fujima and Ryo Hondo. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. *Journal of Microbiological Methods* (in press)
8. 本藤 良、斎藤彩、植田富貴子。特集：動物由来ウイルス感染症、Bウイルス感染症。日本臨床63(12)、2189-2195、2005

2) 学会発表

1. 斎藤彩、藤間勝昭、大屋智香、植田富貴子、鈴木恵真子、小枝暁子、今岡浩一、棚林清、庄司紘、吉川泰宏、本藤 良。Bウイルスおよび単純ヘルペスウイルスの構造糖蛋白(gD, gG)抗原の診断への応用。第139回日本獣医学会学術集会、2005。
2. 関本容子、清家一生、植田富貴子、山田文也、小笠原邦敏、望月真理子、本藤 良。*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究5、*Listeria monocytogenes*分離株の分子進化的解析。第139回日本獣医学会学術集会、2005。
3. 高橋知子、松館宏樹、長谷川和弘、高橋雅輝、大窪富士子、瀬川俊夫、落合由嗣、植田富貴子、本藤 良。と場に搬入された牛におけるリステリア菌の保有状況とL. m分離株のゲノム構造の

特性。第140回日本獣医学会学術集会、2005。

4. 植田富貴子、望月真理子、岩堀満月、川崎麻衣子、古賀敦子、小守忍、伊藤健護、須田詩織、早川一生、本藤 良。愛玩動物飼育用缶詰の安全性についての研究 (2. 市販ネコ用缶詰中の必須元素含量)。第140回日本獣医学会学術集会、2005。
5. 小笠原邦敏、植田富貴子、望月真理子、山田文也、青木英雄、木田中、中野恵、本藤 良。*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究 6、*Listeria monocytogenes*輸入株における分子進化的解析。第140回日本獣医学会学術集会、2005。

表1 α -ヘルペスウイルスゲノムにおける糖蛋白質(gG,gD)領域の相同性

塩基配列の相同性			アミノ酸配列の相同性		
	HSV-1・gG	HSV-2・gG		HSV-1・gG	HSV-2・gG
HSV-2・gG	31 %		HSV-2・gG	36 %	
SHBV・gG	29 %	39 %	SHBV・gG	30 %	37 %

	HSV-1・gD	HSV-2・gD		HSV-1・gD	HSV-2・gD
HSV-2・gD	85 %		HSV-2・gD	78 %	
SHBV・gD	57 %	59 %	SHBV・gD	65 %	63 %

	HSV-1・gG	HSV-2・gG		HSV-1・gG	HSV-2・gG
SHBV・gD	31 %	37 %	SHBV・gD	26 %	26 %

図1

二次抗体の特異性

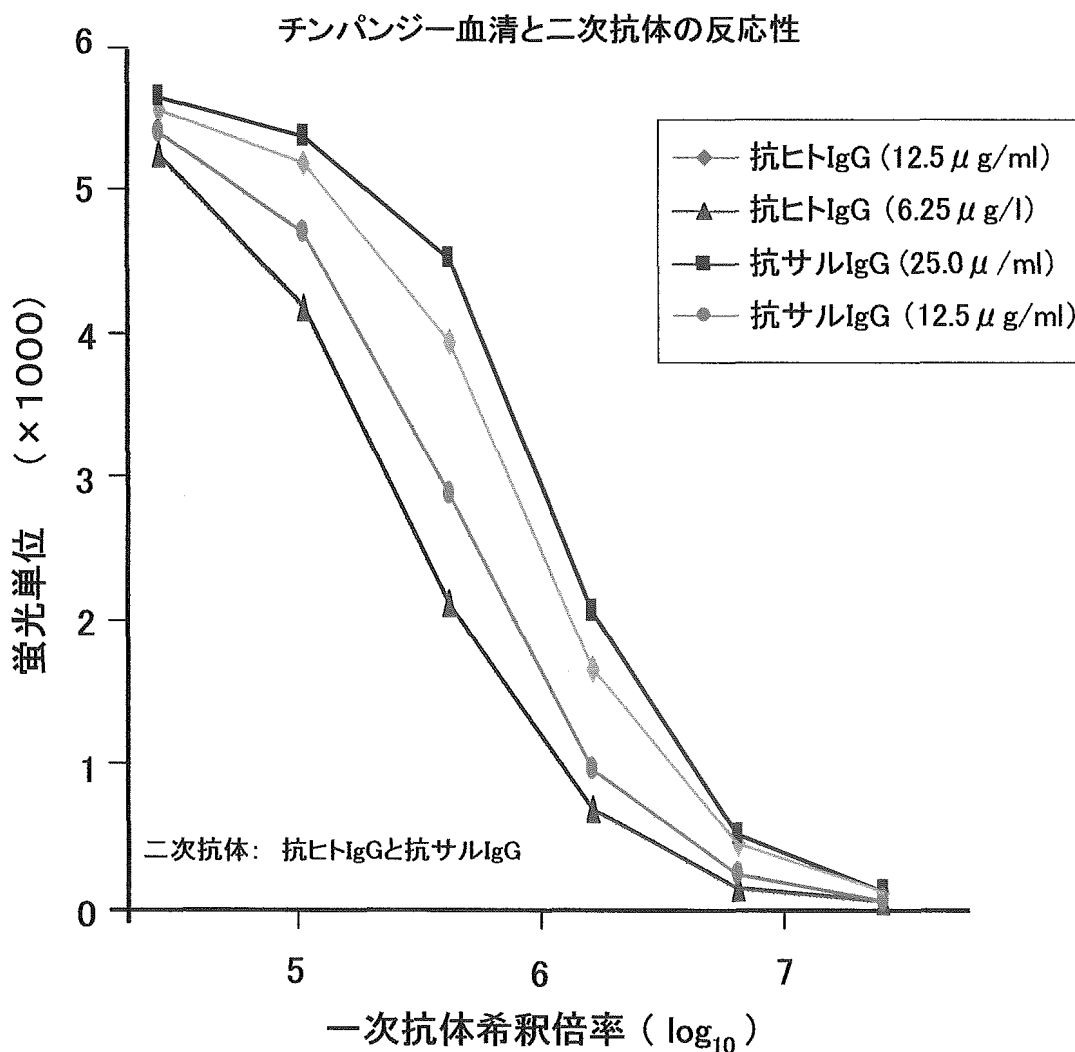


図2-A

HSV-1・gG抗原の特異性

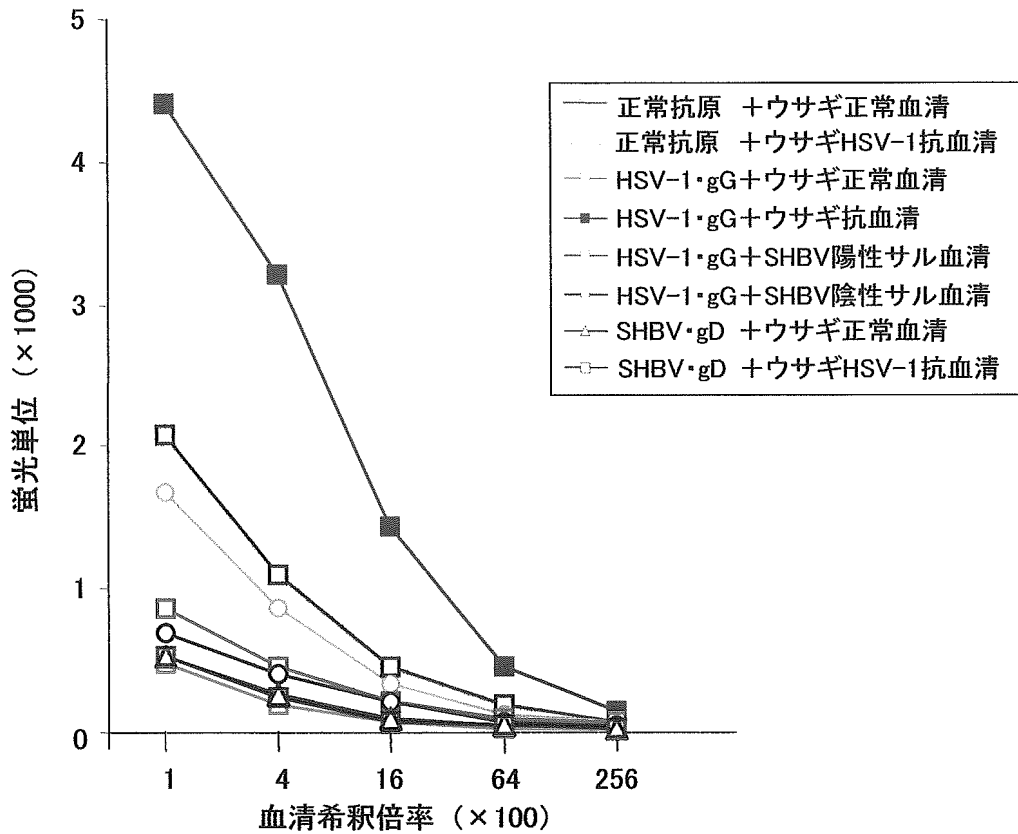


図2-B

HSV-2・gG抗原の特異性

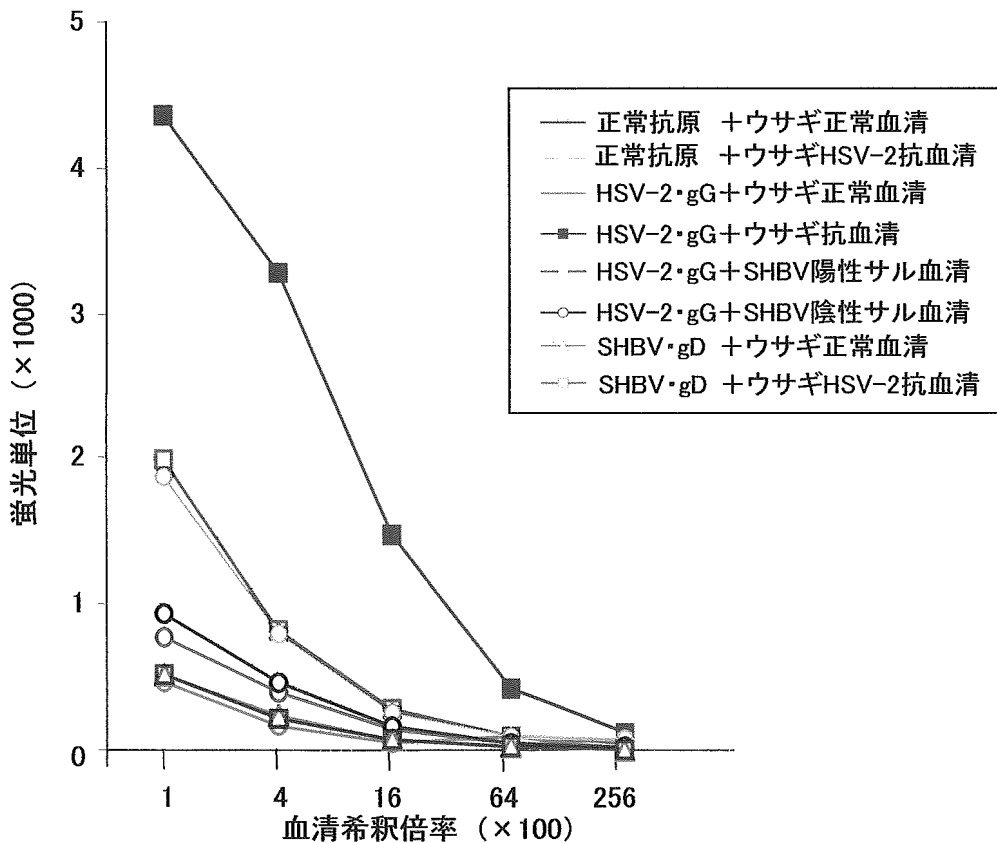


図3-A

HSV-1, 2・gG抗原の特異性

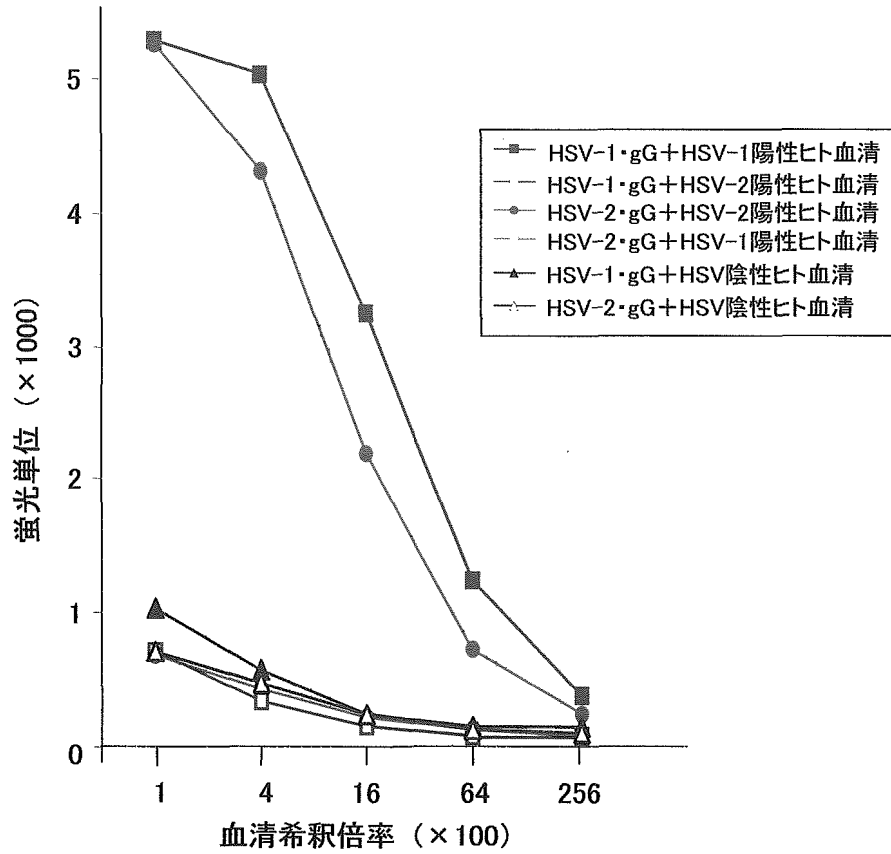


図3-B

SHBV・gD抗原の特異性

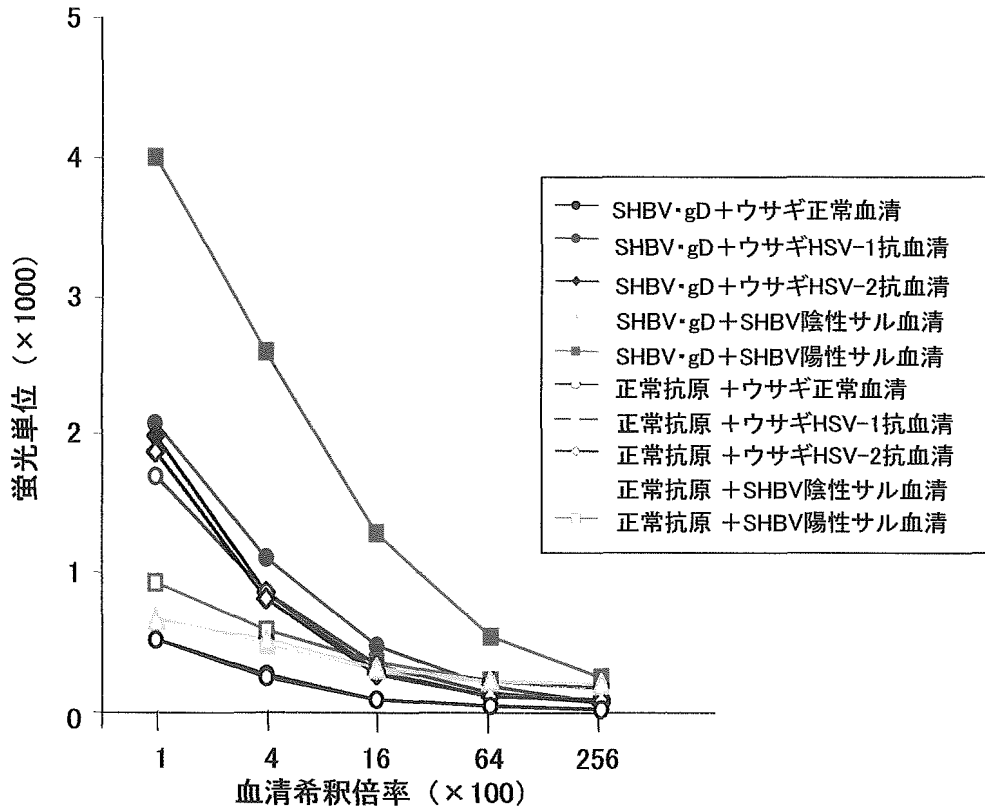


表2 チンパンジーにおける α -Herpesvirusの抗体保有状況

陽性検体率と由来の関係				陽性 F ₁ / F ₂ 検体(%)	
ウイルス種	陽性検体数(%)	陽性検体の性別(%)	陽性野生検体(%)	F ₁ / F ₂ (%)	
1 HSV-1	1 (1.3%)	♂ 1 (100%)		1 (100%)	
		♀			
2 HSV-2	36 (46.8%)	♂ 20 (56%)	11 (30.6%)	9 (25.0%)	
		♀ 16 (44%)	11 (30.6%)	5 (13.9%)	
3 HSV-1 HSV-2	1 (1.3%)	♂ 1 (100%)		1 (100%)	
		♀			
4 HSV-2 SHBV	2 (2.6%)	♂ 1 (50%)	1 (50.0%)		
		♀ 1 (50%)	1 (50.0%)		
5 陰性	37 (48.1%)	♂ 17 (46%)	5 (13.5%)	12 (32.4%)	
		♀ 20 (54%)	12 (32.4%)	8 (21.6%)	
計	77	77	41	36	

図4

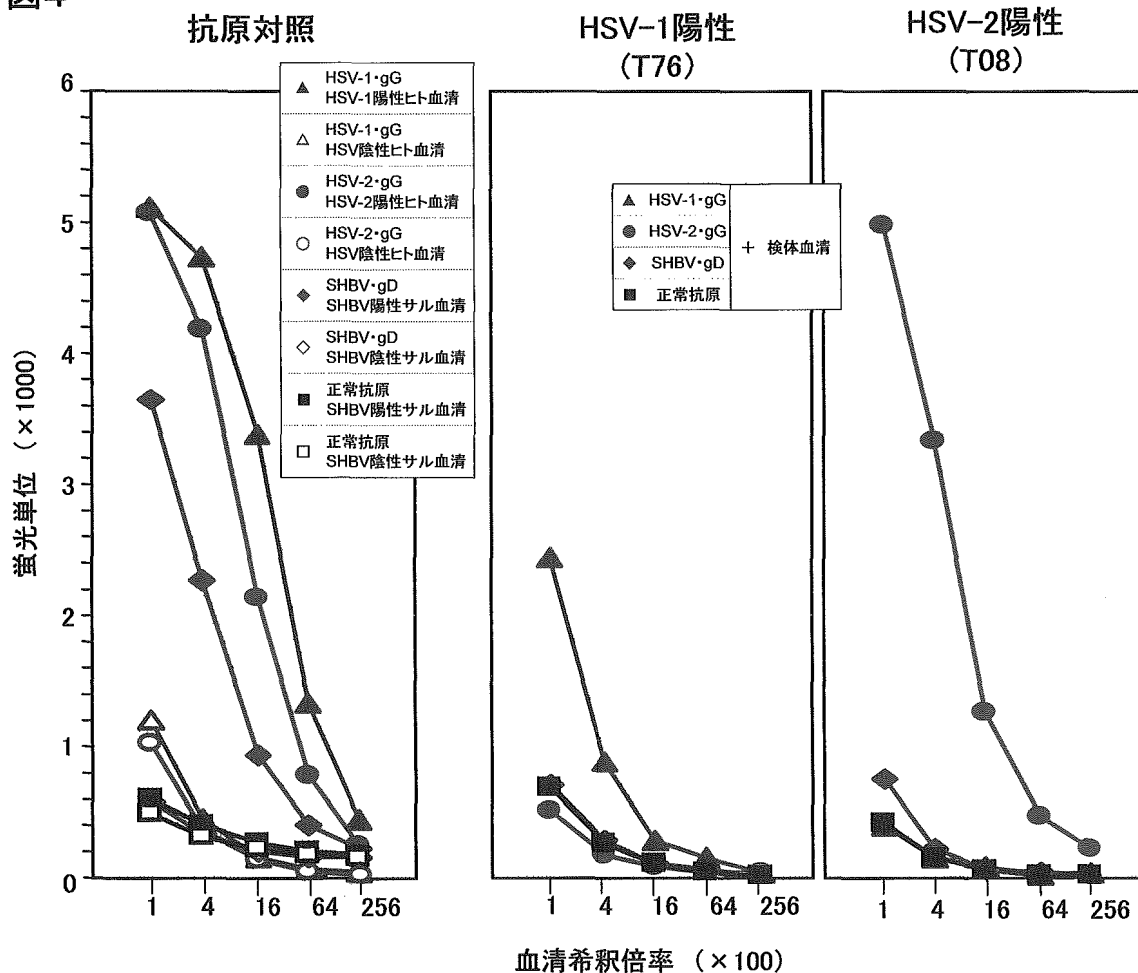


表3. チンパンジーにおける α -Herpesvirusの抗体保有状況

性別と年齢の関係

ウイルス種	陽性検体数 (%)	年齢 (%)		0-9歳	10-19歳	20-29歳	30歳以上
		性別 (%)					
1 HSV-1	1 (1.3%)	♂	1 (100%)	1 (100%)			
		♀					
2 HSV-2	36 (46.8%)	♂	20 (56%)	1 (2.8%)	6 (16.7%)	8 (22.2%)	5 (13.9%)
		♀	16 (44%)		4 (11.1%)	9 (25.0%)	3 (8.3%)
3 HSV-1 HSV-2	1 (1.3%)	♂	1 (100%)		1 (100%)		
		♀					
4 HSV-2 SHBV	2 (2.6%)	♂	1 (50%)			1 (50.0%)	
		♀	1 (50%)				1 (50.0%)
5 陰性	37 (48.1%)	♂	17 (46%)	3 (8.1%)	9 (24.3%)	5 (13.5%)	
		♀	20 (54%)		8 (21.6%)	12 (32.4%)	
計	77		77	5	28	35	9

図5

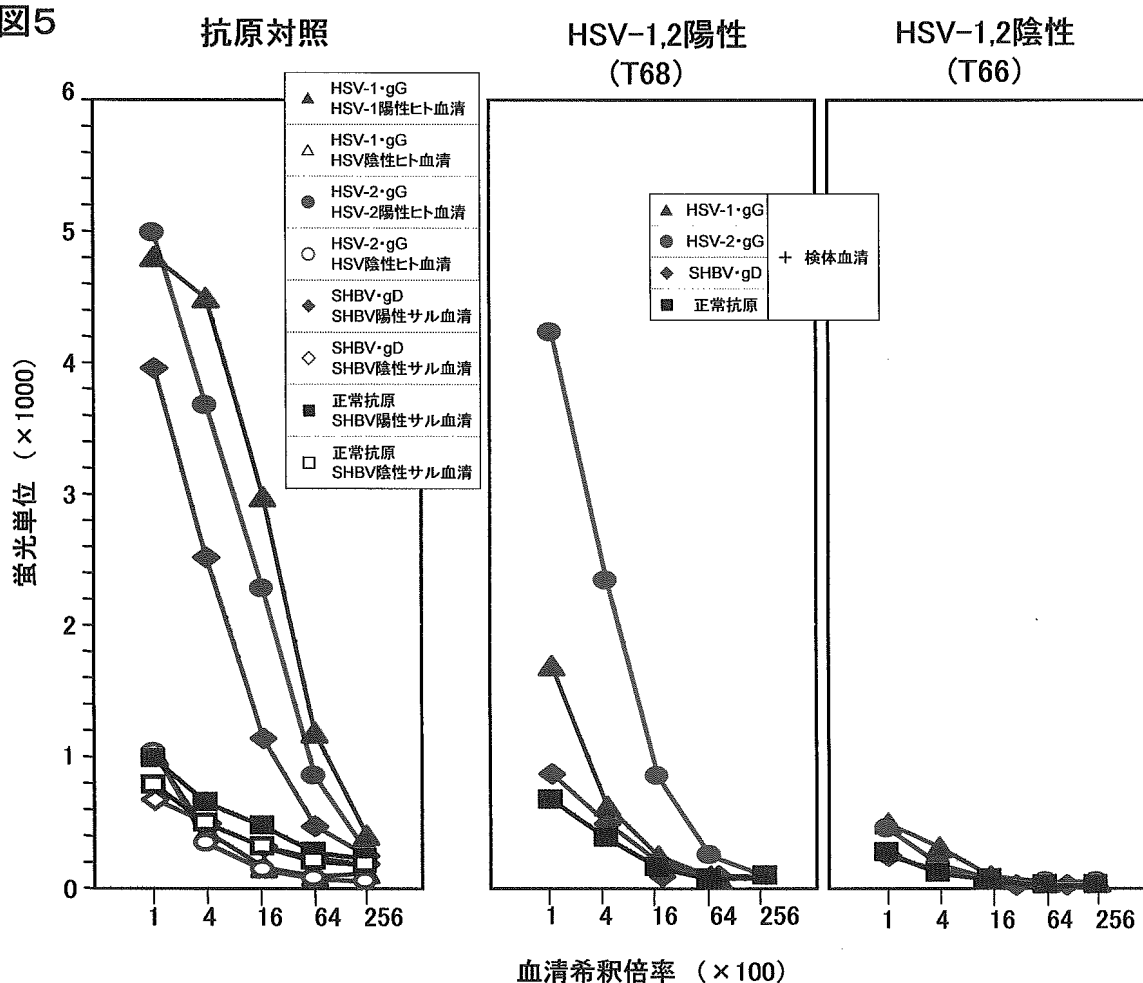


表4. チンパンジーにおける α -Herpesvirusの抗体保有状況

由来と年齢の関係

	ウイルス種	陽性検体数 (%)	年齢 (%)		0-9歳	10-19歳	20-29歳	30歳以上
			性別 (%)					
1	HSV-1	1 (1.3%)	野生					
			F ₁ /F ₂	1 (100%)	1 (100%)			
2	HSV-2	36 (46.8%)	野生	22 (61%)			14 (38.9%)	8 (22.2%)
			F ₁ /F ₂	14 (39%)	1 (2.8%)	10 (27.8%)	3 (8.3%)	
3	HSV-1	1 (1.3%)	野生					
	HSV-2		F ₁ /F ₂	1 (100%)		1 (100%)		
4	HSV-2	2 (2.6%)	野生	2 (100%)			1 (50.0%)	1 (50.0%)
	SHBV		F ₁ /F ₂					
5	陰性	37 (48.1%)	野生	17 (46%)			17 (45.9%)	
			F ₁ /F ₂	20 (54%)	3 (8.1%)	17 (45.9%)		
	計	77		77	5	28	35	9

図6

