

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：ニホンザル血小板減少症の原因となる SRV のウイルス学的解析

研究分担者：三浦 智行（京都大学ウイルス研究所 附属感染症モデル研究センター
霊長類モデル研究領域 准教授）

研究要旨：最近、京都大学霊長類研究所にてニホンザルが血小板減少症により大量死した。これまでの次世代シーケンサーなどの研究からサルレトロウイルス 4 型(SRV-4)との関連が示唆されたが、確定的ではなかった。そこで、発症個体から分離した SRV-4 及び新たに作製した感染性遺伝子クローン由来の SRV-4 をニホンザルに実験感染したところ、血小板減少症が誘導された。また、SRV-4 がニホンザルに感染する際は、中性アミノ酸トランスポーターの一種である ASCT2 を利用することを明らかにし、この分子が多く発現している部位(肺や消化管)で SRV-4 がとくに増殖していることを確認した。本研究により、ニホンザル血小板減少症の原因ウイルスが SRV-4 であることを証明した。

研究協力者：宮沢 孝幸(京都大学ウイルス
研究所 細胞生物学研究部門信号伝達学研
究分野准教授)

免疫不全を引き起こす一方、このような急性感染がみられるのは珍しい。そこで本研究において、感染実験により、ニホンザルにおける SRV-4 感染による病態を調べることにした。

A. 研究目的：

2001 年から 2010 年の間に 2 度、京都大学霊長類研究所にてニホンザルが急性血小板減少症を呈して大量死する事例があった。次世代シーケンサーによる解析により、サルレトロウイルス 4 型(SRV-4)との関連が強く示唆された。SRV-4 はレトロウイルス科ベータレトロウイルス属であり、近縁なウイルスとして SRV-1、SRV-2 や SRV-3 が挙げられる。多くの SRV は慢性感染による

B. 研究方法：

SRV-4 のウイルス学的、遺伝学的性状を解析するにあたって、感染性分子クローンの作製を試みた。上記の目的を達成するために、発症死亡個体の血漿より SRV-4 を分離し、SRV-4 持続感染細胞を作製した。その後、ゲノム DNA を抽出し、SRV-4 特異的プライマーを用いて PCR を行い、SRV-4 全

長をクローニングした。作製したクローンの感染性を LacZ マーカーレスキューアッセイを用いて確認した。

SRV-4 はヒト細胞に感染する際に受容体として中性アミノ酸トランスポーターの一つである ASCT2 を利用することがわかっている。そこで、ニホンザルの ASCT2 が SRV-4 の機能的受容体となりうるか確認するために、ニホンザルより分離した末梢血単核球(PBMC)由来の RNA よりニホンザル ASCT2 をクローニングした。受容体の機能を確認するために、ニホンザル ASCT2 を、SRV-4 非感受性細胞であるマウス線維芽細胞(MDTF 細胞)に発現させ、SRV-4 を接種した。また、ニホンザル各組織での ASCT2 発現量をリアルタイム RT-PCR で確認した。さらに SRV-4 が実際にニホンザルに血小板減少症を引き起こすか確認するために、感染実験を行った。雌 2 頭(JM1、JM2)、雄 2 頭(JM3、JM4)のニホンザルに SRV-4 持続感染細胞由来の SRV-4 を 10^7 TCID₅₀ 以上、雄 2 頭(JM5、JM6)に SRV-4 感染性遺伝子クローン由来の SRV-4 を 10^7 TCID₅₀ 以上、腹腔及び静脈内に接種した。接種後、継続的に血液を回収し、血小板数等の一般血液性状を解析した。また、血液細胞への感染を PCR で確認し、血漿中のウイルス RNA をリアルタイム RT-PCR で確認した。血小板数が $5000/\mu\text{l}$ より減少したのちに実験殺を実施し、全身組織を回収し、PCR で SRV-4 の感染部位を特定した。また、各組織間での SRV-4 複製状況をリアルタイム RT-PCR 及

び免疫組織染色で確認した。

C. 研究成果：

ニホンザルより分離された SRV-4 は既存の SRV-4(NC_014474)と塩基配列で 99%相同であった。また、作製したクローンは感染性であることが確認できた。SRV-4 は MDTF 細胞には感染しないが、ニホンザル ASCT2 を MDTF 細胞に発現させると感染した。このことから、ニホンザル ASCT2 は SRV-4 の受容体であることが明らかとなった。また、ニホンザル ASCT2 は肺や消化管等で高く発現していた(図 1)。

実験感染を行ったところ、SRV-4 は感染後約 1 ヶ月でニホンザルに血小板減少症を誘導した(図 2)。すべての接種個体において、接種後約 1 週間で血液細胞への感染を PCR によって確認できた。また、血漿中の SRV-4 RNA 量は接種後約 1 週間から解剖時まで約 $10^4 \sim 10^7$ コピー/ml を維持し続けた。剖検時、頭部や腹部に点状出血が確認でき、死亡個体(JM3)において肝臓付近に血腫が確認できた。また、全身の臓器よりゲノム DNA を抽出し、感染部位を PCR で解析したところ、ほぼすべての臓器への感染が確認された。JM6 及び JM7 の各組織での SRV-4 の SRV-4 複製状況をリアルタイム RT-PCR 及び免疫組織化染色により検索したところ、SRV-4 は肺や消化管、脾臓、胸腺および各リンパ節で多く増殖していた(図 3、図 4)。加えて、すべての接種個体の血漿、PBMC 及び骨髄より SRV-4 の再分離

に成功した。

D. 考察：

SRV-4 は、感染末期個体において、肺や消化管などの組織で選択的に増殖するのは機能的受容体である ASCT2 が多く発現しているためだと考えられる。また、SRV-4 はリンパ球でもよく増殖することから、これらが集まるリンパ系組織でも多く検出されたと推察される。

E. 結論

本研究により、霊長類研究所で起こったニホンザル血小板減少症は SRV-4 感染によるものであることが確定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

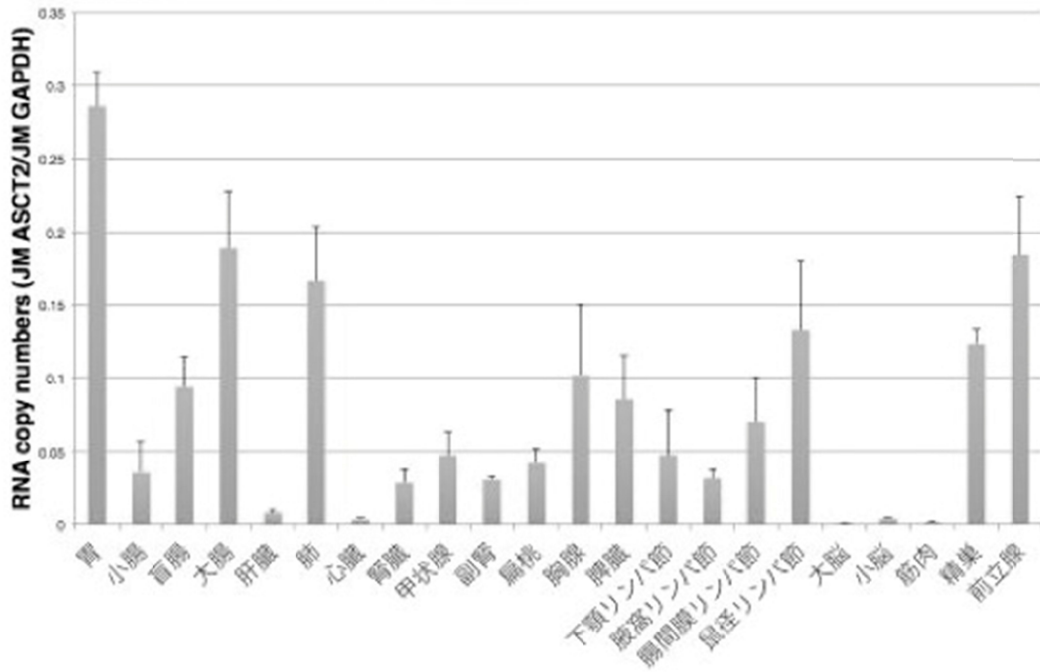


図1: 各組織でのニホンザルASCT2RNA発現量

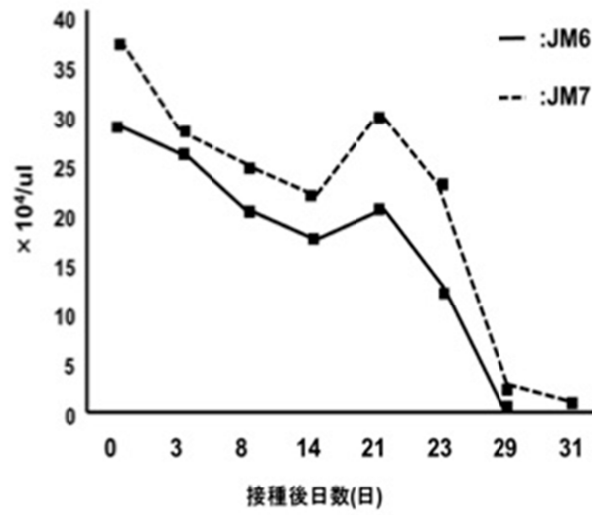


図2: 感染性分子クローン由来SRV-4接種実験におけるニホンザルの血小板数の推移

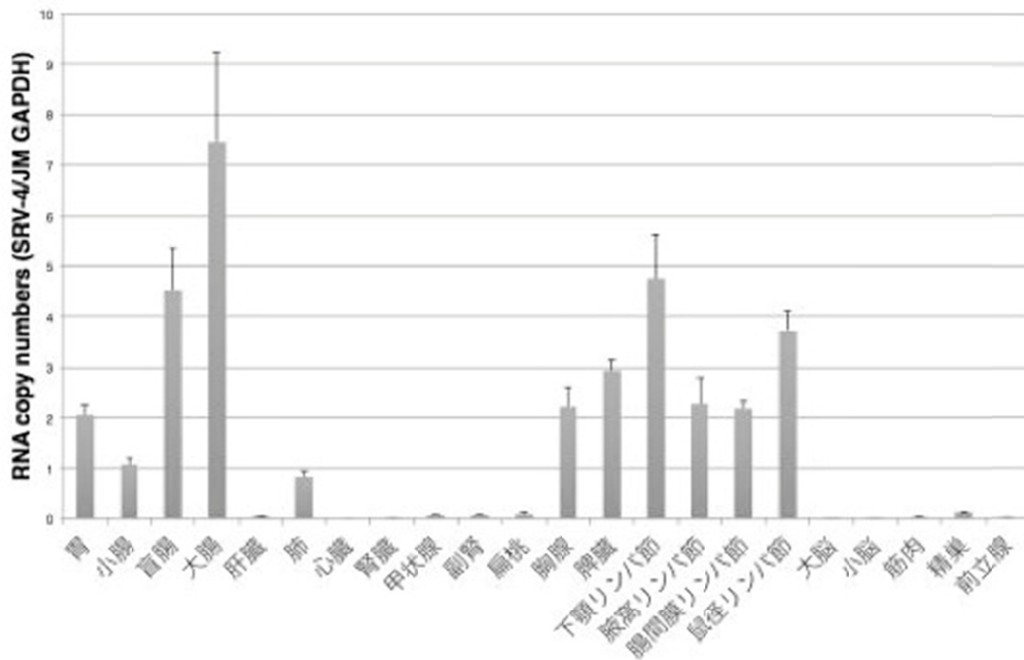


図3: 各組織でのSRV-4RNA発現量

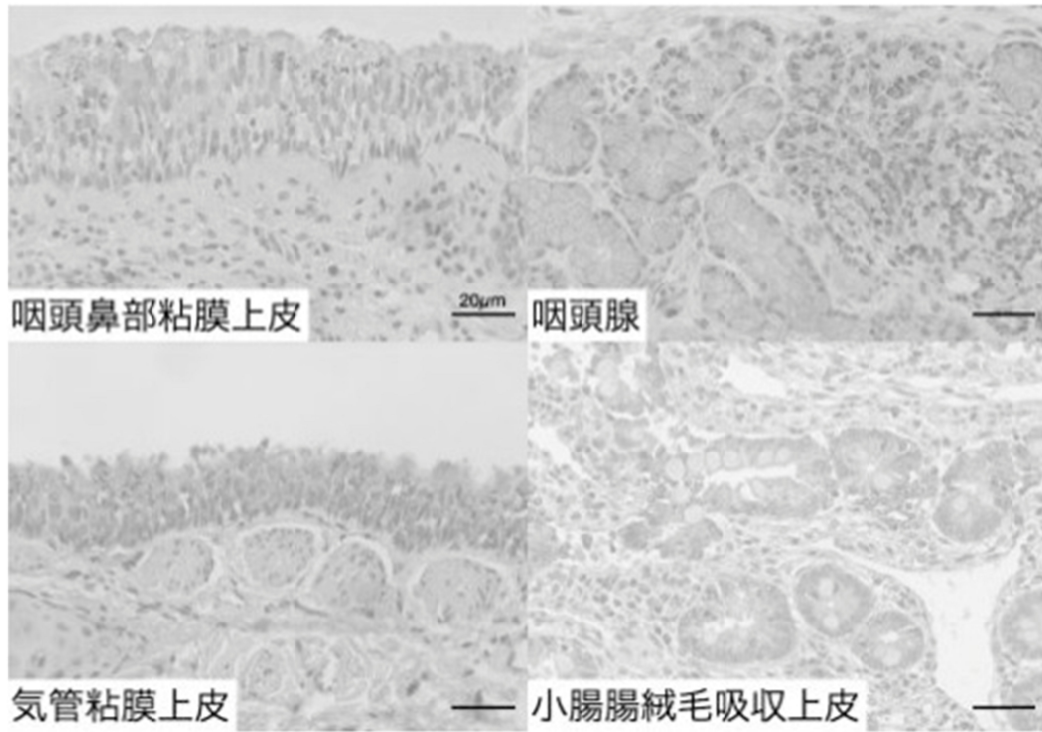


図4: 抗SRV-4カプシド抗体による組織免疫染色