

サル類疾病に関する細菌・ウィルスの遺伝子検査

「新しいサル像をめざして」(2002)

京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター 編

小笠原 麻美、景山 節

30年前に研究所でサル類の飼育が始まった頃からはばらくはニホンザル、アカゲザルなど殆どのサル類は外部より導入せざるを得なかった。特に外国より輸入されたアカゲザルには赤痢菌、結核菌などの感染が見られ、その検査、治療などに多くの人手と時間がかかった。現在導入サルを母群として自家繁殖体制が確立され、検査体制が整備されるとともに危険な病原菌の検出例は減少している。しかしながら、外部環境に起因すると思われるエルシニア症、サルモネラ症などは放飼場飼育が続く限り問題となるものである。また従来は殆ど検査体制のなかった各種ウィルスの保有状況を調べていくことも必要である。遺伝子検査の導入からまだ日が浅いが、簡単にこれまでの結果をまとめて見たい。

I. 細菌

1) エルシニア菌

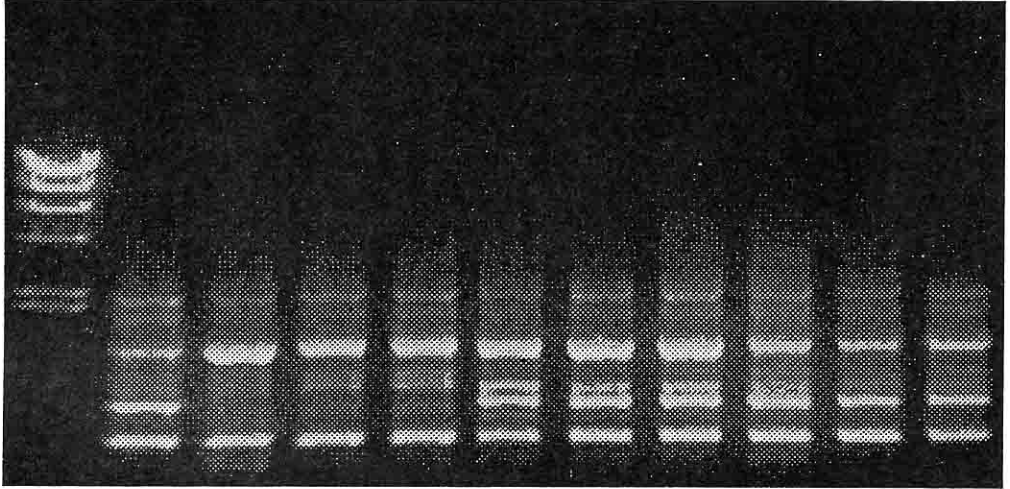
エルシニア菌の中で仮性結核菌と呼ばれる *Yersinia pseudotuberculosis* の感染によるサルの死亡が冬から春にかけてしばしば見られる。グループケージのサルの感染率が高く腸内出血、敗血症により死亡する。グループケージはいくつかの場所に分かれて作られている。感染が見られたケージは特定のものではなく、場所との強い相関関係はない。1999年の例では第2放飼場内のグループケージのマントヒヒの群れで感染が見られ1頭が死亡した。エルシニア菌は死亡した1頭を含め2頭の糞便から検出された。我々はエルシニア菌の検出と同定をPCRで行うため得られた菌株DNAを用いてPCRの基礎的条件を検討した。まずエルシニア菌の phospholipase 遺伝子特異的プライマー、および virulence plasmid 特異的プライマーを用いて nested PCR による高感度なエルシニア菌の検出法を確立した。次に死亡マントヒヒの便より単離されたエルシニア菌、および過去の感染サルから単離保存されていたエルシニア菌について、RAPD-PCR法を用いて菌株の違いを判別した(図1)。この結果、感染が起こった場所で菌株もまたそれぞれ異なっていることが明らかとなった。感染の場所と時期が同じ場合、異なるサルから単離された菌についてはDNAはRAPD-PCR法では違いが検出されず同一菌株の可能性が強かった。PAPD-PCRの結果は研究所内のグループケージで発生したエルシニア菌感染は、幾つかの異なる菌株によって起こったことを示している。

エルシニア菌はネズミ、ハトなどいくつかの野生動物が保菌していることが知られている。これらの動物では腸炎などは起こさず死亡することはない。研究所内のグループケージ周辺でもこれらの野生動物が住み着いていることから、その糞をケージ周辺にまき散らすことによりサルが接触し感染するものと推測される。このことから、エルシニア菌感染の経路を明らかにするためネズミ糞などに含まれるエルシニア菌の nested PCR による検出を試みた。排出後1-2日以内の動物糞をPBSに懸濁しLB液体培地で増菌培養した。遠心して集めた菌体よりDNAを抽出したのちPCRを行いエルシニア菌の検出を試みた。現在までにマントヒヒケージ周辺のネズミ糞241個、グループケージ周辺のスズメ糞24個、研究所本棟屋上のハト糞100個を調べた。

ネズミ糞は大きさから237個がクマネズミと4個がドブネズミのものと推測され、エルシニア菌はクマネズミ糞の4個から検出された。単離された菌のDNAはRAPD-PCR法によると1989年にアカゲザルで発症し、単離された菌株と同一のものと推定された。まだ糞の分析例が少なく結論的なことは言えないが、グループケージでのエルシニア菌感染はネズミが感染源である可能性が高い。グループケージ周辺のネズミの一部のものがエルシニア菌を保菌していることは明らかであり、さらに菌株もネズミ各個体で異なる可能性がある。今後糞の分析例を増やし、感染経路を明らかにしていくことが必要と考えている。

λ/H	Mm 1005	Mm 1303	Mff 1585	Mff 1553	Ph 82	Ph 82	Ph 83	Rr F14	Rr F56	Rr F66
	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

A



B

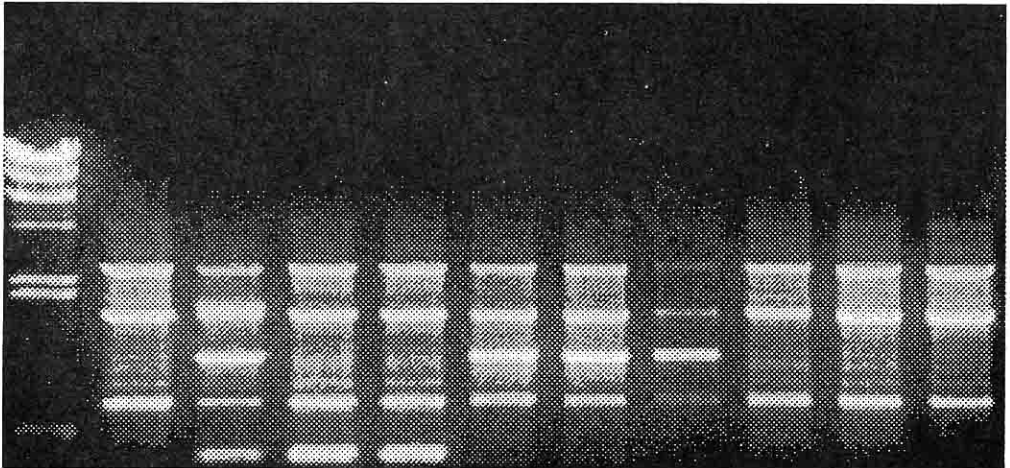


図1. RAPD-PCR法によるエルシニア菌株の比較

AP-47 (A), primer 2 (B)の2種のプライマーを用い、糞便より単離されたエルシニア菌DNAを鋳型としてPCRを行った。Mn1005は1989年のアカゲザル(育成舎8), Mn1303は1996年のアカゲザル(育成舎6), Mff1585, Mff1553は1998年のニホンザル(GC19), Ph82, Ph83は1999年のマントヒビ(第2放飼場小GC), RrF14, RrF56, RrF66は2000年のクマネズミ糞(第2放飼場廊下)より得られたものである。(+), (-)はプラスミド保有の有無を示す。RAPD-PCR分析により4つのDNA増幅パターン(○, ●, □, ■)が得られた。プライマーの塩基配列: AP-47, [5'-GCGGAAATAG-3']; primer 2, [5'-GTTTCGCTCC-3']。

2) ウェルシュ菌

ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* はヒト、サルなど動物の腸管内に生息する嫌気性細菌である。多くの動物の腸内で常在菌として存在する。エンテロトキシンを始めとする様々な毒素を産生するが多くは致死的な病気を引き起こすことはない。しかし毒素産生からいわゆる“悪玉菌”と称されるものであり、腸内細菌の中に高い割合で存在することが続けば動物の健康に悪影響を与えることが予想される。サル類での保有状況を調べるため、1999年秋に放飼場のサルを対象に行われた定期健康診断の際に糞便を採取しウェルシュ菌のPCRによる検出を試みた。プライマーを選びウェルシュ菌DNAに対する高感度なnested PCRの条件を確立した(図2)。さらに糞便の一部をGAM培養液での嫌気培養で増菌したあとDNAを抽出しPCRを行うことにより、糞便内の極めて微量の菌の検出が可能になった。検出結果を図3に示す。放飼場のニホンザルからは殆どの個体糞便よりウェルシュ菌が検出された(図3A)。しかしアカゲザルの群では約半数から検出されたに止まり、しかもnested PCRで検出が可能になった例が多かった(図3B)。これらのことはニホンザル、アカゲザルの2つの種で腸内ウェルシュ菌の保有数に差があり、ニホンザルが全体的に多くの菌を保有していると考えられた。

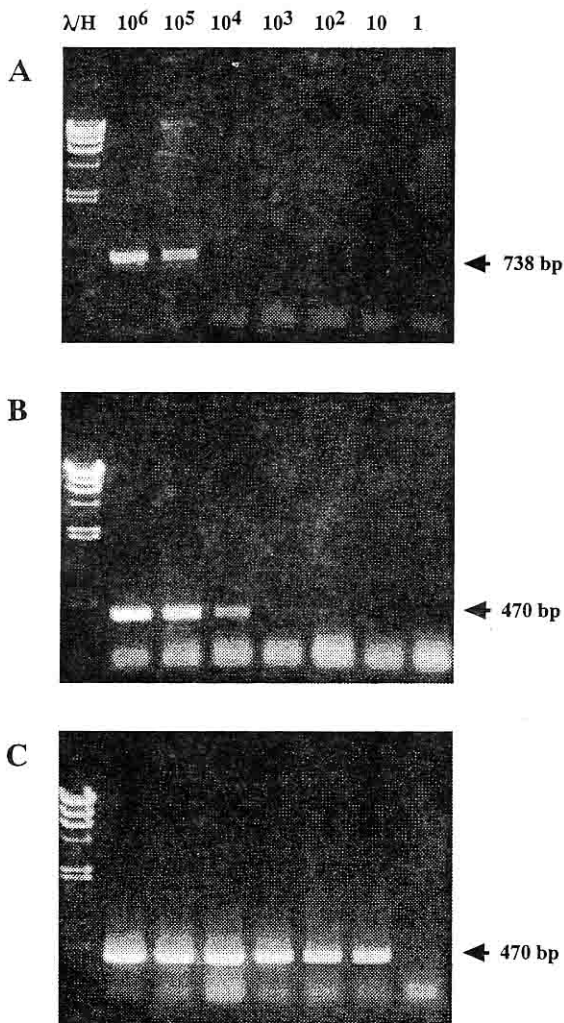


図2. 糞便中のウェルシュ菌のPCRによる検出

- A) 1st PCR用プライマーのみでの検出。
 B) Nested PCR用プライマーのみでの検出。
 C) 1st PCRのちnested PCRでの検出。

10⁶~1は菌DNAを10倍ずつ希釈していったもので、10⁶のDNA量がPCR 1反応あたり約100万個分の菌DNAに相当する。

飼育条件の違いを調べるため個別ケージのアカゲザルについても同様の検査を行ったところ殆どの個体から検出された。放飼場および個別ケージのサルは固形飼料を中心として同じ給餌条件で飼われておりアカゲザルでの糞便内のウェルシュ菌の検出割合の差は飼育環境の違いを反映しているものと考えられた。すなわちサルにとってケージに入れられるなど飼育環境の限定度が厳しくなるにつれウェルシュ菌が増加してくることが推測された。サルの受けるストレス度に比例しているものとも考えられ、ストレス指標としての有用性が示唆された。ニホンザルは放飼場のものではほぼ100%検出されており、アカゲザルとの検出率の違いは種差を反映しているものとも考えられるが、検出率がストレスの度合いと相関しているとすればニホンザルはアカゲザルに比べ飼育環境からストレスを受けやすいとも考えられる。餌の条件は全く異なるが、野生ニホンザル糞便を用いてのPCRではウェルシュ菌は全く検出されなかった。このことは飼育環境とストレスの関係をウェルシュ菌を用いて間接的に調べることができることを示唆している。

3) その他の細菌

致死率の高い病原菌として、赤痢菌 *Shigella* sp. サルモネラ菌 *Salmonella* sp. がある。これらの菌は現在の自家繁殖体制では殆ど見られなくなっているが、緊急時の対応のため、標準菌のDNAの調製とPCR検出条件を確立した。また敗血症など種々の病気から単離された細菌について菌株の保存とDNA抽出を順次進めている。

II. ウィルス

1) Bウィルス

Bウィルスはヘルペスウィルスの一種でマカク類に感染する。感染した時は抗体が作られるのでそれを調べることにより感染の有無を検査できる。この測定系は筑波霊長類センター(TPC)

が開発しており、依頼した検査結果によると霊長類研究所のニホンザル、アカゲザルなどではかなりの数のサルにBウィルスの抗体が検出され、過去に感染したかあるいは感染中であることが分かってきた。このため人類進化モデル研究センターでは放飼場のサルの群れを抗体(十)と(一)群に分離して飼育を続けており現在(一)群の個体数が増加してきている。ELISAによる抗体検査はセンターでも市販されているヒトヘルペスウィルス用キットで測定している。この検査ではTPCの結果とほぼ同じ結果を得ている。抗体検査はウィルスの間接的な検査法であるため、ウィルスDNAのPCR検出による直接的な同定が必要であることから現在基礎研究を続けている。Bウィルスは初感染後にニューロンで潜伏感染状態となる。ウィルスが血液中に出てくるのは微量でしかなく、血液より抽出したDNAを用いたPCRでは検出は極めて困難である。実際に抗体が(十)とされた数個体のサル血液でPCR検出を試みたが検出できなかった。潜伏感染状態から一部活性化したウィルスが口腔粘膜に比較的多く存在することから、この粘膜部分ぬぐい液からDNAを抽出した。ぬぐい液DNAに対してnested PCRを行ないウィルスのDNAのバンドが検出することを試みた。ウィルスDNAと推定される位置の他、いくつかの大きさのDNAのバンドが検出された。ぬぐい液から抽出したDNAには感染しているサル自身の細胞由来のものが圧倒的に多く含まれているので非特異的なDNA増幅が起こっており、PCRのみでウィルス感染を断定することは極めて困難であった。DNAの配列決定を併用するなどしてさらに確実な検出法を確立することが必要である。

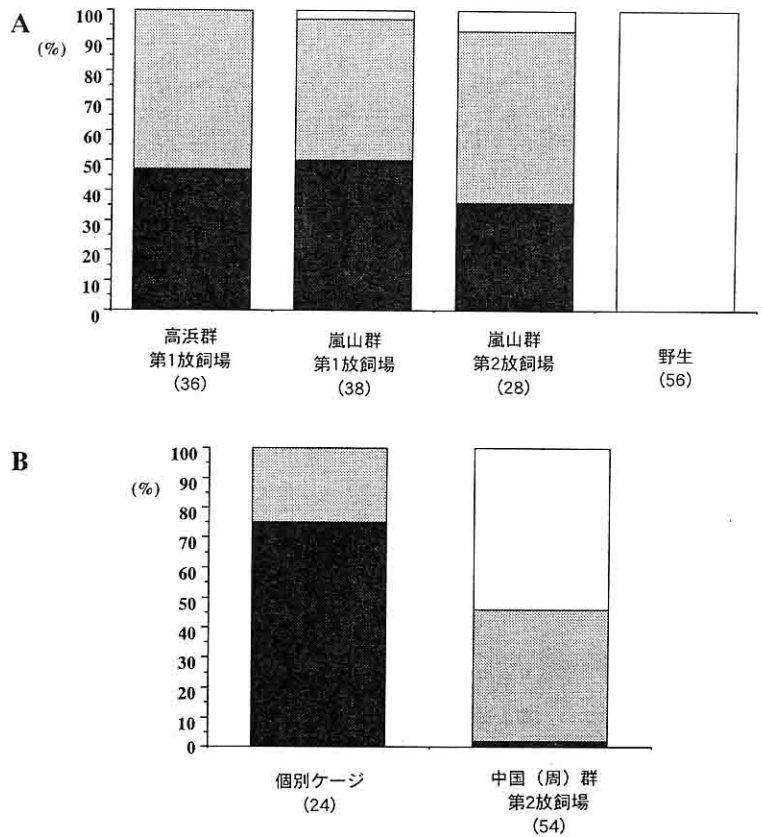


図3. サル糞便内ウェルシュ菌の検出割合

A) 放飼場および野生ニホンザル。

B) 放飼場および個別ケージのアカゲザル。

()内の数は頭数. 野生ニホンザル糞便は愛知県新城市で採取したものである。

■ 1st PCRによる検出、▨ nested PCRによる検出、□ 検出限界以下

2) その他のウイルス

肝炎ウイルスなど、その他のものについて順次進める予定である。

文 献

- Shizokawa, K., Kubota, T., Akahane, S., Hattori, H., Yagi, T., Miyake, T., Takami, K. & Kaneko, S. (1995) Detection of *Yersinia pseudotuberculosis* DNAs in paraffin embedded tissues from dead chimpanzees by using PCR. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 13:156-157.
- Schoepe, H., Potschka, H., Schlapp, T., Fiedler, J., Schau, H. & Baljer, G. (1998) Controlled multiplex PCR of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains in food samples. *Mol. Cell. Probes* 12: 359-365.
- Black, D. H. & Eberle, R. (1997) Detection and differentiation of primate α herpesviruses by PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 225-231.

(おがさわら あさみ、かげやま たかし、京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター)



揺れるロープの上からベッド用のタラの葉を採ることに夢中のペンデーサ