

厚生労働科学研究費 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の
強化に関する研究 (H23 - 新興—指定—020)

(分担)研究報告書

Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome (SFTS: 重症発熱性血小板減少症)の
実験室診断法に関する研究

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部

研究要旨： 2009 年に中国で発生した重症発熱性血小板減少症(SFTS)の原因ウイルスは、
ブニヤウイルス科フレボウイルス属の新種のウイルス(SFTS ウイルス: SFTSV)であること
が中国 CDC によって報告された。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず、
日本を含めアジア、太平洋地域に広く生息している。今年度は、組み換え SFTSV 核蛋白質
を抗原とした ELISA および間接蛍光抗体法による SFTSV 抗体の検出法を用いて、シカを
中心とした血清疫学調査を実施した。これまでに、シカ血清を用いて検査系の評価を行っ
た。

研究協力者：福士秀悦、福間藍子、吉河智
城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸 (国立感
染症研究所ウイルス第一部)、新倉綾(同、
実験動物管理室)

A 研究目的

2009年3月から7月にかけて、中国湖北
省と河南省の山岳地域に住む農民の間で、
発熱、血小板減少、胃腸症状、白血球減少
を示す急性の疾患としてSevere Fever
with Thrombocytopenia Syndrome
(SFTS: 重症熱性血小板減少症候群)が報告
された。当初、*Anaplasma*
*phagocytophilum*などの細菌感染による顆
粒球アナプラズマ症が疑われたが、細菌感

染は検出されず原因は不明であった。中国
疾病防疫センター(CDC)によって、患者末
梢血サンプルからのウイルス分離が試みら
れ、2011年、新種のSFTSウイルス(SFTSV)
の感染が原因であることが報告された。そ
の後の疫学調査でSFTSの高い致死率(感染
患者の約12%が死亡)が明らかになり、
ヒトからヒトへの感染事例も報告されたこ
とから、公衆衛生上重要なウイルス感染症
の一つとして注目されている。

中国CDCにより行われた調査では、
SFTS 流行地域の *Haemaphysalis*
longicornis(フタトゲチマダニ)の5.4%
がRT-PCR陽性であった。フタトゲチマダ
ニは中国だけではなく、日本を含めアジア、

太平洋沿岸の多くの地域に生息し、ヒツジ、ウシ、ネズミなど多くの哺乳動物を宿主としている。このため、日本を含め、広い地域でSFTSV感染サーベイランスを行う必要性がある。

そこで、今年度は、SFTSV 核蛋白に対する抗体検出法を確立し、日本の野外動物における血清疫学調査を開始し、検査法の検証を含めて検討した。また、SFTSV-GP シュードタイプ VSV を作製した。

B 研究方法

バキュロウイルス発現系による SFTSV NP 調製

SFTSV NP を発現するバキュロウイルスを昆虫細胞 Tn5 に感染後、細胞から組換え SFTSV NP を精製した。

哺乳動物細胞での SFTSV NP 発現

SFTSV NP cDNA を哺乳動物細胞発現ベクター-pKS336 にクローニングし、HeLa 細胞にトランスフェクションし、ブラストサイジンで SFTSV NP 発現細胞細胞を選択した。細胞浮遊液をスライドグラス上に塗布し乾燥、固定させ間接蛍光抗体法 (IFA) 用抗原とした。

ウサギ抗 SFTSV NP 血清

バキュロウイルス発現系で調整、精製した SFTSV NP をウサギに免疫して得られた抗 SFTSV NP 血清を血清検査法の陽性対照とした。

SFTSV-GP シュードタイプ VSV

SFTS ウイルス GP 発現プラスミドを作製し、シュードタイプ VSV を調整した。このシュードタイプの感染域を調べた。

C 結果

組み換え SFTSV NP とウサギ抗 SFTSV NP 血清との反応

バキュロウイルス発現系を用いて調整した組換え SFTSV NP を免疫して得られたウサギ抗 SFTSV NP 血清と組換え SFTSV NP との ELISA 及び IFA での反応性を調べた結果、同じフレボウイルスに属するリフトバレー熱ウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (抗 RVFV NP) や、他のウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (抗 CCHFV NP, 抗 LASV NP, 抗 JUNV NP) などは SFTSV の NP に反応せず、抗 SFTSV NP 血清のみが反応したことから特異度が高かった。

SFTSV NP 特異的 ELISA の野生動物への適用

組み換え SFTSV NP を抗原とした IgG-ELISA を野生動物に適用するため、これまで採取されたシカの血清を用いて検討した。その結果、陰性対照抗原に対する非特異反応が強くてた。二次血清として抗シカ IgG-HRPD と protein A/G-HRPD を比較した結果、前者を採用することとした。予備的に 96 血清を用いて ELISA を実施した結果、血清の 100 倍希釈での OD 値の分

布が 0 から 0.3 であった。OD 値の分布からは陽性検体はないと判断された。なお、これらの血清は北海道から九州で捕獲されたシカから採取されたものである。

SFTSV NP 特異的 IFA の野生動物への適用

SFTSV NP を HeLa 細胞で発現させ、細胞塗抹標本をアセトン固定し IFA 抗原とした。ウサギ anti-SFTSV NP は SFTSV NP 発現 HeLa 細胞に特異的に反応し、抗体価 2560 倍であった。RVFV とは交差が認められなかった。本 IFA によりシカ血清を調べた結果すべてが陰性であった(20 倍未満)。

SFTSV-GP シュードタイプ VSV

SFTSV-GP シュードタイプ VSV を調整し、感受性細胞を調べた。その結果、SFTS ウイルス感受性細胞である Vero E6, DH82 細胞に効率よく感染した。一方一部のリンパ球系細胞には感染しなかった。

D 考察

SFTS はその高い致死率と、ヒト-ヒト感染を起こす可能性があることから、公衆衛生上重要なウイルス感染症である。SFTSV を媒介するフタトゲチマダニは中国のみならず日本全国に分布し、多くの野外動物、家畜を宿主とすることから、我が国においてもマダニ類が SFTSV あるいは近縁のウイルスを保有するかどうか調査することが必要である。今年度の予備的調査では野生動物から抗体陽性動物は見出されていない。

しかし、国内で SFTS 患者が発生したこと、その遺伝子解析等から、遺伝子検出法、特にダニからの検出に必要な高感度な遺伝子検出法の開発が必要なことがわかった。国内患者が発生したことから、国内にウイルスが存在することが明らかになったが、野生動物からの抗体陽性が見出されていないことは矛盾するように思われる。これは、シカがウイルスに感染しにくいこと、NP に対する抗体応答が感染動物では高いこと、調べた動物の捕獲されたい地域にはウイルスが分布しないことなどが考えられる。また、ウイルスを用いずに迅速に中和抗体を検出するために SFTSV-GP シュードタイプ VSV を調整した結果、SFTS ウイルスと同様の細胞感染性を示した。今後、よりハイスループットな中和試験法を開発し、疑い患者や動物等からの抗体検出がより確実に行える体制を整備する予定である。

一方、本研究班の枠組みの中で日中韓で協議を重ねた結果、2012 年 11 月に中国 CDC から SFTS ウイルスが分与された。来年度は、組み換え抗原とウイルス抗原との比較も行い、より感度、精度の高い血清診断法を確立したい。

E 結論

(1) 組み換え抗原による血清診断法をシカなどに適用するための検討を行った。予備的な調査では抗体陽性動物は見いだせていない。

(2) SFTSV を用いない中和抗体測定法を開発するため SFTSV-GP シュードタイプ VSV を調整した。

(3) 中国 CDC から SFTS ウイルスが分与された。

F. 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzuki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushima S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, Saijo M, Takeda M, Morikawa S. Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. *J Virol.* 2013, 87(2): 1105-1114
- 2) Neekun Sharma, Akitoyo Hotta, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Shigeru Morikawa, Akio Yamadaa, Kiyoshi Tanabayashia . Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia using a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Vaccine Immunology*, *in press*
- 3) Satoshi Taniguchi, Yusuke Sayama, Noriyo Nagata, Tetsuro Ikegami, Mary E Miranda, Shumpei Watanabe, Itoe Iizuka, Shuetsu Fukushi, Tetsuya Mizutani, Yoshiyuki Ishii, Masayuki Saijo, Hiroomi Akashi, Yasuhiro Yoshikawa, Shigeru Kyuwa and Shigeru Morikawa. Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines. *BMC Veterinary Research*, 2012 Oct 11;8(1):189.
- 4) Shuetsu Fukushi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*, 2012 Oct 12;4(10):2097-114. (special issue: Arenaviruses).
- 5) Harutaka Katano, Seiichi Sato, Tsuyoshi Sekizuka, Akiko Kinumaki, Hitomi Fukumoto, Yuko Sato, Hideki Hasegawa, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Tetsuya Mizutani, Makoto Kuroda. Pathogenic characterization of a cervical lymph node derived from a patient with Kawasaki disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(8):814-823
- 6) Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, Saijo M, Oshitani H, Morikawa S. A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines. *BMC Vet Res.* 2012 Jun 18;8:82.

- 7) Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, Morikawa S, Freiberg AN, Ikegami T. The dominant-negative inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR increases the efficacy of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine. *J Virol*. 2012 Jul;86(14):7650-61.
- 8) Fukushi S, Nakauchi M, Mizutani T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture ELISA for the detection of Rift Valley fever virus nucleoprotein using new monoclonal antibodies. *J Virol Methods*. 2012 Mar;180(1-2):68-74.
- 9) Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, Morikawa S, Okabe N, Yanagihara R, Song JW. Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology*. 2012 Mar 15;424(2):99-105.
- 10) Kennedy JS, Gurwith M, Dekker CL, Frey SE, Edwards KM, Kenner J, Lock M, Empig C, Morikawa S, Saijo M, Yokote H, Karem K, Damon I, Perloth M, and Greenberg RN. Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults. *J Inf Dis* 2011, 204(9):1395-402
- 11) Shirato K, Maeda K, Tsuda S, Suzuki K, Watanabe S, Shimoda H, Ueda N, Iha K, Taniguchi S, Kyuwa S, Endoh D, Matsuyama S, Kurane I, Saijo M, Morikawa S, Yoshikawa Y, Akashi H, Mizutani T. Detection of bat coronaviruses from *Miniopterus fuliginosus* in Japan. *Virus Genes*. 2012 Feb;44(1):40-4.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

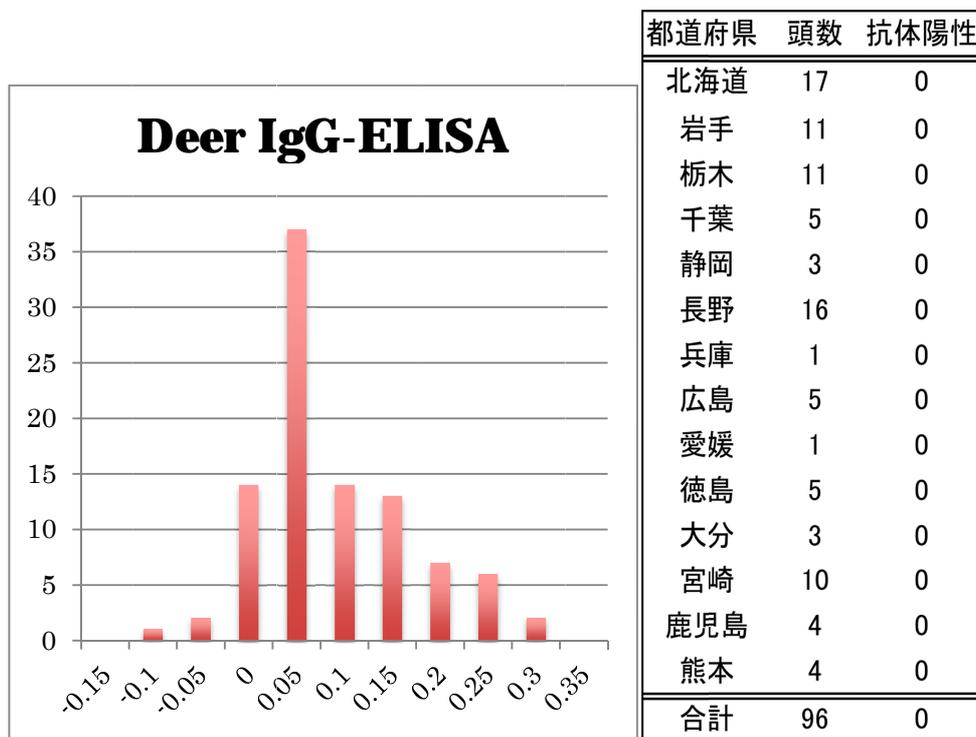


図1 . 予備的なしかの抗体調査結果