

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法と標準化に関する研究  
分担研究報告書

病原体の病理学的検出法の確立

迅速 *in situ* hybridization AT-tailing 法による新興・再興感染症ウイルスの検出

研究分担者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

研究協力者 中島典子、佐藤由子、鈴木忠樹、片野晴隆、長谷川秀樹

（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨 我々が開発した迅速 *in situ* hybridization-AT tailing 法は、オリゴヌクレオチドプローブを用いた高感度で特異性の高い *in situ* 遺伝子検出系である。これを用いて重症熱性血小板減少症候群ウイルスを実際のヒト剖検病理組織切片上で検出した。また中東呼吸器症候群コロナウイルスの *in situ* 検出系も国内ヒト感染例の発生に備えて確立した。新しいウイルス感染症を特異的に検出する病理学的方法を新たに開発しえた。

A．研究目的

生物テロ対策として病原体の病理組織内検出法を確立しておく必要がある。免疫組織化学や *in situ* 核酸検出法は組織切片上で病原体が検出できる方法であり、さらに病原体の体内分布や病変との関連を考えるうえで重要な病理学的解析法である。昨年度は我々が開発した高感度で特異性の高い新しい *in situ* 核酸検出法である *in situ* hybridization-AT tailing (ISH-AT) 法を簡便化かつ迅速化に成功した。今年度はこの迅速 ISH-AT 法を用いて、新興再興感染症ウイルスである重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV)、中東呼吸器症候群コロナウイルス (MERS - CoV) の検出法を確立することを目的とした。

B．研究方法

1)材料

a) 病理組織標本

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を使用。SFTS 感染細胞 (国立感染症研究所ウイルス第1部下島昌幸先生より分与)、SFTS 剖検組織、MERS-CoV 感染細胞標本(国立感染症研究所ウイルス第3部松山州徳先生より分与)を用いた。

b) プローブ

ISH-AT 法用のプローブの作成: SFTS ウイルスのコンセンサスシーケンス部分に、L 鎖と M 鎖に 1 ヲ所ずつ、S 鎖に 2 ヲ所、アンチセンス (AS) プローブとセンス (S) プローブを計 5 セット設計した。MERS - CoV の NP 領域と Env 領域に 1 ヲ所ずつ設計した。なお、SFTSV のゲノムはマイナスの 1 本鎖 RNA であるため、S プローブはゲノム RNA を AS プローブは mRNA を検出

する。MERS-CoV のゲノムはプラスの 1 本鎖 RNA であるため、AS プローブはゲノム RNA と mRNA を検出し、S プローブが陰性コントロールとなる。

## 2) 方法

### a) SFTSV 感染細胞における SFTSV 遺伝子の検出

Vero 細胞に SFTSV を感染後 6、24、48 時間後に細胞を iP Gell で固め、ホルマリン固定パラフィン包埋細胞標本を作成した。

非感染細胞を mock として迅速 ISH-AT 法で SFTSV 遺伝子を検出した。さらに SFTSV 感染ヒト剖検組織 FFPE 切片上で SFTSV を検出した。

### b) MERS-CoV 遺伝子の検出

MERS-CoV 感染細胞のホルマリン固定パラフィン包埋細胞標本を作成した。非感染細胞を mock として迅速 ISH-AT 法で MERS-CoV 遺伝子を検出した。

c) FFPE 組織より RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR 法で切片中の SFTSV-RNA のコピー数を定量した。

(倫理面への配慮) 検討材料は剖検組織であり、剖検時に使用の承諾が得られている。

## C . 研究結果

### ( 1 )SFTSV 検出用 ISH-AT プローブの検討

S 鎖、M 鎖、L 鎖領域に設計したプローブそれぞれ単独で ISH-AT を試行した結果、S 鎖 3'末の NP 領域に対するプローブの感度・特異性がすぐれていた。このプローブ Sense ( S ) プローブは 5'-CTTGGCC CAGATGGGGTYCCCAGCAGAGCTGC

TGAGGTTG-(AT)<sub>10</sub>、AS プローブは 5'-CAACCTCAGCAGCTCTGCTGGG RACCCCATCTGGGCCAAG-(AT)<sub>10</sub> である。T<sub>m</sub> 値は 89.15 、GC%は 62.5%であった。

### ( 2 )SFTSV 感染 Vero 細胞における SFTSV のゲノム RNA および mRNA の検出

感染 6 時間後及び 24 時間後では SFTSV-mRNA 陽性細胞がより多く検出され、48 時間後では SFTSV-RNA 陽性細胞がより多く検出された。感染後 24 時間にウイルス複製が最大になると考えられた。

### ( 3 )SFTSV 剖検組織における SFTSV ゲノムの検出

SFTSV 剖検組織(論文発表 2 の症例)において、腫脹したリンパ節の病理組織は、広範囲の壊死に組織球と芽球様細胞の浸潤を伴っていた。なお好中球の浸潤はみとめられなかった。SFTSV-RNA 陽性細胞は主に、腫脹したリンパ節あるいはその近傍のリンパ節で検出された。SFTSV-RNA は SFTSV NP 抗原陽性細胞と同様、芽球様細胞の細胞質に検出された。切片中の SFTSV コピー数は 10<sup>5</sup>/細胞以上であった。陽性シグナルは Sense プローブをもちいたときの方が多く、解析した切片ではゲノム RNA の方が mRNA のコピー数より多いことが考えられた。

### ( 4 ) MERS-CoV 感染 Vero 細胞

ISH-AT 法で型特異的な AT プローブを NP 及び Env 領域に 1 種類ずつ作製した。AS プローブ : 5'-GAGCTCGGGGCGATTAT GTGAAGAGGAACTGAATCGCGCG-(AT)<sub>10</sub>-3' と 5'-GCGCAGGGGTAGAATTGGCATT AAGAGGTACACCCTGCC-(AT)<sub>10</sub>-3'

ISH-AT 施行時には、2 種類のプローブの mixture とした。感染 Vero 細胞中のウイルス RNA を特異的に ISH-AT 法で検出した。AS プローブとのハイブリダイゼーションで細胞質に陽性シグナルが見られた。陰性コントロールの S プローブでは陽性シグナルが全くみられず、特異的なプローブが作成できたと考えられた。

#### D. 考察

感染病原体を用いたバイオテロの場合、患者あるいは死亡者から採取した検体中から病原体遺伝子を検出・同定する最も強力なツールは次世代シーケンス法であろう。実際、日本においてこれまで診断されていなかった SFTS は次世代シーケンス法により SFTSV の遺伝子が確認された。その後塩基配列が、決定しこれまで中国から報告されていた配列とあわせて、ISH-AT 用プローブを作成した。SFTSV に対しては準備してあった抗体がホルマリン固定パラフィン包埋組織切片の免疫組織化学に使用できたため ISH-AT の結果と合わせて検討できた。ISH-AT の利点としては mRNA を特異的に検出できることである。一方 MERS コロナウイルス感染症では MERS-CoV に対する抗体が FFPE 切片の免疫組織化学に使用可能か現在検討中であるが、日本で患者が発生した場合はすでに ISH-AT 法のプローブは完成している。今後レファレンス標本が海外から入手された場合は ISH-AT 法でウイルスの感染部位を同定したいと考えている。

#### E. 結論

病原体不明の疾患の病原ウイルスが次世代シーケンス法により決定し、日本では重

症熱性血小板減少症候群ウイルスと命名された。中国から報告のあったウイルスであり、すでに抗原検出用の抗体は準備されていたが、速やかに ISH-AT 用のプローブを作成し、ウイルスゲノムを病理組織に検出することができた。主にリンパ芽球様細胞に検出された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Asano S, Mori K, Yamazaki K, Sata T, Kurata A, Sato Y, Odajima H, Akaike Y, Wakasa H, Kojima M. Necrotizing lymphadenitis (NEL) is a systemic disease characterized by blastic transformation of CD8+ cells and apoptosis of CD4+ cells. *Virchows Arch* 464, 95-103, 2014
2. Takahashi T, Maeda K, Suzuki T, Ishido A, Shigeoka T, Tominaga T, Kamei T, Honda M, Ninomiya D, Sakai T, Senba T, Kaneyuki S, Sakaguchi S, Satoh A, Hosokawa T, Kawabe Y, Kurihara S, Izumikawa K, Kohno S, Azuma T, Suemori K, Yasukawa M, Mizutani T, Omatsu T, Katayama Y, Miyahara M, Ijuin M, Doi K, Okuda M, Umeki K, Saito T, Fukushima K, Nakajima K, Yoshikawa T, Tani H, Fukushi S, Fukuma A, Ogata M, Shimojima M, Nakajima N, Nagata N, Katano H, Fukumoto H, Sato Y, Hasegawa H, Yamagishi T, Oishi K, Kurane I, Morikawa S, Saijo M: The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. **J Infect Dis.** 2013.

3. Kuribayashi S, Sakoda Y, Kawasaki T, Tanaka T, Yamamoto N, Okamatsu M, Isoda N, Tsuda Y, Sunden Y, Umemura T, Nakajima N, Hasegawa H, Kida Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens. PLoS One. 9,8(7), 2013.
  4. Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H, San LT, Kawachi S, Liem NT, Suzuki K, Sata T. Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam Mod Pathol.26, 357-369, 2013
2. 学会発表
- 1) 国際発表
    - 1) Nakajima N, Sato Y, Katano H, Kawachi K, Suzuki K, Liem NT, Sata T, Hasegawa H Pathological study of ARDS complicated by influenza virus infection Option for the Control of Influenza VIII September 4-10, 2013. CapeTown
  - 2) 国内発表
    1. 中島典子 病理標本からわかること-新しい *in situ* RNA 検出法:第 124 回小児血液腫瘍懇話会(東京)2013 年 5 月
    2. 中島典子、佐藤由子、片野晴隆、長谷川秀樹 新しい迅速 *in situ* ゲノム検出法の感染病理への応用 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
    3. 片野晴隆、佐藤由子、中島典子、福本瞳、鈴木忠樹、黒田誠、長谷川秀樹 病理検体からの不明病原体検出法の最先端 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
    4. 長谷川秀樹、中島典子 重症インフルエンザ病態解明へのアプローチ剖検例からの検討 第 102 回日本病理学会総会(札幌)2013 年 6 月
    5. 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、細見卓司、塚越博之、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代 新生仔マウスを用いた Saffold virus(SAFV)患者由来株の病原性の比較解析 第 156 回日本獣医学会学術集会(岐阜)2013 年 9 月
    6. 中島典子、片野晴隆 シンポジウム 3 病原体の新しい診断法: 定量的 PCR によるウイルスの網羅的検出法と病理検体への応用 第 18 回日本神経感染症学会(宮崎)2013 年 10 月
    7. 長谷川秀樹、亀井敏昭、高橋徹、鈴木忠樹、片野晴隆、中島典子、福士秀悦、下島昌幸、前田健、水谷哲也、森川茂、西條政幸 日本国内で発生した重症熱性血小板減少症候群の 1 剖検例 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月
    8. 西條政幸、高橋徹、前田健、水谷哲也、大松勉、吉河智城、谷英樹、福士秀悦、下島昌幸、福間藍子、緒方もも子、鈴木忠樹、中島典子、片野晴隆、永田典代、長谷川秀樹、山岸拓也、倉根一郎、森川茂 後方視的に重症熱性血小板減少症候群と診断された 11 名のウイルス学的・臨床的・疫学的研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)2013 年 11 月

- |  |                 |
|--|-----------------|
| 9. 小谷治、Naeem Asif、鈴木忠樹、岩田奈織子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹、田口文広、清水博之、永田典代<br>新生仔マウスを用いた Saffold virus 小脳継代株の作出とその病原性の解析<br>第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013 年 11 月            | 2. 実用新案登録<br>なし |
| 10. 高橋徹、前田健、亀井敏昭、水谷哲也、下島昌幸、福土秀悦、谷英樹、吉河智城、森川茂、長谷川秀樹、中島典子、鈴木忠樹、永田典代、片野晴隆、山岸拓也、大石和徳、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の日本における初症例<br>第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013 年 11 月 | 3. その他<br>なし    |
| 11. 潮田和佳、小谷治、岩田奈織子、鈴木忠樹、中島典子、長谷川秀樹、清水博之、永田典代 コクサッキーウイルス B2 実験室株脳内接種後のマウスにおける水頭症の発症機序<br>第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013 年 11 月                                 |                 |

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得  
なし