

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）
総合分担研究報告書

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）

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2011年に中国 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ことから、中国 CDC から情報を入手して、組換えウイルス蛋白による血清診断系の開発、組換えウイルス蛋白に対する抗体作成、患者診断用の RT-PCR 等を準備した。予備調査で組換え抗原により動物の血清疫学調査を行ったが、2012年時点では抗体陽性動物は検出できなかった。また、ダニからのウイルス遺伝子も検出できなかった。2013年1月には本ウイルスに感染した国内初の SFTS 患者が報告された。患者の実験室診断には、1) 患者診断用 RT-PCR が有効であった、2) ウイルス分離同定や、免疫組織学的染色に、組換えウイルス蛋白に対する抗体が極めて有用であった。一方、組換えウイルス蛋白による血清診断系とダニからのウイルス遺伝子検出法は、感度が充分でないことがわかった。2012年11月に中国 CDC の Prof. Mifang Liang, Prof. Li Dexin に分与された SFTS ウイルス HB29 株を用いて作製した抗体検出法は感度が高く、その後の動物の血清疫学調査等に活用された。マダニからのウイルス遺伝子検出は、MGB プローブによるリアルタイム RT-PCR 法を確立し、反応が陽性対照コンタミによるのか否かを同時に確認できる系へと改良された。

研究協力者：宇田晶彦、木村昌伸、加来義浩、野口章、今岡浩一（同、獣医科学部）、福士秀悦、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸（同、ウイルス第1部）、新倉綾（同、実験動物管理室）

A. 研究目的

重症発熱性血小板減少症(SFTS)ウイルスは2011年に中国で同定された新規ブニヤウイルスである。このウイルスに感染したヒトの症状は、発熱、消化器症状、血小

板減少、白血球数減少等を特徴とし、年齢が高いほど重症例と死亡率が高くなる傾向がある。本研究の目的は、患者の実験室診断を整備して患者発生に備えること、動物の血清疫学を行うための抗体検出法を開発すること、マダニから効率よく SFTS ウイルス遺伝子を検出するリアルタイム RT-PCR を開発することである。

まず、2011年にはウイルスの入手が困難であったため、初年度は、遺伝子配列情報

を中国 CDC より入手し、N 蛋白質(NP) cDNA を化学合成し、各種組換え系によりウイルス蛋白を発現し、血清診断系を作製することを目的とした。また、組換え蛋白をウサギに免疫して作製した特異抗血清を作製した。

二年度には、作製した血清診断系を用いてシカなどの血清疫学を予備的に開始した。また、2012 年 11 月に中国 CDC の Prof. Mifang Liang, Prof. Li Dexin に SFTS ウイルス HB29 株が分与された。これを受けて、ウイルス感染細胞を用いた血清診断系を作製した。血清診断 ELISA を組換え抗原と SFTS ウイルス抗原で比較した結果、組換え蛋白免疫ウサギ血清の抗体検出感度は 30 倍以上後者が優れていることが明らかとなった。このため、SFTS ウイルス感染細胞を用いた ELISA 抗原、感染細胞を用いた間接蛍光抗体法用抗原を調整した。また、2013 年 1 月に国内の SFTS 患者が確認されたが、この実験室診断には、初年度に整備していた RT-PCR が有効であった。現在では RT-PCR 法による患者の診断検査体制が全国に整備されている。また、病理組織学的解析には、初年度に作製した組換え蛋白をウサギに免疫して作製した特異抗血清が極めて有効であった。その後の死亡患者の免疫組織学的解析にも、本抗体が用いられている。

中国においてフタトゲチマダニ (5.4%) およびオウシマダニ (0.6%) から SFTS ウイルス遺伝子が検出され、SFTS はマダニ媒介性の感染症であると考えられている。初年度にはヒトの実験室診断に用いている RT-PCR 法でマダニの予備的調査を行ったが、陽性マダニは検出できなかった。最終

年度の 2013 年 4 月の段階において、国内の SFTS ウイルスを保持するダニ種、陽性率、個体あたりのウイルス量、季節性変動性、陽性マダニの国内分布等は全く不明であった。そこで、三年度は、マダニにおける SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法の確立と陽性対照由来のコントラミをモニターできる方法を至適化した。

B. 研究方法

SFTSV 特異的プライマーセット(患者診断用)

セット 1 :

SFTSV NP-1F: 5'-ATC GTC AAG GCA
TCA GGG AA-3'

SFTSV NP-1Rd: 5'-TTC AGC CAC TTC
ACC CGR A-3'

セット 2 :

SFTSV NP-2F: 5'-CAT CAT TGT CTT
TGC CCT GA-3'

SFTSV NP-2R: 5'-AGA AGA CAG AGT
TCA CAG CA-3'

バキュロウイルス発現系による SFTSV NP 調製

SFTSV NP cDNA (Invitrogen 社で合成) をバキュロウイルストランスファーベクター-pAcYM1 にクローニングし、バキュロウイルス DNA とともに昆虫細胞 Tn5 にトランスフェクション後、昆虫細胞抽出液から組換え SFTSV NP を調製した。

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、プラスト

サイジンで SFTSV NP 発現細胞細胞を選択した。NP 遺伝子非導入細胞と混合後、スライドガラス上に塗布し乾燥、固定させ IFA 抗原とした。

ウサギ抗 SFTSV NP 血清の調製

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、ウサギ抗 SFTSV NP 血清を調製した。

陽性コントロールプラスミドの構築

SFTS ウイルス YG1 株由来部分 S セグメント cDNA のリアルタイム RT-PCR 標的領域に両端に制限酵素サイト (BamHI、EcoRV) を有する 36bp の挿入配列を導入したプラスミドを作製した。

リアルタイム RT-PCR

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を使用した。このリアルタイム RT-PCR には SFTSV-S2-237 プライマー : GCA ACA AGA TCG TCA AGG CAT CAG G、SFTSV-S2-400a プライマー : TGC TGC AGC ACA TGT CCA AGT GG、SFTSV-S2-317MGB プローブ (FAM 標識) : CTG GTT GAG AGG GCA を用いた。陽性対照由来 DNA のコンタミを判別するためには、PosiContTaqman プローブ (HEX 標識) : CAT CCT GCA CCA CCAACT GCT TAG CC を用いた。

リアルタイム RT-PCR の増幅産物の特異性

確認試験

制限酵素処理を行わない場合にはリアルタイム RT-PCR 反応液を電気泳動しウイルス由来増幅産物 (164bp) および陽性対照プラスミド由来増幅産物 (201bp) を識別した。制限酵素処理を行う場合には PCR 産物を制限酵素 (BamHI または EcoRV) 処理後、4%アガロースゲルでウイルス由来増幅産物 (164bp) およびプラスミド由来増幅産物 ((157+44 bp または 126+75bp) を確認した。

C. 研究結果

SFTSV NP の発現とウサギ抗 SFTSV NP 血清の作製

2011年時点には、中国側の規制で SFTSV 遺伝子は入手出来なかったため、SFTSV NP cDNA を化学合成し、バキュロウイルス発現系を用いて組換え SFTSV NP を調製した。これをウサギに免疫し、ウサギ抗 SFTSV NP 血清を作製した (図 1)。

SFTSV NP ELISA

バキュロウイルス発現系で調製した SFTSV NP を抗原として IgG-ELISA を行ったところ、SFTSV NP はウサギ抗 SFTSV NP 血清 (anti-SFTSV NP) に反応した (希釈倍率 6,400 倍以上)。しかし、SFTS ウイルス感染細胞から調整した抗原による ELISA では、20 万倍以上の希釈でも反応したことから、後者の感度が 30 倍以上高いことがわかった。この原因の一つは、精製組換え抗原が失活しやすいためであることがわかった。一方、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 (anti-RVFLV NP) およ

び、他のウイルスの NP に対するウサギ抗血清 (anti-CCHFV NP, anti-LASV NP, anti-JUNV NP) は SFTSV の NP に反応しなかった (図 2)。

IFA による SFTSV NP 検出

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、RVFV 感染細胞には反応しなかった。一方、ウサギ anti-RVFV NP は SFTSV NP 発現 HeLa 細胞に反応しなかった (図 3)。

陽性コントロールプラスミドの構築

リアルタイム RT-PCR のコピー数を算出するための陽性コントロールプラスミドの構築を試みた。最初に構築したプラスミドはリアルタイム RT-PCR で増幅するウイルスの塩基配列 164bp を含む 520bp をプラスミドベクターに挿入した (図 4 左)。しかし、このプラスミドを陽性コントロールが増幅して得られた塩基配列と、ダニに含まれる SFTS ウイルス由来の増幅産物の塩基配列は一致するためコンタミネーションを識別することが困難である。そこで、新規の陽性コントロールプラスミドではリアルタイム RT-PCR で増幅する領域に、2 種類の制限酵素サイト (BamHI : GGATCC、EcoRV : GATATC) と TaqMan プローブ標的配列 (ggctaagcagttggtggtgcaggatg) を含む配列を挿入した。この結果、リアルタイム RT-PCR による増幅がウイルス由来の PCR 産物か、プラスミドのコンタミか否かが迅速に判定可能となった (図 4 右)。

電気泳動によるコンタミネーションの判定法の確認

最初に作出したプラスミド (旧陽性コントロールプラスミド) とウイルス由来の PCR 増幅産物のサイズは両者ともに 164 bp であり、電気泳動によるコンタミ識別は不可能であった (図 5)。一方で新プラスミド由来の PCR 増幅産物のサイズ (201 bp) はウイルス由来の増幅産物 (164 bp) よりも 37bp 大きく、4% アガロースゲルによる電気泳動でコンタミ識別が可能となった。更に新プラスミドの増幅産物は BamHI (157 および 44 bp) または EcoRV (126 および 75 bp) 制限酵素によって消化されるが、ウイルス由来の増幅産物には両制限酵素サイトは存在しない為、制限酵素処理を行っても 164 bp のままであるのでコンタミネーションを容易に判定可能となった (図 5)。

2 色法リアルタイム RT-PCR によるコンタミネーションの判定法の確認

新しい陽性コントロールプラスミドを用いたリアルタイム RT-PCR 法では、反応液にウイルス配列と相補する FAM 標識 MGB プローブ (SFTSV-S2-317MGB) と陽性コントロールプラスミドと特異的に相補する HEX 標識 TaqMan プローブ (PosiContTaqman) を同時に添加すると、ウイルス由来増幅産物では FAM 標識 MGB プローブしか増幅されないが、プラスミド由来増幅産物では FAM 標識 MGB プローブおよび HEX 標識 PosiContTaqman probe の増幅が認められ、コンタミネーションをリアルタイム RT-PCR 反応中にモニタリング可能となった (図 6)。

リアルタイム RT-PCR 法に用いる増幅試薬の選択

SFTS ウイルスを検出するためのリアルタイム RT-PCR 試薬は TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara) および RNA-direct Realtime PCR Master Mix (Toyobo) を各々の推奨反応条件に改編を加え施行した (図 7)。両試薬の性能比較検討を行うにあたり同一のプライマー (SFTS-S2-237s、SFTS-S2-400a) と 10^3 から 10^1 コピー/反応に段階希釈した陽性コントロール用プラスミドを用意し解析を行った (図 8)。この結果、TakaraOne Step PrimeScript RT-PCR Kit では確実に 10 コピーに希釈した陽性コントロールプラスミドを検出することができたが、40 サイクル以降で鋳型を添加していない陰性コントロールでも偽増幅が観察された。一方で、RNA-direct Realtime PCR Master Mix 場合には陰性コントロールの偽増幅は観察されないが、10 コピーに希釈した陽性コントロールプラスミドで 1/3 の割合で増幅が見られなかった。これらの結果から RNA-direct Realtime PCR Master Mix はやや増幅効率は劣るが非特異増幅が見られないことから、ダニサンプルの SFTS ウイルス検出に適していると推測された。

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、公衆衛生上重要な新興ウイルス感染症として注目されている。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。また、2011 年の時点で SFTS が輸入感染症として持ち込まれる可能性を考慮して、SFTSV 抗体検出等の実験室診断法を整備することとした。そこで、ウイルスの NP cDNA を化学合成して組換え蛋白を作製し、ELISA あるいは IFA による SFTS ウイルス抗体検出系を作製した。しかし、2012 年 11 月に中国 CDC より SFTS ウイルスの分与を受け、ウイルス感染細胞由来抗原による ELISA を開発し、組換え抗原による ELISA と比較した結果、後者が 30 倍以上高感度であることがわかった。精製組換え抗原が失活しやすいことが原因の一つであると考えられた。その後の動物の血清疫学や回復患者の抗体検出に後者が用いられている。

疑い患者の血中 SFTS ウイルスの検出には、初年度に開発した RT-PCR が有効であることがわかり、地方衛生研究所での疑い患者の実験室診断にも採用されている。一方、マダニからのウイルス遺伝子検出には、この RT-PCR では感度が充分でないことが、予備実験及び中国 CDC の Prof. Mifang Liang、Prof. Li-Dexin らとの協議でわかった。そこで、より高感度なリアルタイム RT-PCR を開発した。当初開発した方法で、フタトゲチマダニやタカサゴキラマダニ等複数種のマダニから SFTS ウイルスを検出できたが、一部の機器では非特異反応が出ること、陽性対照のコンタミを識別できない等の問題があった。そこで、最終年には、これらの問題を解消できる改良を加えた。そこで陽性対照には、2 種類の制限酵

素サイトと TaqMan プローブサイトを含む 37bp の DNA 断片を挿入したプラスミドを作製した。この陽性コントロールプラスミドを用いれば陽性対照のコンタミネーションによる反応の有無を迅速かつ簡単に判定できた。今後本研究で確立したプロトコルを用いて日本国内の SFTS 陽性ダニの種、ウイルス陽性率、個体あたりのウイルス量、ウイルス陽性ダニの季節性変動性、国内分布等を調査に行いたい。また、複数の機器で非特異反応が出ないことも確認していることから、地方衛研や大学等でマダニの分子疫学調査を行う際にも本リアルタイム RT-PCR 法は、有用である。

E. 結論

SFTS 疑い患者の実験室診断、血清診断が確立された。また、多くの動物種の血清疫学調査を行う抗体検出系も開発された。国内のマダニから SFTS ウイルス検出用リアルタイム RT-PCR 法を確立、改善した。今後の国内での種々の調査が可能となった。

F. 健康危険情報

SFTS は、2013 年に国内で患者が確認され、その後さかのぼり調査で 12 名、2013 年 3 月からの患者が 40 名確認されている。国内では複数種のマダニから SFTS ウイルス遺伝子が検出されている。

1. 論文発表

- 1) 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 Nov 14. in press

- 2) 下島昌幸、福士秀悦、谷 英樹、吉河智城、森川 茂、西條政幸：日本における重症熱性血小板減少症候群、ウイルス 63: 7-12, 2013.
- 3) 森川 茂：重症熱性血小板減少症候群、獣医疫学雑誌 17(2)142-143, 2014.

2. 学会発表

- 1) 前田健、高橋徹、奥田優、水谷哲也、山岸拓也、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの分離・同定 第 156 回日本獣医学会学術集会 2013.9.20~22 岐阜大学
- 2) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、加来義浩、朴ウンシル、鈴木道雄、井上智、今岡浩一、柳井徳磨、下島昌幸、西條政幸、前田健 動物の SFTS ウイルス抗体調査 第 156 回日本獣医学会学術

- 集会 2013.9.20～22 岐阜大学
- 3) Nguyen Dung、下田宙、濱崎千菜美、寺田農、野口慧多、鎌田流星、高野愛、森川茂、前田健 飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスと交差する抗体の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 4) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからのSFTSウイルスと交差する抗体の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 5) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、安藤秀二、川端寛樹、高野愛、前田健、藤田博己、澤邊京子、西條政幸、森川茂 マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.20～22 岐阜大学
 - 6) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、宇田晶彦、谷口怜、福間藍子、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の確定診断に使用されているコンベンショナルPCRの評価、及びリアルタイム定量PCRとの比較 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 7) 福間藍子、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、谷口怜、下島昌幸、森川茂、前田健、西條政幸 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清学的診断法の開発 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 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 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 9) 森川茂、木村昌伸、福士秀悦、福間藍子、加来義浩、朴ウンシル、谷英樹、吉河智城、井上智、今岡浩一、下島昌幸、西條政幸、前田健 SFTSウイルス抗体陽性動物の調査 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 10) 谷口怜、福士秀悦、Joseph Masangkay、渡辺俊平、大松勉、下田宙、前田健、福間藍子、吉河智城、谷英樹、下島昌幸、西條政幸、明石博臣、吉川泰弘、久和茂、森川茂 フィリピンのコウモリからの重症熱性血小板減少症候群ウイルスに反応する抗体の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 11) 宇田晶彦、福士秀悦、加来義浩、吉河智城、下島昌幸、新倉綾、井上智、安藤秀二、前田健、西條政幸、森川茂 マダニからのSFTSウイルス遺伝子の検出 第61回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
 - 12) 谷英樹、下島昌幸、福間藍子、谷口怜、吉河智城、福士秀悦、森川茂、西條政

幸 重症熱性血小板減少症候群ウイルス GP を外套したシュードタイプ VSV の作製 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場

- 13) 高橋徹、亀井敏昭、前田健、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 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場
- 14) 前田健、濱崎千菜美、久保翔太郎、遠藤泰之、寺田農、鍬田流星、高野愛、下田宙、森川茂 国内飼育犬から重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスに対する抗体の検出 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2014.11.10～12 神戸国際会議場

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. 組換えバキュロウイルスによる SFTSV-NP の発現・精製とウサギ免疫血清の作製

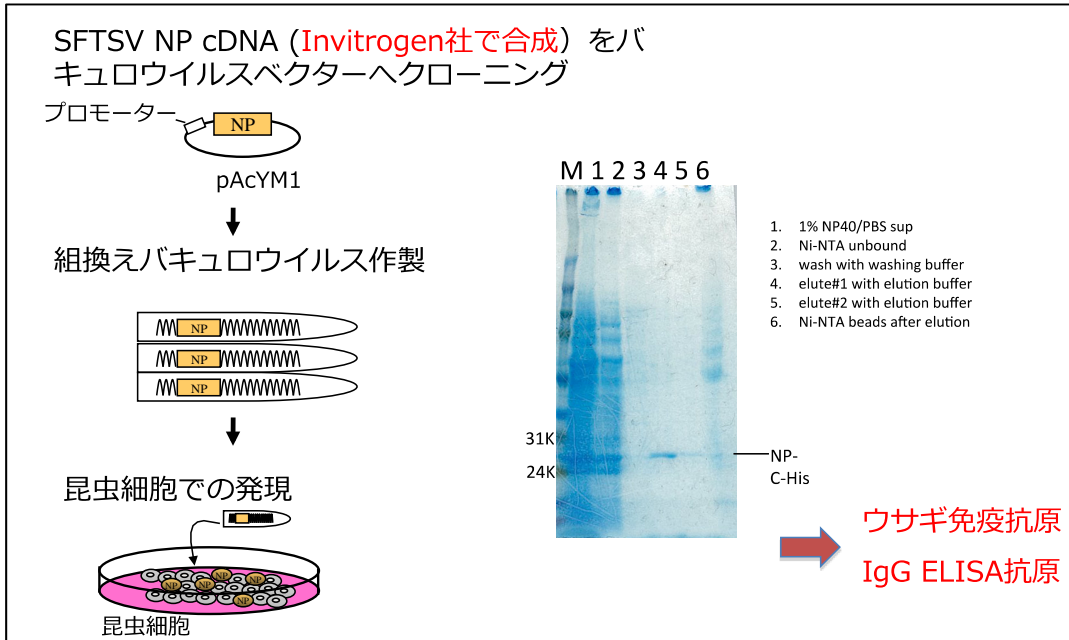


図2-1. 組換え抗原による ELISA

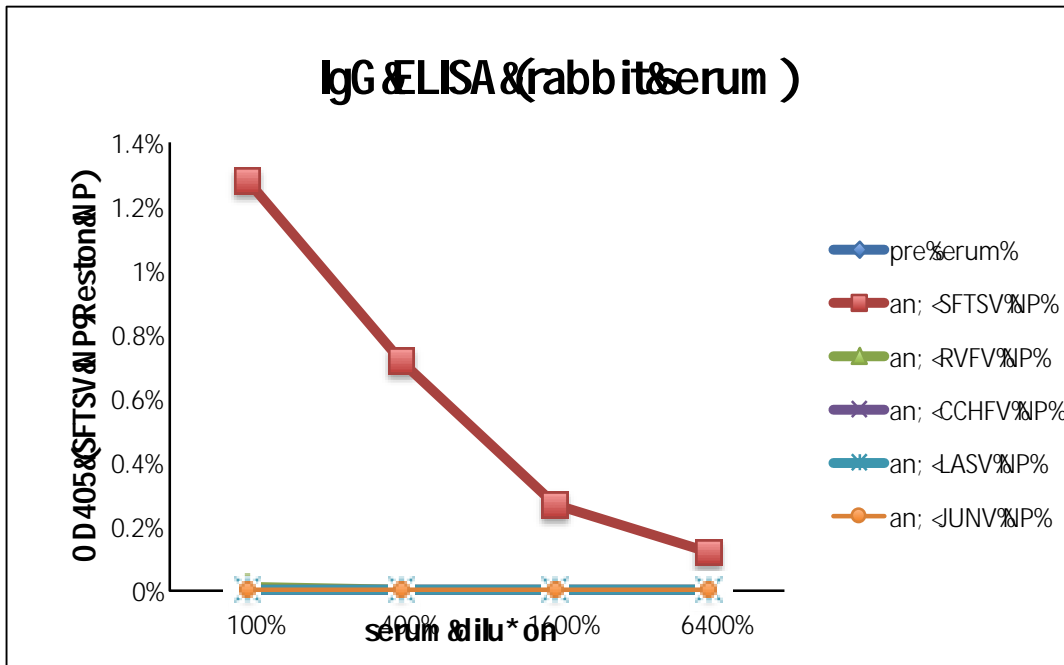


図2-2. SFTS ウイルス感染細胞由来抗原による ELISA

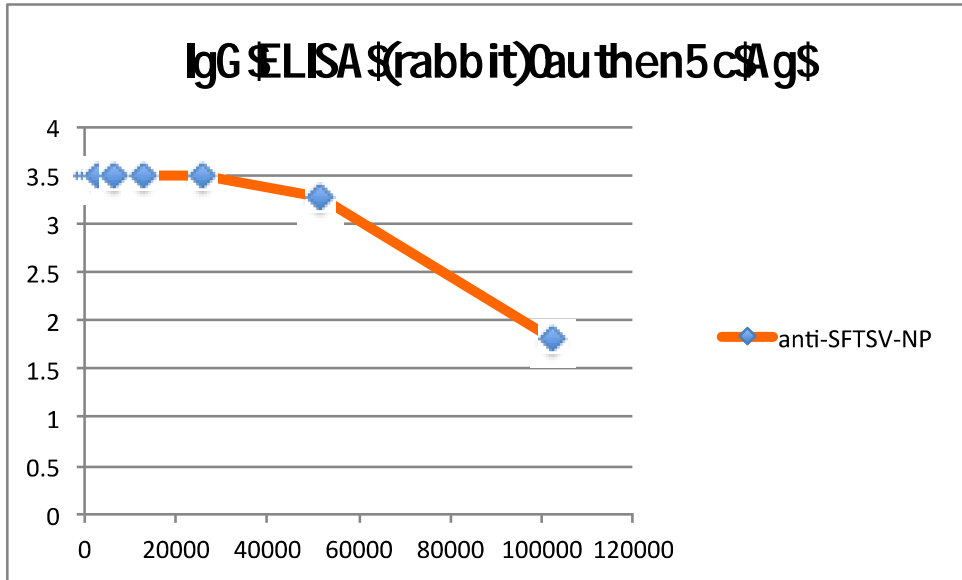


図2-1の組換え抗原による ELISA と比較して30倍以上感度が高い。

図3. SFTSV-NP 発現 HeLa 細胞を抗原とする間接蛍光抗体法

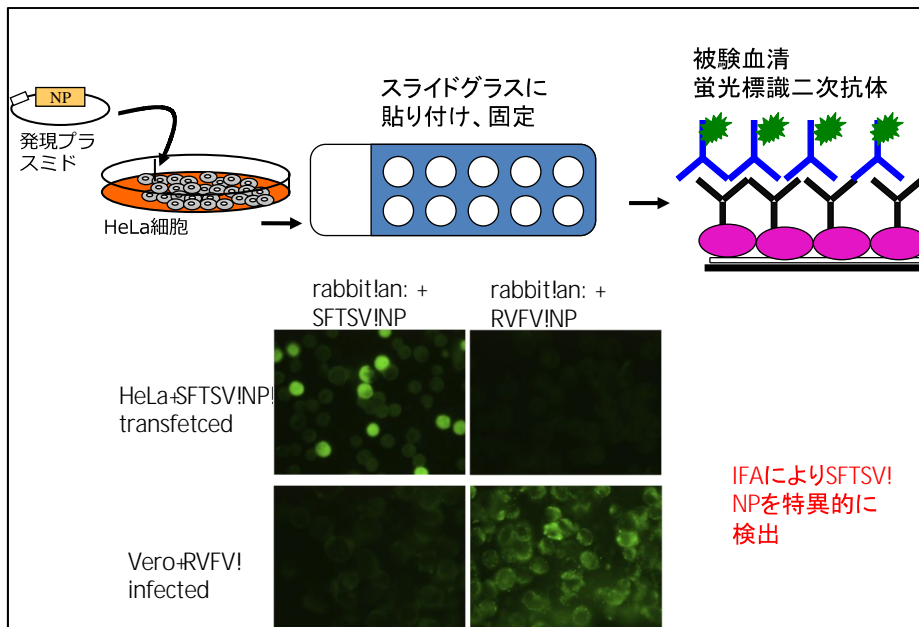


図4. 陽性コントロールプラスミド構築の概要

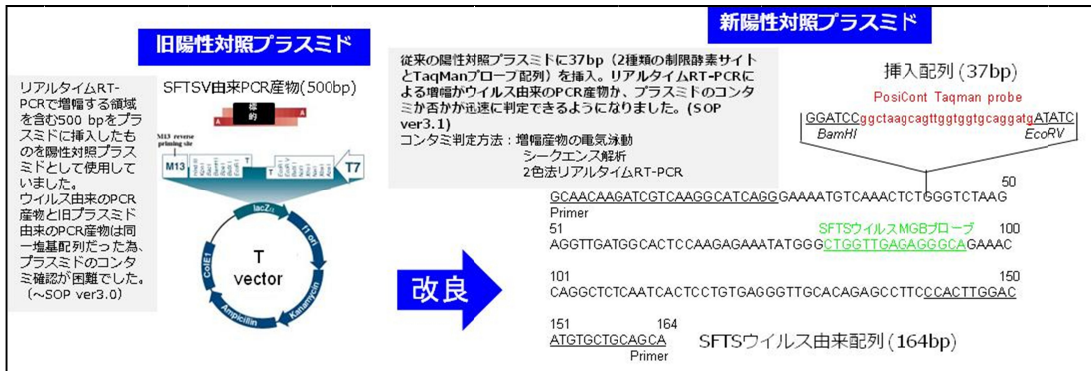


図5. 電気泳動を用いたコンタミネーションの判定

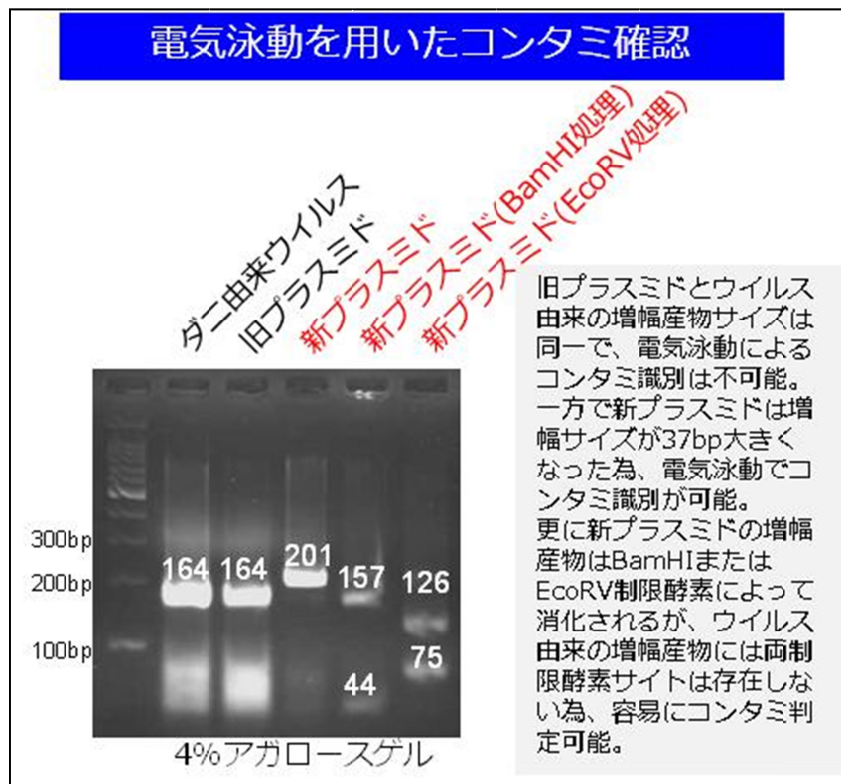


図6. 2色リアルタイム RT-PCR 法を用いたコンタミネーションの判定

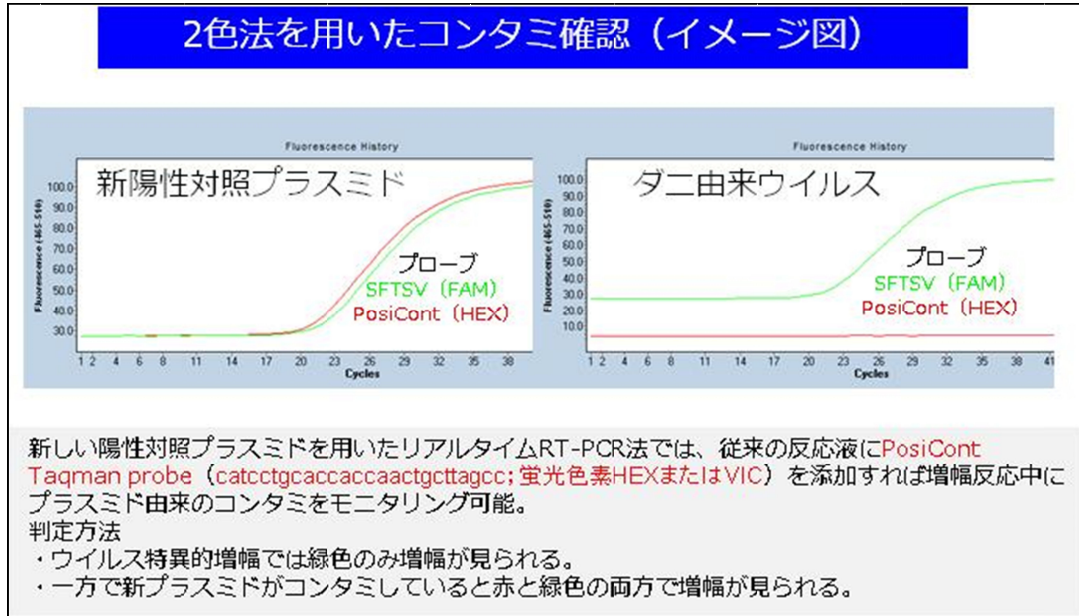


図7. ダニからの SFTS ウイルス検出に用いたリアルタイム RT-PCR 用試薬と温度条件

Takara One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)				TOYOBO RNA-direct Realtime PCR Master Mix		
RT						
			Denature	90°C	30sec	
RT	42°C	5min	RT	61°C	20min	
Denature	95°C	10sec	Denature	95°C	30sec	
PCR						
50 cycles				50 cycles		
Denature	95°C	5sec	Denature	95°C	5sec	
Annealing & elongation	60°C	35sec	Annealing & elongation	64°C	60sec	

図8. リアルタイム RT-PCR 反応試薬の比較

