

201318063A

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

SFTS の制圧に向けた総合的研究

(H25－新興－指定－009)

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26年3月

研究代表者 倉田 毅

(国立感染症研究所、国際医療福祉大学塩谷病院)

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

SFTS の制圧に向けた総合的研究

(H25－新興－指定－009)

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成26年 3 月

研究代表者 倉 田 毅

(国立感染症研究所、国際医療福祉大学塩谷病院)

平成 25 年度厚生労働科学研究補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

SFTS の制圧に向けた総合的研究

平成 25 年度 研究組織

研究代表者

倉田 毅 国立感染症研究所・名誉所員(国際医療福祉大学塩谷病院・教授)

研究分担者

氏名	所属
西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
森川茂	国立感染症研究所獣医科学部・部長
有川二郎	北海道大学大学院医学研究科・教授
森田公一	長崎大学熱帯医学研究所・教授
調恒明	山口県環境保健センター・所長
加藤康幸	国立国際医療研究センター・医長

研究協力者(順不同)

氏名	所属
下島昌幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
谷英樹	国立感染症研究所ウイルス第一部
福士秀悦	国立感染症研究所ウイルス第一部
吉河智城	国立感染症研究所ウイルス第一部
福間藍子	国立感染症研究所ウイルス第一部
緒方もも子	国立感染症研究所ウイルス第一部
高橋徹	山口県立総合医療センター血液内科
東大地	愛媛大学医学部附属病院第一内科
坂口翔太	宮崎県立日南病院内科
泉川公一	長崎大学医歯薬学総合研究科
馬原文彦	馬原医院
長谷川秀樹	国立感染症研究所感染病理部
鈴木忠樹	国立感染症研究所感染病理部
片野晴隆	国立感染症研究所感染病理部
佐多徹太郎	富山衛生研究所
西園晃	大分大医学部
山田健太郎	大分大医学部
網康至	国立感染症研究所動物管理室
永田典代	国立感染症研究所感染病理部
大石和徳	国立感染症研究所疫学センター
山岸拓也	国立感染症研究所疫学センター
中島一敏	国立感染症研究所疫学センター
澤邊京子	国立感染症研究所昆虫医科学
安藤秀二	国立感染症研究所ウイルス第一部
川端寛樹	国立感染症研究所細菌第二部
新倉綾	国立感染症研究所動物管理室
藤田修	国立感染症研究所獣医科学部
高田伸弘	福井大学医学部
藤田博己	馬原アカリ研究所
岸本寿男	岡山県環境保健センター
木田浩司	岡山県環境保健センター
今岡浩一	国立感染症研究所獣医科学部
宇田晶彦	国立感染症研究所獣医科学部

加来義浩	国立感染症研究所獣医科学部
木村昌伸	国立感染症研究所獣医科学部
藤田修	国立感染症研究所獣医科学部
野口章	国立感染症研究所獣医科学部
新井智	国立感染症研究所疫学センター
前田健	山口大学共同獣医学部
高野愛	山口大学共同獣医学部
苅和宏明	北海道大学獣医学部
吉松組子	北海道大学医学部
澤洋文	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター
水谷哲也	東京農工大学農学部
吾郷昌信	長崎県環境保健研究センター
安田二郎	長崎大学熱帯医学研究所
堀尾政博	長崎大学熱帯医学研究所ミュージアム
早坂大輔	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野
四宮博人	愛媛県衛生研究所
菅美樹	愛媛県衛生研究所
福盛順子	鹿児島県環境保健センター
御供田睦代	鹿児島県環境保健センター
柳井徳麿	岐阜大学獣医学部
戸田昌一	山口県環境保健センター
岡本玲子	山口県環境保健センター
村田祥子	山口県環境保健センター
國吉香織	山口県環境保健センター
富尾淳	東京大学医学部附属病院災害医療マネジメント部
忽那賢志	独)国立国際医療研究センター国際感染症センター
福井康雄	高知医療センター感染症科

目次

I. 総括研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究…………… 1
倉田毅

II. 分担研究報告書

1. 重症熱性血小板減少症候群の疫学的特徴の解明と診断および治療法の開発…………… 11
西條政幸

2. 日本の自然界における SFTS ウイルスの存在様式の解明…………… 29
森川茂

3. SFTS ウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明研究…………… 41
有川二郎

4. SFTS 流行地における感染リスクの解明と感染予防のあり方に関する研究…………… 55
森田公一

5. SFTS の調査研究における国内ネットワークのあり方に関する研究…………… 61
調恒明

6. SFTS の臨床対応とガイドライン…………… 67
加藤康幸

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 75

I. 総括研究報告書

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)

総括研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究

(H25-新興-指定-009)

研究代表者	倉田毅	国立感染症研究所(国際医療福祉大学塩谷病院)
研究分担者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部
研究分担者	森川茂	国立感染症研究所獣医科学部
研究分担者	有川二郎	北海道大学大学院医学研究科
研究分担者	森田公一	長崎大学熱帯医学研究所
研究分担者	調恒明	山口県環境保健センター
研究分担者	加藤康幸	独)国立国際医療研究センター

研究要旨:2011年に中国で流行している致死率の高い、ブニヤウイルス科フラビウイルス属に分離される新規ウイルスによる全身感染症, severe fever with thrombocytopenia syndrome(SFTS, 重症熱性血小板減少症候群)が報告された。その報告によるとマダニが媒介する感染症で、発熱、消化管症状を発症し、末梢血液検査で白血球減少と血小板減少が認められることが多い。2013年1月に日本でもSFTS患者発生が確認された。日本におけるSFTS対策目的に以下の研究がなされた。

1) SFTSの診断・疫学・予防・治療法の開発, 2) 日本の自然界におけるSFTSウイルスの存在様式の解明, 3) SFTS流行地における感染リスクの解明と感染予防のあり方に関する研究, 4) SFTSウイルスの感染機構・増殖機構・病原性の解明, 5) SFTSの調査研究における国内ネットワークのあり方に関する研究, 6) SFTSの臨床対応とガイドライン、等である。後方視的にSFTSの流行について調査したところ、2005年から2012年までにSFTSにより死亡または重症な経過をとって回復していた患者11名が確認された。また、2013年には西日本を中心に40名のSFTS患者が報告された。動物におけるSFTS抗体保有状況を調べ、また、高感度SFTSウイルス(SFTSV)ゲノム検出システムを開発してマダニにおけるSFTSV遺伝子の検出等の調査により、SFTSVは日本全国に広く分布している可能性が示唆された。SFTSに関する調査研究が開始されたばかりであり、今後も日本におけるSFTSの流行状況、ヒトのSFTSV感染経路・感染リスク、診断・治療・予防法の開発、基礎的研究、予防啓発に関する研究、診療の手引き、等の研究がなされる必要がある。

A. 研究目的

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は 2011 年に報告されたダニ媒介性の新興ブニヤウイルス(SFTS ウイルス, SFTSV)による新興ウイルス感染症である。致死率が比較的高い。重篤な新興ウイルス感染症である SFTS が国内に存在することが明らかにされた。日本において生活している限り SFTSV に感染する危険性から逃れることはできない。そこで、日本における SFTS の疫学, SFTSV への感染リスクを明らかにすることは、重要でかつ緊急を要する課題である。早急な SFTS 対策の整備・構築が求められる。日本国内での SFTS の診断体制を整備し、正確に SFTS をウイルス学的に診断することにより、疫学・病態・感染リスクを明らかにする。日本で分離された SFTSV に関するデータに基づいて、より高感度な遺伝子検出法, SFTSV 抗原・抗体検出のための診断システムを開発する。国内の SFTS の疫学や臨床的特徴・発症病理を明らかにする。診断, 疫学調査に必須となる超高感度 SFTSV 検出系を開発する。治療や予防法の評価に必要な感染動物モデルを開発する。それは SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性機構を明らかにするための基盤整備に重要である。診断・治療(抗ウイルス薬)・予防法(ワクチン開発を含む)の開発基盤を整備する。

SFTSV は動物由来感染症・ダニ媒介性感染症であることから、日本における SFTSV の自然界における存在様式を明らかにしてヒトへの感染リスクを明らかにしなければならない。そのためには、宿主となるマダニの種類、保有状況、地域性と季節性等を調査研究する必要がある。哺乳動物やマダニと SFTSV の存在様式における関連を科学的に解明する。さらに宿主マダニの忌避や殺ダニ効果のある薬剤に関する研究も行う。

地方自治体や地域住民の協力を得ながら、SFTS 患者発生地域における SFTSV 感染リスクを評価し、感染予防を実践するための基盤も整備する。

臨床面では、患者の臨床対策として院内感染予防対策, 診断・治療ガイドライン, 患者搬送ガイドラインを作成する。

SFTS は中国, 韓国, そして、日本に存在することが確認されている。日本において SFTS 対策を講じることができれば、それは他の感染症の対策や日本以外の国々における SFTS 対策に貢献することに繋がる。SFTS 流行地域での安全・安心につながる対策を有効に行うための科学的知見を得ることが本研究の目的である。

B. 研究方法

1) 重症熱性血小板減少症候群の疫学的特徴の解明と診断および治療法の開発

日本における SFTS の疫学的特徴の解明と実験室診断法の整備に取り組んだ。診断法の開発においては RT-PCR 法, 定量的リアルタイム RT-PCR 法を, 抗体検出法として感染性 SFTSV を抗原とした間接蛍光抗体法, ELISA 法, 中和抗体測定法を整備した。さらに組換え SFTSV-核蛋白質(SFTSV-rN)を抗原とした抗体検出法を開発し、診断における有用性を評価した。ウイルス学的検査システムを開発した上で、後方視的に SFTS に関する疫学的・臨床的調査を実施した。日本の SFTS 患者から分離された SFTSV の塩基配列を決定し、中国株のそれらと比較し、分子疫学的解析を実施した。また、急性期の SFTS 患者のウイルスゲノム量と予後との関連を解析した。さらに、亡くなられた SFTS 患者の組織標本を用いて感染病理学的解析を

行った。

2) 日本の自然界における SFTSV の存在様式の解明

SFTSV ゲノムを高感度に、かつ、特異的に検出する方法として、MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR を開発対象として選択した。日本の SFTSV 数株の塩基配列情報が得られた段階で、MGB プローブを用いた TaqMan-リアルタイム RT-PCR を 10 通りデザインし、1) 遺伝子増幅効率、2) ダニ由来 RNA に対する非特異的増幅の有無、3) ダニ由来 RNA による増幅効率への影響を解析した。各地で捕獲されたマダニのダニ種を同定した。マダニから RNA を抽出し、その 1/10 を用いて、リアルタイム RT-PCR で SFTSV 遺伝子の検出を試みた。蛍光抗体法および ELISA 法を用いて各種動物からの SFTSV 特異的抗体の検出法を開発した。抗原調整には SFTSV 中国株である HB29 株を用いた。

3) SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

SFTSV (中国株 HB29) の GP をまとった VSV シュードタイプ (SFTSVpv) を作製した。シュードタイプウイルスを用いて各種哺乳動物細胞株への感染性を比較した。また、SFTSVpv および SFTSV の pH 依存的な細胞侵入機構を解析した。さらに、これらのウイルスを用いて SFTSV 感染患者血清中の SFTSVpv に対する中和活性価を検討した。C 型レクチ発現細胞での SFTSVpv の感染性および SFTSV の増殖についても検討した。

病理学的解析においては、パラフィン包埋切片を脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として抗

SFTSV NP ポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。また、パラフィン切片から RNA を抽出し、SFTSV N gene を特異的に検出するプローブ、プライマーをデザインし、それらを利用して SFTSV の遺伝子断片を定量的に増幅させた。

SW13 細胞 (ヒト副腎皮質腺癌由来)、293T 細胞 (ヒト胎児腎由来)、Huh-7 細胞 (ヒト肝癌由来) における、リバビリン (100mM)、インターフェロン- α (1×10^3 unit/ml)、S1P 阻害剤 (30mM)、またはそれぞれの組み合わせ SFTSV (YG1 株) に対する増殖抑制効果を評価した。

SFTSV 感染が肝細胞に与える病原性について、SFTSV をヒト肝細胞癌由来 Huh-7 細胞に感染させ、経時的に培養上清および細胞を回収し、その上清中の SFTSV 感染価を測定し、また、感染させた細胞における各種蛋白質の発現についてウェスタンブロット法により確認して解析した。

SFTSV ゲノム遺伝子を定量的に、しかも、高感度に検出するための real-time RT-PCR 法を確立し、北海道等の地域で採取されたマダニ中の SFTSV ゲノム検出を試みた。また、乳のみマウスへの SFTSV の脳内接種により SFTSV 増殖、症状の有無等を解析した。

組換え SFTSV エンベロープ蛋白質のうち、保存的な領域 2ヶ所、アジア型に固有の領域 1カ所を選択し、大腸菌ベクターを用いて発現させるための遺伝子をクローニングした。また、その抗原性を調べるとともに、それを抗原として単クローン抗体の作製を試みる。

4) SFTSV 流行地における感染リスクの解明と感染予防のあり方に関する研究

SFTSV-rN を、大腸菌発現ベクターを用いて発現させ、それを抗原としてヒト、イノシシ、

イヌ, シカにおける SFTSV に対する IgG および IgM 抗体を検出する ELISA 法を開発した。

長崎県在中のダニ媒介感染症に罹患するリスクのある集団および、これらの職業ではない都市生活者からなるボランティアをコントロールとして血清疫学調査を実施した。また県内で発生した 5 名の患者については血清を Vero 細胞に接種しウイルス分離を実施した。分離されたウイルスは遺伝子塩基配列を解析した。

長崎県で捕獲されたイノシシの血清 276 検体, および, 2013 年に長崎県福祉保健部が採取したイヌ血清 114 検体を上記組み換え抗原を用いた ELISA 法, およびウイルス中和法により解析した。

長崎県各地でマダニを採集し, それらの検体から Vero E6 細胞に接種しウイルス分離を試み, また, そこから RNA を抽出し, SFTSV L セグメントゲノムのポリメラーゼ蛋白領域を増幅するように設計した Real-time RT-PCR 反応により遺伝子検出を試みた。

5) SFTS の調査研究における国内ネットワークのあり方に関する研究

国立感染症研究所で分離された SFTSV を鋳型として conventional PCR 法により増幅し, マルチナ(島津株式会社)をもちいて電気泳動を行いバンドが検出される最低濃度を求めた。SFTSV の GP 遺伝子, NP 遺伝子を同時に検出する multiplex PCR 法と conventional PCR 法の検出感度を評価した。

6) SFTS 診療の手引きの作成に関する研究

SFTS 患者の診療に役立つ SFTS 診療マニュアルを作成した。平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金「我が国における一類感染症の患者発生時に備えた診断・治療・予防等の臨床的対応及び積極的疫学調査に関する

研究(H23-新興一般-006)」において作成した「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)診療の手引き」を基に内容の充実, 改訂することを図った。

C. 研究結果

1. 重症熱性血小板減少症候群の疫学的特徴の解明と診断および治療法の開発

後方視的研究を通じて 2012 年以前に SFTS 患者が初めて SFTS と診断された患者を含めて 11 名いたことを見出した。臨床症状や検査数値, 年齢, 居住地, 季節性には特徴が認められ, 高致死率(11 人中 6 人が死亡)であった。2013 年以降の患者も含め分離された SFTSV 遺伝子の塩基配列を決定し, 中国株のそれらと比較したところ, SFTSV 日本株は中国株とは独立して位置し, 更に日本株内でも遺伝子型が複数あることが明らかにされた。日本株の塩基配列に基づく定量 RT-PCR 法を確立し, 血中ウイルス量と予後に関連があることを見出した。抗体検出法として ELISA 法, 中和抗体法, 間接蛍光抗体法を開発し, それらの診断および血清疫学研究における有用性が確認された。SFTS の回復者の血清が高い(中和)抗体価を示すことが証明された。SFTS 患者の病理学的解析がなされ, SFTS の病態解明に重要な所見が得られた。

2. 日本の自然界における SFTSV の存在様式の解明

九州から北海道の 26 自治体において, 植生マダニとシカ付着マダニ(18 種約 5,000 匹)を調査したところ, タカサゴキララマダニ, フタトゲチマダニ, キチマダニ, オオトゲチマダニ, ヒゲナガチマダニ等から, SFTSV 遺伝子が検出されたが, 保有率は 5-20%程度とマダ

この種類により違いがあった。一方、シカについては、調査した 27 自治体のうち 17 自治体で抗体陽性シカが確認され、SFTS 患者発生自治体では陽性率が高い傾向が見られた。イヌ(主に猟犬)は、調査した 19 自治体のうち 10 自治体で抗体陽性動物が確認され、イノシシは、調査した 15 自治体のうち 7 自治体で抗体陽性動物が確認された。また、ノウサギ(2004-2007 年に収集)は、調査した 4 自治体のうち 2 自治体で抗体陽性動物が確認された。北海道では、358 頭のエゾシカ、71 頭のイヌ、431 頭の齧歯類の全てが抗体陰性であった。大分県では、568 頭の飼育犬と 40 頭の放浪犬の抗体陽性率は、それぞれ 0.53、2.5% であった。近畿では多くの野生動物に抗体が検出された。

3. SFTSV の感染機構・増殖機構・病原性の解明研究

SFTSV の GP は、小胞体もしくはゴルジ装置内、および、その周辺に局在した。また、比較的多くの細胞株に感受性を示したが、リンパ球系細胞にはほとんど感染性を示さなかった。SFTS 回復患者血清によって SFTSV_{pv} および SFTSV の感染は阻害された。C 型レクチン発現細胞では、DC-SIGN、DC-SIGNR、LSECtin を発現する細胞全てにおいて、SFTSV_{pv} の感受性および SFTSV の増殖がコントロールの細胞に比べて百倍以上増強した。

SFTS 患者の病理学的解析により、以下の事項が明らかにされた。右腋窩リンパ節は腫大し、肝臓には脂肪変性が見られた。抗 SFTSV NP 抗体を用いた免疫組織化学では、右腋窩リンパ節と右頸部リンパ節に細胞質が明瞭に染色される芽球様の抗原陽性細胞が多数見られた。骨髄、脾臓、肝臓、副腎に

はリンパ節と同様の抗原陽性細胞がわずかに見られたが、それぞれの臓器実質細胞の感染は明らかではなかった。

リバビリン、インターフェロン- α ともに強い抗ウイルス効果を示した。S1P 阻害剤も全ての細胞において感染性ウイルス産生を 15-30%程度に減少させた。全ての細胞において、どの 2 剤併用もウイルス産生を劇的に減少させた。

SFTSV は Huh-7 細胞に効率的に感染し、その培養上清中に、細胞変性効果を起こすことなく非常に多くの (Vero E6 細胞での測定で 10^7 FFU/ml 以上) 感染性ウイルス粒子を産生した。

北海道各地(273 検体)、和歌山(13 検体)、山形(19 検体)から採集した 305 検体を用いて、上述した real-time RT-PCR を用いて検索したが、これらの検体からは SFTSV ゲノムは検出されなかった。SFTSV を脳内接種した乳のみマウスの各臓器の SFTSV RNA の検出を試み、脳において SFTSV RNA は強く検出された。また、脳以外の肺、肝、脾、腎からも脳よりは弱いシグナルが検出された。

目的とした SFTSV-GP の部分ペプチドの遺伝子が RT-PCR で得られた。これらの増幅断片をプラスミド pGEM-T にクローニングし塩基配列を決定した。現在この断片の大腸菌ベクターでの発現を試みている。SFTSV-GP に対する単クローン抗体の作製を試みている。

4. SFTS 流行地における感染リスクの解明と感染予防のあり方に関する研究

抗体検出系の安価な診断用抗原と血清診断系を開発し、それを利用して、患者発生地域におけるヒトの血清疫学調査、3) 動物の血清疫学調査、4) ダニ調査、5) リスクコミュニケーションに資する地域住民の意識調査を開

始した。SFTSV の Nタンパク質を大腸菌で発現させた安価で大量生産に適する診断用抗原を開発し、また、LAMP 法を用いた迅速遺伝子検出系を完成させた。また、患者周辺のハイリスクグループの調査では不顕性感染者は 1 例も発見されなかった。患者急性期血清からは 5 例すべてウイルスが分離され、その遺伝子解析から県内においてウイルスは地域に土着し変化を続けていることが示唆された。動物の調査では野生のイノシシや患者発生地域で飼育されているイヌに抗体陽性 (ELISA 抗体, 中和抗体価ともに陽性) が確認された。またダニの調査では今のところ、ウイルスは分離されなかった。

5. SFTS の調査研究における国内ネットワークのあり方に関する研究

SFTSV ゲノム検出において高感度のリアルタイム PCR 法が開発され、地方衛生研究所においても導入が可能であることが示された。

6. SFTS の診療の手引き」作成に関する研究

「重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の診療の手引き」を作成した。内容は、疾患概要、SFTSV の国内および国際分布、臨床経過、国内症例の疫学、SFTS の臨床的特徴、診断確定に必要な検査、行政検査の流れ、適切な検体と梱包、診断・治療・感染防止のアルゴリズム、家族内・職業感染事例、患者血液・体液曝露時の対応、参考資料である。

D. 考察

SFTS が日本で流行していることが明らかにされてから、約 1 年が経過した。SFTS の日本における流行状況の概要が明らかにされた。また、後方視的に SFTS と診断された患者 11 名 (日本で初めて SFTS と診断され

た患者を含む) の臨床症状を詳細に解析し、予後不良の原因として血球貪食症候群、血液凝固系の異常、多臓器不全が関わっていることが示唆された。SFTS に関する病理所見を詳細に解析し、それを報告した。所属リンパ節で SFTSV が強く増殖し、また、肝臓、脾臓、骨髄においても SFTSV 抗原が検出された。世界で初めての報告となる。日本の患者から分離された SFTSV は、系統樹解析上中国株とは独立したクラスターを形成した。日本株は独立して進化を遂げている。

ウイルス分離および同定、ウイルスゲノムの高感度検出システムを開発した。また、抗体検出システムにおいて、組換え N 蛋白質を抗原とした場合においても診断に有用であることが明らかにされている。抗体検出法が広く行われる体制整備が求められる。

マダニにおける SFTSV ゲノム陽性率を日本全国で採取されたマダニを用いて評価した。また、シカ、イノシシ、イヌ (猟犬) 等における SFTSV 抗体保有状況を明らかにし、本研究班では SFTSV の自然界における存在様式を明らかにしつつある。SFTS 患者が報告されている西日本だけでなく、その他の地域に生息しているマダニからも SFTSV ゲノムが検出されていること、抗体陽性動物が存在することから、今後詳細にかつ前向きに SFTS に関する疫学調査がなされれば、現在患者が報告されていない中部日本、東日本の地域からも SFTS 患者が発生する可能性がある。中部日本、東日本の地域でも、SFTSV に感染する可能性があることが明らかにされた。

SFTS の治療法の開発の一端として、抗ウイルス剤の SFTSV の増殖抑制効果について評価した。インターフェロン α 、リバビリン

等に強い効果が認められた。また、SFTSV の細胞侵入機構、肝細胞への病原性、乳飲みマウスでの SFTSV の病原性と増殖性について詳細な研究がなされた。SFTS の治療法や予防法の開発には、このような基礎的研究が欠かせない。

SFTS が流行している長崎県をモデル地域として、SFTS の発生状況、分離ウイルスの分子疫学、マダニに咬まれるリスクの高い人々における血清疫学、SFTS 予防のためのリスクコミュニケーションのあり方等について研究が開始された。今後もさらなる研究の推進が必要である。

SFTS の国内における診断体制を維持・改良していくためには、現時点では地方衛生研究所を中心とする公衆衛生当局の協力が不可欠である。感染研と地方衛生研究所が連携をとりながら、診断法の開発とその有用性の評価がなされる必要がある。現在、conventional RT-PCR 法だけが地方衛生研究所において整備されている。本研究成果を踏まえて、定量的リアルタイム RT-PCR 法や抗体検出システムを整備する必要性を評価して、日本国内における SFTS 診断体制のさらなる改善が図られる必要がある。

SFTS はヒトからヒトへ感染する。その経路は接触感染考えられているが、SFTS 患者の気管内挿管を実施した医師が患者から SFTSV に感染した事例が報告されている。SFTS 患者の診察・診療・治療に関わる医療従事者に対する診療手引きを開発して、それを多くの医療従事者に提供することが重要である。本研究班で開発された「重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の診療の手引き」は国立国際医療研究センターのホームページ(<http://www.dcc-ncgm.info/topic->

sfts/)でダウンロードできるようにした。

SFTS に対する感染症対策、基礎研究、疫学的臨床的研究は開始されたばかりである。今後も継続した研究を続け、より詳細に SFTS の特徴を明らかにする必要がある。

E. 結論

SFTS 感染症対策に関する研究が開始された。SFTS の疫学、臨床的、病理学的特徴が明らかにされつつある。また、日本における SFTSV の自然界における存在様式、分布について知見が蓄積されつつある。SFTS に関する継続した調査研究を前向きに実施し、少しでも患者数を減らし、予後を改善させることが望まれる。

F. 健康危険情報

長崎県内では野生動物(イノシシ)、および飼育動物(イヌ)で SFTS 感染個体が確認され、生活の場にちかく SFTSV が生息している可能性が高い。同様の調査研究が日本国内のその他の地域でも実施され、SFTS 患者が報告されている西日本だけでなく、中部日本、東日本にも SFTSV ゲノム陽性のマダニが生息していることが明らかにされた。西日本だけでなく、その他の地域でも SFTS 患者が発生する危険性がある。

G. 研究発表

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* 209:816-827, 2014
- 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) 下島昌幸, 西條政幸. ダニ媒介性新興感染症 SFTS. *実験医学* 31:3047-3053, 2013
 - 4) 西條政幸. Severe fever with thrombocytopenia syndrome. *感染症* 43:210-216, 2013
 - 5) 西條政幸. 血小板減少をきたす新しいダニ媒介性ウイルス感染症: SFTS. *Medical Practice* 30:1810-1812, 2013
 - 6) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. *皮膚病診療* 35:822-826, 2013
 - 7) 西條政幸. 日本で流行するダニ媒介性ウイルス感染症 SFTS とダニ媒介性脳炎. *医学のあゆみ* 247:701-702, 2013
 - 8) 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群. *Medical Technology* 41:1275-1277, 2013
 - 9) 谷英樹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS). *検査と技術* 41: 1164-1167, 2013
 - 10) 森川茂. 重症熱性血小板減少症候群, *獣疫学雑誌* 17:142-143, 2014
 - 11) 森田公一. デング熱と vector-borne diseases (SFTS を含む), *化学療法の領域* 29:25-32, 2013
- ## 2. 学会発表
- 1) 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 (2013.11)
 - 2) 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, 神戸 (2013.11)
 - 3) 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, 神戸 (2013.11)
 - 4) 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 (2013.11)
 - 5) 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, 神戸 (2013.11)

- 6) 谷口怜, 福士秀悦, Masangkay Joseoh, 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, 神戸 (2013.11)
- 7) 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, 神戸 (2013.11)
- 8) 下島昌幸, 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 福間藍子, 谷口怜, 前田健, 高橋徹, 西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスに対する ribavirin の in vitro 増殖抑制効果. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 9) 福士秀悦, 谷英樹, 吉河智城, 谷口怜, 福間藍子, 緒方もも子, 下島昌幸, 森川茂, 西條政幸. ナイジェリアにおけるリフトバレー熱の血清疫学. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸 (2013.11)
- 10) 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, 前田健, 高橋徹, 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, 神戸 (2013.11)
- 11) 高橋徹, 前田健, 亀井敏昭, 水谷哲也, 下島昌幸, 福士秀悦, 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, 神戸 (2013.11)
- 12) Shimojima M, Takahashi T, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Morikawa S, Saijo M. Severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. XV International Conference on Negative Strand Viruses, Granada, Spain (2013. 6)
- 13) 高橋徹, 石堂亜希, 重岡徹, 富永貴元, 亀井敏昭, 前田健, 西條政幸, 森川茂, 長谷川秀樹, 水谷哲也. 本法における重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の初発例. 第 108 回日本内科学会中国地方会例会, 岡山 (2013.6)
- 14) 坂口翔太, 平塚雄聡, 西條政幸, 岡山昭彦. 保存血清により診断された重症熱性血小板減少症候群 (SFTS). 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 大阪 (2013.11)
- 15) 末盛浩一郎, 東太地, 村上雄一, 長谷川均, 四宮博人, 西條政幸, 安川正貴. 救命しえた重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) の 1 例. 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 大阪 (2013.11)
- 16) 谷岡大輔, 西條政幸, 守分正. 日本で初めて患者に付着していたタカサゴキラマダニおよび血清から SFTS ウイルスが分離された SFTS の 1 例. 第 83 回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 大阪 (2013.11)
- 17) 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, 岐阜 (2013. 9)
- 18) 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, 柳井徳麿, 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, 岐阜 (2013. 9)
- 19) 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, 岐阜 (2013. 9)
- 20) 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, 岐阜 (2013. 9)
- 21) 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, 岐阜 (2013. 9)
- 22) 前田健, 濱崎千菜美, 久保翔太郎, 遠藤泰之, 寺田農, 鎌田流星, 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, 神戸 (2013.11)
- 23) 余福勲, Ferdinard Adungo, 内田玲麻, 井上真吾, 森田公一, Preparation of genetically- engineered antigen of RVF virus for development of antibody- detecting test kit. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸 (2013.11)
- 24) 早坂大輔, 森田公一, 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の血清診断法の確立および媒介マダニ調査. 九州微生物研究会, 福岡 (2013.12)
- 25) 泉川公一 他, 「SFTS の臨床像」, 第 9 回市中病院でみる世界の感染症, 東京 (2013.10)
- 26) 泉川公一 他, 「我が国で発生した SFTS の臨床と疫学研究」第 13 回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京, (2013.11)
- 27) 泉川公一 他, 「救命し得た SFTS virus による重症熱性血小板減少症候群の一例」, 第 61 回化療・56 回感染症中西日本合同学会, 大阪 (2013.11)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特記事項なし.
 2. 実用新案登録
特記事項なし.
 3. その他
特記事項なし.

II. 分担研究報告書

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)
分担研究報告書

SFTS の制圧に向けた総合的研究(H25-新興-指定-009)
重症熱性血小板減少症候群の疫学的特徴の解明と診断および治療法の開発

研究分担者	西條政幸	(国立感染症研究所ウイルス第一部・部長)
研究協力者	下島昌幸	(国立感染症研究所ウイルス第一部・第一室長)
	福士秀悦	(国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官)
	谷英樹	(国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官)
	吉河智城	(国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官)
	福間藍子	(国立感染症研究所ウイルス第一部・流動研究員)
	緒方もも子	(国立感染症研究所ウイルス第一部第一室・研究員)
	高橋徹	(山口県立総合医療センター血液内科・部長)
	山岸拓也	(国立感染症研究所感染症疫学センター・主任研究官)

研究要旨:重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)は数年前より中国で発生していたウイルス性感染症であるが、日本においても本感染症の患者がいることが2013年初めに報告された。病原ウイルスはブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される新規ウイルス、SFTS ウイルス(SFTSV)、であり、マダニが媒介する。そこで日本における SFTS の疫学的特徴の解明と実験室診断法の整備に取り組んだ。SFTS ウイルスの中国分離株(およびその遺伝子配列)を用いた RT-PCR 法および間接蛍光抗体法による抗体検出法により、後方視的研究を通じて2012年以前に SFTS 患者が初めて SFTS と診断された患者を含めて11名いたことを見出した。臨床症状や検査数値、年齢、居住地、季節性には特徴が認められ、高致死率(11人中6人が死亡)であった。2013年以降の患者も含め分離された SFTSV 遺伝子の塩基配列を決定し、中国株のそれらと比較したところ、SFTSV 日本株は中国株とは独立して位置し、更に日本株内でも遺伝子型が複数あることが明らかにされた。日本株の塩基配列に基づく定量 RT-PCR 法を確立し、血中ウイルス量と予後に関連があることを見出した。抗体検出法として ELISA 法、中和抗体法、間接蛍光抗体法を開発し、それらの診断および血清疫学研究における有用性を評価した。SFTS の回復者の血清が高い(中和)抗体価を示すことを見出した。SFTS 患者の病理学的解析がなされ、SFTS の病態解明に重要な所見が得られた。これらの成果は今後の治療法開発や感染予防対策、診断法の向上(感度、精度、迅速化等)に資すると考えられる。

A. 研究目的
重症熱性血小板減少症候群(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)は
2006年には中国で発生が確認されていた疾患

で、新規ブニヤウイルス SFTS ウイルス(SFTS virus, SFTSV)による全身性感染症であることが2011年に報告された。中国以外での発生は認められていなかったが、海外渡航歴のない日本人が本感染症で死亡していたことが2013年1月に報告された。このことは日本国内でのSFTS発生状況を明らかにする必要があること、流行している場合には疫学状況の把握と診断法の整備、予防法・治療法の開発が必要であること、等を示している。本年度は過去も含め日本におけるSFTSの疫学的特徴の解明と実験室診断法の整備に取り組んだ。

また、本研究では日本国内で確認されたSFTS剖検例の病理組織検体を用いてSFTSの病理学的解析法の確立を目的とした。ウイルス感染症の病理学的検索方法としては、①光学顕微鏡による観察、②免疫組織化学、③ISH(In situ hybridization)法、④電子顕微鏡、⑤遺伝子検査などが挙げられるが、これらのうち、国立感染症研究所感染病理部ではSFTS剖検症例の病理診断のルーチン検査として①光学顕微鏡による観察、②免疫組織化学、⑤遺伝子検査の3つの検査系を組み合わせで行うこととし、それらの検査系を確立した。

B. 研究方法

1) 後方視的調査

SFTSの症例定義を表1のように定め、厚生労働省結核感染症課長通知で全国の医療機関に情報提供及び協力の依頼を行い、患者情報と患者検体(血清、血漿、血液、咽頭拭い液、脳脊髄液、尿)を国立感染症研究所ウイルス第一部に送付され、届けられた検体についてウイルス学的検査が実施された。急性期血清については、ウイルス分離検査、RT-PCR法による遺伝子増幅法、そして、回

復期血清については中和抗体法および間接蛍光抗体法による抗体検査が実施された。

2) RT-PCR

SFTSV中国株(HB29)の遺伝子配列をもとに準備されていたOne-step RT-PCR法により、SFTS疑い患者由来の血液・脳脊髄液・尿検体からSFTSVゲノム検出を試みた。また、日本のSFTSV株の遺伝子配列を基にプライマー、プローブを設計し、SFTSVゲノム量を1ステップリアルタイム定量RT-PCR法を開発した。SFTS患者の急性期の血中SFTSVゲノム量と予後との関連を解析した。

3) 塩基配列決定

SFTSV遺伝子が検出されたSFTS疑い患者の血液より精製されたRNAを、ランダムヘキサマーを用いて逆転写反応によりcDNAを調整した。これを鋳型として、SFTSV(YG1株)の配列をもとに設計したプライマーを用いてオーバーラッピングPCRを行いウイルスゲノムL、M、Sセグメント全てをカバーするPCR産物を用意し、これらの遺伝子配列を次世代シーケンシングの技術を用いて決定した。

4) ウイルス分離

RT-PCRで遺伝子陽性と判断された血清をVero細胞に接種しウイルス分離を試みた。分離の確認は、接種細胞におけるSFTSVの存在を抗SFTSV-N蛋白質ウサギ血清を用いた間接蛍光抗体法によった。

5) 間接蛍光抗体法

SFTSV中国株HB29を感染させたVero細胞と非感染細胞との混合物、あるいは組換えSFTSV-N蛋白質を恒常的に発現するHeLaと非発現HeLa細胞を混合したものをスライドガラスに乾燥固定させ、アセトンとUV照射により固定・不活化したものを抗原とした。患者検体(血液、血清、血漿)を反応後、